

Aus dem Deutschen Zentrum für neurodegenerative Erkrankungen  
und dem Biomedizinischen Zentrum  
Lehrstuhl: Stoffwechselbiochemie  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Christian Haass

**Untersuchung der Pharmakodynamik und Effektivität der  
präventiven BACE1-Inhibierung gegen die Alzheimer  
Demenz unter Verwendung und Charakterisierung des  
APP-Knock-In Mausmodells**



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Tanja Blume  
aus Aachen  
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Christian Haass

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Behrends

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2021

## Eidesstattliche Versicherung

Blume, Tanja

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Untersuchung der Pharmakodynamik und Effektivität der präventiven BACE1-Inhibierung gegen die Alzheimer Demenz unter Verwendung und Charakterisierung des APP-Knock-In Mausmodells**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.04.2021

Tanja Blume



## Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz (AD) stellt im Zeitalter des demographischen Wandels global eine zunehmende medizinische, ökonomische und gesellschaftliche Herausforderung dar. Die Zahl der Betroffenen lag 2018 bei 50 Millionen Menschen weltweit, wobei sich diese Zahl laut Prognosen des „World Alzheimer Report 2018“ bis 2050 verdreifachen wird. Die AD führt unter anderem zu einem progressiven Verlust kognitiver Funktionen und Gedächtnisleistungen sowie zu einer Atrophie bestimmter Hirnareale. Die Diagnoseverfahren zur Feststellung der chronischen, neurodegenerativen Erkrankung des zentralen Nervensystems werden stetig verbessert. Allerdings existieren derzeit weder präventive noch kurative Wirkstoffe, welche das Ausbrechen oder Fortschreiten der Krankheit unterbinden könnten. Einen Erklärungsansatz für die Entstehung der Alzheimer Demenz auf molekularer Ebene bietet die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, welche als Ursache die Akkumulation und Aggregation des Amyloid-Beta ( $A\beta$ )-Peptids postuliert, wodurch fortführend Synapsen und Neurone geschädigt werden und degenerieren. Das  $A\beta$ -Peptid entsteht durch die sequenzielle Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 und die  $\gamma$ -Sekretase. In den letzten Jahrzehnten wurde deshalb intensiv die direkte Hemmung der BACE1-Sekretase als Therapieansatz verfolgt, um eine Reduktion der  $A\beta$ -Generierung zu bewirken. Äußerst wirksame, nicht-peptidische BACE-Inhibitoren wurden entwickelt und für klinische Studien zugelassen. Die klinischen Studien mussten allerdings aufgrund einer unzureichenden Wirkung des Inhibitors sowie infolge von Nebenwirkungen, wie der Verschlechterung der kognitiven Leistung, vorzeitig abgebrochen werden. Neueste Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass eine therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition in einem präklinischem AD-Stadium und somit vor der Manifestierung klinischer Symptome erfolgen muss. Eine weitere Herausforderung wird es sein, eine ausgewogene BACE-Inhibitor Dosierung zu ermitteln, die Wirksamkeit und klinische Sicherheit gewährleistet. Im ersten Teil dieser Dissertation wurde der Verlauf und die Ausprägung der Pathologie des Knock-In Alzheimer Mausmodells APP<sup>NL-G-F</sup> (APP-Knock-In) tiefergehend untersucht. Diese Untersuchung sollte klären, ob das APP-Knock-In Mausmodell ein frühes AD-Stadium widerspiegelt und sich als Modell eignet, die Effektivität einer präventiven und ausgewogenen BACE-Inhibitor Intervention zu ermitteln. Mittels Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie ( $\mu$ PET) wurde eine parallele Zunahme der  $A\beta$ -Last und der Neuroinflammation beobachtet. Die *in vivo* 2-Photonen mikroskopischen Intervalluntersuchung dendritischer Spines des *Stratum Oriens* der CA1-Region des Hippocampus zeigte eine Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität der Postsynapsen abseits von  $A\beta$ -Ablagerungen. Ein Rückgang in der Spine-Dichte konnte allerdings nicht festgestellt werden. Diese Beobachtungen bieten einen möglichen Erklärungsansatz für die darüber hinaus observierten hippocampus-abhängigen Lern- und Gedächtnisdefizite des APP-Knock-In Mausmodells im Morris-Wasserlabyrinth. Zusammenfassend zeigten die Observierungen, dass das APP-Knock-In Mausmodell ein frühes Stadium der Alzheimer Demenz widerspiegelt. Im zweiten Teil der Arbeit wurde anschließend die Effektivität einer präventiven BACE-Inhibition mittels des potenten BACE-Inhibitors NB-360 im APP-Knock-In Mausmodell unter-

sucht. Zunächst wurde eine NB-360-Dosierung ermittelt, welche eine signifikante Hemmung der AD-Pathologie im APP-Knock-In Mausmodell bewirkte ohne gravierende Nebenwirkungen auszulösen. Mittels Intravitalmikroskopischen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass die im APP-Knock-In Mausmodell observierte Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus abseits von A $\beta$ -Ablagerungen unter der frühzeitigen Intervention mittels einer hohen NB-360-Dosierung behoben werden konnte. Im Wildtyp bewirkte die hohe Dosierung des BACE-Inhibitors NB-360 allerdings eine signifikante Abnahme in der Bildung neuer dendritischer Spines. Unter einer niedrig dosierten NB-360-Behandlung wurde im APP-Knock-In Mausmodell kein signifikanter Effekt auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines beobachtet. Im Wildtyp waren die Ergebnisse unter der niedrigen NB-360-Behandlung nicht ganz eindeutig.

Der Therapieansatz einer präventiven BACE-Inhibition bedingt zudem eine langfristige Verabreichung des Inhibitors, weshalb anschließend die Langzeitapplikation der hohen NB-360-Dosierung auf die Entwicklung der A $\beta$ -Last sowie auf die Neuroinflammation mittels  $\mu$ PET untersucht wurde. Unter der präventiven und langfristigen BACE-Inhibitor Behandlung konnte eine signifikante Senkung der kortikalen A $\beta$ -Last sowie der hippocampalen und kortikalen Neuroinflammation im APP-Knock-In Mausmodell beobachtet werden. Darüber hinaus wurde eine signifikante Verbesserung der kognitiven Leistung unter der langfristigen BACE-Inhibitor Behandlung mittels NB-360 festgestellt.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass die präventive BACE1-Inhibition eine valide therapeutische Behandlung bei der Alzheimer Demenz darstellt - Vorausgesetzt der Applikationszeitpunkt und die Dosierung des BACE1-Inhibitors werden adäquat gewählt.

## Summery

In an age of demographic aging, Alzheimer's dementia (AD) represents a global medical, economic and social challenge. In 2018, the number of people affected was 50 million worldwide and according to the World Alzheimer Report of 2018 this number will triple by 2050. AD is characterized by a progressive loss of cognitive functions as well as an atrophy of certain brain areas. Diagnostic procedures for detecting the chronic neurodegenerative disease of the central nervous system are constantly being improved. However, there are currently neither preventive nor curative therapeutic agents that could stop the onset or progression of the disease.

An explanation for the development of Alzheimer's dementia at the molecular level is provided by the amyloid-cascade-hypothesis, postulating the accumulation and aggregation of the amyloid-beta ( $A\beta$ )-peptide as the central pathogenic event, which is followed by synaptic and neuronal damage and degeneration. The  $A\beta$ -peptide is produced by the sequential cleavage of the amyloid precursor protein (APP) by the  $\beta$ -secretase BACE1 followed by the  $\gamma$ -secretase. Therefore, the direct inhibition of the BACE1-secretase has been intensively pursued in the last decades as a therapeutic approach to reduce the generation of  $A\beta$ . Highly effective, non-peptidic BACE-inhibitors have been developed and approved for clinical trials. However, the clinical trials had to be terminated prematurely due to an insufficient effect of the inhibitor as well as side effects such as cognitive worsening. Recent findings suggest that a therapeutic intervention targeting BACE1-inhibition must be performed at a preclinical AD-stage and thus before the onset of clinical symptoms. A further challenge will be to find a suitable therapeutic dosage of a BACE1-inhibitor that reconciles both: efficacy and clinical safety.

In the first part of this thesis, the course of AD-pathology expressed by the knock-in mouse model APP<sup>NL-G-F</sup>(APP-knock-in) was investigated in detail. Based on this investigation the efficacy of preventive BACE-inhibitor treatment in this AD mouse model was evaluated in the second part of this study. The longitudinally monitoring of amyloidogenesis and neuroinflammation using small animal positron-emission-tomography ( $\mu$ PET) revealed a parallel increase in  $A\beta$ -load and neuroinflammation in APP-knock-In mice. Investigating the structural plasticity of dendritic spines in the *Stratum oriens* of the CA1-region of the hippocampus by using 2-photon *in vivo* microscopy, a significant reduction in the formation of new dendritic spines was observed in the distance of  $A\beta$ -deposits. A decrease in Spine-Density was not detected. The *in vivo* detected impairment of synaptic plasticity also offers a possible explanation for the further observed hippocampus-dependent learning and memory deficits in the APP-knock-in mouse model using the Morris water maze test. In summary, the observations confirmed that the mouse model reflects an early stage of Alzheimer's dementia.

In the second part of this thesis, the effectiveness of a preventive BACE-inhibitor treatment in the APP-knock-in mouse model was analyzed. First APP-knock-in mice were treated with two different dosages of the potent, blood-brain barrier penetrating BACE-inhibitor NB-360 to determine which dose successfully inhibits the AD-pathology without side effects. Using

intravital microscopy, it was observed that the high dosage of NB-360 enhanced significantly the initial reduced spine-formation rate in APP-knock-in mice. In wild type mice, the higher dosage of NB-360 resulted in a significant decrease in the formation of new dendritic spines. No significant effect on the structural plasticity of dendritic spines was observed in the APP-knock-in mouse model under low-dose NB360-treatment. In wild type mice, the results were not entirely clear under the low dose NB360-treatment.

The therapeutic approach of a preventive BACE-inhibitor treatment also requires long-term administration of such a therapeutic agent. Therefore, the effects of a preventive, long-term BACE-inhibitor intervention, with the therapeutically effective high dosage of NB-360, were investigated by monitoring the course of amyloidogenesis and neuroinflammation using longitudinal  $\mu$ PET-imaging. The therapeutical approach of a preventive, long-term BACE-inhibition with the higher dosed NB-360-Inhibitor was able to significantly reduce the cortical  $A\beta$ -load as well as the hippocampal and cortical neuroinflammation in the APP-knock-in mouse model. In addition, a significant improvement in cognitive performance was observed under long-term BACE inhibitor treatment with high dosed NB-360.

In summary, these data showed that preventive BACE1-inhibition is a valid therapeutic treatment for Alzheimer's dementia - provided that the timing and dosage of the BACE1-inhibitor are appropriately chosen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der Hippocampus . . . . .	1
1.1.1	Die entorhinale-hippocampale Schleife . . . . .	2
1.1.2	Aufbau des Ammonshorns . . . . .	3
1.1.3	Aufbau der CA1-Region . . . . .	4
1.1.4	Die dendritische Postsynapse in der CA1-Region . . . . .	5
1.1.5	Strukturelle Plastizität dendritischer Spines . . . . .	8
1.1.6	Hippocampale Gedächtnisbildung . . . . .	10
1.1.7	Der Hippocampus im Kontext der Alzheimer Demenz . . . . .	12
1.2	Die Alzheimer Demenz . . . . .	12
1.2.1	Amyloid-Kaskaden-Hypothese . . . . .	13
1.2.2	Das Vorläuferprotein APP und seine Prozessierung . . . . .	15
1.2.3	Lösliches A $\beta$ . . . . .	17
1.2.4	Aggregation des A $\beta$ -Peptides – extrazelluläre Plaquebildung . . . . .	19
1.2.5	Effekt von unphysiologischen A $\beta$ -Konzentrationen auf die dendritische Spine-Plastizität . . . . .	20
1.2.6	Mikrogliazellen - Aktivierung und Funktion in AD . . . . .	21
1.2.7	Neurofibrilläre Bündel . . . . .	23
1.3	Die $\beta$ -Sekretase BACE1 . . . . .	23
1.3.1	Lokalisation und Physiologische Funktionen der BACE1-Sekretase . . . . .	24
1.3.2	BACE1-Inhibierung als Therapieansatz . . . . .	26
1.3.3	Stand und Erkenntnisse aus klinischen und vorklinischen BACE-Inhibitions Untersuchungen . . . . .	27
1.4	Ziel dieser Arbeit . . . . .	28
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
2.1	Charakterisierung des APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell . . . . .	30
2.1.1	Das APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell bildet überwiegend A $\beta$ -Plaques von diffuser Morphologie aus . . . . .	31
2.1.2	Parallele Zunahme der A $\beta$ -Last und der Neuroinflammation im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell über das Alter . . . . .	32
2.1.3	Das APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell zeigte eine defizitäre hippocampusabhängige Lernleistung sowie Beeinträchtigungen beim Abrufen des Referenzgedächtnisses . . . . .	35
2.1.4	An und abseits von A $\beta$ -Ablagerungen in der hippocampalen CA1-Region weist das APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell einen Verlust von pilzförmigen Spines auf . . . . .	38
2.1.5	Die strukturelle Plastizität dendritischer Spines des <i>Stratum oriens</i> der CA1-Region des Hippocampus ist im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell signifikant beeinträchtigt . . . . .	40

2.1.6	Weibliche APP <sup>NL-G-F</sup> -Versuchstiere wiesen einen erhöhten Anteil an abgebauten Spines gegenüber männlichen APP <sup>NL-G-F</sup> -Versuchstieren auf	45
2.2	Inhibierung der $\beta$ -Sekretase BACE1 mittels NB-360 als präventiver Therapieansatz im AD-Mausmodell APP <sup>NL-G-F</sup>	46
2.2.1	Der BACE-Inhibitor NB-360 bewirkt eine Änderung der Fellpigmentierung in APP <sup>NL-G-F</sup> -Versuchstieren	47
2.2.2	In APP <sup>wtGFP-M</sup> -Versuchstieren beeinträchtigt die BACE-Inhibition mittels NB-360 dosisabhängig die Kinetik und Dichte dendritischer Spines der CA1-Region des Hippocampus	48
2.2.3	Die BACE-Inhibitor Intervention mittels NB-360 steigerte die Neubildung dendritischer Spines der CA1-Region abseits von A $\beta$ -Ablagerungen im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell	52
2.2.4	Die präventive langfristige BACE-Inhibitor Intervention mittels NB-360 verringert im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell signifikant die A $\beta$ -Last und die Neuroinflammation	54
2.2.5	Die präventive und langfristige BACE-Inhibitor Intervention mittels NB-360 steigert die hippocampusabhängigen kognitiven Fähigkeiten von APP <sup>NL-G-F</sup> -Versuchstieren	59
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
3.1	Charakterisierung des APP-Knock-In Mausmodells	62
3.1.1	Das APP-Knock-In Mausmodell zeigt eine frühe Neuroinflammation sowie eine parallele, nicht korrelierende Zunahme in der A $\beta$ -Last über die Zeit	63
3.1.2	Die hippocampusabhängige Lernfähigkeit sowie die Abrufbarkeit des Referenzgedächtnisses ist im APP-Knock-In Mausmodell stark vermindert	65
3.1.3	Im APP-Knock-In Mausmodell ist die Morphologie sowie die strukturelle Plastizität dendritischer Spines der hippocampalen CA1-Region signifikant beeinträchtigt	66
3.1.4	Fazit: Das APP-Knock-In Mausmodell eignet sich für die Evaluierung präventiver therapeutischer Interventionen gegen AD	69
3.2	Evaluierung der BACE-Inhibition mittels NB-360 als präventive therapeutische Intervention im AD-Mausmodell APP-Knock-In	71
3.2.1	Die negative Wirkung der BACE-Inhibition auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines des <i>Stratum oriens</i> der hippocampalen CA1-Region von Wildtyptieren ist dosisabhängig	72
3.2.2	Die präventive therapeutische Intervention mittels der hohen NB-360-Dosierung steigerte die reduzierte strukturelle Plastizität dendritischer Spines der hippocampalen CA1-Region im APP-Knock-In Mausmodell	76

3.2.3	Die präventive sowie langfristige therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition induziert eine Aktivitätssenkung der Mikrogliazellen durch Reduktion der fibrillären A $\beta$ -Last und bedingt eine signifikante Verbesserung der kognitiven Leistung im APP-Knock-In Mausmodell . . . . .	79
3.2.4	Herausforderungen der pharmakologischen BACE1-Inhibition als präventive Intervention gegen AD . . . . .	81
3.2.5	Fazit: Eine individualisierte, präventive BACE-Inhibition könnte eine therapeutische Intervention bei Patienten mit hohem Risiko eine AD zu entwickeln darstellen . . . . .	85
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>86</b>
4.1	Transgene Mäuse und deren Genotypisierung . . . . .	86
4.1.1	Maushaltung . . . . .	86
4.1.2	Transgene Mauslinien . . . . .	86
4.1.3	Genotypisierung . . . . .	87
4.2	Applikation, Formulierung und Wirksamkeit des BACE-Inhibitors NB-360 . . . . .	89
4.3	Intravitalmikroskopie . . . . .	89
4.3.1	Implantation eines hippocampalen Fensters . . . . .	90
4.3.2	<i>In vivo</i> 2-Photonen Mikroskopie . . . . .	92
4.3.3	<i>In vivo</i> Färbung von A $\beta$ -Aggregaten . . . . .	94
4.3.4	Versuchsablauf der <i>In vivo</i> 2-Photonen Mikroskopie . . . . .	94
4.3.5	Bildanalyse und quantitative Auswertung dendritischer Spines <i>in vivo</i> . . . . .	94
4.4	Kleintier-PET-Untersuchungen . . . . .	95
4.4.1	Radiosynthese . . . . .	95
4.4.2	$\mu$ PET-Datenakquisition, Bildrekonstruktion und Co-Registrierung . . . . .	95
4.4.3	$\mu$ PET-Studienablauf . . . . .	97
4.4.4	$\mu$ PET-Datenanalyse . . . . .	98
4.5	Verhaltensversuche MWM-Test . . . . .	100
4.5.1	Versuchsablauf des MWM-Tests . . . . .	100
4.5.2	Auswertung des MWM-Tests . . . . .	101
4.6	Immunfluoreszenz . . . . .	102
4.6.1	Transkardinale Perfusion . . . . .	102
4.6.2	Anfertigung von Gehirn-Schnitten mittels Vibratom . . . . .	102
4.6.3	IF-Färbeprotokolle . . . . .	102
4.6.4	Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie . . . . .	103
4.6.5	Bildanalysen und quantitative Auswertung dendritischer Spines <i>ex vivo</i> . . . . .	104
4.6.6	Bildanalysen und Quantitative Auswertung von A $\beta$ -Plaques <i>ex vivo</i> . . . . .	104
4.7	Statistische Auswertung . . . . .	104
4.8	Programme . . . . .	105
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>

Inhaltsverzeichnis	IX
--------------------	----

---

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>141</b>
------------------------------	------------

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>143</b>
----------------------------	------------

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>144</b>
------------------------------	------------

<b>Manuskripte in Vorbereitung</b>	<b>147</b>
------------------------------------	------------

<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	<b>147</b>
----------------------------------	------------

<b>Danksagung</b>	<b>149</b>
-------------------	------------

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Hippocampus

**„Hippocampus is the pen with which we can write our long-term memories – the ink being the sensations – and the paper being the cortex.“**

(K. Dharani in The Biology of Thought; 2015)

Der Hippocampus befindet sich am inneren Rand des Temporallappens und zwischen den lateralen Ventrikel. Zum Hippocampus zählen die Strukturen des Gyrus dentatus (DG), Subiculum (SUB) und des Hippocampus proper welcher auch, aufgrund seiner anatomischen Form, Ammonshorn (cornu ammonis (CA)) genannt wird<sup>1</sup>.

Das Ammonshorn wird zudem in vier Teilfelder aufgeteilt: CA1, CA2, CA3 und CA4 (siehe auch Kapitel 1.1.2).

Zusammen mit der parahippocampalen Formation, die das Präsubiculum, Parasubiculum und den entorhinalen Cortex (EC) umfasst, bildet der Hippocampus ein komplexes Netzwerk: Die Hippocampusformation. Die neuronale Verschaltung innerhalb der Hippocampusformation ist dabei in den meisten Säugetieren vergleichbar<sup>2</sup>. Durch die intensiven Studien am Patienten Henry Gustav Molaison (Patient H.M.) weiß man zudem, dass der Hippocampus eine sehr wichtige Rolle beim Lernen sowie der Formierung des Gedächtnisses einnimmt. Dem Patienten H.M. wurde aufgrund von schweren epileptischen Anfällen die Amygdala sowie der Hippocampus entfernt. Die Folge war eine anterograde Amnesie, wobei operantes Lernen weitestgehend unbeeinträchtigt war. Im Hippocampus fließen Informationen verschiedener sensorischer Systeme zusammen, die teilweise dort verarbeitet und anschließend zu weiteren Bereichen des Cortex zurückgesandt werden. Damit nimmt der Hippocampus eine wichtige Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung ein<sup>3</sup>.

Darüber hinaus ist der Hippocampus im Verlauf der Alzheimer Demenz (AD), welche im zweiten Abschnitt der Einleitung weiter beschrieben wird, eins der ersten Hirnareale welches von synaptischen und neuronalen Verlust betroffen ist<sup>4,5</sup>. Der Nervenzelluntergang führt im weiteren Krankheitsverlauf zu kognitiven Störungen und zu einem gravierenden Gedächtnisverlust<sup>6,7,8,9</sup>. Um die Auswirkungen der pathologischen Prozesse der AD auf die Funktion des Hippocampus herauszustellen, wird im ersten Teil der Einleitung auf die hippocampale Verschaltung und Aufbau sowie auf den Prozess der synaptischen Plastizität und der hippocampalen Gedächtnisformierung eingegangen. Das Hauptaugenmerk wird dabei auf die CA1-Region des Hippocampus gelegt, da dort die Degeneration von Neuronen im Verlauf der AD besonders ausgeprägt ist<sup>4,5</sup> und zudem die CA1-Pyramidenzellen im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden sind. Im zweiten Teil der Einleitung wird auf die Entstehung und die neuropathologischen Merkmale der AD eingegangen. Desweiteren wird die Funktionsweise der  $\beta$ -Sekretase BACE1 sowie ihre Inhibierung als Therapieansatz gegen AD im dritten Teil der Einleitung erörtert.

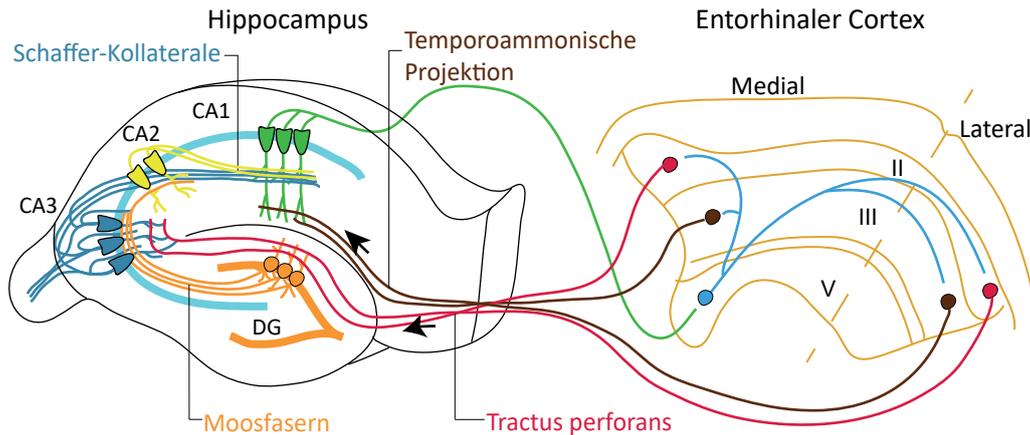
### 1.1.1 Die entorhinale-hippocampale Schleife

Als intrinsischer Startpunkt des Schaltkreises der Hippocampusformation wird der EC angesehen, der anhand der neuronalen Anordnung in fünf Schichten unterteilt wird. Glutamateerge exzitatorische Neurone des EC projizieren auf die Körnerzellendriten sowie auf die inhibitorischen Interneurone des DG und formen dadurch die Hauptnervenfaserbahn, den *Tractus perforans* zum Hippocampus (siehe Abbildung 1, roter Signalweg). Der Signalweg läuft unidirektional, da die Körnerzellen nicht zurück auf den EC projizieren sondern über exzitatorische Moosfasern, Axone mit großen blattförmigen Endknöpfchen, auf die Pyramidenzellen der CA2- und CA3-Region des Ammonshornes projizieren<sup>10,11</sup> (siehe Abbildung 1, orangener Signalweg).

Zudem projizieren die Neurone der Schicht-II des EC auch direkt auf die distalen Pyramidenzellendriten der CA3-Region<sup>2,12</sup> und des SUB. Die Pyramidenzellen der CA3-Region innervieren sich zum einen untereinander, zum anderen gehen Axon-Verzweigungen der CA3-Pyramidenzellen über die Schaffer-Kollateralen (SK) synaptische Verbindungen mit den basalen und apikalen Pyramidenzellendriten der CA1-Region ein und gelten als ihre hauptsächliche exzitatorische Eingangsquelle (siehe Abbildung 1, dunkelblauer Signalweg)<sup>13</sup>.

Dieser Informationsfluss ist ebenfalls unidirektional, die CA1-Neurone projizieren nicht zur CA3-Region zurück, sondern projizieren über den Alveus (AV) unidirektional aufs SUB sowie zurück auf die tiefe Schicht (Schicht-V) des EC, wobei sie die CA1-EC-informationsschleife bilden (siehe Abbildung 1, grüner Signalweg). Neurone der Schicht-III des ECs projizieren über die temporoammonische Projektion (siehe Abbildung 1, brauner Signalweg) direkt auf die Pyramidenzellendriten der CA1-Region<sup>14,15,16</sup>. Über die temporoammonische Projektion ziehen zudem afferente Eingänge auf die Pyramidenzellen des SUB sowie auf Subpopulationen von inhibitorischen Interneuronen der CA1-Region<sup>12,17</sup>. Das SUB projiziert schließlich hippocampale Informationen zu verschiedenen kortikalen und subkortikalen Hirnarealen<sup>18</sup> sowie zu den tiefen Schichten des EC<sup>19</sup>. Über die Verschaltung der tiefen Schichten des EC mit dessen oberflächlichen Schichten (siehe Abbildung 1, hellblauer Signalweg)<sup>20,21</sup>, welche ihrerseits über die bereits beschriebenen Faserbündel in den Hippocampus projizieren, wird die entorhinale-hippocampale Schleife geschlossen.

Darüber hinaus ziehen Fasern aus der CA1-Region und dem SUB in verschiedene Areale des präfrontalen Cortex<sup>22,23</sup>. Efferenzen der Pyramidenzellen des Ammonshorn sowie des SUB ziehen über den Alveus Richtung DG und sammeln sich dort schließlich in der Fornix<sup>1</sup>. Von dort projizieren sie einerseits zu subkortikalen Regionen, wie den lateralen und basolateralen Kernen der Amygdala<sup>24</sup>, dem Thalamus<sup>25</sup>, Hypothalamus, Hirnstamm, Septum<sup>26</sup> und Striatum<sup>27,28</sup> sowie andererseits über parahippocampale Regionen zu kortikalen Strukturen. Ein weiteres Faserbündel, das Angular Faserbündel, verbindet den Hippocampus mit dem entorhinalen Cortex und das dorsale sowie ventrale Faserbündel verbinden die zwei Hippocampus-Hemisphären untereinander. Die Hippocampusformation ist somit auf vielfältige Weise in kortikale und subkortikale Schaltkreise eingebunden, wobei der Grundaufbau dieses Erregungskreises in Menschen, Affen und Ratten sehr ähnlich ist<sup>2</sup>.



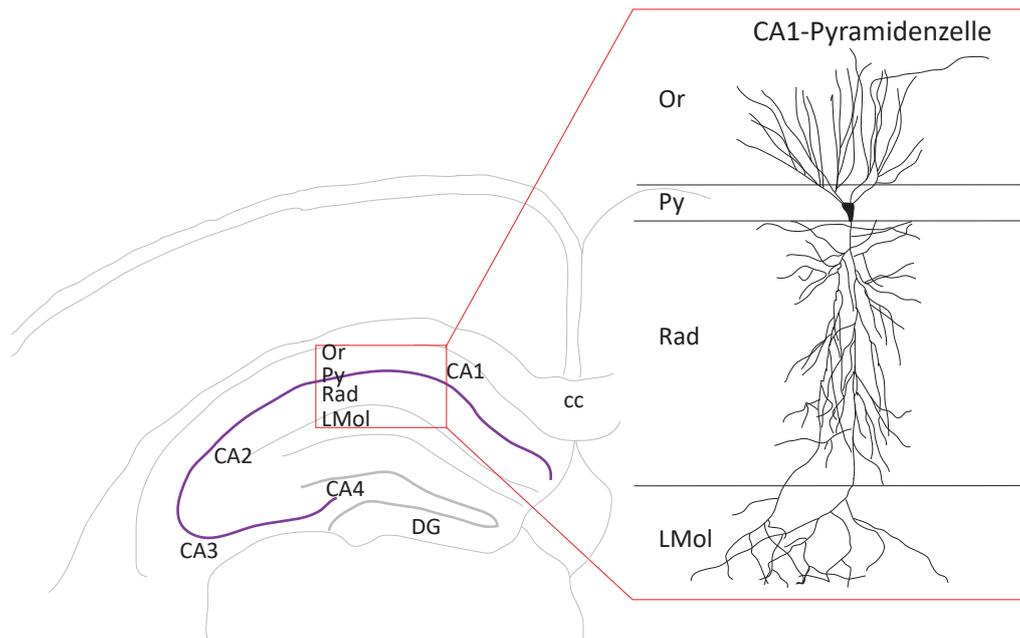
**Abbildung 1:** Der Schaltkreis der Hippocampusformation. Als intrinsischer Startpunkt wird der entorhinale Cortex (EC) angesehen. Der Tractus perforans wird in Rot, der Signalweg der exzitatorischen Moosfasern in Orange, der Signalweg der Schaffer-Kollateralen in Blau sowie die CA1-EC-Informationsschleife in Grün dargestellt. Die temporoammonische Projektion ist als brauner Signalweg abgebildet und die Verschaltung der Schicht-V des EC mit dessen oberflächlichen Schichten als hellblauer Signalweg. Schema nach Neves *et al.*<sup>29</sup>.

### 1.1.2 Aufbau des Ammonshorns

Der Anatom Lorente de Nó<sup>30</sup> teilte das Ammonshorn anhand der Anordnung der Neurone, wie bereits erwähnt, in vier Teilfelder auf. Er gab jedem das Präfix CA (lat. für *cornu ammonis*), um anzuzeigen, dass sie zum Ammonshorn gehören: CA1, CA2, CA3 und CA4. Auffällig in diesen Regionen ist die hohe Dichte an Neuronen sowie ihr charakteristisches Erscheinungsbild. In Säugetieren besitzen hippocampale Neurone buschartig verteilte Dendriten, die vom Zellkörper aus sowohl in die oberen als auch in die tieferen hippocampalen Schichten ziehen. Dieser hippocampuspezifische Zelltyp wird als Pyramidenzelle bezeichnet. Die Schicht, in der ihre Zellkörper liegen, wird als Pyramidenzellschicht (Py) bezeichnet und bildet die Hauptzellschicht im Hippocampus. Weitere Neurone, die nicht als Pyramidenzelle klassifiziert werden, werden als Interneurone bezeichnet. Im System von Lorente de Nó wird der übergeordnete Bereich mit einer dicht gepackten Pyramidenzellschicht mit CA1 bezeichnet. Der untergeordnete Bereich, welcher sich durch eine locker gepackte Pyramidenzellschicht auszeichnet, wird mit CA3 bezeichnet. Zwischen CA1 und CA3 befindet sich die CA2-Region. Hier ist die Pyramidenzellschicht ebenfalls lockerer gepackt als in CA1. Der Bereich CA4 ist der Bereich von diffus verteilten Pyramidenzellen der bis in den DG reicht (siehe Abbildung 2).

Über der Pyramidenzellschicht liegt die Schicht *Stratum oriens* (Or), in der sich die basalen Dendriten der Pyramidenzelle sowie unterschiedliche Interneurone befinden. Diese stellt die Hauptinputschicht der CA2-Pyramidenzellen dar. In CA3 sowie CA2 existiert unter der Pyramidenzellschicht zudem eine zusätzliche Schicht, das *Stratum lucidum*, dort sind beispielsweise in der CA3-Region die Moosfasern lokalisiert. Unter der Pyramidenzellschicht (bzw. dem *Stratum lucidum*) schließt sich das *Stratum radiatum* (Rad) an, wo die Schaffer Kollateralen lokalisiert sind. Unter dem *Stratum radiatum* befindet sich das *Stratum lacu-*

*nosum-moleculare (LMol)*. In diese Schicht ziehen die afferenten Neurone des ECs. Beide Schichten, *Stratum radiatum* und das *Stratum lacunosum-moleculare* beherbergen zudem verschiedene Arten von meist GABAergen Interneuronen<sup>31</sup>. Die Pyramidenzellen der CA3-Region variieren in ihrer Größe und Anordnung, wohingegen die Pyramidenzellen der CA1-Region eine äußerst homogene Größe aufweisen und dabei generell kleiner als die Pyramidenzellen der CA3-Region sind<sup>2</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Pyramidenzellen der CA1-Region untersucht, weshalb diese auch in den folgenden Abschnitten tiefergehend betrachtet werden.

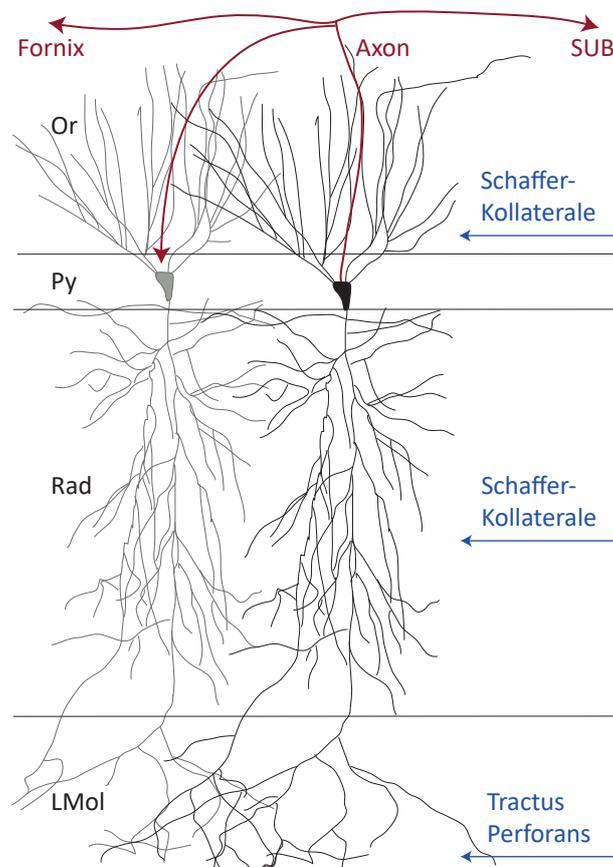


**Abbildung 2:** Aufbau des Ammonshorns und die verschiedenen Schichten der CA1-Region. Das Ammonshorn wird in vier neuronenreiche Regionen, CA1, CA2, CA3 und CA4 aufgeteilt. Diese Regionen weisen unterschiedliche Schichten auf, die exemplarisch für die CA1-Region abgebildet sind. In der Pyramidenzellschicht (Py) befinden sich die Zellkerne der Pyramidenzellen. In das darüber liegende *Stratum oriens* (Or) ziehen die basalen Dendriten, in das, unter der Pyramidenzellschicht liegende, *Stratum radiatum* (rad) die Schaffer-Kollaterale und in die darunterliegende Schicht (*Stratum lacunosum-moleculare* (LMol)) ziehen die afferenten Neurone des EC. Bei den Regionen CA2, CA3 und CA4 existiert unter der Pyramidenzellschicht noch eine zusätzliche Schicht, das *Stratum lucidum* (nicht abgebildet).

### 1.1.3 Aufbau der CA1-Region

Wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben, stellt die Pyramidenzelle die Hauptzellart der CA1-Region dar. Ihr Soma befindet sich in der Pyramidenzellschicht. Von dort zieht ein basaler dendritischer Baum, mit drei bis fünf Dendriten, ins *Stratum oriens*, wo diese Dendriten stark verzweigen. Ein apikaler dendritischer Baum zieht mit einem dickem Hauptdendrit vom Soma bis ins *Stratum lacunosum-moleculare* und bildet dort sowie im *Stratum radiatum* dünnere Fortsätze und Verzweigungen aus<sup>32</sup>. Bei apikalen Dendriten unterscheidet man zudem noch zwischen distalen, längeren und dem Axon entgegengesetzt laufenden, sowie proximalen, kürzeren und von näher gelegenen Neuronen wie Interneu-

ronen innervierten, Dendriten. Direkten Input vom EC erhalten die distalen apikalen Dendriten der CA1-Region im *Stratum lacunosum-moleculare* über den *Tractus perforans* (siehe Abbildung 3). Die Schaffer-Kollaterale dagegen projizieren auf die apikalen Dendriten des *Stratum radiatum* sowie auf die basalen Dendriten des *Stratum oriens*<sup>2</sup>. Zudem projizieren Pyramidenzellen der CA2-Region sowie verschiedene Interneurone auf die Dendriten der CA1-Region des *Stratum oriens*<sup>33</sup>. Das Axon der CA1-Pyramidenzelle verzweigt sich und projiziert sowohl caudal, in Richtung SUB, sowie rostral über das *Stratum oriens* in den Alveus in Richtung Fimbria/Fornix. Die Verzweigungen des Axons projizieren zudem zu benachbarten CA1-Pyramidenzellen und bilden lokal feine axonale Plexūs aus<sup>33</sup> (siehe Abbildung 3).

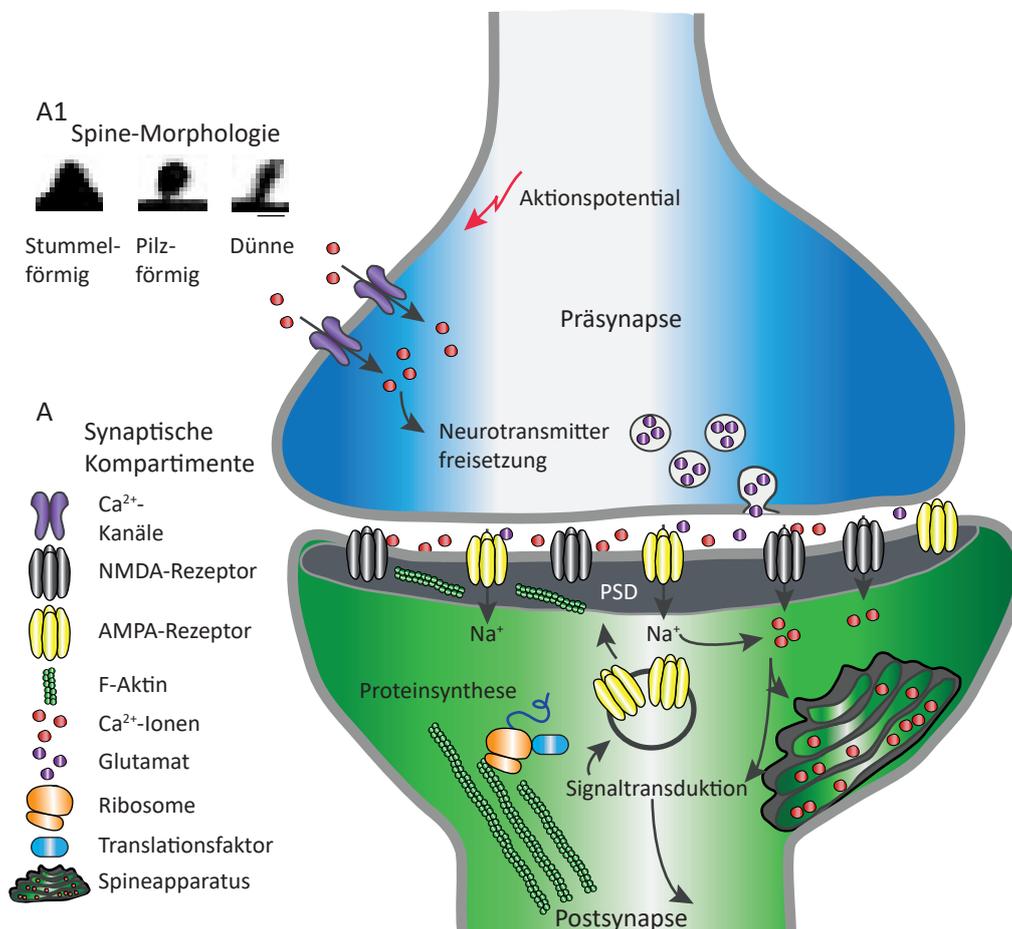


**Abbildung 3:** Efferenzen und Afferenzen der Pyramidenzelle der CA1-Region. In Blau sind die Afferenzen der CA1-Pyramidenzelle über den *Tractus Perforans* sowie den Schaffer-Kollateralen gekennzeichnet. In Rot sind die Efferenzen, die über das Axon in den Alveus und von dort caudal Richtung Subiculum (SUB) oder rostral zur Fornix sowie auf benachbarte CA1-Pyramidenzellen projizieren, dargestellt.

#### 1.1.4 Die dendritische Postsynapse in der CA1-Region

Jede Pyramidenzelle der CA1-Region erhält um die 30 000 exzitatorische sowie 1700 inhibitorische Signale<sup>32</sup>. Während neuronale Informationen innerhalb einer Nervenzelle durch elektrische Signale weitergeleitet werden, geht der transneuronaler Signalaustausch über chemische Synapsen. Bei diesem Signalaustausch fungieren Neurotransmitter, die von der

axonalen Präsynapse über den synaptischen Spalt zur dendritischen Postsynapse gelangen, als Kommunikationsbotenstoffe und innervieren die dendritische Postsynapse. In Abbildung 4 ist die glutamaterge Signaltransmission dargestellt. Das Aktionspotential erreicht die präsynaptische Endigung und führt dort zu einer spannungsabhängigen Öffnung von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Kanälen, die einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Präsynapse ermöglichen. Durch die Spannungsänderung werden Neurotransmitter wie Glutamat, die gespeichert in synaptischen Vesikeln vorliegen, in den synaptischen Spalt mittels Exozytose entlassen. Glutamat bindet an AMPA-Rezeptoren, das chemische glutamaterge Signal wird wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt, die Postsynapse wird depolarisiert und NMDA-Rezeptoren werden aktiviert. Der daraufhin einströmende  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluss aktiviert weitere Signalkaskaden in der Postsynapse. Der Prozess der Signalumwandlung ermöglicht der Postsynapse, ihre Reaktivität und Plastizität langfristig anzupassen. Dies wird z.B. durch Rekrutierung von AMPA-Rezeptoren zur Membranoberfläche oder durch deren Abbau bewirkt.



**Abbildung 4:** Ablauf der glutamatergen Signaltransmission. A) Synaptische Kompartimente die in der glutamatergen Signaltransmission eine wichtige Rolle einnehmen. A1) Anhand ihrer Morphologie werden Spines in verschiedene Kategorien eingeteilt. Aufgrund der Beschaffenheit ihres Kopfes und ihrem sogenannten Hals unterscheidet man vor allem zwischen stummelförmigen, pilzförmigen und dünnen Spines. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie (LSM) aufgenommen. Der Maßstab repräsentiert  $0,5 \mu\text{m}$

Da in der vorliegenden Arbeit die Postsynapsen am Dendriten chronisch *in vivo* untersucht wurden, wird in den nächsten Abschnitten der Aufbau sowie die strukturelle Plastizität der dendritischen Postsynapsen näher beschrieben.

Dendriten bilden, um ihre Membranoberfläche zu vergrößern und dadurch mehr Signale von umliegenden Synapsen erhalten zu können, elektrisch isolierte, dornenartige Fortsätze aus, welche Spines genannt werden<sup>34</sup>. Zunächst wurden diese Ausstülpungen als Präzipitate der von Golgi entwickelten Silberfärbung betrachtet. Erst Cajal analysierte 1888, dass diese Präzipitate echte morphologische Strukturen des Nervensystems waren und das postsynaptische Kompartiment einer Synapse darstellen<sup>34,13,32</sup>. Für diese Entdeckung erhielten Santiago Ramón y Cajal und Camillo Golgi, in Anerkennung ihrer Arbeit über die Struktur des Nervensystems, 1906 gemeinsam den Nobelpreis für Physiologie / Medizin. Der lange, parallele Verlauf von exzitatorischen Axonen in der CA1-Region sowie die weit verzweigten Dendritenbäume der Pyramidenzellen mit ihren ausgebildeten Spines gewährleisteten, dass möglichst viele Neurone miteinander in Kontakt treten können<sup>35</sup>. Dendritische Spines stellen für ihre Neurone die Haupteingangsstelle für synaptische Signale dar, welche in der CA1-Region meist exzitatorisch geprägt sind<sup>36</sup>. Zudem erfolgt durch die vorausgehende Prozessierung des präsynaptischen Inputs am Spine eine Verlangsamung der Ladungsübertragung, was einer übermäßigen Erregung der Nervenzelle vorbeugt<sup>37</sup>. Inhibitorische sowie modulatorische Synapsen enden im Ammonshorn dagegen direkt am Dendriten oder am Zellsoma<sup>38</sup>. Die Dendriten der CA1-Region bilden, je nachdem wie nah sie am Soma gelegen sind, eine unterschiedlich hohe Dichte von Spines auf ihrer Zellmembran aus. Im basalen dendritischen Baum sind die Dendriten, die direkt vom Soma abzweigen, sehr dick und weisen kaum Spines auf. Die Anzahl der Spines steigt graduell mit der Entfernung und dem Verzweigungsgrad zum Soma, wobei die distalen Dendriten im *Stratum oriens* nach der ersten Verzweigung die höchste Dichte an Spines aufweisen. Bei den apikalen Dendriten zeichnen sich ebenfalls unterschiedliche Klassen anhand der Spine-Dichte ab. Proximale, dicke Dendriten in der Schicht *Stratum radiatum* besitzen kaum Spines, wohingegen distale Dendriten im *Stratum radiatum* eine hohe Spine-Dichte aufweisen. Im *Stratum lacunosum-moleculare* sind die meisten Dendriten nach mehrmaliger Verzweigung sehr dünn und mit nur wenigen Spines besetzt.<sup>32</sup> Abhängig davon welche Färbemethode angewendet wurde variieren die Werte für die Spine-Dichte der unterschiedlichen Schichten allerdings, weshalb hier auf eine Angabe exakter Werte verzichtet wurde. Spines bestehen morphologisch aus einem Hals, der vom Dendritenschaft abzweigt, sowie einem kugelförmigen Kopf. An der Membranoberfläche des Kopfes und gegenüber der aktiven Zone der Präsynapse liegt die postsynaptische Dichte (PSD) des Spines<sup>39</sup>. In der PSD konzentrieren sich AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)-Rezeptoren und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren für Neurotransmitter wie Glutamat, sowie Struktur- und Signal-Proteine, wie zum Beispiel F-Aktin, die in zahlreichen Signalwegen der postsynaptischen Signalverarbeitung involviert sind<sup>40,39</sup> (siehe Abbildung 4). Spines besitzen kaum Mitochondrien, diese sind im dendritischen Schaft lokalisiert. Das produzierte Adenosin-triphosphat (ATP) kann allerdings vom Schaft in die Dornfortsätze diffundieren. Für Spines in der CA1-Region konnte zudem gezeigt werden, dass die meisten Spines Polyribosome

sowie einen Spine-Apparatus, eine spezielle Form des endoplasmatischen Retikulums (ER), besitzen<sup>41,42</sup>.

Anhand der Morphologie des Kopfes und des Halses, werden Spines generell in drei Kategorien eingeteilt<sup>43,44</sup> (siehe Abbildung 4A1):

1. Pilzförmige Spines (engl. mushroom spines): großer Kopf / schmaler Hals.
2. Dünne Spines (engl. thin spines): schmaler Kopf / schmaler Hals.
3. Untersetzte oder stummelförmige Spines (engl. stubby spines): breiter Kopf der direkt am Dendritenschaft ansetzt / kein oder nur sehr kleiner Hals.

Eine weitere Kategorie stellen die verzweigten Spines (engl. branched spines) dar: Sie bilden an einem Hals zwei Köpfe aus, woran jeweils eine Synapse endet<sup>45</sup>. Zudem wird noch eine dendritische Membranausstülpung unterschieden: Die Filopodien. Filopodien sind sehr dünne Membranausstülpungen von denen angenommen wird, dass sie, abhängig von der Art des Axons und vor der Ausbildung einer Synapse, zwischen potentiellen synaptischen Partnern wählen können<sup>46</sup>. Filopodien können sich nach dem Kontakt mit einem aktiven Axon zu dendritischen Spines mit funktioneller PSD entwickeln<sup>47</sup>. Für Spines in der CA1-Region des Hippocampus konnte gezeigt werden, dass sie eine totale Länge zwischen 0,2 - 2  $\mu\text{m}$ , eine Halslänge von 0,1 - 2  $\mu\text{m}$  sowie einem Gesamtvolumen zwischen 0,004 - 0,6  $\mu\text{m}^3$  aufweisen<sup>40</sup>.

### 1.1.5 Strukturelle Plastizität dendritischer Spines

Dendritische Spines sind höchst dynamische Strukturen. Durch ihr flexibles Aktin-Zytoskelett<sup>38</sup> können sie schnell auf äußere Einflüsse, wie auf die Aktivierung von Rezeptoren durch Neurotransmitter oder auf hormonelle Signale, reagieren und ihre Morphologie modifizieren<sup>48,49,39,50</sup>. Zudem werden auch im adulten Gehirn, stetig neue Spines gebildet und abgebaut<sup>51,52,53,54</sup>. Diese kinetischen Veränderungen werden als strukturelle Plastizität dendritischer Spines bezeichnet. Aufgrund ihrer strukturellen Plastizität, welche im Folgenden weiter erläutert wird, wird den Spines eine wichtige Rolle beim zellulären Prozess des Lernens sowie bei der Langzeitspeicherung von Informationen zugeschrieben. Die anhand ihrer Morphologie unterschiedenen Spine-Arten übernehmen im Prozess des Lernens und der Gedächtnisbildung unterschiedliche Rollen. Es wird postuliert, dass die Größe des Spine-Kopfes im engen Zusammenhang mit der Größe der PSD<sup>44</sup> sowie der Anzahl der Glutamat-Rezeptoren steht<sup>55,56,57</sup>. Spines mit großen Köpfen, wie pilzförmige und untersetzte Spines, sind dadurch befähigt starke synaptischen Verbindungen auszubilden<sup>58,44</sup>.

Dünne Spines verändern ihre anatomische Gestalt mit Hilfe ihres flexiblen Aktin-Zytoskeletts dagegen stetig. Ihre weniger ausgeprägte PSD weist darüber hinaus eine geringere Anzahl von Glutamat-Rezeptoren auf<sup>59,59</sup>. Ihre synaptischen Verbindungen sind deshalb schwächer und unbeständiger. Deshalb übernehmen dünne Spines und auch Filopodien vor allem während der postnatalen Entwicklung, beim Ausbau des neuronalen Netzwerkes, eine entscheidende Rolle. Durch kontinuierliches Vorstoßen und Zurückziehen ihres Zytoskeletts tasten sie ihre Umgebung nach potentiellen aktiven Axonen ab um mit ihnen

eine synaptische Verbindungen einzugehen und dadurch ihre PSD auszubauen oder zu einem vollwertigen Spine mit PSD heranzureifen<sup>60,61</sup>. Auch im adulten Gehirn zeichnen sich Spines durch eine hohe strukturelle Plastizität aus. Dabei handelt es sich teilweise um „intrinsische Fluktuationen“<sup>62</sup>, was spontane Vorgänge bezeichnet die keine synaptische Aktivität benötigen und deren genaue Funktionen noch nicht abschließend geklärt sind. Die meisten dynamischen, morphologischen Veränderung der Spines werden allerdings durch synaptische Aktivität gesteuert<sup>63</sup>.

Donald Hebb postulierte 1949 das Prinzip der synaptischen Plastizität, welches besagt, dass Synapsen veränderbar sind und je öfter zwei Neurone gleichzeitig aktiv sind, desto effizienter und stärker würde ihre wechselseitige synaptische Verbindung werden<sup>64</sup>. Das Hebb'sche Postulat konnte anschließend durch verschiedene Versuche belegt werden. Es wurde unter anderem gezeigt, dass die Induktion einer synaptischen Langzeit-Potenzierung (engl.: long-term potentiation (LTP)), wobei die Präsynapse hochfrequent erregt wird, eine Neubildung und damit eine Zunahme von Spines am Dendriten bewirkt<sup>65,66,67,68</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch ein lokalspezifisches LTP oder elektrische Stimulation das Spine-Volumen in Minutenschnelle durch einen aktiven Umbau des Aktin-Zytoskeletts um das Dreifache zunimmt<sup>69</sup>. Dabei wird ebenfalls die PSD des Spines vergrößert sowie weitere AMPA-Rezeptoren eingebaut<sup>70,71</sup>.

Im Gegensatz zur hochfrequenten Stimulation, konnte gezeigt werden, dass eine niederfrequente Stimulation in einer synaptischen Langzeit-Depression (engl.: long-term depression (LTD)) resultiert, was zu einer Schrumpfung<sup>71,72</sup> bis hin zur Eliminierung dendritischer Spines führt<sup>73,66</sup>. Änderungen der synaptischen Aktivität auf dem Level einzelner Präsynapsen bewirkt somit, wie von Hebb postuliert, dauerhafte morphologische Veränderungen an ihren Postsynapsen. Die ursprüngliche Größe der Spines bestimmt dabei ob und in welchem Ausmaß die Stärke der Synapse verändert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die synaptische Potenzierung eines großen Spines, wie den pilzförmigen Spines, nicht sehr effektiv ist und sein Volumen höchstens für kurze Zeit vergrößert<sup>70</sup>. Dünne Spines zeigen hingegen die Fähigkeit ihre Volumenvergrößerung beizubehalten und somit permanent potenziert zu bleiben<sup>70</sup>. Da das Hebb'sche Prinzip der synaptischen Plastizität bis heute als Grundlage für das Verständnis von Lernen und Gedächtnis gilt, wird weiter postuliert, dass dünne Spines die flexiblen lernenden Spines sind, wohingegen die großen pilzförmigen Spines stabilere synaptische Verbindungen eingehen und somit als erinnernde Spines gelten<sup>74</sup>. Wie bereits erwähnt bewirken LTP-Stimulationen, unter anderem auch im adulten Gehirn, eine Neubildung von Spines<sup>65,66</sup>. Diese neugebildeten Spines können, ohne filipodiale Vorstufe, innerhalb von Minuten einen physikalischen Kontakt zu Präsynapsen ausbilden und dabei innerhalb von 15 - 19 Stunden alle ultrastrukturellen Merkmale einer synaptischen Verbindung entwickeln<sup>75</sup>. Durch Intravitaluntersuchungen konnte mittels der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie in Kombination mit der Generierung transgener Mauslinien, die neuronal fluoreszierende Moleküle exprimieren, gezeigt werden, dass neugebildete Spines unterschiedliche Lebensdauern aufweisen<sup>76,77</sup>. Neugebildete Spines mit einer Lebensdauer von weniger als acht Tagen werden als transiente Spines bezeichnet, während persistente Spines mindestens acht Tage existieren, aber meist auch nach dieser Zeit stabil bleiben und

alle Merkmale einer funktionellen Synapse ausbilden<sup>60,78</sup>. Im adulten Gehirn sind je nach Gehirnregion 70 % der Spines persistent<sup>76,79</sup>.

Mittels der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie konnte zudem der Einfluss spezifischer Lernaufgaben auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Erlernen bestimmter Greifübungen oder das Balancieren auf einem rotierenden Zylinder zur schnellen Neubildung von Spines im murinen Motorkortex führt, wobei der Lernerfolg mit der Anzahl der neuen Spines korreliert<sup>52</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch wiederholtes Training die Spines stabilisiert sowie die neu erlernten Fähigkeiten erhalten bleiben<sup>51</sup>. Eine Erhöhung der Spine- und Synapsendichte im Hippocampus sowie somatosensorischen Cortex wurde zudem unter einer reizangereicherten Umgebung (engl. enriched environment), bei der eine erhöhte sensorische, kognitive und motorische Stimulation der Versuchstiere erfolgt, beobachtet<sup>80,81,82,83</sup>.

Zur strukturellen Plastizität von Axonen und ihren axonalen Boutons ist weniger bekannt. Axonale Boutons werden generell in *en passant* Boutons entlang des Axons und in abzweigende terminale Boutons unterteilt<sup>84</sup>. Gezeigt wurde, dass die axonalen Verzweigungen unter Kontrollbedingungen relativ stabil sind<sup>84</sup>. Eine sensorische Manipulation kann allerdings zum Abbau oder zur Neubildung ganzer Axonbäume führen<sup>85,86</sup>. Eine elektrische oder sensorische Stimulation der Boutons resultiert ebenfalls in einem Verlust oder Neubildung dieser axonalen Strukturen<sup>87</sup>. Somit können, neben den dendritischen Spines, die als physikalisches Korrelat für die Gedächtnisformation angesehen werden und deren Neuausbildung und ihre Plastizität mit dem Erlernen neuer Fähigkeiten korreliert<sup>88,89</sup>, auch strukturelle Veränderungen axonaler Boutons zur funktionalen Plastizität des neuronalen Netzwerks beitragen.

### 1.1.6 Hippocampale Gedächtnisbildung

Das hippocampale Gedächtnissystem besteht aus der Hippocampusformation und der angrenzenden parahippocampalen Region und wird als deklaratives (explizites) Gedächtnis bezeichnet. Dagegen wird das Hippocampus unabhängige, non-deklarative (implizites) Gedächtnis abgegrenzt<sup>90,91</sup>. Das deklarative Gedächtnis umfasst das Lernen von Fakten (semantisches Gedächtnis), Ereignissen (episodisches Gedächtnis) sowie das räumliche Lernen und unterliegt der bewussten Kontrolle<sup>92,93,94</sup>. Der Prozess der Gedächtnisbildung wird generell als ein dreistufiger Informationsverarbeitungsprozess beschrieben. Zunächst werden neue Informationen aufgenommen und müssen dann erstmalig verarbeitet werden (Enkodierung oder Lernphase). Beim deklarativen Gedächtnis reicht dabei ein einmaliges Lernen, um eine sogenannte Gedächtnisspur im Hippocampus zu bilden. Der Enkodierung folgt als zweite Teilphase die Konsolidierung (Speicherung), wobei die neu erworbenen und zunächst noch labilen Gedächtnisinhalte gefestigt und damit weniger anfällig gegenüber interferierenden Informationen werden<sup>95</sup>. Die letzte Stufe besteht aus der Wiedergabe der zuvor enkodierten und konsolidierten Information und wird als Abruf bezeichnet. Bei der Konsolidierung wird zum einem zwischen der lokalen bzw. zellulären und der systemischen Konsolidierung unterschieden<sup>96</sup>.

Dabei stellt die synaptische Aktivität das Grundkonzept der zellulären Konsolidierung dar und bewirkt, wie im vorherigen Kapitel erläutert, eine Verstärkung (LTP) oder Schwächung (LTD) synaptischer Verbindungen. Das neuronale Netzwerk wird durch diese molekularen Vorgänge morphologisch moduliert. Die systemische Konsolidierung erfolgt um einiges langsamer als die zelluläre Konsolidierung. Bei dem Prozess werden neue Informationen allmählich, durch wiederholte Informationstransfers, vom Hippocampus in bestehende neokortikale Netzwerke integriert und so der Langzeitspeicherung zugeführt<sup>97</sup> (siehe Kapitel 1.1.1). Es wird daher angenommen, dass der Hippocampus als eine Art Zwischenspeicher fungiert, der Informationen schnell aufnehmen kann und diese nach der Verarbeitung an weitere Bereiche der Großhirnrinde weiterleitet<sup>97</sup>.

Unter Anwendung des Prinzips der systemischen Konsolidierung ist auch der Fall des Patienten H.M erklärbar. Wie im Kapitel 1.1 bereits erwähnt, litt Patient H.M. an schweren epileptischen Anfällen und wurde einer Operation unterzogen, bei der bilateral anteilig der mediale Temporallappen sowie große Teile beider Hippocampi entfernt wurden. Nach der Operation bildete H.M eine retrograde Amnesie aus. Ereignisse aus einem begrenzten Zeitraum vor dem Eintritt der Schädigung konnten nicht mehr abgerufen werden. Ältere Ereignisse, die bereits neokortikal abgespeichert worden waren, konnte er jedoch korrekt wiedergeben. Zudem litt er an einer anterograden Amnesie, wodurch neue Ereignisse nicht mehr dem Cortex zugeführt werden konnten und deshalb nicht langfristig gespeichert wurden<sup>98</sup>. In den folgenden Jahren wurden weitere Befunde eines temporalen Gradienten der retrograden Amnesie nach hippocampaler Schädigung bei anderen Patienten erhoben<sup>99,90,100</sup>. Bei Patienten mit neokortikalen Schädigungen sind dagegen insbesondere Gedächtnisdefizite für Ereignisse aus frühen Lebensphasen beobachtet worden<sup>101</sup>. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Pyramidenzellen der CA1-Region zudem eine wichtige Rolle beim Abfragen des kontextbezogenen Gedächtnisses einnehmen<sup>102</sup> sowie bei der Erkennung von neuen Umgebungseinflüssen<sup>103,104,105</sup> und sogenannte Ortszellen, eine besondere Art der Pyramidenzellen, bei der räumlichen Lokalisation<sup>106</sup>.

Um die hippocampale Lern- und Gedächtnisspeicherung in Tiermodellen zu untersuchen wird oft die nach Richard Morris benannte Methodik des Morris-Wasserlabyrinths (engl. morris water maze (MWM)) verwendet. Dieser Test erlaubt die Beurteilung des hippocampusabhängigen räumlichen oder ortsbezogenen Lernens und dem Referenzgedächtnisses<sup>107,108</sup>. Unter dem Referenzgedächtnis versteht man das Gedächtnis, welches während einer Tätigkeit erworben wurde und das für allgemeine Prinzipien und Fertigkeiten, welche für die Bewältigung einer spezifischen Aufgaben benötigt wird, abgerufen werden kann. Um das Referenzgedächtnis zu testen wird ein Intervall von 24 Stunden nach der letzten Trainingseinheit angesetzt. Dadurch wird gewährleistet, dass nicht das Kurzzeitgedächtnis der letzten Trainingseinheit untersucht wird. Es gibt mehrere Erweiterungen des MWM-Protokolls, um zusätzlich noch weitere Parameter wie unter anderem das räumliche Arbeitsgedächtnisses zu untersuchen. Zudem wurde gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Leistung im MWM-Test und LTP sowie der NMDA-Rezeptorfunktion besteht, sodass mittels des MWM-Test therapeutische Wirkstoffe sowie die Funktionalität des Neurotransmitter-Systems untersucht werden können<sup>109,110,111</sup>. Die Testung wurde ebenfalls

im Rahmen dieser Studie verwendet und der Versuchsaufbau ist im Kapitel 4.5.1 genauer erläutert.

### 1.1.7 Der Hippocampus im Kontext der Alzheimer Demenz

Im Krankheitsverlauf der Alzheimer Demenz (AD), deren Entstehung und neuropathologischen Merkmale in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden, manifestiert sich im Hippocampus sehr früh ein Nervenzellverlust<sup>4,5</sup>. Der Verlust von Neuronen und Synapsen, der vorwiegend die pyramidalen Neuronen in der CA1-Region betrifft, kann bereits bis zu drei Jahre vor der Diagnose einer milden-kognitiven Störung sowie sechs Jahre vor einer klinischen AD-Diagnose detektiert werden<sup>6,7,8,9</sup>. Darüber hinaus korreliert der hippocampale Neuronenverlust, der zudem zu einer Atrophie des Hippocampus führt, im Krankheitsverlauf mit den kognitiven Veränderungen und Gedächtnisdefiziten bei AD-Patienten<sup>112,113,114</sup>, was die kritische Rolle des Hippocampus bei der Gedächtniskonsolidierung unterstreicht. Der Volumenverlust, der sich aus der Atrophie des Hippocampus ergibt, dient des Weiteren als Biomarker der frühen AD-Diagnose und kann mittels Magnetresonanztomographie (MRT) erkannt werden<sup>115,116</sup>. Darüber hinaus wurde mittels MRT eine Vergrößerung der lateralen Ventrikel des Hippocampus im frühen AD-Stadium beobachtet. Aufgrund der wichtigen Rolle des Hippocampus bei der Gedächtniskonsolidierung sowie seiner frühen Beeinträchtigung bei AD, stellt der Hippocampus eines der zentralen Hirnareale zur Evaluierung von therapeutischen Ansätzen zur Behandlung der Alzheimer Demenz dar.

## 1.2 Die Alzheimer Demenz

Die neurodegenerative Krankheit wurde 1906 zum ersten Mal durch den Neuropathologen Alois Alzheimer anhand seiner Patientin Auguste Deter beschrieben. Klinisch zeigte Auguste Deter Symptome wie einen rapiden Gedächtnisverlust, Wahn und Halluzinationen. Zudem verlor sie ihr Orientierungsvermögen in Raum und Zeit. *Post mortem* wies ihr Gehirn eine stark fortgeschrittene Atrophie, auffallende pathologische Neurofibrillen und „ungewöhnliche Ablagerungen in der Hirnrinde“ auf. Seine Studie „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“<sup>117</sup>, gilt bis heute als Grundstein für das Verständnis der 1910 nach ihm benannten Krankheit Morbus Alzheimer oder auch Alzheimer Demenz.

Die Beobachtungen von Alois Alzheimer wurden in den nächsten Jahrzehnten bestätigt. Die durchschnittliche Verlaufsdauer der Krankheit beträgt nach der Manifestierung erster klinischer Symptome sieben bis zehn Jahre, wobei der fortschreitende Verlust kognitiver Fähigkeiten über den Verlust der Persönlichkeit und der Unfähigkeit von alltäglichen Handlungen bis hin zum Tod führt<sup>118</sup>. Die von Alzheimer beschriebene Atrophie wird auf den massiven Verlust von Nervenzellen, insbesondere im Hippocampus und im Cortex, zurückgeführt<sup>118</sup>. Die „ungewöhnlichen Ablagerungen in der Hirnrinde“ wurden als extrazelluläre Proteinaggregate, die hauptsächlich aus dem Amyloid-beta (A $\beta$ )<sub>42</sub>-Peptid bestehen und als A $\beta$ -Plaques bezeichnet werden, charakterisiert<sup>119</sup>. Zudem wurde beobachtet, dass sich A $\beta$ -Aggregate auch an Blutgefäße anlagern, was als cerebrale Amyloidangiopathie bezeichnet wird<sup>120</sup>.

Bei den pathologischen Neurofibrillen wurde gezeigt, dass es sich um das hyperphosphorylierte und aggregierte Protein Tau handelt, das sich zu intrazellulären, neurofibrillären Bündeln (eng. neurofibrillary tangles, (NFT)) zusammenlagert<sup>121</sup>. Die NFT zeigen ein charakteristisches Verteilungsmuster im Gehirn von AD-Patienten, was nach Braak zur weiteren Einteilung der AD-Stadien verwendet wurde<sup>4</sup>.

Der Hauptrisikofaktor für AD ist das Alter. Der symptomatische Verlauf der Krankheit setzt bei den Betroffenen typischerweise ab 65 Jahren ein und wird als sporadische Alzheimer Demenz (SAD) bezeichnet. Die Krankheitshäufigkeit verdoppelt sich ab diesem Alter ungefähr alle fünf Jahre<sup>122</sup>. Ein frühzeitiger Ausbruch der Krankheit wurde bei den selteneren Fällen der autosomal-dominant vererbten familiären Alzheimer Demenz (FAD) beschrieben<sup>123,124</sup>, wobei diese Form weniger als ein Prozent der Alzheimerfälle ausmacht<sup>125</sup>. Als weitere Risikofaktoren gelten unter anderem Kopfverletzungen<sup>126</sup> sowie Schlaganfälle<sup>127</sup>. Lebensgewohnheiten wie eine kognitive Auslastung, körperliche Aktivität, der Body-Mass-Index, Alkoholkonsum und Rauchen sind ebenfalls mit dem Ausbruch von AD assoziiert<sup>128,129</sup>. Die Wahrscheinlichkeit an der sporadischen Variante zu erkranken wird durch den Einfluss bestimmter genetischer Faktoren erhöht. Eine Variante des Apolipoprotein E (ApoE) steigert beispielsweise das Risiko an AD zu erkranken um das fünfzehnfache<sup>124,130</sup>. Insgesamt wird der Einfluss genetischer Faktoren bei der sporadischen Form auf 60 bis 80 % geschätzt<sup>131</sup>.

Die Forschung ist sich einig, dass 10 - 20 Jahre vor den ersten klinischen Symptomen der AD schon erste neuropathologische Veränderungen in Form von A $\beta$ - und Tau-Ablagerungen auftreten<sup>132</sup>. Neue Diagnoseverfahren, wie das bestimmen der Konzentration des Tau- und A $\beta$ -Proteins und anderer neurodegenerativer Biomarkern in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) sowie neuronale Bildgebungsverfahren, wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit Radioliganden gegen A $\beta$ -Aggregate oder den Glukosemetabolismus, der die neuronale Aktivität widerspiegelt<sup>133</sup>, erhöhen die Möglichkeit einer frühzeitigen Diagnose.

Die globale Relevanz der Alzheimer Demenz ist enorm. Laut dem Bericht des „World Alzheimer Report 2018“<sup>134</sup> erkrankt alle drei Sekunden ein Mensch weltweit an Alzheimer. Im Jahr 2018 waren es knapp 50 Millionen Menschen. Diese Zahl wird sich bis 2050 laut dem Report mehr als verdreifacht haben<sup>134</sup>. Trotz der über 100 Jahre währenden Forschung ist zurzeit weder ein präventiver noch kurativer Wirkstoff verfügbar und eine frühzeitige Diagnose eher die Ausnahme. Die Notwendigkeit der Weiterentwicklung und der Forschung nach neuen Therapieansätzen sowie Diagnoseverfahren ist deshalb unbestreitbar.

### 1.2.1 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die von John A. Hardy und Dennis J. Selkoe postulierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese beschreibt die molekularen Ursachen sowie den Ablauf der pathologischen Vorgänge der AD. Als initiales Ereignis wurde die Aggregation und Akkumulation des A $\beta$ 42-Peptides identifiziert<sup>135,136,137</sup>, wodurch es in den Fokus der heutigen therapeutischen Wirkstoffentwicklung gerückt ist. Das A $\beta$ 42-Protein wird durch die endoproteolytische Prozessierung des



Weitere Studien zeigten allerdings, dass das A $\beta$ -Protein während des normalen APP-Metabolismus ein ganzes Leben lang produziert wird<sup>150,151</sup>. Zudem stellte sich heraus, dass das aggregierte A $\beta$ 42-Peptid in Form von A $\beta$ -Plaques nur bedingt mit dem Ausmaß des Verlustes kognitiver Fähigkeiten von AD-Patienten korreliert<sup>150,152</sup>. Aufbauend auf diesen Befunden wurde anschließend das vorrangig toxische Potential in den löslichen A $\beta$ 42-Oligomeren vermutet und die Amyloid-Kaskaden-Hypothese dementsprechend angepasst<sup>138,139</sup>. Darauf folgend konnte gezeigt werden, dass der Grad an vorhandenen, löslichen A $\beta$ -Oligomeren signifikant mit dem Grad des Verlustes der kognitiven Fähigkeiten in AD-Patienten korreliert<sup>153,154,155</sup>.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass synthetisch sowie *in vitro* hergestellte A $\beta$ -Oligomere LTP inhibieren und das Lernvermögen in Ratten verschlechtern<sup>156,157,158</sup>.

Laut der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wird die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und die Akkumulation von Tau-Aggregaten als Folge der A $\beta$ -Ablagerungen sowie der darauffolgenden Immunreaktion gesehen. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Tau-Gen zu A $\beta$ -unabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Frontotemporalen Demenz (engl. frontotemporal lobar degeneration, (FTLD)) führen können<sup>159</sup>. Die Tau-Pathologie ähnelt bei FTLD-Fällen der Tau-Pathologie in AD, jedoch ohne das Vorhandensein von A $\beta$ -Plaques. Dies impliziert, dass die Tau-Pathologie an sich neurotoxisch ist, aber nicht die A $\beta$ -Pathologie induzieren kann<sup>160,139</sup>.

Da die beiden Pathologien miteinander verknüpft sind zeigten weitere *in vivo* Studien. Die genetische Deletion des Tau-Proteins kompensiert die A $\beta$ -induzierten Schädigungen wie LTP-Minderung, Lerndefizite sowie Synapsen- und Nervenzelluntergang<sup>161,162,163</sup>. Eine kombinierte Überexpression von mutierten humanen APP und Tau resultierte dagegen in einer verstärkten Tau-Pathologie im Vergleich zur alleinigen Überexpression von Tau<sup>164</sup>, was die Amyloid-Kaskaden-Hypothese weiter bestätigte. Die molekularen Wechselwirkungen der Tau- und A $\beta$ -Pathologie in AD sind weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Ihre Untersuchung stellt jedoch eine Herausforderung dar, da viele der traditionell generierten transgenen AD-Mausmodelle entweder eine pathologische Variante des Tau-Protein exprimieren oder pathologische A $\beta$ -Ablagerungen zeigen.

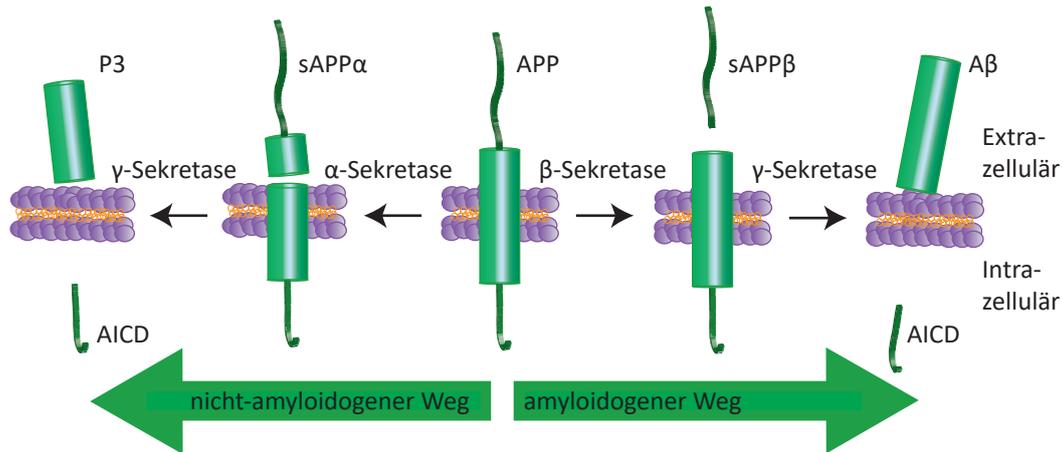
In den folgenden Kapiteln werden die molekularen Prozesse und die pathologischen Veränderungen, die laut der Amyloid-Kaskaden-Hypothese schlussendlich zur AD-Pathologie führen, tiefergehend betrachtet.

### 1.2.2 Das Vorläuferprotein APP und seine Prozessierung

APP ist ein Typ-I orientiertes Transmembranprotein, das zusammen mit den beiden Homologen APLP1 und APLP2 (engl. für amyloid precursor like protein 1/2) die APP-Proteinfamilie<sup>165,166</sup> bildet. Es existieren mehrere Isoformen von APP, wobei die 695-Aminosäuren (AS) lange Variante vorwiegend im Gehirn und dort hauptsächlich in den Synapsen der Neurone exprimiert wird<sup>167,168</sup>. APP besteht aus einer membrandurchspannenden mittleren Domäne sowie aus einem großen extrazellulären, glykosylierten N-Terminus und einem kürzeren, intrazellulären C-Terminus. Auch wenn die normalen physiologischen Funktionen von

APP noch nicht abschließend geklärt sind, konnte gezeigt werden, dass APP als Regulator für die synaptische Stabilisierung und Reparatur<sup>169</sup>, den anterograden neuronalen Transport<sup>170</sup> sowie für den Eisenexport<sup>171</sup> fungiert. Ein weiteres Indiz für eine synaptische Funktion zeigten Studien in APP-defizienten Mausmodellen, bei denen eine verringerte Dichte dendritischer Spines gemessen wurde<sup>172,128</sup>. Zudem wird APP eine Rolle beim Aufbau des neuronalen Netzwerkes während der Entwicklung<sup>173,174</sup> sowie im Prozess des Lernens und der Gedächtnissformation zugesprochen<sup>175</sup>.

APP wird auf zwei verschiedenen Wegen proteolytisch prozessiert. Dabei unterscheidet man zwischen dem amyloidogenen Weg, bei dem A $\beta$  generiert wird, sowie dem nicht-amyloidogenen Weg (siehe Abbildung 6). Bei dem nicht-amyloidogenen Weg wird APP zunächst durch die  $\alpha$ -Sekretase prozessiert. Dies führt zur Sekretion der löslichen, extrazellulären sAPP $\alpha$ -Ektodomäne sowie zur Entstehung des 83-AS langen, membranständigen C-terminalen APP Fragment ( $\alpha$ -CTF)<sup>176</sup>. Die anschließende Spaltung des  $\alpha$ -CTF durch die  $\gamma$ -Sekretase resultiert wiederum in der Freisetzung der APP-intrazellulären Domäne (engl. APP intracellular domain (AICD)) sowie des Peptid3 (P3)<sup>177,178</sup>. Beim amyloidogenen Weg wird APP zunächst von der  $\beta$ -Sekretase BACE1 (beta-site APP-cleaving enzyme 1) im Endosom prozessiert<sup>179</sup>. Bei dieser Prozessierung wird ein Teil der Ektodomäne von APP (APPs $\beta$ ) in den extrazellulären Raum entlassen. Es entsteht das membranständige, C-terminale Fragment ( $\beta$ -CTF oder C99). C99 wird an verschiedenen Stellen weiter von der  $\gamma$ -Sekretase gespalten, woraufhin Fragmente mit Aminosäurelängen von 43,45,46, 48, 49 und 51 entstehen<sup>180</sup>. Diese Fragmente werden weiter prozessiert und es entstehen unter anderem die finalen A $\beta$ -Varianten A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42<sup>181,182</sup>. Zudem wird, wie bei der Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase, AICD intrazellulär freigesetzt<sup>179,183</sup>. Für AICD wurde gezeigt, dass es zum Nukleus wandert, wo es unter anderem die Expression von apoptotischen Genen reguliert<sup>178</sup>. Der  $\gamma$ -Sekretasen Komplex umfasst eine hufeisenförmige, transmembrane Domäne die aus 19-Transmembransegmenten (TM) besteht und eine, über dem Hohlraum des TM-Hufeisens angesiedelten, extrazelluläre Domäne der Nikastrin-Untereinheit<sup>184</sup>. Insgesamt besteht der  $\gamma$ -Sekretasen Komplex aus vier Proteinen: PS-1 sowie PS-2, Nikastrin, Aph-1 (engl. für anterior pharynx defective 1) sowie dem Präsenilin-Verstärker-2 (PEN-2). PS-1 und PS-2 bilden dabei das katalytische Zentrum der  $\gamma$ -Sekretase<sup>185,186</sup> und Nikastrin, PEN-2 und Aph-1 modulieren im Gesamten die enzymatische Aktivität indem sie auf physiologische Stimuli reagieren<sup>187,188</sup>.



**Abbildung 6:** Sequenzielle Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP). Bei der nicht-amyloiden Prozessierung von APP (linke Seite der Abbildung) erfolgt die Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins durch die  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der Sequenz des A $\beta$ -Peptides. Beim amyloiden Weg (rechte Seite der Abbildung) wird APP von der  $\beta$ -Sekretase außerhalb des A $\beta$ -Peptides gespalten, sodass nach der anschließenden Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase das zuvor membranständige A $\beta$ -Peptid in den extrazellulären Raum entlassen wird.

### 1.2.3 Lösliches A $\beta$

A $\beta$  wird nach seiner Abspaltung von APP durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -sekretase durch Exozytose in den extrazellulären Raum entlassen, wo es an verschiedene Rezeptoren bindet. Die A $\beta$ 40-Variante gilt als neuroprotektiv und bildet mit einem Anteil von etwa 90% des gesamt sekretiertem A $\beta$  die Hauptvariante im Gehirn<sup>189,190,191</sup>. A $\beta$ 42 wird physiologisch zu einem sehr geringen Anteil sekretiert, neigt zur Aggregation und bildet den Hauptbestandteil der A $\beta$ -Plaques. Neben extrazellulärem A $\beta$  wurde auch die intrazelluläre Bildung von A $\beta$  und dessen Akkumulation im ER sowie im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) gezeigt<sup>192,193</sup>. Posttranslational erfährt das A $\beta$ -Protein zudem einige Modifikationen, wie Nitrierung oder Pyroglutaminierung. Es wurde postuliert, dass diese essentiell für die Aggregationsaffinität des A $\beta$ -Proteins und damit vermutlich für seine vermittelte Toxizität verantwortlich sind<sup>161,194</sup>. Bei synaptischer Aktivität wird A $\beta$  physiologisch in geringen Dosen ausgeschüttet, was für das Überleben von Neuronen notwendig und förderlich für die synaptische Plastizität ist<sup>195,196,197,198</sup>. A $\beta$  spielt zudem eine wichtige Rolle beim Abbau von Synapsen<sup>199</sup> und bei der Stimulierung der Neurogenese im Hippocampus während der Gehirnentwicklung<sup>200</sup>. Zur Aufklärung der physiologischen Rollen von A $\beta$  wurden bisher vorwiegend lösliche A $\beta$ -Monomere verwendet<sup>201,202</sup>.

Die physiologische Rolle der A $\beta$ -Oligomere ist dagegen noch weitestgehend ungeklärt (siehe Kapitel 1.2.1). A $\beta$ -Oligomere konnten in hohen Konzentrationen aus den Gehirnen von AD-Patienten isoliert werden, wobei ihre Konzentration signifikant mit dem Grad des Verlustes der kognitiven Fähigkeiten der Betroffenen korrelierte<sup>153,154,155</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass A $\beta$ -Oligomere in AD-Patienten eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Synapsen aufweisen<sup>203,204</sup>. Die Gruppe der A $\beta$ -Oligomere ist sehr heterogen und umfasst A $\beta$ -Aggregationen zwischen 3 - 50 A $\beta$ -Untereinheiten, die wie A $\beta$ -Fibrillen einen hohen

Anteil an  $\beta$ -Faltblättern aufweisen. Diese bilden sich an den Aminosäureresten 24 - 28 durch  $\beta$ -Wendungen<sup>205</sup>. Synthetische A $\beta$ -Oligomere sind unter anderem kleine ADDL (engl. für A $\beta$ -derivated diffusible ligands). Sie sind nicht fibrillär aber gelten als neurotoxisch nachdem gezeigt wurde, dass sie LTP inhibieren und Zelltod auslösen können<sup>206</sup>.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass A $\beta$ -Oligomere Modifikationen an der Struktur von Synapsen bewirken und dadurch ihre Funktionalität stark beeinträchtigen<sup>207,208,209</sup>. Dagegen konnte eine Restriktion der Bildung von A $\beta$ -Oligomeren, in APP-transgenen Mausmodellen, die Degeneration von Synapsen hemmen und somit Beeinträchtigungen in der Gedächtnisbildung entgegenwirken, ohne dass Änderungen bei der A $\beta$ -Plaquedichte sowie Volumen festgestellt wurden<sup>210</sup>. Es wird auch die These postuliert, dass die A $\beta$ -Plaquebildung an sich insofern protektiv ist, als dass es das Level von freien, toxischen A $\beta$ -Oligomeren senkt<sup>211</sup>.

Wie genau A $\beta$ -Oligomere an neuronale Strukturen binden und diese beeinträchtigen ist noch nicht abschließend geklärt<sup>212</sup>. In den letzten Jahren wurden jedoch einige Proteine identifiziert, unter anderem Glutamatrezeptoren wie AMPA und mGluR5 (metabotroper Glutamatrezeptor5), das zelluläre Prion Protein (PrP<sup>C</sup>), Frizzled-Rezeptoren und Adhäsionsproteine der Neuroligin-Familie<sup>213,214,215,216</sup>, die als Rezeptoren für A $\beta$ -Oligomere an der neuronalen Plasmamembran fungieren könnten. Von einigen Molekülen wie PrP<sup>C</sup>, Neuroligin und Frizzled, konnte gezeigt werden, dass sie direkt mit A $\beta$ -Oligomeren interagieren und das deren genetische Deletion die Bindungsaffinität von A $\beta$ -Oligomeren an neuronalen Strukturen reduzieren konnte, wodurch neuronale Schädigungen eingedämmt wurden<sup>212</sup>. Für A $\beta$ -Oligomere die an Neuronen gebunden waren konnte gezeigt werden, dass sie eine Vielzahl von aberranten Signalwegen auslösen. Hierzu zählen unter anderem ein gestörter Ca<sup>2+</sup>-Signalweg<sup>217,218</sup>, oxidativer Stress<sup>219</sup>, Tau-Hyperphosphorylierung<sup>220</sup>, Abbau von AMPA<sup>221</sup> und NMDA-Rezeptoren<sup>222,208</sup> an Synapsen, erhöhte D-Serin Werte<sup>223</sup>, ein beeinträchtigter axonaler Transport<sup>224,225</sup> sowie eine erhöhte Glutamatfreigabe an der Präsynapse<sup>226,227</sup>.

Erste Studien zur physiologischen Rolle von A $\beta$ -Oligomeren legen jedoch nahe, dass pikomolare Konzentrationen von A $\beta$ 42-Monomeren sowie Oligomeren förderlich für die Gedächtnisbildung sein könnten. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Zugabe von natürlich im Gehirn vorkommenden pikomolaren Konzentrationen von A $\beta$ 42-Monomeren/Oligomeren das LTP gesteigert werden konnte<sup>196</sup>, wohingegen erst hohe nanomolare Konzentrationen die synaptische Plastizität beeinträchtigten, indem LTP reduziert wurde. Hohe Konzentrationen von A $\beta$ -Oligomeren führten zudem zu einem Untergang von Neuronen<sup>196,206,223</sup>. Die physiologische Rolle der A $\beta$ -Oligomere muss im Hinblick auf therapeutische Ansätze jedoch noch weiter untersucht werden<sup>138</sup>. Zudem werden A $\beta$ -Oligomere bei der fortgeschrittenen AD-Pathologie vor allem im Umkreis von A $\beta$ -Plaques, die aus fibrillären, unlöslichen A $\beta$ -Aggregaten bestehen, gefunden, wodurch ein Zusammenspiel zwischen diesen beiden A $\beta$ -Formen in der AD-Pathologie im Hinblick auf therapeutische Ansätze nicht vernachlässigt werden sollte<sup>138</sup>.

#### 1.2.4 Aggregation des A $\beta$ -Peptides – extrazelluläre Plauebildung

Extrazelluläre A $\beta$ -Plaques weisen eine sphärische Morphologie sowie eine poröse Struktur<sup>228</sup> auf und bestehen, wie im Kapitel 1.2.3 beschrieben, aus aggregierten A $\beta$ -Proteinen. Diese liegen in Form von A $\beta$ -Oligomeren sowie unlöslichen A $\beta$ -Fibrillen vor<sup>229,203</sup>, wobei die aggregierten A $\beta$ -Fibrillen eine sehr dicht gepackte, parallele  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweisen. A $\beta$ -Fibrillen stellen den Endpunkt eines komplexen Aggregationsprozesses dar, der verschiedene Zwischenprodukte beinhaltet, wie A $\beta$ -Dimere, A $\beta$ -Oligomere, A $\beta$ -Globulomere und A $\beta$ -Protofibrillen<sup>230</sup>. Eine Polymerisation zu A $\beta$ -Fibrillen ist nur oberhalb einer kritischen Mindestkonzentration an A $\beta$ -Monomeren möglich, die zunächst einen sogenannten Aggregationskeim bilden müssen<sup>231,232</sup>. Die weitere Polymerisation des Aggregationskeimes zu A $\beta$ -Fibrillen ist thermodynamisch vorteilhaft, weshalb eine exponentielle Wachstumsphase der A $\beta$ -Plaques folgt. Es wurde weiter beobachtet, dass sich A $\beta$ -Proteine in dieser Phase mit einer sehr viel höheren Wahrscheinlichkeit an schon bestehende Plaques anlagern, anstatt neue A $\beta$ -Plaques zu bilden. Sobald ein thermodynamisches Gleichgewicht erreicht wird, stagniert auch das Wachstum des A $\beta$ -Plaques<sup>233</sup>. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sich neue A $\beta$ -Plaques mit einer hohen Wahrscheinlichkeit im Umkreis von schon bestehenden A $\beta$ -Plaques bilden<sup>233,234</sup>.

A $\beta$ -Fibrillen können durch Elektronenmikroskopie aber auch mittels Fluoreszenzfarbstoffen, welche sich zwischen die  $\beta$ -Faltblattstrukturen einlagern können, wie Thioflavin S oder Methoxy-X4, in der Lichtmikroskopie sichtbar gemacht werden<sup>235,236,230</sup>. Aufgrund der Form der A $\beta$ -Plaques, die einen Durchmesser von bis zu 200  $\mu$ m erreichen können<sup>237</sup>, unterscheidet man grob zwischen *cored*-Plaques, neuritischen Plaques und den diffusen Plaques. *Cored*-Plaques weisen einen verdichteten Kern bestehend aus A $\beta$ -Fibrillen auf sowie einer äußeren, etwas diffuseren Mantelschicht. Neuritische Plaques sind von geschwollenen, dystrophen Axonen und Dendriten umgeben<sup>238,239</sup>. Zudem ist in ihrer Umgebung eine stets erhöhte Inflammation in Form von aktivierten Mikroglia- und Astrozytenzellen zu beobachten. Diffuse Plaques formen keinen dichtgepackten, aus A $\beta$ -Fibrillen bestehenden Kern und besitzen keine klaren Begrenzungen. Ihre A $\beta$ -Aggregate sind im Plaque gleichmäßig verteilt<sup>239</sup> und können nur durch Immunfärbungen gegen das A $\beta$ -Peptid detektiert werden<sup>236</sup>. Diffuse Plaques wurden auch in kognitiv unbeeinträchtigten, älteren Menschen gefunden<sup>240</sup>.

Die Ausbreitung der A $\beta$ -Plaques in der AD-Pathologie unterliegt einem räumlich sowie zeitlich definierten Verlauf, welcher sich in fünf Phasen einteilen lässt: Zunächst lassen sich Plaques im Isokortex feststellen (Phase 1), dann im entorhinalen Cortex und Hippocampus (Phase 2), gefolgt vom Striatum und Zwischenhirn (Phase 3) sowie den verschiedenen Kernen des Stamms (Phase 4). In der letzten Phase (Phase 5) werden A $\beta$ -Plaques im Kleinhirn detektiert<sup>241</sup>.

### 1.2.5 Effekt von unphysiologischen A $\beta$ -Konzentrationen auf die dendritische Spine-Plastizität

Die neuronale Aktivität bewirkt eine Ausschüttung physiologischer Konzentrationen des A $\beta$ -Peptides<sup>195,196</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass das ausgeschüttete A $\beta$  die neuronale Aktivität im Anschluss wieder senkt, weshalb man A $\beta$  die Rolle eines negativen Feedback-Regulators im Prozess der synaptischen Plastizität zuspricht<sup>157</sup>. Hohe unphysiologische Konzentrationen und Überproduktion von A $\beta$  an Dendriten und Axonen reduzieren allerdings signifikant die Plastizität ihrer Synapsen, was schließlich zu deren Untergang führt<sup>196,206,223,208</sup>. Dabei beginnt die Degeneration von Synapsen auf dem Level dendritischer Spines, die maßgeblich an der Gedächtnisbildung beteiligt sind (siehe Kapitel 1.1.4)<sup>40,242,243</sup>.

Während des pathologischen Verlaufs von AD wurden in Patienten sowie in transgenen Mausmodellen ein signifikanter Rückgang in der Spine-Dichte<sup>244,245,246,247</sup> sowie in der Konzentration von Molekülen und Proteinen die maßgeblich bei der Signalweiterleitung am Spine involviert sind<sup>248,249</sup> verzeichnet. Dabei ist eine Reduktion der Spine-Dichte sowie der Spine-Plastizität aufgrund von dimorphen Neuriten in der direkten Umgebung zum A $\beta$ -Plaque am ausgeprägtesten<sup>250,251</sup>. Ein Rückgang in der Spine-Dichte ist schon vor den ersten klinischen Symptomen der Krankheit Alzheimer zu beobachten<sup>246</sup>. Als mögliche Ursache werden, wie im Kapitel 1.2.3 dargestellt, unnatürlich hohe Konzentrationen von A $\beta$ -Oligomeren vermutet die unter anderem LTP hemmen und LTD induzieren<sup>208,196</sup> sowie zu Abnormalitäten in der Struktur und Komposition von Spines führen<sup>207</sup>. Dies führt im AD-Krankheitsverlauf zu einer Zerstörung synaptischer Verknüpfungen und damit zu dauerhaften kognitiven Defiziten<sup>252</sup>. Der Untergang von Spines korreliert zudem signifikant mit dem Maß der kognitiven Verschlechterung in AD-Patienten<sup>152</sup>. Der molekulare Mechanismus, der den Abbau von Spines durch hohe Konzentrationen von A $\beta$ -Oligomeren bewirkt, konnte allerdings noch nicht vollständig nachvollzogen werden. Wie im Kapitel 1.2.3 erläutert, konnte gezeigt werden, dass A $\beta$ -Oligomere an der PSD von einem Spine binden und dadurch eine Signalkaskade auslösen, die zu einer Dysfunktion und schließlich zu einem Abbau der PSD und schlussendlich der Synapse führt<sup>203</sup>. Durch die Bindung von A $\beta$  an NMDA-Rezeptoren wird unter anderem die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (engl. für cAMP response element-binding protein) beeinträchtigt<sup>253</sup> sowie eine unnatürliche Expression von Arc (engl. für activity-regulated cytoskeleton-associated protein) ausgelöst. Arc ist ein Zytoskelett assoziiertes Protein, welches die Internalisierung von AMPA-Rezeptoren aus der neuronalen Zellmembran reguliert<sup>254</sup>. Dies führt zu einem gravierenden Verlust von NMDA- und APMA-Rezeptoren an der Spine-Oberfläche<sup>207</sup>. Zudem wird auch die Produktion des Rezeptors Ephrin-B2 (EphB2) an der Membranoberfläche des Spines durch die Bindung von A $\beta$ -Oligomeren signifikant reduziert. Da die extrazellulären Domänen des EphB2- und des NMDA-Rezeptors, der eine Hauptfunktion in LTP-Induktion ausübt<sup>255</sup>, in Verbindung stehen, wird dem EphB2-Rezeptor ebenfalls eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität zugesprochen<sup>256</sup>.

Der gesamte Mechanismus der im Verlauf der AD zu einer abnormalen synaptischen Plastizität und Beeinflussung der Spine-Morphologie führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Beeinträchtigung der Spine-Plastizität zu verhindern wäre ein großer Schritt bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen.

### 1.2.6 Mikrogliazellen - Aktivierung und Funktion in AD

Mikrogliazellen sind die ortsständigen Makrophagen des zentralen Nervensystems<sup>257</sup>. Sie kommen in großer Anzahl im Gehirn sowie Rückenmark vor, wobei ihr Anteil von 5 % im Cortex bis zu 12 % im *corpus callosum* variiert<sup>258</sup>. Auf neuronale Schädigungen reagieren die Zellen mit erhöhter Proliferation und Wanderung zur Schädigungsstelle<sup>259,260</sup>. Zudem sind Mikrogliazellen an der Erneuerung neuronaler Netzwerke und der synaptischen Verschaltung im adulten Alter sowie während der Entwicklung des Gehirnes beteiligt, indem sie unter anderem inaktive Synapsen phagozytieren. Gleichzeitig schützen Mikrogliazellen aktive Synapsen und führen Reparaturprozesse durch<sup>261,262,263,264,265,266</sup>. Eine Besonderheit von Mikrogliazellen ist es, dass sie sich durch Proliferation aus der eigenen Zellreihe erneuern können<sup>267,268</sup>.

Ruhende Mikrogliazellen tasten mit ihren freibeweglichen Prozessen das umliegende Gewebe nach potentiellen Pathogenen und apoptotischen Zellen ab<sup>269</sup>, um diese zu phagozytieren<sup>270</sup>. Zudem reagieren Mikrogliazellen auf Signale die bei Gewebsschädigungen ausgeschüttet werden, wie extrazelluläres Calcium oder Adenosintriphosphat (ATP). Sie wandern dabei zum Ort der Schädigung<sup>271,272</sup> und proliferieren dabei von einer ruhenden zu einer aktiven Zelle<sup>273</sup>. Die Detektion der pathologischen Signale erfolgt über spezifische Rezeptoren, welche pathogenassoziierte molekulare Marker (engl. pathogen-associated molecular patterns, (PAMPs)) oder schadenassoziierte molekulare Marker (engl. damage-associated molecular patterns, (DAMPs)) erkennen. Die vom Gewebe oder der Nachbarzelle aus gesendeten Signale bewirken verschiedene Arten der Proliferation der Mikrogliazelle, sodass sie als aktivierte Zelle verschiedene Funktionen erfüllen kann<sup>273</sup>. Der Unterteilung bei Makrophagen entsprechend wurden bei aktivierten Mikrogliazellen ursprünglich zwei unterschiedliche Aktivitätsstadien unterschieden. Diese wurden bei Makrophagen als M1- und M2-Stadium sowie bei Mikrogliazellen als M1-ähnliches sowie M2-ähnliches Stadium bezeichnet<sup>274,273</sup>. Beim M1-ähnlichen Stadium übernehmen Mikrogliazellen wie Makrophagen eine pro-inflammatorische und im M2-ähnlichen Stadium eine anti-inflammatorische Funktion. Eine strikte Abgrenzung der Stadien durch Transkriptomanalysen bei Mikrogliazellen scheiterte allerdings<sup>275</sup>. Es wurden stattdessen weitere Aktivierungszustände definiert, was eine Erweiterung des M2-ähnlichen Stadiums um die Stadien M2a, M2b und M2c zu Folge hatte. Zellen im M2a und M2c Stadium unterstützen die Heilung des geschädigten Gewebes, wohingegen Zellen des M2c Stadiums pro- und anti-inflammatorische Funktionen übernehmen<sup>276,277</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen und Makrophagen zwischen den Stadien wechseln können und so pro- und anti-inflammatorische Funktionen ausüben können<sup>278,279,280,281</sup>. *In vivo* Studien konnten belegen, dass Mikrogliazellen ebenfalls durch A $\beta$ -Ablagerungen aktiviert werden und aktiv zum A $\beta$ -Plaques

hinwandern, wobei sie ihr Soma zum A $\beta$ -Plaques hin ausrichten<sup>282</sup>. Diese Wanderung geschieht innerhalb von ein bis zwei Tagen sobald ein neuer A $\beta$ -Plaques gebildet wurde<sup>282,283</sup>. Am A $\beta$ -Plaques sind Mikrogliazellen in der Lage lösliche A $\beta$ -Oligomere und teilweise fibrilläres A $\beta$  durch Rezeptoren an der Zelloberfläche wie z.B. SCARA1 (engl. scavenger receptor class A-member-1), CD36 (engl. cluster of differentiation, (CD)), CD14,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1-Integrin sowie Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. toll-like receptor, (TLR)) wie TLR2, TLR4, TLR6 und TLR9, zu binden und die Phagozytose einzuleiten<sup>284,285,286</sup>. Die Degeneration erfolgt in den Mikrogliazellen über extrazelluläre Proteasen wie Neprilysin und Insulin-abbauende Enzyme.

Das Mikrogliazellen in AD eine wichtige Rolle spielen wird dadurch unterstrichen, dass einige Mutationen in ihren Genen, deren Produkte für die Funktion mikroglialer Zellen erheblich sind, beschrieben wurden, die das AD-Risiko deutlich steigern. Unter anderem zählen dazu die Mutation der extrazellulären Domäne des TREM2 (engl. triggering receptor expressed on myeloid cells-2)-Rezeptors der Mikrogliazellen der Phospholipide, apoptotische Zellen und Lipoproteine erkennt<sup>287,288,289,290,291</sup>. Dabei bewirkt die Mutation eines Arginine-zu-Histidin Austausches an der Position 47 (R47H) oder 62 (R62H), dass Phospholipid-Liganden schlechter gebunden werden<sup>291,288,292,289</sup>. Eine weitere Mutation im Gen des Oberflächenrezeptors CD33 der Mikrogliazellen, bewirkt eine Reduktion der A $\beta$ -Phagozytose und dadurch eine erhöhte A $\beta$ -Ablagerung im neuronalen Gewebe<sup>293</sup>.

Der enzymatische Abbau von A $\beta$ -Fibrillen durch Mikrogliazellen steht noch im Diskurs. Einige Studien zeigen, dass fibrilläres A $\beta$  gegen den enzymatischen Abbau resistent ist<sup>128</sup>. Darüber hinaus wurde eine dreifach erhöhte Verlustrate von Plaques-assoziierten Mikrogliazellen im Vergleich zu nicht-Plaques-assoziierten festgestellt, wobei die Bildungsrate abseits sowie am Plaques konstant blieb<sup>294</sup>. In der Peripherie, also abseits von A $\beta$ -Ablagerungen, wurden im transgenen AD-Mausmodell eine signifikant reduzierte Anzahl von Mikrogliazellen gegenüber Wildtyptieren, die keine A $\beta$ -Plaques aufweisen, beobachtet<sup>295</sup>. Diese Untersuchungen zeigten somit, dass die Akkumulation und Aggregation des A $\beta$ 42-Peptides nicht zu einer erhöhten Bildungsrate von Mikrogliazellen führt, sondern nur eine Abwanderung von Mikrogliazellen aus der Peripherie hin zu A $\beta$ -Plaques bewirkt<sup>295</sup>.

Zudem wurde festgestellt, dass bei der sporadischen AD die Rezeptoren welche die Phagozytose einleiten auf der Zelloberfläche der Mikrogliazellen herunterreguliert sind, wodurch ebenfalls der Abbau von A $\beta$  reduziert wird<sup>296</sup>. Außerdem zeichnen sich Plaques-assoziierte Mikrogliazellen durch eine verringerte Mobilität ihrer Prozesse aus<sup>297</sup>.

Nach diesen Beobachtungen wurde die Hypothese postuliert, dass eine fortgeschrittene A $\beta$ -Pathologie mit einer ausgeprägten fibrillären A $\beta$ -Last, welche nicht mehr ausreichend phagozytiert werden kann, den Wechsel von Mikrogliazellen von dem zunächst anti-inflammatorischen Zustand nach einer kurzen Aktivitätsabnahme in den pro-inflammatorischen Zustand bewirkt<sup>298</sup>. Im fortgeschrittenen pro-inflammatorischen Zustand verstärken aktivierte Mikrogliazellen allerdings die von A $\beta$ -Plaques induzierte Neurotoxizität durch das Generieren von reaktiven Sauerstoffverbindungen und Peroxynitrit. Dadurch wird die toxische Umgebung um den A $\beta$ -Plaques noch erweitert<sup>299,300</sup>.

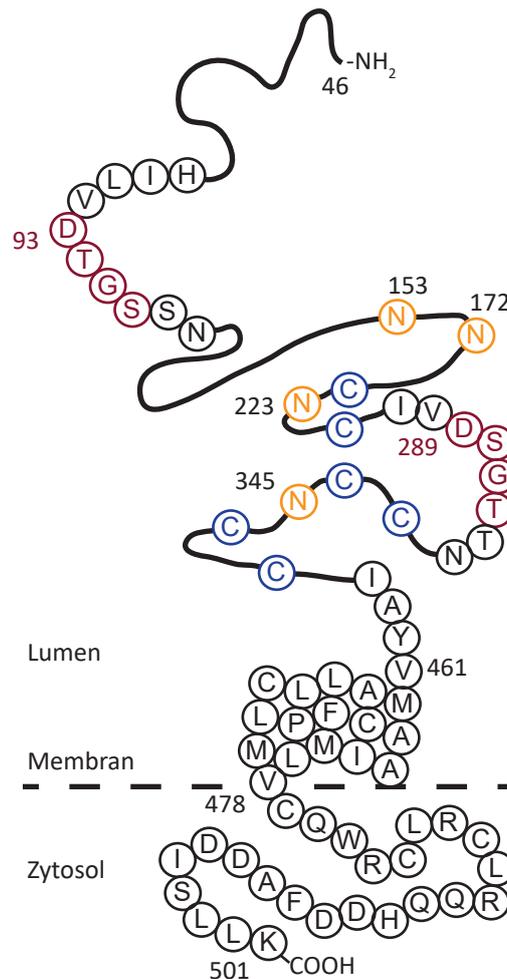
### 1.2.7 Neurofibrilläre Bündel

Neurofibrilläre Bündel (eng. neurofibrillary tangles, (NFT)) bestehen aus dem aggregierten hyperphosphorylierten Tau-Protein und führen in Neuronen zu toxischen Läsionen<sup>301</sup>. Das Tau-Protein gehört zu den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, reguliert die Stabilität des Zytoskeletts und beeinflusst dadurch den intrazellulären Transport. Bei AD herrscht ein Ungleichgewicht in der Aktivität von Kinasen und Phosphatasen, wobei es zu einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins kommt<sup>302</sup>. Zudem ist die Gesamtkonzentration vom Tau-Protein bei Alzheimerpatienten um das Achtfache erhöht. Die unphysiologischen Veränderungen des Tau-Proteins führen zu einer Destabilisierung sowie Depolymerisation der Mikrotubuli und dadurch zu einer Beeinträchtigung des axonalen Transports und der Neurotransmission<sup>303,304</sup>. Die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins führt weiterhin, wie vorhin erwähnt, zu einer Aggregation des Proteins. Es bildet kleine Ablagerungen, sogenannte Präfibrillen, die schließlich Tau-Faltblattkonformationen in paarigen helikalen Filamenten einnehmen<sup>305</sup>. Die paarigen helikalen Filamente lagern sich zu großen Neurofibrillen zusammen und bewirken die toxischen Läsionen innerhalb des Neurons<sup>303</sup>. Wie im Kapitel 1.2 bereits angesprochen, lässt sich anhand der Häufigkeit der NFT das Fortschreiten der AD-Pathologie nach Braak in sechs Stadien einteilen. In Phase eins und zwei sind vor allem Aggregate im trans-entorhinalen Cortex zu finden. Erst in Phase drei und vier ist das limbische System mit dem Hippocampus betroffen und in den Phasen fünf sowie sechs treten vermehrt NFT im Isocortex auf<sup>4,306</sup>. Diese Einteilung der Phasen ermöglicht eine bessere Abgrenzung zur normalen altersbedingten Tau-Aggregation bei nicht AD-Patienten und zeichnet das Vorkommen von NFT deutlich als Anzeichen für AD aus<sup>118</sup>.

### 1.3 Die $\beta$ -Sekretase BACE1

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, stellt die Prozessierung durch die  $\beta$ -Sekretase den ersten sowie limitierenden Schritt in der proteolytischen Spaltung von APP und damit in der A $\beta$ -Produktion dar. Im Jahre 1999 wurde in Form von BACE1 (engl.  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1) erstmals eine humane transmembrane Aspartatprotease identifiziert, die allen bekannten Charakteristika der  $\beta$ -Sekretase entsprach<sup>307,308,309,310,311</sup>. Bei BACE1 handelt es sich um ein Typ-1-Transmembranprotein welches aus insgesamt 501-AS besteht (siehe Abbildung 7). Die zwei Aspartylmotive des aktiven Zentrums DTGS (AS 93-96) und DSGT (AS 289-292) befinden sich im luminalen Abschnitt der Protease und sind essenziell für dessen Proteaseaktivität<sup>308</sup>. Der transmembrane Abschnitt befindet sich zwischen den Aminosäuren 461-477 und bewirkt, dass BACE1 nicht sekretiert wird und sich daher im TGN anreichern kann<sup>310</sup>. Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Protease ist ihr katalytisches Zentrum, das sich aus den Aminosäureresten 65-79 zusammensetzt. Das katalytische Zentrum der Sekretase ist auch die Bindestelle für BACE1-Inhibitoren, siehe Kapitel 1.3.2<sup>312</sup>. Neben BACE1 wurde zudem eine zweite Aspartat-Endopeptidase identifiziert, die Sekretase BACE2. BACE2 weist auf Aminosäureebene eine Homologie von über 60 % zu BACE1 auf<sup>313,314,315</sup>, ist nach aktuellem Forschungsstand allerdings nicht in der Prozessierung von

APP involviert<sup>316</sup>. Für BACE1 konnte dagegen gezeigt werden, dass eine Überexpression der Protease zur vermehrten APP-Prozessierung an der  $\beta$ -Schnittstelle und somit zur erhöhten Freisetzung des A $\beta$ -Proteins führt<sup>308,311,309,310</sup>, wohingegen eine Reduktion der Expression von BACE1 durch siRNA (engl. small interference ribonucleic acid) oder antisense RNA eine verminderte Prozessierung von APP zur Folge hat<sup>307,310</sup>. Darüber hinaus ergab die Analyse embryonaler Fibroblasten-Zelllinien sowie neuronalen Zellen, gewonnen aus BACE1-defizienten Mäusen, dass BACE1 vermutlich die einzige  $\beta$ -Sekretase ist die APP prozessiert, da in den isolierten Zellen kein A $\beta$ -Peptid nachgewiesen werden konnte<sup>317,318,319</sup>.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der  $\beta$ -Sekretase BACE1. Das membranständige Enzym BACE1 vollführt den ersten und somit limitierenden Schritt bei der proteolytischen Spaltung von APP und gilt dadurch als primäres und direktes therapeutisches Ziel für AD. Abbildung modifiziert von Nawrot *et al.*<sup>320</sup>.

### 1.3.1 Lokalisation und Physiologische Funktionen der BACE1-Sekretase

BACE1 wird in fast allen Geweben am stärksten aber im Gehirn und hier vor allem in Neuronen exprimiert, wobei BACE1 hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert ist<sup>321,310</sup>. Intrazellulär befindet sich die pH-abhängige Protease hauptsächlich im Golgi-Apparat und in den Endosomen<sup>311,307,309</sup>, wo es bei einem pH-Wert zwischen 4,5-6,0 seine maximale katalytische Aktivität entfalten kann<sup>322</sup>. Als unreifes Vorläuferprotein wird BACE1 ins ER entlassen und

erfährt auf dem weiteren Weg über den Golgi-Apparat und das TGN zur Plasmamembran sowie den Endosomen zahlreiche posttranslationale Modifikationen. Dabei ist die korrekte Glykosylierung, ein Prozess der im ER anfängt und erst im TGN abgeschlossen wird, wichtig für die enzymatische Aktivität von BACE1<sup>323,324</sup>. Die Palmitoylierung von drei Cysteinen der zytoplasmatischen Domäne hat zudem Einfluss auf den Transport und die Lokalisation der Sekretase<sup>325</sup>. Darüber hinaus wird die Pro-Domäne der Protease im Golgi-Apparat abgespalten<sup>326</sup>. Weitere posttranslationale Modifikationen sind unter anderem die Ausbildung von drei Disulfidbrücken und die Phosphorylierung von Serin an der Aminosäure 489<sup>323,327</sup>. Weitere Studien haben gezeigt, dass BACE1 aufgrund des sauren Milieus APP vorwiegend in den Endosomen spaltet<sup>328,316,329,330</sup> und dass die Erhöhung des endosomalen pH-Wertes die A $\beta$ -Produktion effektiv inhibiert<sup>331</sup>. Neben APP wurden für BACE1 noch weitere neuronale Substrate identifiziert. Dazu gehören unter anderem die APP-Homologen APLP1 und APLP2 (eng. amyloid precursor-like proteins), die ebenfalls von der  $\gamma$ -Sekretase geschnitten werden<sup>332,333</sup>. Da sie aber nicht die Sequenz für A $\beta$  tragen, geht man davon aus, dass sie nicht zur AD-Pathologie beitragen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von BACE1 postnatal besonders hoch ist und mit dem Alter abnimmt<sup>334</sup>. Während der Ausbildung der Myelinschicht von Neuronen wurde zudem eine hohe BACE1-Expression observiert<sup>335</sup>. In diesem Zusammenhang wurde Neuregulin-1 (NRG1) als ein Substrat von BACE1 identifiziert<sup>335,334</sup>. NRG1 ist ein wichtiges Protein das bei der Regulation der Myelinisierung von Neuronen des zentralen sowie peripheren Nervensystems und bei der Bildung der Muskelspindeln involviert ist. Die BACE1-defiziente Mauslinie weist deshalb unter anderem eine Hypomyelinisierung der Neurone<sup>334,335</sup> sowie eine verminderte Muskelspindelbildung auf<sup>336</sup>. NRG1 wird wie APP von einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase endoproteolytisch gespalten, um seine korrekte Funktion ausüben zu können. Ein weiteres immunologisch relevantes BACE1-Substrat ist der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand1 (PSG-L1). Dieser Ligand moduliert die Adhäsion von Leukozyten bei entzündlichen Reaktionen. Es konnte gezeigt werden, dass BACE1 neben BACE2 und ADAM10 (engl. a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10) in der Lage ist PSG-L1 zu spalten<sup>337</sup>. Weitere BACE1-Substrate sind die  $\beta$ -Untereinheiten der spannungsgesteuerten Natriumkanäle, die eine putative BACE1-Spaltstelle enthalten<sup>338</sup>. Die  $\beta$ -Untereinheiten erfüllen wichtige regulatorische Aufgaben für die Natriumkanäle, die aus ein bis zwei  $\beta$ -Untereinheiten und einer porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheit bestehen. Sie spielen beispielsweise eine Rolle beim Transport der Kanäle an die Plasmamembran und deren dortiger Stabilisierung, was maßgeblich die Natriumkanaldichte an der Membranoberfläche beeinflusst<sup>339</sup>. Neben der subzellulären Lokalisation wirken  $\beta$ -Untereinheiten auch modulatorisch auf die Funktion der Natriumkanäle und bewirken unter anderem die zeitnahe Inaktivierung dieser. In BACE1-defizienten Mäusen wurde beobachtet, dass eine gestörte modulatorische Funktion der  $\beta$ -Untereinheiten vermehrt zu epileptischen Anfällen führt<sup>340,341</sup>.

Zudem wurden in BACE1-defizienten Mäusen Lern- sowie Gedächtnisstörungen und subtile Verhaltensabnormitäten wie Beeinträchtigungen des räumlichen Lernens und des explorativen Verhaltens festgestellt<sup>318,342,343,344</sup>. In diesem Kontext konnte man zeigen, dass

BACE1-defiziente Mäuse eine beeinträchtigte axonale Verschaltung der Moosfasern innerhalb des infrapyramidalen Bündels des Hippocampus aufweisen<sup>321</sup>. Das infrapyramidale Bündel gilt als Korrelat der Gedächtnisleistung und ist in BACE1-defizienten Mäusen um 30 % verkürzt<sup>321</sup>. Man geht davon aus, dass es mit der gestörten Spaltung des neuronalen Zelladhensionsmolekül CHL1 (engl. close homolog of L1) zusammenhängt, was als ein weiteres BACE1-Substrat identifiziert wurde<sup>345</sup>. CHL1 ist ein Typ-1 Membranprotein welches durch ADAM8<sup>346</sup> und BACE1<sup>345</sup> prozessiert wird und dessen lösliche Ektodomäne mit Neuphilin-1 und Semaphorin-3A interagieren kann, um die axonale Zielfindung zu beeinflussen<sup>347,348</sup>. Des Weiteren wurde Sez6 (engl. seizure-related gene6), ein dendritisch lokalisiertes Typ-1 Membranprotein, als BACE1-Substrat identifiziert<sup>349</sup>. Sez6-defiziente Mäuse weisen eine verminderte dendritische Spine-Dichte und eine beeinträchtigte Erregbarkeit der pyramidalen Nervenzellen in der kortikalen Schicht-V auf<sup>349,350</sup> und tragen somit ebenfalls zu den beobachteten Lern- und Gedächtnisstörungen BACE1-defizienter Mäuse bei. Durch die Entdeckung der in synaptischen Prozessen involvierten BACE1-Substrate konnten teilweise die kognitiven Defizite im BACE1-defizienten Mausmodell erklärt werden.

### 1.3.2 BACE1-Inhibierung als Therapieansatz

Eine partielle Unterdrückung von BACE1 als Therapie gegen AD, um dadurch die Entstehung der toxischen A $\beta$ -Proteine zu reduzieren, bleibt trotz der beobachteten pathologischen Nebeneffekte des BACE1-defizienten Mausmodells, weiterhin attraktiv.

Anhand der Kreuzung des BACE1-defizienten Mausmodells mit einem transgenen AD-Mausmodell, welches humanes APP überexprimiert, konnte gezeigt werden, dass heterozygote Nachkommen neben einer 50 %igen BACE1-Reduktion auch eine Reduktion des A $\beta$ -Proteins um 12 % aufwiesen. Dies führte zu einem signifikanten Rückgang der A $\beta$ -Last sowie der gesamten Ausprägung der neurodegenerativen Charakteristika der AD-Pathologie<sup>351</sup>. Zudem liegen einige der phänotypischen Veränderungen der BACE1-defizienten Mauslinie darin begründet, dass BACE1 eine kritische Rolle während der Neurogenese und Entwicklung einnimmt, wie unter anderem bei der Myelinisierung von Neuronen. Dieser Prozess ist allerdings im adulten Alter abgeschlossen<sup>352</sup>, wodurch eine Hypomyelinisierung unter BACE1-Inhibition im Erwachsenenalter eher unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus bleibt auch immer die Frage der Übertragbarkeit der im BACE1-defizienten Mausmodell beobachteten Phänotypen auf den Menschen.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Teil-Inhibierung von BACE1 zu einer effektiven Reduktion der A $\beta$ -Bildung führt und dadurch die AD-Pathologie signifikant reduziert werden kann, ohne die Nebenwirkungen der genetischen Ablation aufzuweisen, wie es in der BACE1-defizienten Mauslinie zu beobachten war<sup>353</sup>. Die Entdeckung einer protektiven APP-Punktmutation (Ala673Thr) im Menschen, die eine lebenslange Reduktion der A $\beta$ -Produktion um 40 % bewirkt, was ausreicht um den Ausbruch von AD zu verhindern<sup>353</sup>, gilt als Grundsatzbeweis dieser Hypothese. Seitdem werden industriell vermehrt BACE-Inhibitoren sowie BACE-Modulatoren, die die Aktivität des Enzyms verändern indem sie außerhalb des aktiven Zentrums binden<sup>354</sup>, hergestellt.

Bei BACE-Inhibitoren wird zwischen peptidischen und nicht-peptidischen Inhibitoren unterschieden. Zu den peptidischen Inhibitoren gehören unter anderem Molekülstrukturen wie Statine, Norstatine oder Hydroxyethylene. Diese wiesen jedoch, neben den hohen Produktionskosten, eine geringe Stabilität und orale Bioverfügbarkeit sowie eine mangelhafte Liquorgängigkeit auf<sup>355</sup>. Nicht-peptidische Inhibitoren, wie unter anderem Triazine und Guanidine, zeigen dagegen eine höhere Stabilität und besitzen ein niedrigeres Molekulargewicht, was dementsprechend zu einer besseren oralen Bioverfügbarkeit sowie Liquorgängigkeit führt<sup>356</sup>. Die von unterschiedlichen Pharmafirmen produzierten, nicht-peptidischen BACE-Inhibitoren bewirken eine signifikante Reduzierung der cerebralen A $\beta$ -Konzentration<sup>357,280,358,359</sup>, was ebenfalls zu einer Verringerung der A $\beta$ -Plaquelast in transgenen AD-Mausmodellen führt<sup>356,360,361</sup>. Neben der Bioverfügbarkeit war ein weiteres wichtiges Kriterium die Selektivität der Inhibitoren für BACE1 gegenüber anderen homologen Proteasen wie BACE2 oder Cathepsin-D (CatD). BACE2 übernimmt beispielsweise eine wichtige Funktion in der Melanogenese und Prozessierung von PMEL (engl. cell specific melanocyte protein), weshalb das BACE2-defiziente Mausmodell Pigmentierungsdefizite aufweist und ein silbergraues bis weißes Fell ausbildet<sup>362</sup>. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen BACE1 und BACE2 ist es schwierig, nicht-peptidische, niedermolekulare BACE-Inhibitoren zu entwickeln, die ausschließlich BACE1 inhibieren<sup>363</sup>. Die Selektivität der Inhibitoren gegenüber BACE1 zu BACE2 konnte jedoch im Laufe der Zeit stetig verbessert werden. Der nicht-peptidische BACE-Inhibitor CNP520 (Novartis) weist beispielsweise eine dreifach höhere Selektivität gegenüber BACE1 zu BACE2 auf<sup>364</sup>. Peptidische BACE-Inhibitoren zeigten teilweise allerdings eine tausendfach höhere Selektivität gegenüber BACE1 zu BACE2, schafften es aber aufgrund der zuvor aufgeführten Gründe nicht in die klinische Testphase<sup>365,366</sup>.

### 1.3.3 Stand und Erkenntnisse aus klinischen und vorklinischen BACE-Inhibitions Untersuchungen

Im Jahr 2018 befanden sich verschiedene BACE-Inhibitoren, darunter MK-8931 (Verubecestat) von Merck, JNJ-54 861 911 von Janssen, CNP520 von Novartis, AZD3293 (Lanabecestat) von AstraZeneca und Eli Lilly & Co. sowie E2609 (elenbecestat) von Eisai und Biogen in der klinischen Testphase-III<sup>367</sup>. Bis 2020 wurden allerdings alle diese Studien aus Gründen der Sicherheit, meist wurde eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeit beobachtet, oder aufgrund einer unzureichenden Wirkung, vorzeitig beendet<sup>368,369,370</sup>. Der BACE-Inhibitor MK-8931 beispielsweise scheiterte bei Patienten in der milden bis moderaten AD-Phase daran, die AD-Pathologie signifikant zu verlangsamen oder gar zu stoppen<sup>371,372</sup>. Ein Jahr später stellte Merck auch die klinische Studie in Patienten der prodromalen bis milden AD-Phase aufgrund von kognitiven Verschlechterungen bei der Versuchsgruppe ein<sup>373</sup>. In einem Mausmodell, welches das fluoreszierende Protein eGFP (engl.: enhanced green fluorescent protein) in spezifischen, einzelnen Nervenzellen exprimiert<sup>374</sup>, konnte die Plastizität von dendritischen Spines unter BACE-Inhibition mit der klinischen Dosis von MK-8931 mittels *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie chronisch untersucht werden. Unter BACE-Inhibi-

tion wurde ein Rückgang der dendritischen Spine-Dichte im Wildtyp Mausmodell beobachtet, was ebenfalls einen möglichen Erklärungsansatz für die observierten kognitiven Verschlechterungen in BACE-Inhibitor behandelten AD-Patienten bietet<sup>375</sup>. In dieser Studie wurde allerdings auch gezeigt, dass die Inhibition von BACE1 nicht zu einem Verlust der schon bestehenden Spines führt, sondern nur die Formation neuer Spines reduziert. Der observierte Effekt konnte nach Absetzen des Inhibitors revidiert werden<sup>375</sup>. Weitere vorklinische Studien im Wildtyp Mausmodell konnten darüber hinaus zeigen, dass der Effekt der BACE-Inhibition auf die Plastizität dendritischer Spines stark von der Dosierung des BACE-Inhibitors abhängt. Während hohe Inhibitor-Konzentrationen einen Rückgang der Spine-Plastizität bewirkten, wurde dieser Effekt bei niedrigeren Konzentrationen, die trotzdem das A $\beta$ -Level um 40 % senkten, nicht beobachtet<sup>376</sup>.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass der dosisabhängige Rückgang in der Spine-Dichte in der gestörten Spaltung von Sez6 begründet liegt. Sez6 wird, wie im Kapitel 1.3.1 beschrieben, exklusiv durch BACE1 gespalten und nimmt eine wichtige Rolle im Prozess der synaptischen Plastizität ein<sup>377</sup>.

Aus diesen vorklinischen Untersuchungen lässt sich für zukünftige klinische Studien zur BACE-Inhibition ableiten, dass eine BACE1-Inhibitor Dosierung gefunden werden muss, die ein Gleichgewicht zwischen der benötigten Hemmung von BACE1, um die A $\beta$ -Produktion zu reduzieren, sowie der notwendigen Aktivität von BACE1, um die Spaltung der nicht-amyloiden Substrate wie Sez6, NRG1 etc. zu gewährleisten, herstellt<sup>366</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch die BACE-Inhibition vor allem die Formation neuer A $\beta$ -Plaques verhindert wird. Das Wachstum von A $\beta$ -Ablagerungen konnte allerdings kaum verlangsamt werden<sup>234</sup>. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass für den Erfolg zukünftiger klinischer Studien der Therapieansatz einer präventiven BACE1-Inhibitor Behandlung mit einer adäquaten Inhibitor-Dosierung verfolgt werden muss.

#### 1.4 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt einer frühzeitigen sowie dosisabhängigen BACE-Inhibition auf die Pathogenese der Alzheimer Demenz im Hippocampus eines geeigneten AD-Mausmodells zu untersuchen und auf seine Suffizienz hin zu überprüfen, dem pathologischen Verlauf der AD signifikant entgegenwirken zu können.

Im Ersten Teil der Arbeit wurde das neu generierte AD-Mausmodell APP<sup>NL-G-F</sup> tiefgehend, anhand der A $\beta$ -Aggregation, der Neuroinflammation, der strukturellen Plastizität dendritischer Spines der CA1-Region sowie der hippocampusabhängigen kognitiven Leistung charakterisiert. Anhand dieser fundierten Analyse sollte evaluiert werden welches AD-Stadium dieses Mausmodell widerspiegelt und ob ein präventiver Therapieansatz mittels BACE1-Inhibition realisiert werden kann.

Im Anschluss sollte im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell eine ausgewogene Inhibition der BACE1-Aktivität gefunden werden, um einerseits die A $\beta$ -Produktion einzudämmen sowie andererseits die Spaltung anderer BACE1-Substrate wie SEZ6 zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Dosierungen des BACE-Inhibitors NB-360 von Novartis verwen-

det und der Effekt auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines im Hippocampus untersucht. Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben, wurde in vorherigen Studien ein dosisabhängiger negativer Effekt auf die Dichte sowie Plastizität dendritischer Spines im Wildtyp observiert<sup>376,375,377</sup>. Diese Beobachtung wurde als möglicher Erklärungsansatz für die kognitiven Verschlechterungen der BACE-Inhibitor behandelten AD-Patienten in den klinischen Studien postuliert<sup>350,350</sup>. Allerdings gilt zu bedenken, dass die BACE1-Konzentration und Aktivität im Gehirn von AD-Patienten und transgenen AD-Mausmodellen im Vergleich zu einem normalen, gesunden Gehirn, um das Zweifache erhöht ist<sup>378</sup>.

Nach der Evaluierung einer effektiven und ausgewogenen NB-360-Dosierung, welche auf Grundlage der observierten BACE-Inhibitor Effekte auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines der CA1-Region des Hippocampus erfolgte, wurden zudem die Auswirkungen einer langfristigen BACE-Inhibitor Behandlung auf die A $\beta$ -Last sowie auf die Neuroinflammation im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell ermittelt. Darüber hinaus wurde die kognitive Leistung nach einer achtmonatigen BACE-Inhibitor Behandlung überprüft.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Grundstein für die Beurteilung der Hypothesen legen, ob sich die BACE-Inhibition nach Evaluierung einer adäquaten Inhibitor-Dosierung als präventive und somit langfristige Therapie gegen AD eignet und effizient dem pathologischen Verlauf der Krankheit entgegenwirken kann.

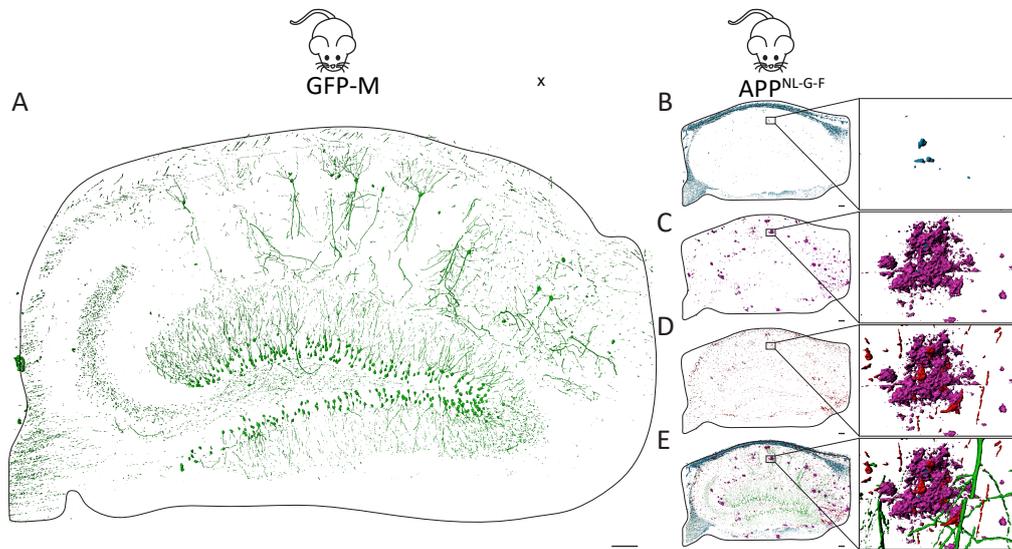
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Charakterisierung des APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell

Der größte Vorteil des APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodells ist der, dass APP nicht überexprimiert wird, wie es bei transgenen AD-Mausmodellen der Fall ist. Transgene AD-Mausmodelle weisen bedingt durch die unphysiologisch erhöhte Generierung von APP artifizielle Phänotypen auf, die zu Missdeutungen der AD-Pathologie führen können. Im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell wird APP dagegen auf einem endogenen Expressionslevel wie auch bei nicht-genveränderten Mäusen generiert. Das Vorkommen sowie die Ablagerung und Aggregation des pathogenen A $\beta$ 42-Peptides wird desweiteren aufgrund dreier Mutationen stark erhöht<sup>379</sup> (siehe Kapitel 4.1.2). Es wurde beschrieben, dass die APP<sup>NL-G-F</sup>-Mauslinie schon ab einem Alter von zweieinhalb Monaten A $\beta$ -Ablagerungen zeigt, wobei vor allem der Hippocampus sowie der Cortex betroffen sind<sup>379</sup>. Zudem wurde ein signifikanter Unterschied in der A $\beta$ -Last ab einem Alter von zwölf Monaten zwischen Männchen und Weibchen festgestellt. Bei einem Alter von zwölf Monaten ist die A $\beta$ -Last in Weibchen fast doppelt so hoch wie bei männlichen Tieren, wobei die Ursache noch nicht genau geklärt wurde<sup>380</sup>. Bei jüngeren Tieren wurden bislang keine geschlechtlichen Unterschiede in der A $\beta$ -Last festgestellt. Um das neue AD-Mausmodell weiter zu charakterisieren und seine Stärken sowie Limitationen herauszustellen, wurden verschiedene *ex* und *in vivo* Methoden im Rahmen dieser Arbeit angewendet. Zunächst wurden immunhistologische Färbungen zur A $\beta$ -Plaques Beschaffenheit angefertigt sowie die Dichte und die Morphologie dendritischer Spines in der CA1-Region des Hippocampus untersucht. Dies bildete die Grundlage für weiterführende chronische *in vivo* Experimente, bei denen wöchentlich die Plastizität der dendritischen Spines, in der CA1-Region des Hippocampus über einen Zeitraum von sechs Wochen analysiert wurde. Darüber hinaus wurden *in vivo* longitudinale  $\mu$ PET-Scans zur A $\beta$ -Belastung sowie zur Neuroinflammation durchgeführt. Anschließend wurde der MWM-Test zur Untersuchung der hippocampusabhängigen Lernfähigkeit und Gedächtnisformierung im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell angewendet.

Die Verkreuzung der APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie mit der Thy1.2-GFP-M-Linie ermöglichte die Untersuchung der dendritischen Spines im Hippocampus. Die Thy1.2-GFP-M-Linie exprimiert das grünfluoreszierende Protein eGFP insbesondere in Neuronen der neokortikalen Schicht V und der hippocampalen CA1-Region<sup>374</sup> (siehe Kapitel 4.1.2). Im Rahmen dieser Arbeit wird die gewonnene APP<sup>NL-G-F</sup> x Thy1.2-GFP-M-Linie weiter als APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie bezeichnet. Abbildung 8 zeigt die Expressierung von eGFP, die A $\beta$ -Last und die Immunantwort im Hippocampus eines APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieres mit einem Alter von fünf Monaten. Die Expressierung von eGFP in vereinzelt Pyramidenzellen der CA1-Region ermöglichte die Verfolgen einzelner Spines mittels der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie. Zudem konnte gezeigt werden, dass A $\beta$ -Plaques im APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Mausmodell überwiegend aus A $\beta$ -Oligomeren bestanden und nur einen kleinen Kern aus A $\beta$ -Fibrillen aufwiesen (siehe Abbildung 8B, C). Wie in Abbildung 8D zu sehen lösten die A $\beta$ -Ablagerungen im APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-

M-Mausmodell eine gemäßigte Aktivierung von Mikrogliazellen, immunogefärbt mit IBA-1 in ihrer Umgebung aus.



**Abbildung 8:** Einführung des verwendeten AD-Mausmodells APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M. A) Expressionsmuster von eGFP in einem sagittalen Gehirnschnitt des Hippocampus der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie. B) FSB bindet an die fibrillären Bestandteile der A $\beta$ -Ablagerungen. C) Fluoreszenzsignal der NAB228-Immunfärbung gegen A $\beta$ -Oligomere. D) Die A $\beta$ -Ablagerungen führten zu einer Immunreaktion und zu einer Ansammlung von aktivierten Mikrogliazellen, immunogefärbt mit dem Antikörper IBA-1. Die aktivierten Mikrogliazellen dringen bis zum fibrillären Kern des A $\beta$ -Plaques vor. In E) ist die Überlagerung der Färbungen von A, B, C und D zu sehen. In der rechten Spalte sind jeweils vergrößerte, dreidimensionale und volumengerenderte Bildausschnitte der Färbungen dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100  $\mu$ m in den Übersichtsbildern (A-E) sowie 5  $\mu$ m in den Vergrößerungsbildern von B-E.

Die folgenden Ergebnisse wurden teilweise in der geteilten Erstautorenschaft: Sacher C., Blume T. *et al.* 2019 veröffentlicht.

### 2.1.1 Das APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell bildet überwiegend A $\beta$ -Plaques von diffuser Morphologie aus

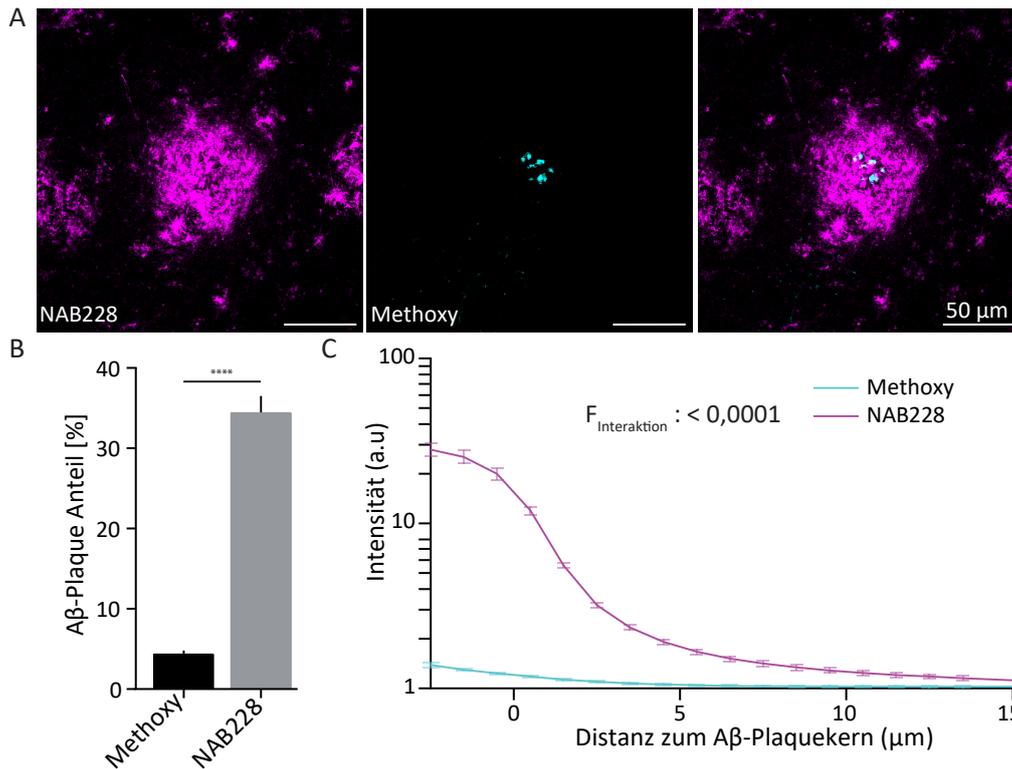
Um die Morphologie der extrazellulären A $\beta$ -Plaques im Hippocampus von APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren mit einem Alter von fünf Monaten zu untersuchen, wurden Immunfärbungen gegen A $\beta$ -Oligomere sowie Methoxy-X04-Färbungen gegen fibrilläres A $\beta$  angefertigt.

Bei dem Mausmodell APP<sup>NL-G-F</sup> war bei einem Alter von fünf Monaten der Anteil von dicht zusammengelagerten A $\beta$ -Fibrillen äußerst gering (siehe Abbildung 9B). Dagegen war der Anteil von akkumulierten A $\beta$ -Oligomeren deutlich erhöht (Mittelwerte A $\beta$ -Plaque Anteil %  $\pm$  SEM: Methoxy-X04 = 4,404  $\pm$  0,425; NAB228 = 34,49  $\pm$  2,022. P = <0,0001).

Mit abnehmender Distanz zum Kern des A $\beta$ -Plaques stieg die Intensität des NAB228-Signals signifikant und gegenüber der Intensität des Methoxy-X04-Signals um das Zehnfache an (siehe Abbildung 9C, Mittelwerte Intensität  $\pm$  SEM: Distanz 0,5  $\mu$ m: NAB228 = 11,979  $\pm$  0,666; Methoxy-X04 = 1,181  $\pm$  0,016. Distanz 5,5  $\mu$ m: Methoxy-X04 = 1,046  $\pm$  0,013; NAB228 = 1,669  $\pm$  0,062. Distanz 14,5  $\mu$ m: Methoxy-X04 = 1,025  $\pm$  0,012; NAB228 = 1,131

$\pm 0,034$ .  $P = <0,0001$ ).

Zusammenfassend zeigte die Auswertung der A $\beta$ -Plaques Beschaffenheit, dass die A $\beta$ -Ablagerungen im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell nur einen sehr geringen Anteil von dichtgepackten A $\beta$ -Fibrillen und dafür einen signifikant höheren Anteil von diffusen A $\beta$ -Oligomeren aufwies, wodurch sich das APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell weiter von den meisten transgenen AD-Mausmodellen unterscheidet. Die meisten transgenen AD-Mausmodelle bilden nämlich sogenannte *Cored-Plaques* aus<sup>381</sup>. *Cored-Plaques* bestehen überwiegend aus dichtgepackten A $\beta$ -Fibrillen (siehe Kapitel 1.2.4).



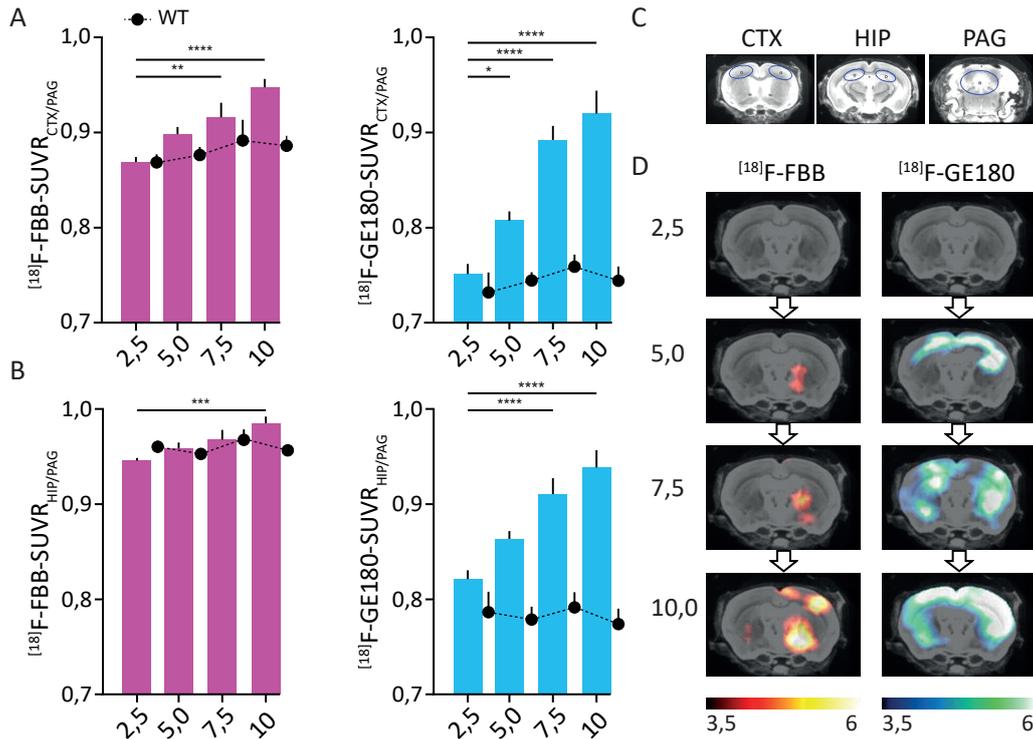
**Abbildung 9:** A $\beta$ -Ablagerungen des APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodells bestanden hauptsächlich aus A $\beta$ -Oligomeren. A) Immunfärbung gegen A $\beta$ -Oligomere (NAB228, linkes Bild) sowie die Färbung von A $\beta$ -Fibrillen (Methoxy-X04, mittleres Bild). Im rechten Bild ist die Überlagerung beider Färbungen zu sehen. B) Der Anteil der akkumulierten A $\beta$ -Oligomere war gegenüber dem Anteil von A $\beta$ -Fibrillen deutlich erhöht ( $t(8)=14,56$ ,  $P <0,0001$ ). C) Die Fluoreszenzintensität der NAB228-Immunfärbung war gegenüber der Methoxy-X04-Färbung mit abnehmender Distanz zum A $\beta$ -Plaqueskern signifikant erhöht ( $F_{\text{Interaktion}}(43\ 704)=14,79$ ,  $P <0,0001$ ). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SEM;  $n = 9$  Versuchstiere mit mindestens 42 analysierten Plaques pro Versuchstier. Zweistichproben- $t$ -Test sowie zweifaktorielle Varianzanalyse. Die Daten waren nach D'Agostino & Pearson Test sowie Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. \*\*\*\*  $P <0,0001$ .

### 2.1.2 Parallele Zunahme der A $\beta$ -Last und der Neuroinflammation im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell über das Alter

Mittels radioaktiv markierter Trägerstoffe (Radiotracer) wurde in dieser Arbeit der Verlauf der zerebralen A $\beta$ -Last sowie die Neuroinflammation im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell ab einem Alter von zweieinhalb Monaten und über acht Monate *in vivo* verfolgt. Als A $\beta$ -Radiotracer

wurde die Fluor-markierte Substanz  $^{18}\text{F}$ -Florbetaben ( $^{18}\text{F}$ -FBB)<sup>382</sup> und für die Verfolgung der Neuroinflammation der Radiotracer  $^{18}\text{F}$ -GE180 verwendet<sup>383</sup>.  $^{18}\text{F}$ -GE180 bindet das 18kDa-Translokator-Protein (TSPO). Zur Kalkulierung des SUVR (engl. standardized uptake value ratio) wurde das Kernkomplex periaquäduktales Grau (PAG) im Mittelhirn als Referenzregion verwendet (siehe Kapitel 4.4.4). Als VOI (engl. volume of interest) wurden bilateral die frontalen Cortexe sowie bilateral die Hippocampi festgelegt (siehe Abbildung 10C). Der entsprechende Zielparameter setzte sich somit aus dem Verhältnis des standardisierten Aufnahmewertes im Cortex/Hippocampus gegenüber der Referenzregion zusammen ( $\text{SUVR}_{\text{CTX/PAG}}$ ;  $\text{SUVR}_{\text{HIP/PAG}}$ ). Die erste Untersuchung mit zweieinhalb Monaten diente als Referenzwert für die folgenden Untersuchungen mit fünf und siebeneinhalb sowie der finalen Untersuchung mit zehn Monaten.

Die  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Linie zeigte einen signifikant erhöhten kortikalen  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR mit siebeneinhalb Monaten im Vergleich zu zweieinhalb Monaten (siehe Abbildung 10A). Die kortikale Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FBB stieg kontinuierlich mit dem Alter an, wobei mit zehn Monaten der höchste kortikale  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR im Vergleich zur ersten Untersuchung mit zweieinhalb Monaten observiert wurde (Mittelwerte  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR  $\pm$  SEM: 2,5 =  $0,869 \pm 0,005$ . 5,0 =  $0,898 \pm 0,007$ . 7,5 =  $0,916 \pm 0,015$ . 10,0 =  $0,948 \pm 0,009$ .  $P = <0,0001$ ). Die kortikale Aufnahme des  $^{18}\text{F}$ -GE180-Radiotracers stieg ebenfalls über das Alter kontinuierlich und noch deutlicher als die  $^{18}\text{F}$ -FBB-Aufnahme an (siehe Abbildung 10B). Bei einem Alter von fünf Monaten wurde bei den  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren ein signifikant erhöhter  $^{18}\text{F}$ -GE180-SUVR gegenüber dem Referenzwert gemessen, welcher bis zur letzten Untersuchung bei einem Alter von zehn Monaten weiter signifikant anstieg (Mittelwerte  $^{18}\text{F}$ -GE180-SUVR  $\pm$  SEM: 2,5 =  $0,750 \pm 0,01$ . 5,0 =  $0,806 \pm 0,01$ . 7,5 =  $0,891 \pm 0,015$ . 10,0 =  $0,918 \pm 0,024$ .  $P = <0,0001$ ). Im Hippocampus war ein signifikanter Anstieg des  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR erst bei einem Alter von siebeneinhalb Monaten gegenüber dem Referenzwert der ersten Untersuchung zu beobachten. Eine weitere signifikante Erhöhung des  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR im Vergleich zum Referenzwert wurde bei der finalen Untersuchung mit zehn Monaten detektiert (Mittelwerte  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR  $\pm$  SEM: 2,5 =  $0,946 \pm 0,003$ . 5,0 =  $0,959 \pm 0,025$ . 7,5 =  $0,968 \pm 0,01$ . 10,0 =  $0,985 \pm 0,007$ .  $P = 0,002$ ). Eine signifikante Erhöhung des  $^{18}\text{F}$ -GE180-SUVR wurde ebenfalls bei einem Alter von siebeneinhalb Monaten observiert, der bis zu einem Alter von zehn Monaten, verglichen mit dem Referenzwert, weiter signifikant anstieg (Mittelwerte  $^{18}\text{F}$ -GE180-SUVR  $\pm$  SEM: 2,5 =  $0,822 \pm 0,0089$ . 5,0 =  $0,863 \pm 0,034$ . 7,5 =  $0,91 \pm 0,017$ . 10,0 =  $0,938 \pm 0,018$ .  $P = <0,0001$ ).



**Abbildung 10:** Alters abhängiger Anstieg der A $\beta$ -Last und der Neuroinflammation im frontalen Cortex sowie Hippocampus der APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie. A) Im Cortex war eine signifikante Steigerung des standardisierten Aufnahmewertquotienten (SUVR) für <sup>[18]F</sup>-FBB longitudinal über das Alter ( $F(3, 56) = 11,53, P = <0,0001$ ), sowie für <sup>[18]F</sup>-GE180 zu beobachten ( $F(3, 58) = 28,37, P = <0,0001$ ). B) Im Hippocampus war ebenfalls eine signifikante aber nicht so prägnante Steigerung des <sup>[18]F</sup>-FBB-SUVR ( $F(3, 57) = 5,826, P = 0,0015$ ) sowie des <sup>[18]F</sup>-GE180-SUVR ( $F(3, 58) = 16,2, P = <0,0001$ ) in APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren mit zunehmendem Alter zu verzeichnen. Die gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert von Wildtypstieren (WT) über die Zeit ( $n = 6 - 15$ ). Die Daten werden als Mittelwerte der SUVR dargestellt  $\pm$  SEM;  $n = 13$ . Signifikante Änderungen gegenüber dem Referenzwert wurden mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse mit Messwiederholung und anschließendem Turkey-post-hoc-test evaluiert. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Die Daten waren nach D'Agostino & Pearson Test normalverteilt. C) Definition der VOI anhand koronarer und axialer MRT-Schnitte für Cortex (CTX), Hippocampus (HIP) und periaquäduktales Grau (PAG). D) Effektgrößen sind repräsentiert durch Cohen's d. Voxel-basierte Analysen und fusioniert auf frontale MRT-Vorlagen. Gezeigt wird der Gruppenvergleich von APP<sup>NL-G-F</sup>- mit gleichaltrigen Wildtypstieren für <sup>[18]F</sup>-FBB sowie <sup>[18]F</sup>-GE180. Signifikanzen wurden mittels Zweistichproben-t-Test ermittelt.  $P < 0,001, k < 20$  Voxels.

Die Voxel-basierte Auswertung stellt die Aufnahme der beiden Radiotracer von APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypstieren dar. Den größten Unterschied bei der Aufnahme des <sup>[18]F</sup>-FBB-Radiotracers zwischen APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren und Wildtypstieren wurde im linken Thalamus beobachtet ( $P < 0,001$ , unkorrigiert, siehe Abbildung 10D, erste Reihe). Ab einem Alter von fünf Monaten wurde ein erhöhtes Signal in dieser Region bei APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren beobachtet, welches sich bis zu einem Alter von zehn Monaten weiter verstärkte. In neokortikalen Bereichen wurden ein signifikant erhöhter SUVR erst bei einem Alter von zehn Monaten festgestellt. In diesem Stadium zeigte schon 29 % des gesamten Hirnvolumens ein erhöhtes <sup>[18]F</sup>-FBB-Signal im Vergleich zu Wild-

typtieren. Die Voxel-basierte  $^{18}\text{F}$ -GE180-Auswertung zeigte eine erhöhte  $^{18}\text{F}$ -GE180-Aufnahme im frontalen Cortex sowie im Hippocampus ab einem Alter von fünf Monaten in  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren im Vergleich zu Wildtyptieren ( $P < 0,001$ , unkorrigiert, siehe Abbildung 10D, zweite Reihe). In diesem Altersstadium zeigte schon 18 % des totalen Hirnvolumens von  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren ein erhöhtes  $^{18}\text{F}$ -GE180-Signal im Vergleich zu Wildtyptieren. Bei einem Alter von zehn Monaten zeigten  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstiere ein erhöhtes  $^{18}\text{F}$ -GE180-Signal in 48 % ihres totalen Hirnvolumens ( $P < 0,001$ , unkorrigiert).

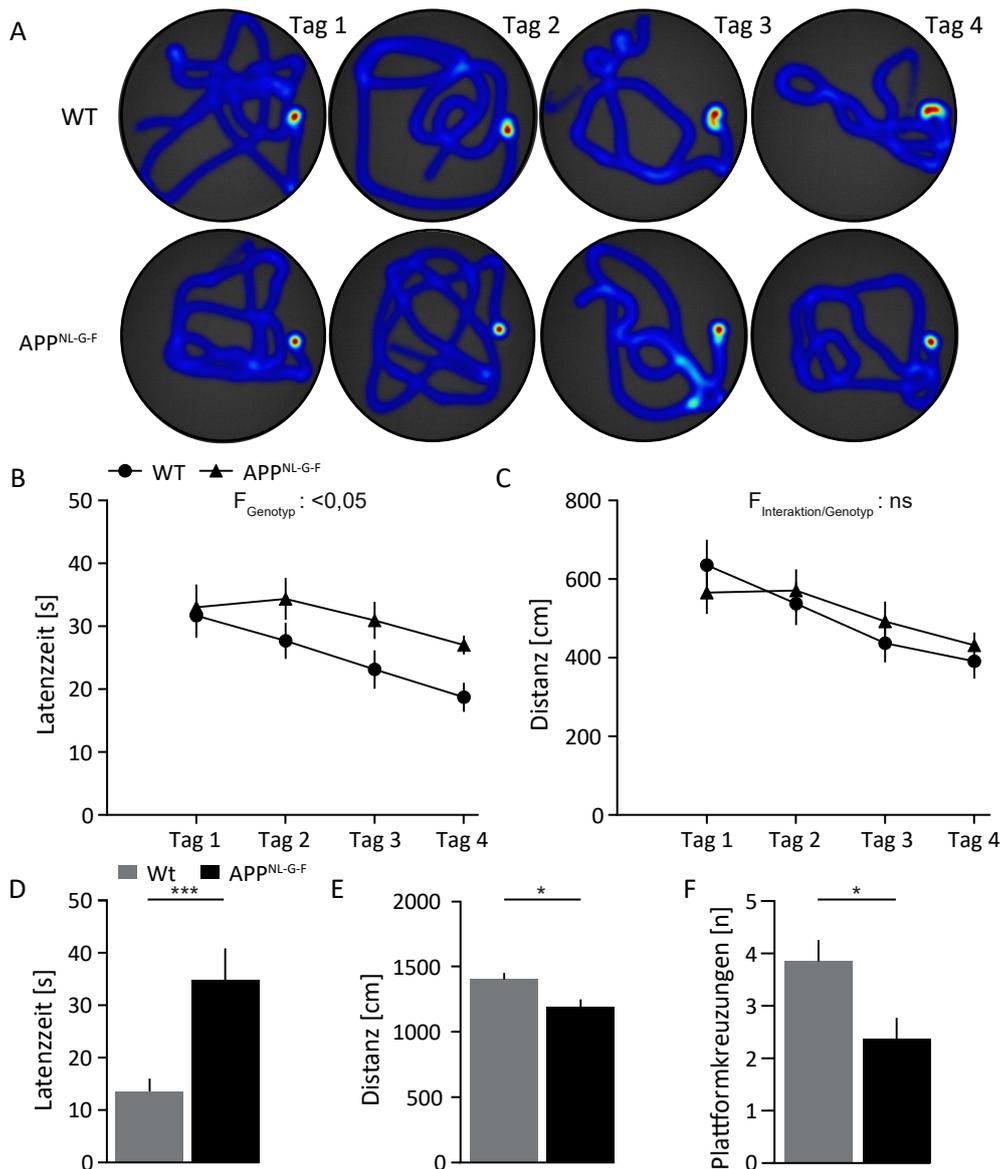
Zusammenfassend wurde eine progressive, parallele Zunahme der  $\text{A}\beta$ -Last sowie der Neuroinflammation im  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Mausmodell mit dem Alter mittels seriellem  $^{18}\text{F}$ -FBB und  $^{18}\text{F}$ -GE180- $\mu\text{PET}$  beobachtet. Allerdings war die Signalzunahme im  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Mausmodell beim TSPO- $\mu\text{PET}$  über die Zeit fast doppelt so hoch wie die Signalzunahme beim  $\text{A}\beta$ - $\mu\text{PET}$ . Die longitudinale  $\mu\text{PET}$ -Analyse der  $\text{A}\beta$ -Last war durch die ausgebreitete zerebrale Pathologie (siehe Abbildung 28) und die relativ geringe Fibrillarität der  $\text{A}\beta$ -Plaques zwar limitiert, allerdings unter Verwendung der Referenzregion PAG valide. Für die detaillierte Beschreibung der Definition der Referenzregion siehe Kapitel 4.4.4.

### **2.1.3 Das $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Mausmodell zeigte eine defizitäre hippocampusabhängige Lernleistung sowie Beeinträchtigungen beim Abrufen des Referenzgedächtnisses**

Der MWM-Test startete zwei Wochen nach den  $\mu\text{PET}$ -Untersuchungen. Die  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstiere hatten somit ein Alter von zehneinhalb Monaten erreicht. Beim MWM-Test sollten die Versuchstiere mit Hilfe von Markierungen am Beckenrand den Weg zur Plattform erlernen und abspeichern. Während des viertägigen Trainings mit jeweils vier Durchläufen pro Versuchstier, wurde zunächst die Lernfähigkeit und beim anschließenden Transfer-Test das Referenzgedächtnis der Versuchstiere analysiert. Der Versuchsablauf ist in Kapitel 4.5 detaillierter erörtert.

An jedem der vier Trainingstage wurde für  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstiere im Vergleich zu Wildtyptieren eine signifikant höhere Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform gemessen (siehe Abbildung 11B, Mittelwerte Latenzzeit der Testdurchläufe in  $\text{s} \pm \text{SEM}$ : Tag 1: WT =  $31,704 \pm 3,522$ ;  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$  =  $33,032 \pm 3,612$ . Tag 2: WT =  $27,690 \pm 2,869$ ;  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$  =  $34,351 \pm 3,332$ . Tag 3: WT =  $23,126 \pm 3,069$ ;  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$  =  $30,950 \pm 2,960$ . Tag 4: WT =  $18,723 \pm 2,308$ ;  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$  =  $27,023 \pm 1,508$ .  $P = 0,0355$ ). Zur Datenvisualisierung wurden Heatmaps der vier Testdurchläufe von einzelnen Versuchstieren abgebildet, welche den Mittelwert der Latenzzeit des jeweiligen Testdurchlaufs der beiden Versuchsgruppen repräsentierten (siehe Abbildung 11A). Beide Versuchsgruppen legten allerdings eine ähnliche Distanz bis zur Plattform zurück (siehe Abbildung 11C, Mittelwerte Distanz der Testdurchläufe in  $\text{cm} \pm \text{SEM}$ : Tag 1: WT =  $635,654 \pm 64,495$ ;  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$  =  $565,797 \pm 54,157$ . Tag 2: WT =  $537,743 \pm 54,824$ ;  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$  =  $571,001 \pm 54,024$ . Tag 3: WT =  $437,144 \pm 48,729$ ;  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$  =  $492,574 \pm 50,311$ . Tag 4: WT =  $391,180 \pm 44,453$ ;  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$  =  $431,394 \pm 33,029$ .  $P = \text{ns}$ ). Beim Transfer-Test wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Latenzzeit bis zum erstmaligen Erreichen der Plattform beobachtet.

gem Erreichen der früheren Plattformposition bei APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren im Vergleich zu Wildtypstieren beobachtet (siehe Abbildung 11D, Mittelwerte Latenzzeit in s  $\pm$  SEM: WT =  $13,57 \pm 2,437$ ; APP<sup>NL-G-F</sup> =  $34,85 \pm 6,044$ . P = 0,0007). Über die gesamte Testdauer von 70 Sekunden legten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere eine signifikant geringere Distanz zurück (siehe Abbildung 11E, Mittelwerte Distanz in cm  $\pm$  SEM: WT =  $1399 \pm 50,39$ ; APP<sup>NL-G-F</sup> =  $1191 \pm 56,03$ . P = 0,0141). Darüber hinaus kreuzten sie die vorherige Position der Plattform während der 70 Sekunden Testdauer signifikant seltener als Wildtypstiere (siehe Abbildung 11F, Mittelwerte Frequenz in n  $\pm$  SEM: WT =  $3,85 \pm 1,814$ ; APP<sup>NL-G-F</sup> =  $2,364 \pm 0,4106$ . P = 0,0248).



**Abbildung 11:** Die Lernfähigkeit sowie das Abfragen des Referenzgedächtnisses war in APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren signifikant beeinträchtigt. A) Heatmaps einzelner WT-Versuchstiere (1.Reihe) sowie APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere (2.Reihe), die den Mittelwert der Latenzzeit der jeweiligen Testdurchläufe repräsentierten. B,C) Quantifizierung der Latenzzeit zur Plattform ( $F_{\text{Genotyp}}(1, 31) = 4,833, P = 0,0355$ ) sowie der zurückgelegten Distanz während der Trainingstage ( $F_{\text{Genotyp}}(1, 31) = 0,1054, P = 0,7477$ ). D-F) Quantifizierung der Latenzzeit ( $t(28)=3,82, P = 0,0007$ ), der zurückgelegten Distanz ( $t(32)=2,598, P = 0,0141$ ) sowie der Plattformkreuzungen beim Transfer-Test ( $t(29)=2,368, P = 0,0248$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte der Testdurchläufe  $\pm$  SEM;  $n = 21$  WT,  $n = 12$  APP<sup>NL-G-F</sup>. Signifikante Änderungen über die Trainingszeit zwischen WT und APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit angeschlossenem Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. Signifikanzen beim Transfer-Test wurden mittels Zweistichproben-t-Test ermittelt. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*  $P < 0,0001$ . Die Daten waren nach D'Agostino & Pearson Test normalverteilt.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse des MWM-Test, dass die Lernleistung sowie das Abfragen von Erlerntem beim APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell gegenüber Wildtyptieren signifikant beeinträchtigt war.

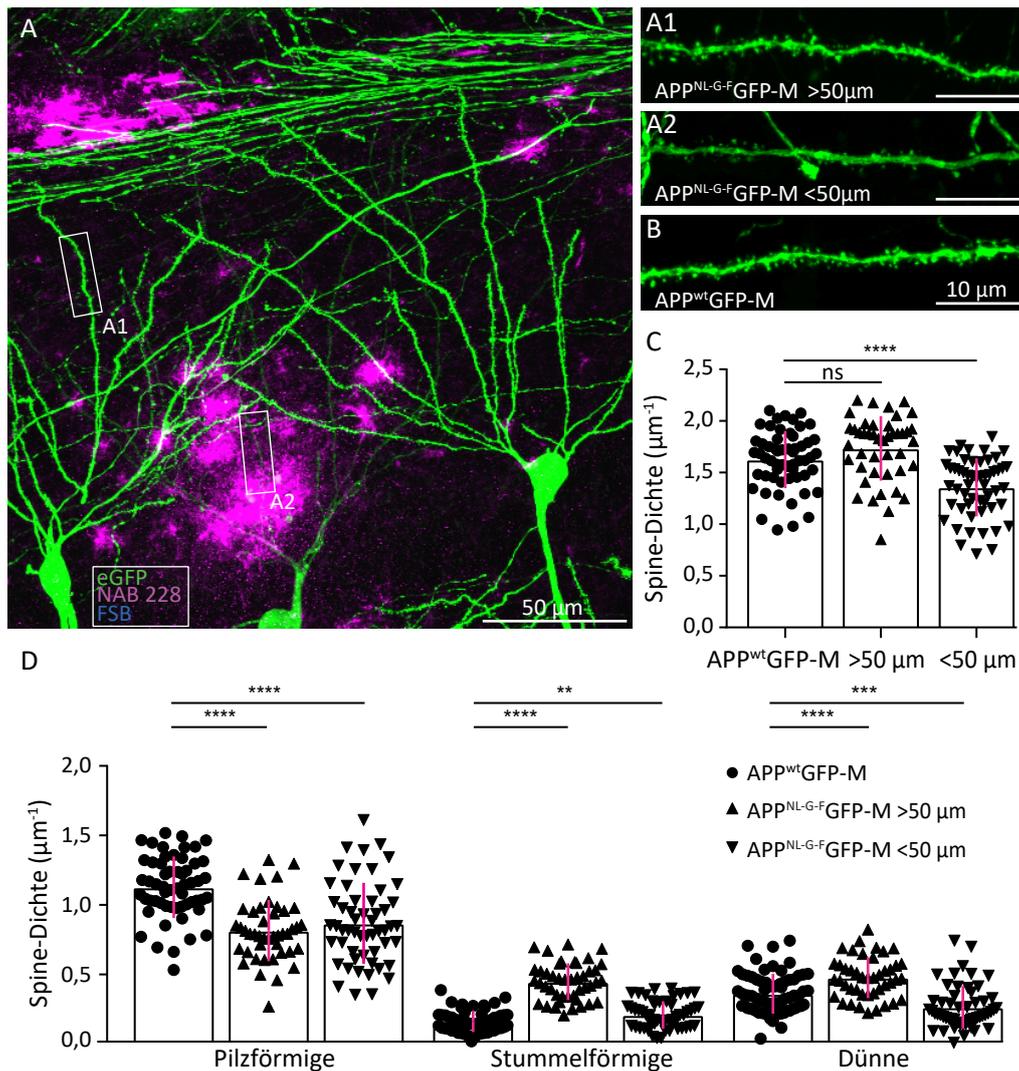
APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere wiesen unter anderem eine signifikant höhere Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform während der Trainingstage auf. Ihre beeinträchtigte Lernfähigkeit spiegelte sich auch im Transfer-Test wider. Beim Abfragen des zuvor erlernten Weges zur Plattform zeigten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere ebenfalls eine signifikant erhöhte Latenzzeit bis zum erstmaligem Erreichen der früheren Plattformposition.

#### **2.1.4 An und abseits von A $\beta$ -Ablagerungen in der hippocampalen CA1-Region weist das APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell einen Verlust von pilzförmigen Spines auf**

Eines der charakteristischsten AD-Merkmale ist der Verlust von Synapsen. Bei diesem Prozess, der durch eine erhöhte neurotoxische Konzentration des A $\beta$ -Peptides sowie der Aggregation des Tau-Proteins hervorgerufen wird, wird zunächst die Degeneration von dendritischen Spines bewirkt<sup>138,139,40,242,243</sup> (siehe Kapitel 1.2.5).

Bisher wurde der Verlust dendritischer Spines vorrangig in AD-Mausmodellen untersucht, die APP überexprimieren und dadurch eine erhöhte A $\beta$ -Konzentration aufweisen. Diese AD-Mausmodelle zeigten einen Verlust dendritischer Spines im Umkreis von 50  $\mu$ m von A $\beta$ -Ablagerungen<sup>384,172,385,386,246,251</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dichte und die Morphologie dendritischer Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus in der Nähe und abseits von A $\beta$ -Ablagerungen im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell untersucht. Wie bereits erwähnt wurde zur Visualisierung dendritischer Spines die Thy1.2-GFP-M-Linie eingekreuzt (siehe Kapitel 4.1.2). Als Kontrolltiere wurden auf C57Bl/6 zurückgekreuzte APP<sup>NL-G-F</sup>-Mäuse gekreuzt mit der Thy1.2-GFP-M-Linie verwendet. Die resultierende APP<sup>wt</sup>GFP-M-Linie war nur noch für eGFP transgen und bildete keine AD-Pathologie aus. Für diesen Versuch wurden APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M- sowie APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstiere in einem Alter von fünf Monaten verwendet und *ex vivo* die dendritische Spine-Dichte und Morphologie in der Nähe (Entfernung <50  $\mu$ m) und abseits (Entfernung >50  $\mu$ m) von FSB und NAB228 immunogefärbten A $\beta$ -Ablagerungen untersucht. Es wurden stets basale Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus des zweiten dendritischen Verzweigungsgrades analysiert. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Dendriten senkrecht zur optischen Achse des Objektivs verliefen<sup>387,388</sup>.

Für die basalen Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region abseits von A $\beta$ -Ablagerungen der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie wurde eine leichte, nicht signifikante Erhöhung in der Spine-Dichte beobachtet (Mittelwerte Spines/ $\mu$ m  $\pm$  SEM: APP<sup>wt</sup>GFP-M = 1,625  $\pm$  0,037; >50  $\mu$ m APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 1,735  $\pm$  0,047. P = 0,066), wohingegen in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen ein signifikanter Verlust in der Spine-Dichte in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren gegenüber APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren detektiert wurde (Mittelwerte Spines/ $\mu$ m  $\pm$  SEM: APP<sup>wt</sup>GFP-M = 1,625  $\pm$  0,037; <50  $\mu$ m APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 1,358  $\pm$  0,038. P = <0,0001).



**Abbildung 12:** Die Dichte pilzförmiger Spines der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie war im *Stratum Oriens* der hippocampalen CA1-Region in der Nähe sowie abseits von A $\beta$ -Ablagerungen signifikant erniedrigt. A) Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme der CA1-Region des Hippocampus der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Mauslinie. eGFP-Expression (grün) in hippocampalen Pyramidenzellen. A $\beta$ -Ablagerungen wurden mittels NAB228 (Magenta) sowie FSB (Cyan) gefärbt. A1, A2, B) Konfokalmikroskopische Aufnahmen von zweifachverzweigten, basalen Dendriten des *Stratum oriens* abseits (Abstand >50  $\mu$ m) und in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen (Abstand <50  $\mu$ m) sowie von der Kontrollgruppe APP<sup>wt</sup>GFP-M. C) Quantifizierung der Spine-Dichte abseits ( $t(99)=1,859$ ,  $P = 0,066$ ) und in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen ( $t(109)=5,042$ ,  $P < 0,0001$ ). D) Abseits und in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen wurde ein signifikanter Verlust von pilzförmigen Spines in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren observiert ( $t(99)=7,01$ ,  $P < 0,0001$ ); ( $t(109)=5,284$ ,  $P < 0,0001$ ). Die Dichte stummelförmiger Spines dagegen war abseits und in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen signifikant erhöht ( $t(99)=13,53$ ,  $P < 0,0001$ ); ( $t(109)=2,745$ ,  $P = 0,0071$ ). Die Spine-Dichte dünner Spines war abseits von A $\beta$ -Ablagerungen ebenfalls signifikant erhöht ( $t(109)=4,13$ ,  $P < 0,0001$ ) und in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen signifikant erniedrigt gegenüber Kontrolltieren ( $t(119)=3,56$ ,  $P = 0,0005$ ). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SEM;  $n = 5$  männliche Versuchstiere pro Gruppe mit  $N = 7 - 10$  Dendriten pro Versuchstier. Signifikanzen wurden mittels Zweistichproben- $t$ -Test ermittelt. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Die Daten waren nach D'Agostino & Pearson Test normalverteilt.

Zudem konnte ein signifikanter Verlust von pilzförmigen Spines abseits und in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen festgestellt werden (Mittelwerte pilzförmige Spines/ $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ : APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $1,129 \pm 0,029$ ;  $>50 \mu\text{m}$  APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,818 \pm 0,033$ ;  $<50 \mu\text{m}$  APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,87 \pm 0,04$ . P =  $<0,0001$ ; P =  $<0,0001$ ) sowie ein signifikanter Anstieg in der Anzahl von stummelförmigen Spines abseits und in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden (Mittelwerte stummelförmige Spines/ $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ : APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,164 \pm 0,01$ ;  $>50 \mu\text{m}$  APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,448 \pm 0,02$ ;  $<50 \mu\text{m}$  APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,21 \pm 0,013$ . P =  $<0,0001$ ; P =  $0,0071$ ). Die Spine-Dichte von dünnen Spines abseits von A $\beta$ -Ablagerungen in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren war zudem signifikant erhöht, wohingegen sie in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen, gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigt war (Mittelwerte dünne Spines/ $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ : APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,353 \pm 0,018$ ;  $>50 \mu\text{m}$  APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,469 \pm 0,022$ ;  $<50 \mu\text{m}$  APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,256 \pm 0,021$ . P =  $<0,0001$ ; P =  $0,0005$ ).

Diese Beobachtungen sind im Einklang mit einer vorherigen Studie, die ebenfalls eine Reduktion in der Anzahl von hippocampalen, pilzförmigen Spines sowie eine Erhöhung der stummelförmigen Spines in sechs Monate alten APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren gegenüber Kontrolltieren feststellte. Allerdings detektierte diese Studie einen signifikanten Anstieg in der Spine-Dichte in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren gegenüber Kontrolltieren, ohne jedoch zu spezifizieren, ob die untersuchten Dendriten in der Nähe oder abseits von A $\beta$ -Ablagerungen lokalisiert waren<sup>389</sup>.

Zusammenfassend war die Spine-Dichte basaler Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie nur in der Nähe von A $\beta$ -Ablagerungen gegenüber Kontrolltieren signifikant erniedrigt. Die Morphologie der Spines war allerdings auch abseits von A $\beta$ -Ablagerungen signifikant beeinträchtigt. Der Verlust pilzförmiger Spines in der Nähe und abseits von A $\beta$ -Ablagerungen deutete auf ein Defizit im hippocampus-abhängigem Lernen und Gedächtnisprozess hin und lässt zudem eine Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität der dendritischen Spines vermuten. Die zuvor mittels des MWM-Tests observierten Beeinträchtigungen in der Lehrfähigkeit und der Gedächtniskonsolidierung unterstrichen diese Hypothese. Deshalb wurde im Rahmen dieser Studie in den folgenden Versuchen mittels *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie überprüft ob eine Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität der dendritischen Spines in der CA1-Region des Hippocampus im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell vorlag.

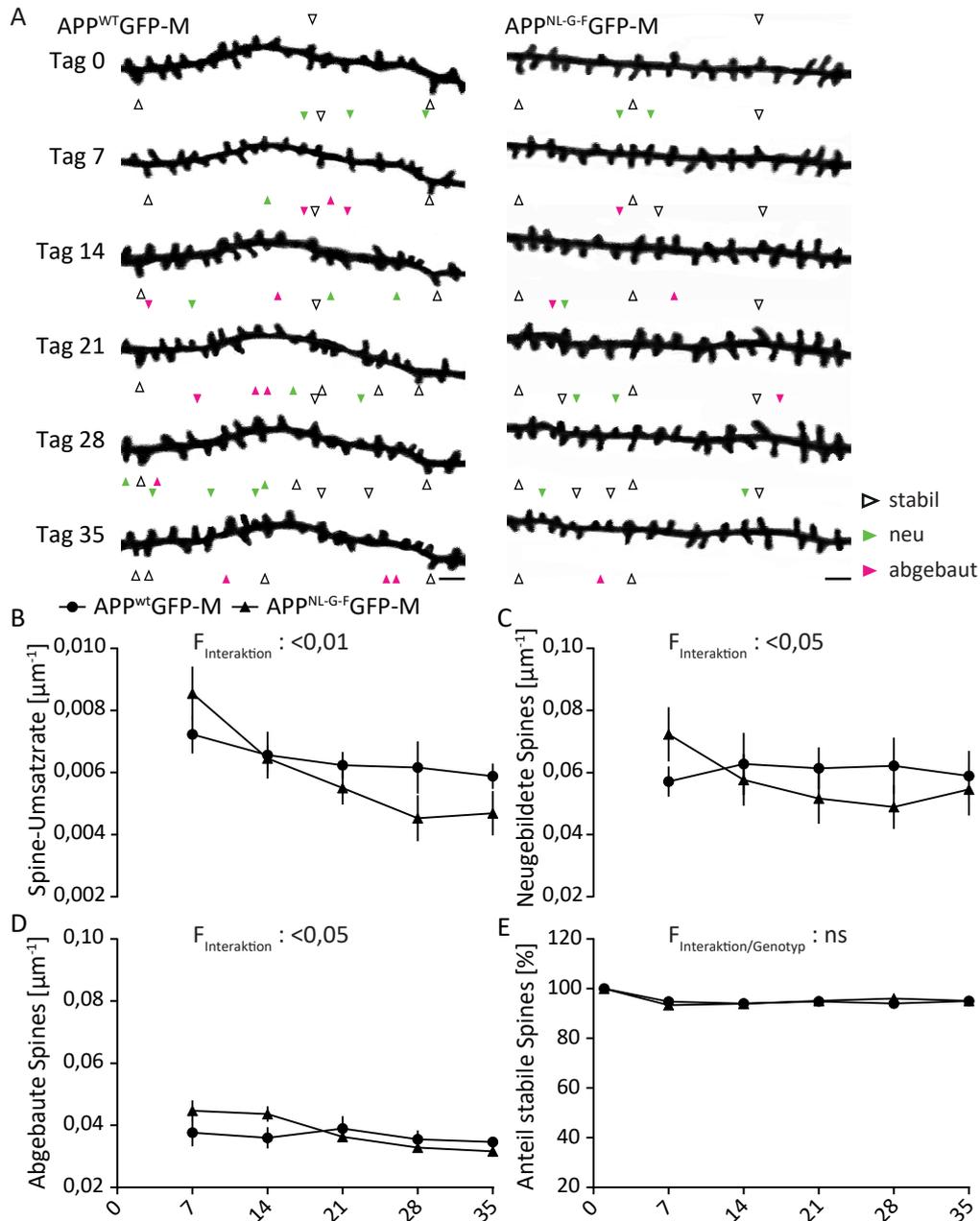
### **2.1.5 Die strukturelle Plastizität dendritischer Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus ist im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell signifikant beeinträchtigt**

Anhand der im vorherigen Abschnitt beschriebenen *ex vivo* Untersuchungen konnte im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell eine Beeinträchtigung der Spine-Morphologie basaler Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus observiert werden. In der absoluten Spine-Dichte abseits von A $\beta$ -Ablagerungen wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt. Diese Observierung ließ eine *in vivo* 2-Photonen

Untersuchung sehr vielversprechend erscheinen. Der entscheidende Vorteil der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie gegenüber histologischen *ex vivo* Endpunktanalysen ist der, dass die Kinetik einzelner dendritischer Spines chronisch über einen längeren Zeitraum im gleichen Versuchstier nachvollzogen werden kann. Wenn man hinzuzieht, dass im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell vor allem die Dichte der pilzförmigen Spines, die Spines die eine stabile synaptische Verbindungen zu Präsynapsen eingehen und deshalb in Bezug auf den Mechanismus des Lernens und der Gedächtnisbildung als erinnernde Spines gelten<sup>74</sup>, signifikant erniedrigt war und die Dichte der dünnen Spines, die Spines die als sehr flexibel und transient gelten und damit in Bezug auf den Mechanismus des Lernens und der Gedächtnisbildung zu den lernenden Spines zählen<sup>74</sup>, signifikant erhöht war, stellte sich die Frage, ob die beeinträchtigte Spine-Morphologie im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell durch eine veränderte strukturelle Plastizität der dendritischen Spines bedingt wurde. Um diese Frage zu klären wurde in den folgenden Experimenten mittels *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie die strukturelle Plastizität dendritischer Spines der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie gegenüber der Kontrolllinie APP<sup>wt</sup>GFP-M abseits von A $\beta$ -Ablagerungen untersucht. Beide Mauslinien wiesen eine starke, zytosolische Expression des grün fluoreszierenden Proteins eGFP in vereinzelt Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus auf. Die Pyramidenzellen wurden durch die Implantation eines hippocampalen Fensters der Intravitalmikroskopie zugänglich gemacht. Diese Methodik wurde im Rahmen dieser Arbeit im Labor etabliert und ist Kapitel 4.3.1 detaillierter beschrieben. Anhand dreidimensionaler Übersichtsbilder, die ebenfalls die Zellsomata der Pyramidenzellen umfassten, wurde der Mindestabstand von über 50  $\mu$ m zu FSB-positiven A $\beta$ -Ablagerungen der Dendriten des *Stratum oriens* überprüft sowie ihr dendritischer Verzweigungsgrad nachvollzogen. Von senkrecht zur optischen Achse des Objektivs verlaufenden, basalen Dendriten des zweiten Verzweigungsgrades wurden anschließend hochaufgelöste, dreidimensionale Aufnahmen angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen wurde die Kinetik einzelner dendritischer Spines über einen Zeitraum von sechs Wochen nachvollzogen und analysiert (siehe Kapitel 4.3.2).

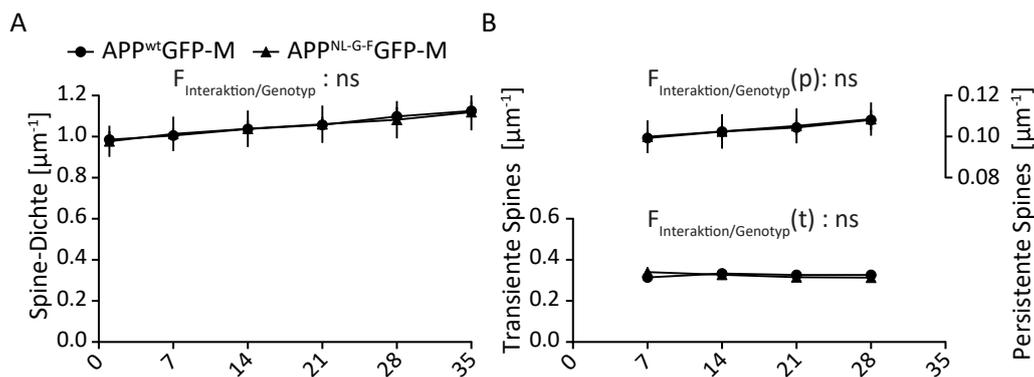
In der Spine-Umsatzrate wurde ein signifikanter Rückgang bei APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren gegenüber APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren beobachtet (siehe Abbildung 13B). Bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt sank die Spine-Umsatzrate der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstiere um 45,16 %, wohingegen bei den Kontrolltieren nur ein leichter Rückgang um 14,29 % zu beobachten war (Mittelwerte Spine-Umsatzrate/ $\mu$ m  $\pm$  SEM: Tag 7: APP<sup>wt</sup>GFP-M = 0,007  $\pm$  0,001; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 0,009  $\pm$  0,001. Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M = 0,006  $\pm$  0,0004; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 0,005  $\pm$  0,001. P = 0,006). Die Umsatzrate setzt sich aus dem Anteil neugebildeter sowie abgebauter Spines zusammen, weshalb sich die Reduktion der Spine-Umsatzrate auch in einem signifikanten Rückgang in der Dichte von neugebildeten Spines in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren gegenüber Kontrolltieren widerspiegelte (siehe Abbildung 13C). Bis zum Tag 28 sank die Dichte neugebildeter Spines um 31,94 %. Vom Tag 28 auf Tag 35 stieg der Anteil neugebildeter Spines wiederum um 12,24 % an, sodass insgesamt eine Reduzierung um 23,61 % von Tag 1 bis Tag 35 observiert wurde (Mittelwerte neugebildete Spines/ $\mu$ m  $\pm$  SEM: Tag 7: APP<sup>wt</sup>GFP-M = 0,057  $\pm$  0,005; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 0,072  $\pm$  0,009).

Tag 28: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,062 \pm 0,009$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,049 \pm 0,007$ . Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,059 \pm 0,008$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,055 \pm 0,008$ . P = 0,021). Zudem wurde ein signifikanter Rückgang in der Dichte der abgebauten Spines der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstiere gegenüber den Kontrolltieren detektiert (siehe Abbildung 13D). Dabei sank die Dichte abgebauter Spines der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstiere bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt um 28,89 %. Bei den Kontrolltieren dagegen konnte nur ein leichter Rückgang um 7,89 % beobachtet werden (Mittelwerte abgebaute Spines/ $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ : Tag 7: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,038 \pm 0,004$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,045 \pm 0,003$ . Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,035 \pm 0,001$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,032 \pm 0,002$ . P = 0,024). Der Rückgang in der Dichte abgebauter Spines lässt sich dadurch erklären, dass in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren ebenfalls weniger neue Spines gebildet wurden. Neugebildete Spines unterliegen einer höheren Fluktuation und werden eher wieder abgebaut als bereits bestehende Spines<sup>60</sup>. Der Anteil stabiler Spines unterschied sich nicht zwischen den beiden Genotypen (siehe Abbildung 13E, Mittelwerte stabile Spines in %  $\pm \text{SEM}$ : Tag 7: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $94,791 \pm 0,525$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $93,335 \pm 0,495$ . Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $95,014 \pm 0,641$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $95,119 \pm 1,098$ . P = ns).



**Abbildung 13:** Die strukturelle Plastizität dendritischer Spines von APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren war abseits von A $\beta$ -Ablagerungen signifikant beeinträchtigt. A) *In vivo* 2-Photonen mikroskopische Aufnahmen eGFP-markierter basaler Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus der APP<sup>wt</sup>GFP-M sowie einer APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie. Exemplarisch werden stabile Spines durch weiße Pfeilspitzen markiert, neugebildete Spines durch cyanfarbende Pfeilspitzen und abgebaute Spines durch magentafarbene Pfeilspitzen. B-D) Quantifizierung der Spine-Umsatzrate ( $F_{\text{Interaktion}}(4, 40) = 4,182, P = 0,0064$ ), Dichte neugebildeter Spines ( $F_{\text{Interaktion}}(4, 40) = 3,266, P = 0,0208$ ), sowie der Dichte abgebaute Spines ( $F_{\text{Interaktion}}(4, 40) = 3,164, P = 0,0238$ ) in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M gegenüber APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren. E) Der Anteil stabiler Spines unterschied sich nicht zwischen den Versuchsgruppen ( $F_{\text{Genotyp}}(1, 40) = 0,04388, P = 0,8383$ ). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SEM;  $n = 6$  männliche Versuchstiere pro Gruppe mit  $N = 7 - 10$  Dendriten pro Versuchstier. Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit angeschlossenen Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Daten waren nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Maßstab repräsentiert  $2 \mu\text{m}$ .

Über den beobachteten Zeitraum von 35ig Tagen wurde, wie in den vorhergegangenen *ex vivo* Untersuchungen, kein signifikanter Unterschied in der Spine-Dichte der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren gegenüber den Kontrolltieren beobachtet (siehe Abbildung 14A). Über die Zeit stieg die Spine-Dichte bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt in beiden Genotypen an (Mittelwerte Spines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  SEM: Tag 7: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,985 \pm 0,041$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,978 \pm 0,076$ . Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $1,125 \pm 0,048$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $1,119 \pm 0,089$ . P = 0,006). Die Dichte persistenter sowie transienter Spines unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Genotypen (siehe Abbildung 14B). Allerdings konnte bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt ein leichter Anstieg in beiden Genotypen in der Dichte persistenter Spines verzeichnet werden (Mittelwerte persistenter Spines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  SEM: Tag 7: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,993 \pm 0,038$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,999 \pm 0,080$ . Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $1,082 \pm 0,048$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $1,085 \pm 0,081$ . P = 0,959). Die Dichte transienter Spines blieb in beiden Genotypen über den Beobachtungszeitraum relativ konstant (Mittelwerte transienter Spines/ $\mu\text{m}$   $\pm$  SEM: Tag 7: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,031 \pm 0,0002$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,034 \pm 0,002$ . Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $0,033 \pm 0,0007$ ; APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M =  $0,031 \pm 0,001$ . P = 0,952).



**Abbildung 14:** Die Spine-Dichte von basalen Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie ist abseits von A $\beta$ -Ablagerungen nicht beeinträchtigt. A) Quantifizierung der Spine-Dichte ( $F_{\text{Genotyp}}(1, 10) = 0,001\ 006$ , P = 0,9753). B) Die Dichte persistenter und transienter Spines von APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren unterschied sich ebenfalls nicht gegenüber APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren ( $F_{\text{Genotyp}}(p)(1, 10) = 0,0027$ , P = 0,9593;  $F_{\text{Genotyp}}(t)(1, 10) = 0,0038$ , P = 0,9521). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SEM; n = 6 männliche Versuchstiere pro Gruppe mit N = 7 - 10 Dendriten pro Versuchstier. Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit angeschlossenen Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; \*\*\*\*P < 0,0001. Die Daten waren nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt.

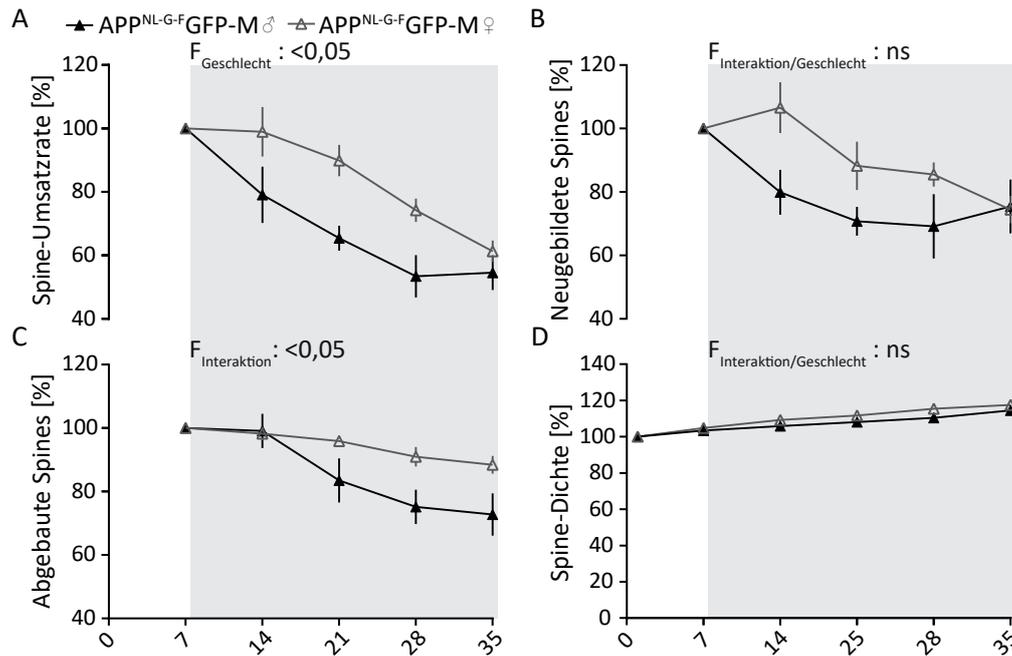
Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass die strukturelle Plastizität der dendritischen Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren abseits von A $\beta$ -Ablagerungen signifikant beeinträchtigt war, was sich allerdings noch nicht signifikant auf die Spine-Dichte auswirkte.

### 2.1.6 Weibliche APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere wiesen einen erhöhten Anteil an abgebauten Spines gegenüber männlichen APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren auf

Für das APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell ist in der Literatur ein Unterschied in der AD-Pathologie zwischen älteren weiblichen und männlichen Tieren beschrieben. Bei älteren weiblichen Tieren wurde eine fast doppelt so hohe A $\beta$ -Last beobachtet wie in gleichaltrigen männlichen Tieren<sup>380</sup>. Im Rahmen dieser Studie wurde deshalb untersucht, ob es einen Unterschied in der strukturellen Plastizität zwischen weiblichen und männlichen Versuchstieren der APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie gibt. In weiblichen APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren wurde eine signifikant höhere Spine-Umsatzrate gegenüber den männlichen Versuchstieren beobachtet (siehe Abbildung 15A).

Die Spine-Umsatzrate in weiblichen Versuchstieren sank allerdings bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt ebenfalls um 38,68 % und näherte sich somit dem Wert der männlichen APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren stark an (Mittelwerte Spine-Umsatzrate in %  $\pm$  SEM: Tag 35: weibliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 61,32  $\pm$  3,42; männliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 54,57  $\pm$  5,47. P = 0,0112). Die erhöhte Spine-Umsatzrate in weiblichen APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren ergab sich vorrangig aus einem signifikant erhöhten Anteil abgebauter Spines (siehe Abbildung 15C, Mittelwerte abgebauter Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35: weibliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 88,456  $\pm$  2,824; männliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 72,77  $\pm$  6,66. P = 0,022). Der Anteil neu gebildeter Spines unterschied sich in männlichen und weiblichen APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 15B, Mittelwerte Neugebildeter Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35: weibliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 74,44  $\pm$  4,33; männliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 75,44  $\pm$  8,48. P = 0,0510). Die Spine-Dichte in männlichen sowie weiblichen APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren war ebenfalls vergleichbar (siehe Abbildung 15D, Mittelwerte Spine-Dichte in %  $\pm$  SEM: Tag 35: weibliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 117,5  $\pm$  3,13; männliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 114,56  $\pm$  1,96. P = 0,1739).

In weiblichen APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren wurde zudem *in vivo* eine deutlich höhere Anzahl FSB-positiver A $\beta$ -Ablagerungen beobachtet, wodurch die mikroskopische Aufnahme von Dendriten abseits von A $\beta$ -Ablagerungen erschwert wurde. Darüber hinaus wurden in weiblichen Versuchstieren eine höhere Anzahl an eGFP-positiver Neurone observiert. Dies erschwerte die Nachverfolgung einzelner, ungekreuzter Dendriten und beeinträchtigte anschließend ebenfalls die Analyse der dendritischen Spine-Kinetik. Aus diesen Gründen wurden in den nachfolgenden Versuchen zur präventiven therapeutischen Intervention mittels BACE-Inhibierung nur männliche APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstiere verwendet.



**Abbildung 15:** Die Spine-Umsatzrate in weiblichen  $APP^{NL-G-F}GFP-M$ -Versuchstieren ist bedingt durch einen erhöhten Anteil an abgebauten Spines signifikant erhöht. A-D) Quantifizierung der Spine-Umsatzrate ( $F_{\text{Geschlecht}}(1, 9) = 10,12$ ,  $P = 0,0112$ ), der Dichte neu gebildeter Spines ( $F_{\text{Geschlecht}}(1, 9) = 5,063$ ,  $P = 0,0510$ ), sowie der Dichte abgebauter Spines ( $F_{\text{Interaktion}}(4, 36) = 3,272$ ,  $P = 0,0218$ ) in weiblichen  $APP^{NL-G-F}GFP-M$ - gegenüber männlichen  $APP^{NL-G-F}GFP-M$ -Versuchstieren. E) Die Spine-Dichte unterschied sich nicht zwischen den Geschlechtern ( $F_{\text{Geschlecht}}(1, 9) = 2,181$ ,  $P = 0,1739$ ). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SEM;  $n = 5 - 6$  Versuchstiere pro Gruppe mit  $N = 7 - 10$  Dendriten pro Versuchstier. Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit angeschlossenem Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Die Daten waren nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt.

## 2.2 Inhibierung der $\beta$ -Sekretase BACE1 mittels NB-360 als präventiver Therapieansatz im AD-Mausmodell $APP^{NL-G-F}$

In den folgenden Versuchen wurde die BACE-Inhibierung mittels des Inhibitors NB-360 von Novartis als präventiver Therapieansatz im  $APP^{NL-G-F}$ -Mausmodell verfolgt. Zunächst wurden die Effekte zweier NB-360-Dosierungen auf die bereits beeinträchtigte strukturelle Plastizität dendritischer Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region abseits von  $A\beta$ -Ablagerungen untersucht. Es sollte evaluiert werden, ob eine frühzeitige Intervention mittels BACE-Inhibition einen positiven Effekt auf die beeinträchtigte Kinetik dendritischer Spines im  $APP^{NL-G-F}GFP-M$ -Mausmodell ausübt.

Der Effekt der BACE-Inhibition auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines wurde in vorherigen Studien nur im somatosensorischen Cortex in Wildtypieren analysiert<sup>376,375,350</sup>. Im AD-Kontext stellt der Hippocampus allerdings eine interessantere Hirnregion dar, da die Hippocampusformation, anders als der somatosensorische Cortex, die zentrale Schaltstelle für den Mechanismus des Lernens und der Gedächtnisbildung bildet.

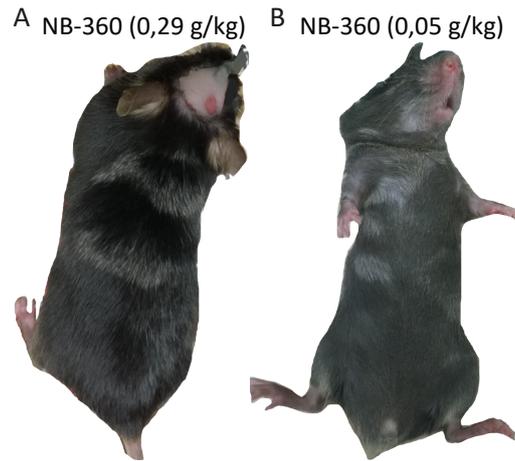
Um die vorliegende Arbeit mit vorherigen Studien zum Effekt der BACE-Inhibition auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines der Pyramidenzellen des somatosensorischen Cortex von Wildtyptieren vergleichen zu können, wurden zunächst die Auswirkungen einer hohen und einer niedrigen NB-360-Dosierung auf die Plastizität dendritischer Spines der CA1-Region des Hippocampus in den Kontrolltieren APP<sup>wt</sup>GFP-M evaluiert.

Darüber hinaus wurden die Auswirkungen einer langfristigen BACE-Inhibition, welche durch den präventiven Therapieansatz notwendig werden würde, auf die A $\beta$ -Last und die Neuroinflammation sowie auf die kognitive Leistung im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell untersucht. Bei diesen Untersuchungen wurde die NB-360-Dosierung verwendet, welche in den vorherigen Experimenten zur strukturellen Spine-Plastizität als therapeutisch effektiv evaluiert wurde.

### **2.2.1 Der BACE-Inhibitor NB-360 bewirkt eine Änderung der Fellpigmentierung in APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren**

Der BACE-Inhibitor NB-360 von Novartis wurde in Futterpellets verabreicht. In Wildtyptieren wurde eine A $\beta$ 40-Hemmung von 84,4 % nach einer sechstägigen Behandlung mittels des BACE-Inhibitors NB-360 (0,25 g/kg) erzielt. Die NB-360-Dosierung 0,05 g/kg bewirkte eine A $\beta$ 40-Reduktion von 78 %<sup>390</sup>. Eine Behandlung mit dem BACE-Inhibitor NB-360 erfolgte ohne Beeinträchtigung des Gesundheitsstatus oder Körpergewicht der Versuchstiere. Es konnte allerdings nach einer zweiwöchigen NB-360-Behandlung bei beiden Dosierungen eine Veränderung der Fellpigmentierung der Versuchstiere beobachtet werden (siehe Abbildung 16).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen der BACE1- und BACE2-Sekretase blockieren die gegenwärtigen BACE-Inhibitoren ebenfalls die  $\beta$ -Sekretase BACE2. BACE2 übernimmt, wie in Kapitel 1.3.2 näher beschrieben, eine wichtige Funktion in der Melanogenese<sup>362</sup>. Der Phänotyp der Fellpigmentveränderung unter NB-360-Behandlung ist somit nicht der Inhibition von BACE1, sondern der gleichzeitigen und unspezifischen Blockierung der BACE2-Aktivität zuzuschreiben.



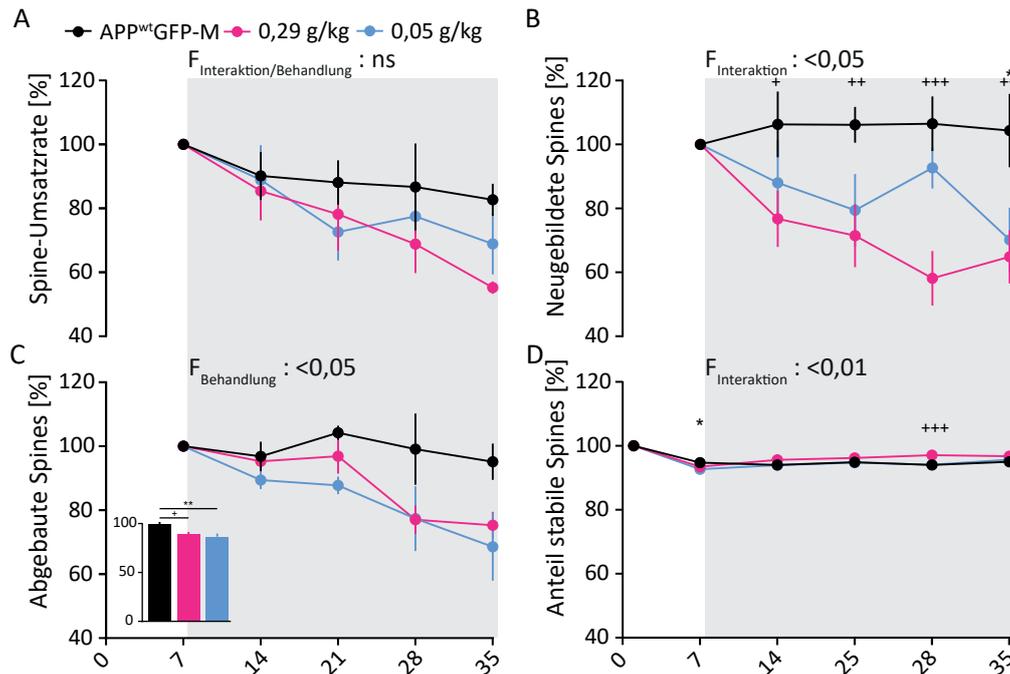
**Abbildung 16:** Auswirkung der chronischen pharmakologischen BACE-Inhibition mittels NB-360 auf die Fellpigmentierung der APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstiere. Die Veränderung der Fellpigmentierung war bei jedem Versuchstier nach spätestens einer vierzehntägigen Behandlung zu sehen.

### 2.2.2 In APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren beeinträchtigt die BACE-Inhibition mittels NB-360 dosisabhängig die Kinetik und Dichte dendritischer Spines der CA1-Region des Hippocampus

Die *in vivo* 2-Photonen mikroskopische Untersuchung erfolgte in APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren analog zum Versuch 2.1.5 und ist detailliert im Kapitel 4.3.2 beschrieben. Vor Therapiebeginn wurden zwei Aufnahmezeitpunkte als interner Referenzwert für die Spine-Kinetik und Dichte aufgenommen. Die Nachverfolgung der Kinetik einzelner dendritischer Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus erfolgte anschließend in wöchentlichen Intervallen. Es wurden basale Dendriten des zweiten Verzweigungsgrades mikroskopiert. Die 28-tägige BACE-Inhibitor Behandlung mittels NB-360 wurde in zwei Dosierungen (0,05 g/kg und 0,29 g/kg) durchgeführt. Die BACE-Inhibitor Intervention startete mit einem Alter von vier Monaten.

Es wurde ein leichter aber nicht signifikanter Rückgang der Spine-Umsatzrate unter BACE-Inhibition mittels beider NB-360-Dosierungen im APP<sup>wt</sup>GFP-M-Mausmodell beobachtet (siehe Abbildung 17A, Mittelwerte Spine-Umsatzrate in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $82,68 \pm 5,02$ ; 0,29 g/kg =  $55,25 \pm 1,93$ ; 0,05 g/kg =  $68,9 \pm 9,53$ .  $P = 0,2968$ ). Beim Anteil neugebildeter Spines wurde ein signifikanter Rückgang unter der hohen NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) über den gesamten Behandlungszeitraum festgestellt (siehe Abbildung 17B). Bis zum Tag 28 sank der Anteil neugebildeter Spines auf den niedrigsten Wert. Da der Anteil neugebildeter Spines danach nochmal leicht anstieg, wurde insgesamt eine Reduktion um 35,07 % unter der 0,29 g/kg NB-360-Dosierung observiert. Unter der niedrigen NB-360-Dosierung (0,05 g/kg) sank der Anteil neugebildeter Spines kontinuierlich bis zum Tag 21 und stieg zum Tag 28 ebenfalls an. Da der Anteil neugebildeter Spines bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt erneut stark sank, wurde insgesamt eine Reduktion um 29,83 % beobachtet (Mittelwerte neugebildete Spines %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $106,48 \pm 11,48$ ;

0,29 g/kg =  $64,93 \pm 8,39$ ; 0,05 g/kg =  $70,17 \pm 10,1$ .  $P = 0,0132$ ). Im Anteil der abgebauten Spines wurde ebenfalls ein signifikanter Rückgang unter beiden NB-360-Dosierungen beobachtet (siehe Abbildung 17C). In der niedrig dosierten NB-360-Behandlungsgruppe sank der Anteil an abgebauten Spines bis zum letzten Behandlungszeitpunkt um 31,43 %. Bei der hoch dosierten NB-360-Behandlungsgruppe wurde eine Reduktion um 24,68 % beobachtet (Mittelwerte abgebauter Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $95,15 \pm 5,68$ ; 0,29 g/kg =  $75,32 \pm 4,19$ ; 0,05 g/kg =  $68,57 \pm 10,582$ .  $P = 0,0356$ ). Um den Behandlungseffekt der beiden NB-360-Dosierungen gegenüber der Kontrollgruppe prägnanter herauszustellen, wurde neben der zweifaktoriellen Varianzanalyse noch eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt (Mittelwerte abgebauter Spines in %  $\pm$  SEM: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $99,06 \pm 2,57$ ; 0,29 g/kg =  $88,91 \pm 2,55$ ; 0,05 g/kg =  $86,72 \pm 3,06$ .  $P = 0,0039$ ). Wie in Abbildung 17D zu sehen, nahm der Anteil stabiler Spines im APP<sup>wt</sup>GFP-M-Mausmodell unter der BACE-Inhibitor Intervention mittels beider NB-360-Dosierungen signifikant zu (Mittelwerte stabile Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $95,01 \pm 0,64$ ; 0,29 g/kg =  $96,77 \pm 0,34$ ; 0,05 g/kg =  $95,69 \pm 0,37$ .  $P = 0,0056$ ).

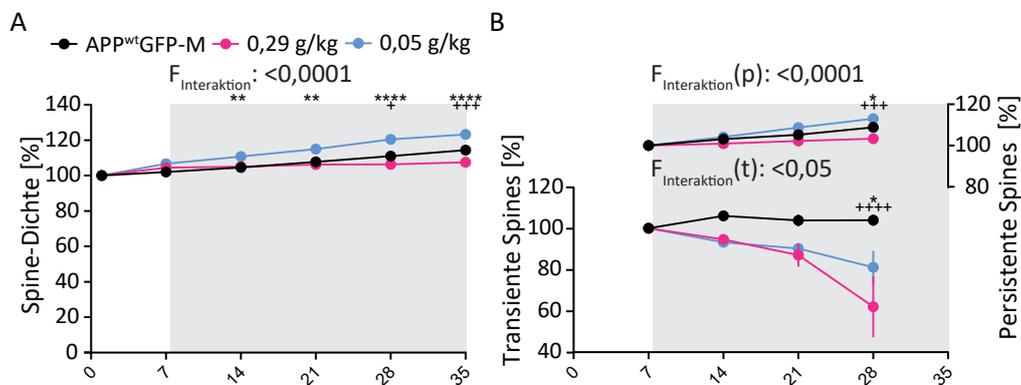


**Abbildung 17:** Die Bildung neuer dendritischer Spines im *Stratum oriens* der CA1-Region ist in APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren unter BACE-Inhibition signifikant erniedrigt. A) Die BACE-Inhibitor Behandlung bewirkte unter beiden NB-360-Dosierungen (0,29 g/kg und 0,05 g/kg) einen negativen Trend in der Spine-Umsatzrate ( $F_{\text{Behandlung}}(2, 13) = 1,336, P = 0,2968$ ). B-C) Der Anteil neugebildeter Spines ( $F_{\text{Interaktion}}(8, 52) = 2,744, P = 0,0132$ ) sowie der Anteil abgebaute Spines ( $F_{\text{Behandlung}}(2, 13) = 4,359, P = 0,0356$ ) waren unter BACE-Inhibition mittels beider NB-360-Dosierungen signifikant reduziert. Der Behandlungseffekt gegenüber der Kontrollgruppe wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse weiter analysiert ( $F_{\text{Einfaktorielle v.}}(2, 82) = 5,954, P = 0,0039$ ). D) Die BACE-Inhibitor Intervention wirkte sich signifikant auf den Anteil stabiler Spines aus ( $F_{\text{Interaktion}}(10, 65) = 2,829, P = 0,0056$ ). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SEM;  $n = 5 - 6$  Versuchstiere pro Gruppe mit  $N = 7 - 10$  Dendriten pro Versuchstier. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit angeschlossenen Bonferroni-post-hoc-test, bei Erreichen einer Signifikanz in der Behandlung wurde im Anschluss eine einfaktorierliche Varianzanalyse mit angeschlossenen Bonferroni-post-hoc-test durchgeführt, um die Signifikanzen der Behandlungsgruppen zu erhalten. \*/+P <0,05; \*\*/+P <0,01; \*\*\*/+++P <0,001; \*\*\*\*/++++P <0,0001. Die Daten waren nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt.

Darüber hinaus wurde in APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren unter BACE-Inhibition eine Abweichung in der Spine-Dichte gegenüber der Kontrollgruppe observiert (siehe Abbildung 18A). In der niedrig dosierten NB-360-Behandlungsgruppe wurde ein signifikanter Anstieg in der Spine-Dichte ab der ersten Behandlungswoche observiert, wobei die Spine-Dichte am letzten Beobachtungszeitpunkt gegenüber der Kontrollgruppe um 8,9 % erhöht war. Dagegen wurde in der hoch dosierten NB-360-Behandlungsgruppe eine signifikante Reduktion in der Spine-Dichte ab der dritten Behandlungswoche und schlussendlich am letzten Beobachtungszeitpunkt um 6,9 % gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet (Mittelwerte Spine-Dichte in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M =  $114,41 \pm 1,87$ ; 0,29 g/kg =  $107,52 \pm 2,1$ ; 0,05 g/kg =  $123,31 \pm 1,9$ .  $P = <0,0001$ ).

Die signifikanten Änderungen in den Spine-Dichten unter BACE-Inhibition sind durch die signifikanten Änderungen in den Dichten persistenter Spines zu erklären (siehe Abbildung 18B). Unter der niedrigen NB-360-Dosierung wurde ein signifikanter Anstieg in der Dichte persistenter Spines bis zum letzten Aufnahmezeitpunkt um 13,02 % beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, dass unter der niedrigen NB-360-Dosierung zwar ebenfalls signifikant weniger Spines gebildet wurden, die Spines die gebildet wurden allerdings vermehrt persistent waren. Der Anstieg im Anteil persistenter Spines könnte auch die Erhöhung der Spine-Dichte erklären, dies wird weiter in Kapitel 3.2.1 diskutiert. Unter der höheren NB-360-Dosierung wurde dagegen eine signifikante Erniedrigung in der Dichte persistenter Spines bis zum letzten Aufnahmezeitpunkt gegenüber den Kontrolltieren beobachtet (Mittelwerte persistente Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M = 108,82  $\pm$  1,45; 0,29 g/kg = 103,32  $\pm$  1,64; 0,05 g/kg = 113,02  $\pm$  1,2.  $P = <0,0001$ ). Die Dichte transientser Spines differenzierte ebenfalls signifikant von der Kontrollgruppe, wobei unter beiden NB-360-Dosierungen eine signifikante Erniedrigung observiert wurde (Mittelwerte transiente Spine in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>wt</sup>GFP-M = 104  $\pm$  2,75; 0,29 g/kg = 62,02  $\pm$  14,78; 0,05 g/kg = 81,12  $\pm$  8,01.  $P = <0,0172$ ).

Allerdings wurde ebenfalls beobachtet, dass der Referenzwert - die ersten beiden Beobachtungszeitpunkte - zwischen der Kontrollgruppe und der niedrig NB-360 dosierten Behandlungsgruppe sich ebenfalls voneinander unterschied, was den Effekt der BACE-Behandlung nochmal verstärkte. Dieser Aspekt wird in Kapitel 3.2.1 weiter diskutiert.



**Abbildung 18:** Die Spine-Dichte basaler Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus in APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren ist unter BACE-Inhibition signifikant beeinträchtigt. A) Unter der hohen NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) ist eine signifikante Reduktion der Spine-Dichte zu beobachten, wohingegen unter der niedrigen NB-360-Dosierung (0,05 g/kg) eine signifikante Erhöhung der Spine-Dichte beobachtet wurde ( $F_{\text{Interaktion}}(10, 65) = 11,05$ ,  $P = <0,0001$ ). B) Zudem wurde eine signifikante Erniedrigung unter der hohen NB-360-Dosierung sowie eine signifikante Erhöhung unter der niedrigen NB-360-Dosierung im Anteil persistenter Spines observiert ( $F_{\text{Interaktion}}(6, 39) = 7,643$ ,  $P = <0,0001$ ). Der Anteil transientser Spines wurde bei beiden NB-360-Dosierung signifikant erniedrigt ( $F_{\text{Interaktion}}(6, 39) = 2,977$ ,  $P = 0,0172$ ). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SEM;  $n = 5 - 6$  Versuchstiere pro Gruppe mit  $N = 7 - 10$  Dendriten pro Versuchstier. Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit angeschlossener Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. \*/+P  $<0,05$ ; \*\*/+P  $<0,01$ ; \*\*\*/+P  $<0,001$ ; \*\*\*\*/+P  $<0,0001$ . Die Daten waren nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt.

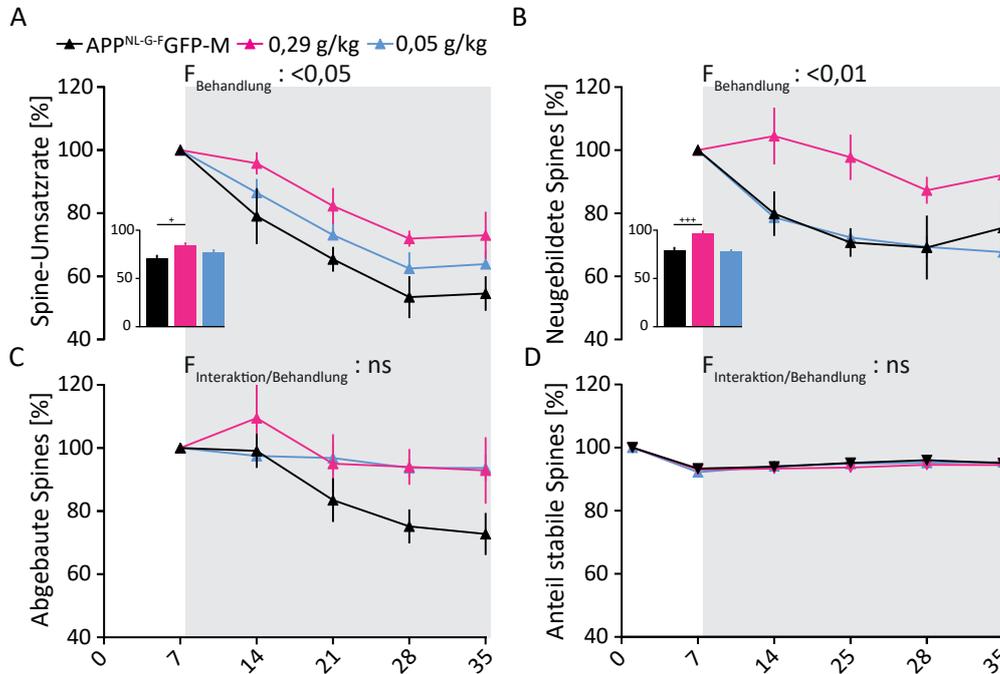
Zusammenfassend wurde in APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren wurde eine signifikante Beeinträchtigung bei der Bildung von neuen Spines für Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus unter BACE-Inhibition observiert. Allerdings wurde nur unter der hohen NB-360-Dosierung ein Rückgang in der Spine-Dichte von APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren beobachtet, wohingegen unter der niedrigen NB-360-Dosierung eine Erhöhung der Spine-Dichte observiert wurde. Die Erhöhung der Spine-Dichte unter der niedrigen NB-360-Dosierung spiegelte sich ebenfalls im signifikant erhöhten Anteil persistenter Spines wider.

### 2.2.3 Die BACE-Inhibitor Intervention mittels NB-360 steigerte die Neubildung dendritischer Spines der CA1-Region abseits von A $\beta$ -Ablagerungen im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell

Die *in vivo* 2-Photonen mikroskopische Untersuchung erfolgte in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren analog zum Versuch 2.2.2 und ist detailliert im Kapitel 4.3.2 beschrieben. Vor Therapiebeginn wurden zwei Aufnahmezeitpunkte als interner Referenzwert für die Spine-Kinetik und Dichte aufgenommen. Die Nachverfolgung der Kinetik einzelner dendritischer Spines erfolgte anschließend in wöchentlichen Intervallen. Die 28-tägige BACE-Inhibitor Behandlung mittels NB-360 wurde in zwei Dosierungen (0,05 g/kg und 0,29 g/kg) durchgeführt. Die Intervention startete mit einem Alter von vier Monaten im APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Mausmodell. Bei diesem Alter wurde im APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Mausmodell noch keine fortgeschrittene A $\beta$ -Last im Hippocampus festgestellt<sup>379</sup>. Die Analyse der strukturellen Plastizität dendritischer Spines des zweiten Verzweigungsgrades erfolgte abseits von FSB-positiven A $\beta$ -Ablagerungen.

Die chronische Verabreichung der hohen NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Spine-Umsatzrate und zu einer gesteigerten Neubildung von Spines abseits von A $\beta$ -Ablagerungen im *Stratum Oriens* der CA1-Region im APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Mausmodell. Bis zum letzten Aufnahmezeitpunkt wurde eine Steigerung der Spine-Umsatzrate um 18,44 % unter der hohen NB-360-Dosierung gegenüber der Kontrollgruppe observiert. Die niedrig dosierte NB-360-Behandlung (0,05 g/kg) bewirkte dagegen nur eine leichte aber nicht signifikante Erhöhung der Spine-Umsatzrate (siehe Abbildung 19B, Mittelwerte Spine-Umsatzrate in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 54,57  $\pm$  5,47; 0,29 g/kg = 73  $\pm$  7,53; 0,05 g/kg = 63,92  $\pm$  4,4. P = 0,0154). Ein besonders stark ausgeprägter Effekt ließ sich auf die Bildung neuer Spines unter der hohen NB-360-Dosierung feststellen. Bereits nach einer Behandlungswoche stieg der Anteil neugebildeter Spines in APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren stark an. Bis zum letzten Aufnahmezeitpunkt wurde eine Steigerung um 16,76 % gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet. Unter der niedrig dosierten NB-360-Behandlung wurde kein Effekt auf den Anteil neugebildeter Spines observiert (Mittelwerte Neugebildete Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 75,44  $\pm$  8,48; 0,29 g/kg = 92,19  $\pm$  11,75; 0,05 g/kg = 67,7  $\pm$  3,29. P = 0,0098). Darüber hinaus stieg auch der Anteil abgebauter Spines unter der hohen NB-360-Dosierung an, erreichte allerdings bei beiden NB-360-Dosierungen keine Signifikanz (Mittelwerte abgebaute Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35:

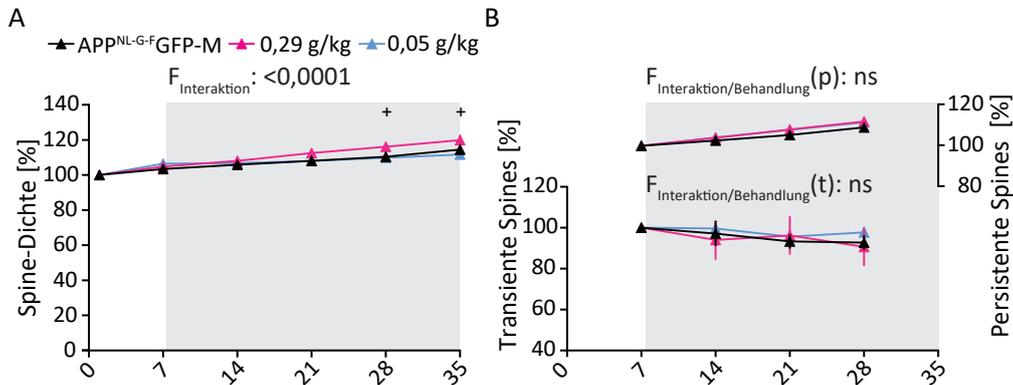
APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 72,77 ± 6,66; 0,29 g/kg = 92,87 ± 10,54; 0,05 g/kg = 93,72 ± 4,26; . P = 0,1012). Der Anteil stabiler Spines veränderte sich nicht unter der NB-360-Behandlung über die Zeit (Mittelwerte stabile Spines in % ± SEM: Tag 35: APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 95,51 ± 1,1; 0,29 g/kg = 94,51 ± 0,43; 0,05 g/kg = 95,46 ± 0,3. P = 0,3039).



**Abbildung 19:** Die BACE-Inhibitor Intervention mittels der hohen NB-360-Dosierung bewirkte eine signifikante Steigerung der Spine-Umsatzrate im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell. A) Beide NB-360-Dosierungen (0,29 g/kg und 0,05 g/kg) bewirkten eine Steigerung der Spine-Umsatzrate ( $F_{\text{Behandlung}}(2, 15) = 5,585$   $P = 0,0154$ ), welche unter der hohen NB-360-Dosierung gegenüber der Kontrollgruppe signifikant wurde ( $F_{\text{Einfaktorielle v.}}(2, 87) = 4,326$ ,  $P = 0,0162$ ). B) Die BACE-Inhibitor Behandlung bewirkte ebenfalls einen Anstieg der neugebildeten Spines ( $F_{\text{Behandlung}}(2, 15) = 6,389$   $P = 0,0098$ ) und wurde unter der hohen NB-360-Dosierung signifikant ( $F_{\text{Einfaktorielle v.}}(2, 87) = 10,52$ ,  $P = <0,0001$ ). C) Der Anteil abgebauter sowie stabiler Spines veränderte sich unter beiden NB-360-Dosierungen nicht signifikant ( $F_{\text{Behandlung}}(8, 15) = 2,679$ ,  $P = 0,1012$ ), ( $F_{\text{Behandlung}}(2, 15) = 1,1291$ ,  $P = 0,3039$ ) D). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt ± SEM; n = 6 Versuchstiere pro Gruppe mit N = 7 - 10 Dendriten pro Versuchstier. Zweifaktorielle Varianzanalyse mit angeschlossenen Bonferroni-post-hoc-test. Bei Erreichen einer Signifikanz in der Behandlung wurde im Anschluss eine einfaktorielle Varianzanalyse mit angeschlossenen Bonferroni-post-hoc-test durchgeführt, um die Signifikanzen der Behandlungsgruppen zu erhalten. \*/+P <0,05; \*\*/+P <0,01; \*\*\*/+P <0,001; \*\*\*\*/+P <0,0001. Die Daten waren nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt.

Die gesteigerte Bildung von neuen Spines unter der hohen NB-360-Dosierung führte im APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Mausmodell zudem zu einer signifikanten Steigerung der Spine-Dichte ab dem fünften Aufnahmezeitpunkt. Unter der niedrigen NB-360-Dosierung wurde keine Veränderung der Spine-Dichte observiert (Mittelwerte Spine-Dichte in % ± SEM: Tag 35: APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 114,555 ± 1,961; 0,29 g/kg = 119,86 ± 3,03; 0,05 g/kg = 111,71 ± 1,11. P = <0,0001). Für den Anteil transienter sowie persistenter Spines wurde unter beiden NB-360-Dosierungen keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet (siehe Abbildung 20). Der Anteil transienter Spines sank in den Behandlungsgruppen

sowie in der Kontrollgruppe über die Zeit (Mittelwerte transiente Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 92,77  $\pm$  3,64; 0,29 g/kg = 90,64  $\pm$  9,29; 0,05 g/kg = 97,78  $\pm$  2,76. P = 0,879), wohingegen der Anteil der persistenten Spines in allen drei Gruppen leicht anstieg (Mittelwerte persistente Spines in %  $\pm$  SEM: Tag 35: APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M = 109,1  $\pm$  1,85; 0,29 g/kg = 111,9  $\pm$  1,76; 0,05 g/kg = 111,53  $\pm$  0,96. P = 0,3151).



**Abbildung 20:** Die Spine-Dichte basaler Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region von APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren stieg unter der hohen NB-360-Dosierung signifikant an. A) Unter der hohen NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) ist eine signifikante Steigerung der Spine-Dichte zu beobachten ( $F_{\text{Interaktion}}(10, 75) = 4,47$ ,  $P = <0,0001$ ). B) Im Anteil transienter sowie persistenter Spines wurde keine signifikante Veränderung unter BACE-Inhibition beobachtet ( $F_{\text{Behandlung}}(t)(2, 15) = 0,1302$ ,  $P = 0,8789$ ), ( $F_{\text{Behandlung}}(p)(2, 15) = 1,249$ ,  $P = 0,3151$ ). Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SEM;  $n = 6$  Versuchstiere pro Gruppe mit  $N = 7 - 10$  Dendriten pro Versuchstier. Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit angeschlossenen Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. \*/+P <0,05; \*\*/++P <0,01; \*\*\*/+++P <0,001; \*\*\*\*/++++P <0,0001. Die Daten waren nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt.

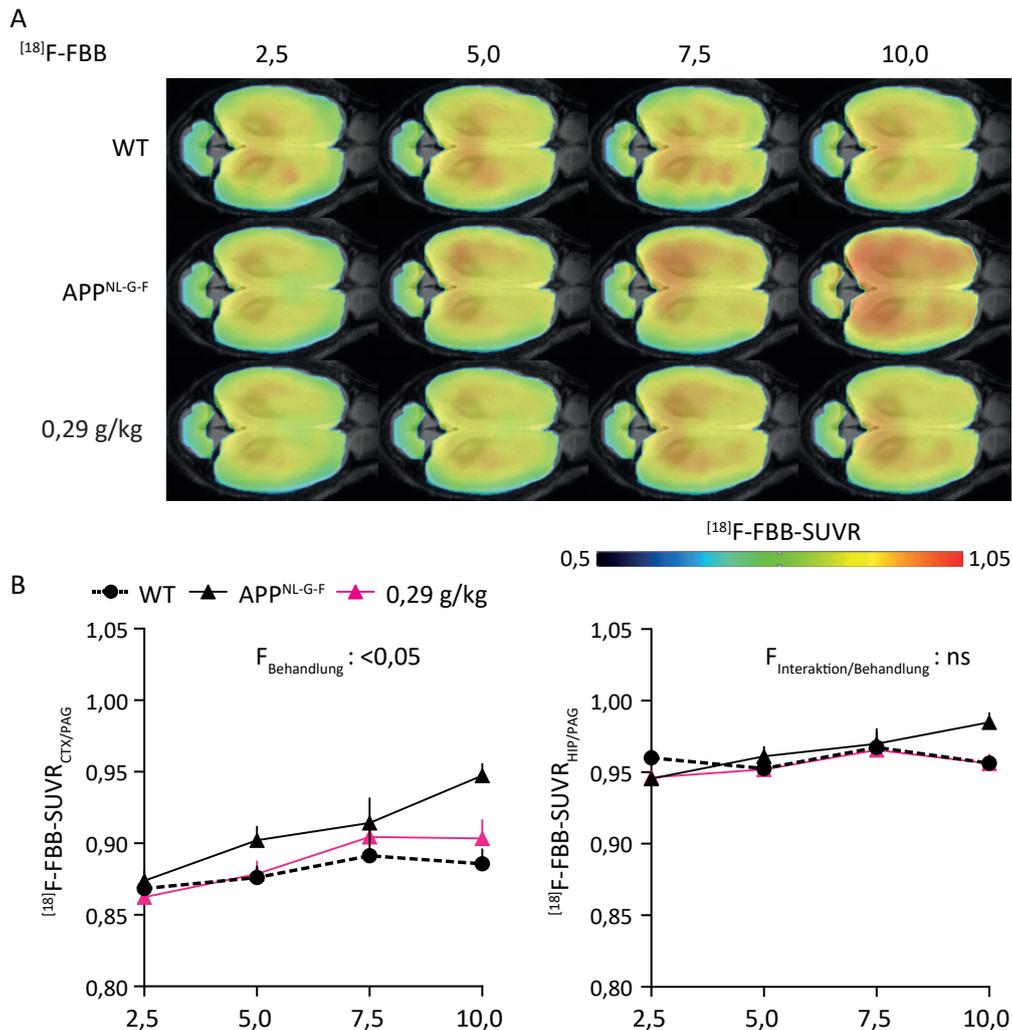
Zusammenfassend konnte die signifikant erniedrigte Spine-Umsatzrate dendritischer Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus abseits von A $\beta$ -Ablagerungen im APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Mausmodell mittels einer frühzeitigen BACE-Inhibitor Intervention gesteigert werden. Der Effekt auf die Spine-Umsatzrate, auf die Neubildung dendritischer Spines sowie auf die Spine-Dichte war dosisabhängig. Unter der niedrig dosierten NB-360-Behandlung wurde nur eine leichte Erhöhung beobachtet, wohingegen unter der hohen NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) eine signifikante Steigerung der Spine-Umsatzrate, der Neubildung sowie der Spine-Dichte observiert wurde.

#### 2.2.4 Die präventive langfristige BACE-Inhibitor Intervention mittels NB-360 verringert im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell signifikant die A $\beta$ -Last und die Neuroinflammation

Ab einem Alter von zweieinhalb Monaten und in einem Intervall von zehn Wochen wurden APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere longitudinal im  $\mu$ PET untersucht. Die A $\beta$ -Last wurde, wie in Kapitel 4.4.2 ausführlicher beschrieben und analog zum  $\mu$ PET-Versuch in Kapitel 2.1.2, unter Verwendung des Radiotracers [<sup>18</sup>F]-FBB detektiert, wohingegen die Ausbreitung der Neu-

roinflammation mittels des Radiotracers  $^{18}\text{F}$ -GE180 verfolgt wurde. Die BACE-Inhibitor Intervention, mittels der zuvor als therapeutisch effektiv evaluierten NB-360-Dosierung von 0,29 g/kg, startete mit einem Alter von neun Wochen und wurde für acht Monate fortgeführt. Nach der letzten  $\mu\text{PET}$ -Untersuchung wurde die kognitive Leistung der Versuchstiere im MWM-Test untersucht.

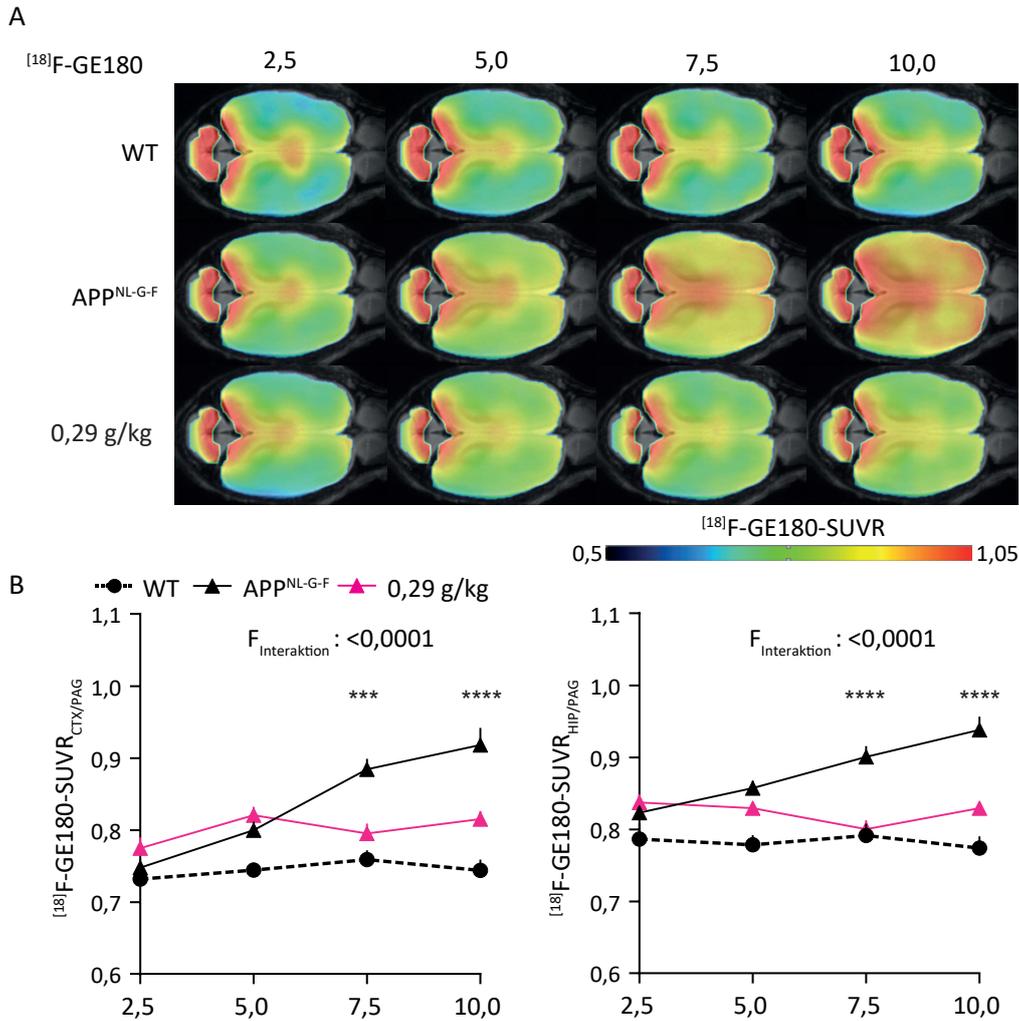
Die BACE-Inhibition mittels NB-360 (0,29 g/kg) bewirkte im  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Mausmodell eine signifikante Verringerung des  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR über die Behandlungsdauer im Cortex (siehe Abbildung 21B). Die Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -FBB stieg in unbehandelten  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren um 8,35 % an, wohingegen in NB-360 behandelten  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren nur ein Anstieg von 4,76 % bis zu einem Alter von zehn Monaten gemessen wurde. Bei Therapieende war der kortikale  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR von NB-360 behandelten gegenüber unbehandelten  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren um 4,65 % erniedrigt (Mittelwerte  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR  $\pm$  SEM: 2,5:  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}} = 0,874 \pm 0,007$ ; 0,29 g/kg =  $0,862 \pm 0,006$ . 5,0:  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}} = 0,902 \pm 0,01$ ; 0,29 g/kg =  $0,879 \pm 0,009$ . 7,5:  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}} = 0,914 \pm 0,018$ ; 0,29 g/kg =  $0,904 \pm 0,007$ . 10,0:  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}} = 0,947 \pm 0,009$ ; 0,29 g/kg =  $0,903 \pm 0,013$ .  $P = 0,0435$ ). Im Hippocampus wurde unter NB-360-Behandlung keine signifikante Verringerung des  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR gegenüber unbehandelten  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren observiert (Mittelwerte  $^{18}\text{F}$ -FBB-SUVR  $\pm$  SEM: 2,5:  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}} = 0,946 \pm 0,003$ ; 0,29 g/kg =  $0,946 \pm 0,005$ . 5,0:  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}} = 0,961 \pm 0,007$ ; 0,29 g/kg =  $0,952 \pm 0,004$ . 7,5:  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}} = 0,970 \pm 0,011$ ; 0,29 g/kg =  $0,966 \pm 0,006$ . 10,0:  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}} = 0,985 \pm 0,007$ ; 0,29 g/kg =  $0,956 \pm 0,007$ .  $P = 0,1032$ ).



**Abbildung 21:** Die langfristige BACE-Inhibitionstherapie mittels NB-360 senkt signifikant die kortikale A $\beta$ -Last im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell. A) Regionale Analyse gruppengemittelter SUVR des Radiotracer<sup>s</sup> <sup>18</sup>F-FBB im Wildtyp (obere Reihe), in unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren (mittlere Reihe) sowie in NB-360 behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren (untere Reihe), dargestellt in axialen Schnitten projiziert auf MRT-Standardvorlagen. B) Die Intervention mittels NB-360 (0,29 g/kg) senkt signifikant die Aufnahme des <sup>18</sup>F-FB-Radiotracer<sup>s</sup> im Cortex ( $F_{\text{Behandlung}}(1, 23) = 4,564, P = 0,0435$ ), wohingegen im Hippocampus kein signifikanter Effekt gegenüber unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren beobachtet wurde ( $F_{\text{Behandlung}}(1, 26) = 2,853, P = 0,1032$ ). Die gestrichelte Linie stellt Mittelwerte von Wildtyptieren über die Zeit dar (n=6 - 15). Die Daten werden als Mittelwerte der SUVR dargestellt  $\pm$  SEM; n = 13 - 15. Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit angeschlossener Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; \*\*\*\*P < 0,0001. Die Daten waren nach D'Agostino & Pearson Test normalverteilt.

Analog zu der verringerten <sup>18</sup>F-FBB-Aufnahme wurde in NB-360 behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren ebenfalls eine signifikant verringerte kortikale <sup>18</sup>F-GE180-Aufnahme über die Zeit im Vergleich zu unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren verzeichnet. Die kortikale Aufnahme von <sup>18</sup>F-GE180 stieg in unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren bis zu einem Alter von zehn Monaten um 22,72 % an, wohingegen in NB-360 behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren ab einem Alter von siebenmonatigen ein signifikanter Rückgang im

<sup>[18]F</sup>-GE180-SUVR beobachtet wurde. Insgesamt wurde ein Anstieg des <sup>[18]F</sup>-GE180-SUVR bis zum Therapieende von 5,16 % verzeichnet. Bei Therapieende wurde eine Erniedrigung des kortikalen <sup>[18]F</sup>-GE180-SUVR um 11,22 % in NB-360 behandelten gegenüber unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren beobachtet (Mittelwerte <sup>[18]F</sup>-GE180-SUVR ± SEM: 2,5: APP<sup>NL-G-F</sup> = 0,748 ± 0,013; 0,29 g/kg = 0,775 ± 0,015. 5,0: APP<sup>NL-G-F</sup> = 0,800 ± 0,012; 0,29 g/kg = 0,821 ± 0,012. 7,5: APP<sup>NL-G-F</sup> = 0,884 ± 0,014; 0,29 g/kg = 0,795 ± 0,014. 10,0: APP<sup>NL-G-F</sup> = 0,918 ± 0,024; 0,29 g/kg = 0,815 ± 0,011. P = <0,0001). Im Hippocampus wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion des <sup>[18]F</sup>-GE180-SUVR unter NB-360-Behandlung gegenüber unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren beobachtet. In NB-360 behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren sank die <sup>[18]F</sup>-GE180-Aufnahme sogar bis zum Therapieende um 0,84 % gegenüber dem Referenzwert, wohingegen in unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren ein Anstieg von 13,97 % gemessen wurde. Bei der letzten μPET-Untersuchung mit zehn Monaten unterschied sich der hippocampale <sup>[18]F</sup>-GE180-SUVR um 13,01 % zwischen unbehandelten und NB-360 behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren (Mittelwerte <sup>[18]F</sup>-GE180-SUVR ± SEM: 2,5: APP<sup>NL-G-F</sup> = 0,823 ± 0,009; 0,29 g/kg = 0,837 ± 0,011. 5,0: APP<sup>NL-G-F</sup> = 0,857 ± 0,010; 0,29 g/kg = 0,830 ± 0,007. 7,5: APP<sup>NL-G-F</sup> = 0,901 ± 0,015; 0,29 g/kg = 0,800 ± 0,013. 10,0: APP<sup>NL-G-F</sup> = 0,938 ± 0,018; 0,29 g/kg = 0,830 ± 0,010. P = <0,0001).



**Abbildung 22:** Die langfristige BACE-Inhibitionstherapie mittels NB-360 senkt signifikant die Neuroinflammation im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell. A) Regionale Analyse gruppengemittelter SUVR des Radiotracer <sup>18</sup>F-GE180 im Wildtyp (obere Reihe), in unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren (mittlere Reihe) sowie in NB-360 behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren (untere Reihe), dargestellt in axialen Schnitten projiziert auf MRT-Standardvorlagen. B) Die Intervention mittels NB-360 (0,29 g/kg) senkt signifikant das <sup>18</sup>F-GE180-Signal im Cortex ( $F_{\text{Interaktion}}(3, 78) = 15,55, P = <0,0001$ ), sowie im Hippocampus gegenüber unbehandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren ( $F_{\text{Interaktion}}(3, 78) = 13,73, P = <0,0001$ ). Die gestrichelte Linie stellt Mittelwerte von Wildtypen über die Zeit dar (n = 6 - 15). Die Daten werden als Mittelwerte der SUVR dargestellt  $\pm$  SEM; n = 13 - 15. Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; \*\*\*\* P < 0,0001. Die Daten waren nach D'Agostino & Pearson Test normalverteilt.

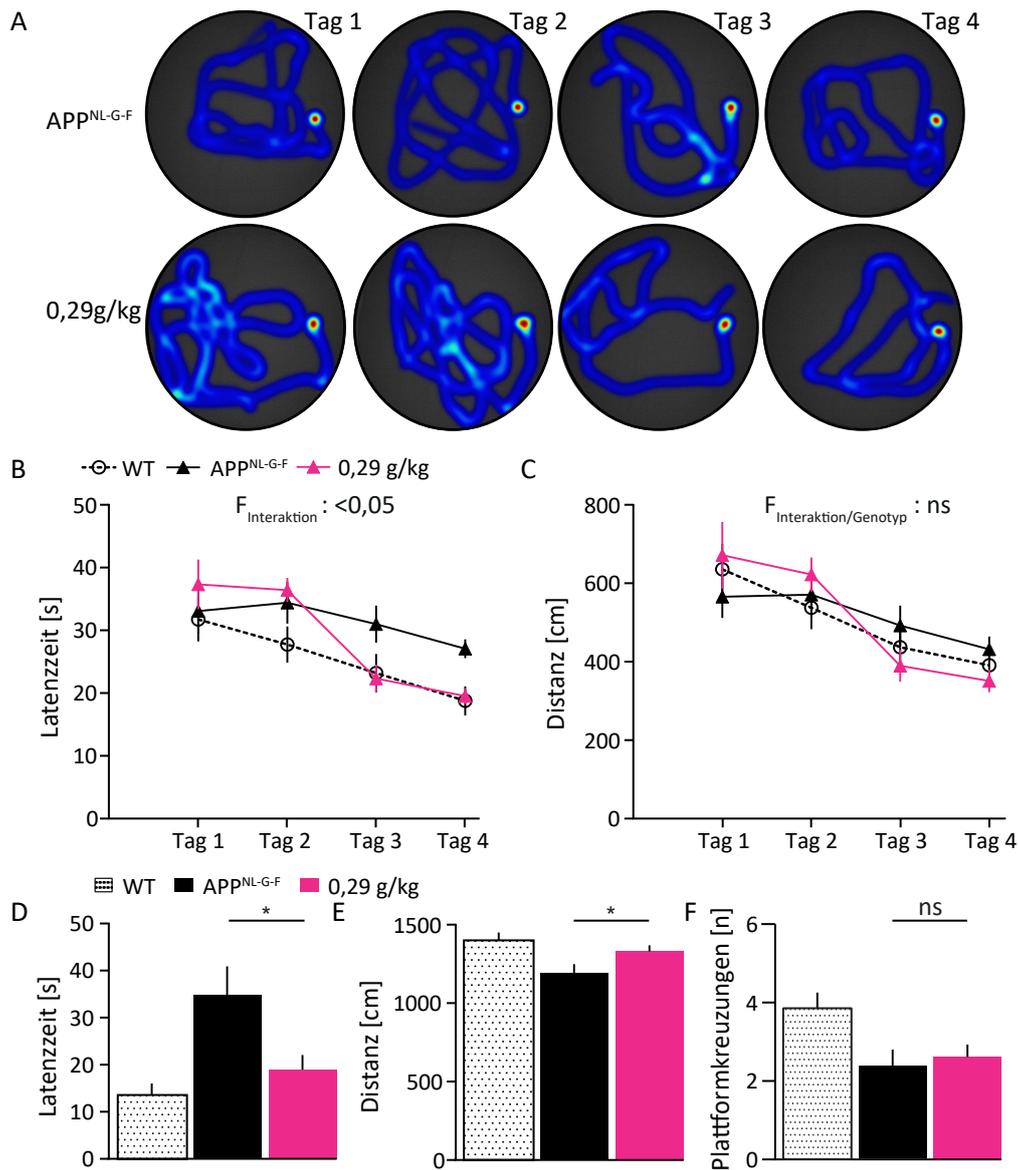
Zusammenfassend zeigten die longitudinalen  $\mu$ PET-Untersuchungen, dass eine Langzeittherapie mittels NB-360 (0,29 g/kg) die kortikale A $\beta$ -Last signifikant reduzieren sowie die kortikale und hippocampale Neuroinflammation im AD-Mausmodell APP<sup>NL-G-F</sup> senken konnte. Zudem wurde während der Langzeittherapie mittels NB-360 keine erhöhte Ausfallrate in den behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren gegenüber den Kontrolltieren observiert.

### 2.2.5 Die präventive und langfristige BACE-Inhibitor Intervention mittels NB-360 steigert die hippocampusabhängigen kognitiven Fähigkeiten von APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren

Zwei Wochen nach der letzten  $\mu$ PET-Untersuchung und mit einem Alter der APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere von zehn Monaten wurde der MWM-Test durchgeführt. Die Versuchstiere wurden bis zum Abschluss des MWM-Tests mit NB-360 (0,29 g/kg) sowie der Kontrollsubstanz behandelt. Der MWM-Test wurde analog zum vorherigen MWM-Test durchgeführt (siehe Kapitel 4.5.1).

Nach den ersten beiden Trainingstagen wurde eine signifikante Steigerung in der Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform für die NB-360 behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet (siehe Abbildung 23B). Bis zum Ende der Trainingszeit wurde eine Verringerung der Latenzzeit für NB-360 behandelten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren um 27,95 % gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet (Mittelwerte Latenzzeit der Testdurchläufe in s  $\pm$  SEM: Tag 1: APP<sup>NL-G-F</sup> = 33,032  $\pm$  3,612; 0,29 g/kg = 37,260  $\pm$  3,962. Tag 2: APP<sup>NL-G-F</sup> = 34,351  $\pm$  3,332; 0,29 g/kg = 36,361  $\pm$  1,942. Tag 3: APP<sup>NL-G-F</sup> = 30,95  $\pm$  2,96; 0,29 g/kg = 22,26  $\pm$  2,207. Tag 4: APP<sup>NL-G-F</sup> = 27,023  $\pm$  1,508; 0,29 g/kg = 19,47  $\pm$  1,25. P = 0,0464). Zur Datenvisualisierung wurden Heatmaps der vier Testdurchläufe von einzelnen Versuchstieren abgebildet, welche den Mittelwert der Latenzzeit des jeweiligen Testdurchlaufs der beiden Versuchsgruppen repräsentieren (siehe Abbildung 23A). Es wurde zudem eine leichte aber nicht signifikante Verringerung in der zurückgelegten Distanz am Ende des Trainings in der NB-360 behandelten Versuchsgruppe observiert (siehe Abbildung 23C, Mittelwerte Distanz der Testdurchläufe in cm  $\pm$  SEM: Tag 1: APP<sup>NL-G-F</sup> = 565,797  $\pm$  54,157; 0,29 g/kg = 671,338  $\pm$  85,106. Tag 2: APP<sup>NL-G-F</sup> = 571  $\pm$  54,024; 0,29 g/kg = 622,275  $\pm$  43,538. Tag 3: APP<sup>NL-G-F</sup> = 492,574  $\pm$  50,311; 0,29 g/kg = 389,636  $\pm$  40,567. Tag 4: APP<sup>NL-G-F</sup> = 431,394  $\pm$  33,029; 0,29 g/kg = 350,944  $\pm$  28,570. P = 0,8743).

NB-360 behandelte APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere erzielten auch beim Transfer-Test eine signifikant kürzere Latenzzeit bis zum erstmaligen Erreichen der früheren Plattformposition als die Kontrollgruppe (siehe Abbildung 23D, Mittelwerte Latenzzeit in s  $\pm$  SEM: APP<sup>NL-G-F</sup> = 34,85  $\pm$  6,044; 0,29 g/kg = 18,97  $\pm$  3,108. P = 0,0206). Über die gesamte Testdauer von 70 Sekunden legten NB-360 behandelte APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere eine weitere Distanz zurück als unbehandelte (siehe Abbildung 23E, Mittelwerte Distanz in cm  $\pm$  SEM: APP<sup>NL-G-F</sup> = 1191  $\pm$  56,03; 0,29 g/kg = 1330  $\pm$  37,27. P = 0,0426). Bei der Anzahl der Plattformkreuzungen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt (siehe Abbildung 23F, Mittelwerte Frequenz in n  $\pm$  SEM: APP<sup>NL-G-F</sup> = 2,364  $\pm$  0,411; 0,29 g/kg = 2,6  $\pm$  0,321. P = 0,6494).



**Abbildung 23:** Die langfristige BACE-Inhibitionstherapie mittels NB-360 steigert signifikant die Lernfähigkeit und das Abrufen von Erlerntem im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell. A) Heatmaps einzelner Versuchstiere der Kontrollgruppe (1.Reihe) sowie der NB-360 behandelten Versuchsgruppe (2.Reihe), welche den Mittelwert der jeweiligen Testdurchläufe repräsentierten. B,C) Quantifizierung der Latenzzeit ( $F_{\text{Interaktion}}(3, 72) = 2,793, P = 0,0464$ ) sowie der zurückgelegten Distanz während der Trainingszeit ( $F_{\text{Behandlung}}(1, 24) = 0,02558, P = 0,8743$ ). D-F) Quantifizierung der Latenzzeit ( $t(23)=2,486, P = 0,0206$ ), der insgesamt zurückgelegten Distanz ( $t(25)=2,137, P = 0,0426$ ) sowie der Plattformkreuzungen beim Transfer-Test ( $t(24)=0,4604, P = 0,6494$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte der Testdurchläufe  $\pm$  SEM;  $n = 12 - 14$ . Signifikante Änderungen über die Trainingszeit zwischen beiden Versuchsgruppen wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit angeschlossenen Bonferroni-post-hoc-test ermittelt. Die gestrichelte Linie stellt Mittelwerte von Wildtyptieren dar ( $n = 21$ ). Signifikanzen beim Transfer-Test wurden mittels Zweistichproben-t-Test ermittelt. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Die Daten waren nach D'Agostino & Pearson Test normalverteilt.

Zusammenfassend konnte anhand des MWM-Test gezeigt werden, dass durch eine präventive sowie langfristige BACE-Inhibitor Intervention mittels NB-360 der Dosierung 0,29 g/kg die Latenzzeit zur Plattform von APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren während der Trainingstage signifikant erniedrigt werden konnte. Beim Transfer-Test erreichten behandelte APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere die frühere Position der Plattform ebenfalls signifikant schneller als unbehandelte Versuchstiere.

### 3 Diskussion

Das in dieser Studie verwendete APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell sowie die Kreuzung APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M wird zur Vereinfachung in der Diskussion als APP-Knock-In Mausmodell bezeichnet. Die APP<sup>wt</sup>- sowie die APP<sup>wt</sup>GFP-M-Linie wird demnach des Weiteren als Wildtyp bezeichnet.

#### 3.1 Charakterisierung des APP-Knock-In Mausmodells

Tiermodelle menschlicher Krankheiten, welche die klinische Pathologie rekapitulieren, sind für das Verständnis der molekularen Mechanismen und das Ausführen vorklinischer Studien unverzichtbar. Bei traditionell generierten transgenen AD-Mausmodellen kann allerdings die Überexpression von Proteinen wie APP zusätzliche Phänotypen verursachen, die nicht mit der AD in Verbindung stehen<sup>381</sup>. Die Knock-In Technik hebt sich von der traditionellen transgenen Technik dadurch ab, dass eine gezielte Insertion des veränderten Gens in einem bestimmten Locus erfolgt. Das in dieser Arbeit verwendete APP-Knock-In Mausmodell exprimiert somit das genetisch modifizierte und spezifisch inserierte APP-Gen auf einem physiologischem Level und dementsprechend auf Wildtypniveau<sup>379</sup>. Im endogenen APP-Genlocus des APP-Knock-In Mausmodells wurde die A $\beta$ -Sequenz humanisiert sowie drei klinische AD-Mutationen eingefügt (siehe auch Kapitel 4.1.2). Diese Technik gewährleistet, dass das APP-Knock-In Mausmodell keine unspezifische und durch die Überexpression von Proteinen bedingte AD-Pathologie ausbildet<sup>379</sup>. In der Literatur wird das APP-Knock-In Mausmodell weitestgehend als AD-Modell eingestuft, welches eine frühe Phase der AD widerspiegelt<sup>381</sup>. Aus diesen Gründen erschien die vorklinische Testung einer präventiven therapeutischen Intervention, um den Ausbruch der AD zu hemmen, im APP-Knock-In Mausmodell attraktiv.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb im ersten Teil die AD-Pathologie des APP-Knock-In Mausmodells anhand von *ex* und *in vivo* Untersuchungen evaluiert. Hierfür wurde zunächst mittels Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie ( $\mu$ PET) ab einem Alter von zwei Monaten die A $\beta$ -Last sowie die Immunantwort der Mikrogliazellen über einen Zeitraum von acht Monaten *in vivo* observiert. Im Anschluss und mit einem Alter von zehneinhalb Monaten, wurde die hippocampusabhängige Lernfähigkeit sowie das Referenzgedächtnis unter Verwendung des MWM-Tests der APP-Knock-In Versuchstiere untersucht. Während der  $\mu$ PET-Untersuchungen konnte im APP-Knock-In Mausmodell im Alter von fünf Monaten ein leicht erhöhtes Signal im A $\beta$ - $\mu$ PET gemessen werden (siehe Abbildung 10). Da der pathologische Verlauf von AD durch einen progressiven Verlust von Synapsen und Neuronen geprägt ist, der mit dem Abbau von Postsynapsen beginnt<sup>138,139</sup>, wurde überprüft, ob im APP-Knock-In Mausmodell mit einem Alter von fünf Monaten bereits eine Beeinträchtigung der Postsynapsen vorlag. Zu diesem Zweck wurde *ex vivo* die Dichte sowie die Morphologie dendritischer Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region im Hippocampus untersucht. Für diese Untersuchung wurden die Dendriten und ihre Spines spezifisch sichtbar gemacht, indem das APP-Knock-In Mausmodell mit einer Mauslinie verpaart wurde, welche das grünfluoreszierende Protein eGFP in vereinzelt Nervenzellen, insbesondere der neokortikalen Schicht-V

und der hippocampalen CA1-Region, exprimiert<sup>374</sup>. Darüber hinaus wurde die strukturelle Plastizität dendritischer Spines mit Hilfe der 2-Photonen Mikroskopie *in vivo* untersucht. Bei diesem Versuch wurde die Spine-Kinetik ausgewählter Dendriten der Pyramidenzellen im *Stratum oriens* der CA1-Region im APP-Knock-In Mausmodell über einen Zeitraum von sechs Wochen nachvollzogen. Die *in vivo* Studie startete mit einem Alter von dreieinhalb Monaten, da die Dichte der hippocampalen A $\beta$ -Plaques der APP-Knock-In Versuchstiere zu diesem Zeitpunkt noch relativ gering war und somit die Verfolgung einzelner dendritischer Spines abseits von A $\beta$ -Ablagerungen (mindestens 50  $\mu$ m Distanz, meist deutlich mehr) zuverlässig durchgeführt werden konnte. Zur Realisierung der *in vivo* 2-Photonen Studie wurde im Rahmen dieser Arbeit die Implantation des hippocampalen Fensters etabliert (siehe Kapitel 4.3.1). Die folgende Charakterisierung des APP-Knock-In Mausmodells fließt anschließend in den zweiten Teil dieser Arbeit ein, um eine fundierte Beurteilung und Diskussion des Therapieansatzes der präventiven BACE-Inhibition gegen AD zu ermöglichen.

### **3.1.1 Das APP-Knock-In Mausmodell zeigt eine frühe Neuroinflammation sowie eine parallele, nicht korrelierende Zunahme in der A $\beta$ -Last über die Zeit**

Die longitudinalen *in vivo*  $\mu$ PET-Untersuchungen zeigten einen parallelen Anstieg der A $\beta$ -Last sowie der Neuroinflammation im APP-Knock-In Mausmodell. Es konnte allerdings beobachtet werden, dass der kortikale Anstieg im TSPO-Signal (22,5 %) bis zu einem Alter von zehn Monaten doppelt so hoch war wie der Anstieg des A $\beta$ -Signals (9 %) im  $\mu$ PET (siehe Abbildung 10). TSPO ist ein Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran. Unter physiologischen Bedingungen wird TSPO in Mitochondrien von Mikrogliazellen auf einem sehr geringen Niveau exprimiert. Allerdings wird die Expression von TSPO während neuroinflammatorischen Prozessen stark hochreguliert<sup>391,392</sup>. Im Hippocampus wurde generell eine geringere longitudinale Signalzunahme der beiden Radioliganden bis zu einem Alter von zehn Monaten in APP-Knock-In Versuchstieren beobachtet.

Studien an humanen Gehirnschnitten konnten zeigen, dass die AD-Pathologie mit einer intrinsischen Immunreaktion einhergeht, welche laut der Amyloid-Kaskaden-Hypothese als Folge von A $\beta$ -Ablagerungen sowie neuronalen Schäden erfolgt<sup>139</sup>. Neuere neurobildungs- und genomweite Assoziationsstudien (engl. Genome-wide association study (GWAS)) deuten allerdings darauf hin, dass die Neuroinflammation ein frühes Ereignis im Verlauf der AD ist, welches vor und anschließend parallel zur A $\beta$ -Amyloidose verläuft<sup>393,394,395</sup>. Die Hypothese der früh auftretenden Neuroinflammation wird durch die in dieser Arbeit observierten Ergebnisse unterstützt. Im APP-Knock-In Mausmodell wurde ebenfalls eine frühe kortikale Erhöhung des TSPO- $\mu$ PET-Signals um 7,5 % bei einem Alter von fünf Monaten beobachtet, wohingegen eine signifikante kortikale Erhöhung des A $\beta$ - $\mu$ PET-Signals um 5,4 % erst mit einem Alter von siebeneinhalb Monaten gegenüber dem Referenzwert detektiert wurde. Diese Beobachtung ist konform mit anderen Studien, die eine frühe Aktivierung der Mikrogliazellen im APP-Knock-In Mausmodell observierten<sup>396</sup>. Anhand einer vergleichenden Profilierungsstudie der kortikalen Genexpression von AD-Patienten sowie

des APP-Knock-In Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Neuroinflammation progressiv mit dem Fortschreiten der A $\beta$ -Amyloidose verläuft<sup>397</sup>, was die Hypothese eines parallelen Verlaufs der A $\beta$ -Amyloidose und der Neuroinflammation weiter bestätigt. Longitudinale  $\mu$ PET-Studien in transgenen AD-Mausmodellen beobachteten ebenfalls einen fast identischen Anstieg des A $\beta$ - sowie TSPO- $\mu$ PET-Signals vom Krankheitsausbruch bis zur vollständigen Pathologie<sup>295,398</sup>. Zudem wird die Hypothese durch *in vivo* Studien gestützt, die zeigen konnten, dass Mikrogliazellen durch A $\beta$ -Ablagerungen in kürzester Zeit aktiviert werden und innerhalb von ein bis zwei Tagen zu diesen migrieren<sup>282,294</sup>, um dort die Phagozytose von A $\beta$ -Peptiden einzuleiten<sup>284,285,286</sup>. Die im Rahmen dieser Studie observierten longitudinalen  $\mu$ PET-Ergebnisse im APP-Knock-In Mausmodell zeigten allerdings, wie bereits beschrieben, einen zweifach höheren kortikalen Anstieg des TSPO-Signals gegenüber dem kortikalen Anstieg des A $\beta$ -Signals bis zu einem Alter von zehn Monaten. Diese Diskrepanz im APP-Knock-In Mausmodell ließ sich anhand der spezifischen Beschaffenheit der A $\beta$ -Ablagerungen des Mausmodells und der Bindungsaffinität des verwendeten Radioliganden im A $\beta$ - $\mu$ PET erklären. Bei der Untersuchung der A $\beta$ -Plaques Beschaffenheit des APP-Knock-In Mausmodells konnte festgestellt werden, dass das Mausmodell überwiegend diffuse A $\beta$ -Plaques ausbildete, die nur durch eine Immunfärbung gegen A $\beta$ -Oligomere detektiert werden konnten (siehe Abbildung 9). Die größeren A $\beta$ -Plaques des Mausmodells bildeten zwar einen inneren Kern aus zusammengelagerten A $\beta$ -Fibrillen, allerdings zeigte die Auswertung, dass die jeweiligen fibrillären A $\beta$ -Bestandteile einen vergleichsweise geringen Anteil des A $\beta$ -Plaques ausmachten. Zum größten Anteil bestanden die A $\beta$ -Ablagerungen im APP-Knock-In Mausmodell aus A $\beta$ -Oligomeren. Zudem wurde gezeigt, dass die fibrillären Bestandteile der A $\beta$ -Ablagerungen der APP-Knock-In Linie weniger kompakt sind als bei transgenen AD-Mausmodellen<sup>399,295,398</sup>. Darüber hinaus wurde bei transgenen AD-Mausmodellen vorwiegend eine Anreicherung von Mikrogliazellen am äußeren Rand des kompakten A $\beta$ -Plaqueskerns beobachtet<sup>399</sup>. Die diffusere Beschaffenheit der A $\beta$ -Ablagerungen des APP-Knock-In Mausmodells führte dagegen ebenfalls zu einer Akkumulation von Mikrogliazellen zwischen den fibrillären A $\beta$ -Bestandteilen des A $\beta$ -Plaques (siehe Abbildung 8). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die A $\beta$ -Ablagerungen der APP-Knock-In Mauslinie durch ihre Beschaffenheit eher die Morphologie der humanen A $\beta$ -Plaques widerspiegeln als die A $\beta$ -Plaques der transgenen AD-Mausmodelle<sup>400,381</sup>. Der in dieser Arbeit verwendete A $\beta$ -Radioligand zeigt eine nur geringe Bindungsaffinität für diffuse, oligomere A $\beta$ -Plaques Bestandteile, die hauptsächlich im APP-Knock-In Mausmodell vorlagen, wohingegen die Affinität für kompakte, fibrilläre A $\beta$ -Plaques sehr hoch ist<sup>401,382</sup>. Dies führte wahrscheinlich dazu, dass nur ein Bruchteil der A $\beta$ -Ablagerungen des APP-Knock-In Mausmodells mittels des A $\beta$ - $\mu$ PET Tracers [<sup>18</sup>F]-FBB detektiert wurden, was die Diskrepanz zwischen der Signalzunahme im A $\beta$ - und TSPO- $\mu$ PET erklärt. Die niedrige Bindungsaffinität des A $\beta$ - $\mu$ PET-Tracers [<sup>18</sup>F]-FBB für nicht fibrilläre A $\beta$ -Plaques Bestandteile stellt zwar eine Limitierung bei der Verwendung dieses Radioliganden im APP-Knock-In Mausmodell dar, dennoch konnte gezeigt werden, dass eine robuste Quantifizierung der SUVR (engl. für standardized uptake value ratios) des A $\beta$ - $\mu$ PET-Signals im Verhältnis zu ei-

ner definierten zerebralen Vergleichsregion des APP-Knock-In Mausmodells möglich war (siehe Kapitel 4.4.4).

### **3.1.2 Die hippocampusabhängige Lernfähigkeit sowie die Abrufbarkeit des Referenzgedächtnisses ist im APP-Knock-In Mausmodell stark vermindert**

Für APP-Knock-In Versuchstiere wurde bei einem Alter von zehneinhalb Monaten eine signifikant verminderte Lernfähigkeit sowie eine Beeinträchtigung beim Abrufen des Referenzgedächtnisses anhand des MWM-Tests observiert. Dies spiegelte sich in einer erhöhten Latenzzeit bis zur Plattform über die Trainingstage (27 s vs. 18,7 s am letzten Trainingstag) sowie beim Transfer-Test (34,9 s vs. 13,6 s) für APP-Knock-In Versuchstiere im Vergleich zu Wildtyptieren wider. Allerdings unterschied sich die zurückgelegte Distanz nur während des Transfer-Tests zwischen den beiden Genotypen. Der Transfer-Test bietet die Möglichkeit das Referenzgedächtnis der Versuchstiere zu untersuchen und zu überprüfen, ob das Erlernete unter leicht veränderten Bedingungen abgerufen und angewendet werden kann<sup>107,108</sup>.

Die Ergebnisse des durchgeführten MWM-Tests lassen darauf schließen, dass sich APP-Knock-In Versuchstiere öfters neu orientieren mussten, um die Plattform schlussendlich zu erreichen. Es ist anzunehmen, dass die wiederholte Umorientierung der APP-Knock-In Versuchstiere aufgrund einer fehlerhaft erstellten räumlichen Landkarte, welche anhand von Markierungen am Beckenrand erstellt werden sollte, notwendig wurde. Dies galt ebenfalls für den Transfer-Test. APP-Knock-In Versuchstiere brauchten signifikant länger, um die frühere Plattformposition zu erreichen als Wildtyptiere. Darüber hinaus kreuzten APP-Knock-In Versuchstiere die frühere Plattformposition nur halb so oft wie Wildtyptiere während des Transfer-Tests (siehe Abbildung 11). Aus diesen Beobachtungen können signifikante Beeinträchtigungen der Erinnerungs- sowie Transferleistung für das APP-Knock-In Mausmodell abgeleitet werden. Weitere Studien zeigten ebenfalls eine Beeinträchtigung der hippocampusabhängigen, räumlichen Gedächtnisleistung im APP-Knock-In Mausmodell anhand anderer Testverfahren<sup>402,380</sup>. Zu der Frage, ob das APP-Knock-In Mausmodell weitere kognitive Beeinträchtigungen aufweist, liegen zum aktuellen Forschungsstand allerdings kontroverse Studien vor. Eine Studie observierte, aufgrund der erhöhten präfrontalen A $\beta$ -Last im APP-Knock-In Mausmodell, Beeinträchtigungen kortikaler Mechanismen, die Veränderungen in sozialen und angstrelevanten Verhaltensweisen bewirkten<sup>403</sup>. Allerdings publizierte eine weitere Studie für das APP-Knock-In Mausmodell, dass keine Beeinträchtigung im Mechanismus des Lernens und der Gedächtnisformation im Hinblick der Angst-Konditionierung beobachtet wurde<sup>404</sup>.

Es ist zu vermuten, dass die observierten Beeinträchtigungen in der hippocampusabhängigen Lernfähigkeit und der Gedächtnisleistung der APP-Knock-In Versuchstiere im Rahmen dieser Studie, durch den konstanten Anstieg der A $\beta$ -Last sowie der parallel zunehmenden Neuroinflammation mit dem Alter bewirkt wurde. Die in den folgenden Kapiteln diskutierten Beobachtungen zur beeinträchtigten strukturellen Plastizität dendritischer Spines der CA1-Region des Hippocampus im APP-Knock-In Mausmodell bieten einen weiteren Erklä-

rungsansatz für die Ergebnisse des MWM-Tests. Die strukturelle Plastizität dendritischer Spines wird als physikalisches Korrelat für das Lernen und die Gedächtnisformation angesehen. Darüber hinaus korreliert ihre Plastizität mit dem Erlernen neuer Fähigkeiten<sup>88,89</sup> (siehe Kapitel 1.1.5).

### **3.1.3 Im APP-Knock-In Mausmodell ist die Morphologie sowie die strukturelle Plastizität dendritischer Spines der hippocampalen CA1-Region signifikant beeinträchtigt**

Für die basalen Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus wurde im APP-Knock-In Mausmodell *ex vivo* eine Spine-Dichte von circa  $1,7 \mu\text{m}^{-1}$  abseits von A $\beta$ -Ablagerungen ( $>50 \mu\text{m}$ ) festgestellt, die sich nicht signifikant von der Spine-Dichte der Wildtyptiere (circa  $1,6 \mu\text{m}^{-1}$ ) unterschied. Dagegen wurde im direkten Umfeld ( $<50 \mu\text{m}$ ) von A $\beta$ -Ablagerungen eine signifikante Reduzierung der Spine-Dichte (circa  $1,4 \mu\text{m}^{-1}$ ) beobachtet. Diese Beobachtung ist im Einklang mit weiteren Studien, die einen Verlust von dendritischen Spines in der Umgebung von A $\beta$ -Ablagerungen bis zu einer Entfernung von  $50 \mu\text{m}$  bei transgenen AD-Mausmodellen beobachteten<sup>172,384,385,251,246,386,405</sup>. Zudem wurde in der Nähe sowie abseits von A $\beta$ -Ablagerungen eine signifikante Reduzierung in der Dichte pilzförmiger Spines in APP-Knock-In Versuchstieren gegenüber Wildtyptieren beobachtet. Frühere Studien zeigten für das APP-Knock-In Mausmodell bei einem Alter von sechs Monaten ebenfalls eine Reduzierung der Dichte von pilzförmigen Spines apikaler Dendriten der CA1-Region<sup>389</sup>. Darüber hinaus wurde ein Anstieg in der absoluten Spine-Dichte gegenüber Wildtyptieren beobachtet. In der Studie von Zhang *et al.* wurde allerdings weder der Verzweigungsgrad der Dendriten noch ihre Entfernung zu A $\beta$ -Ablagerungen angegeben, was den Unterschied zu der beobachteten Spine-Dichte bei APP-Knock-In Versuchstieren im Rahmen dieser Studie erklären könnte. Darüber hinaus konnten Zhang *et al.* zeigen, dass der STIM2 (engl. stromal interaction molecule 2)-nSOC (engl. neuronal store-operated calcium entry) -Signalweg ab einem Alter von drei Monaten beeinträchtigt ist. Diese Beeinträchtigung führt laut der Studie unter anderem zu dem beobachteten Abbau von pilzförmigen Spines im APP-Knock-In Mausmodell<sup>389</sup>.

Pilzförmige Spines nehmen im Prozess der Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle ein. Ihre Morphologie zeugt von einer ausgeprägten postsynaptischen Dichte (PSD) sowie einer hohen Anzahl von Glutamatrezeptoren<sup>44,55,56</sup>, wodurch sie befähigt sind starke synaptische Verbindungen auszubilden<sup>58</sup>. Deshalb gelten pilzförmige Spines, in Bezug auf den Mechanismus des Lernens und der Gedächtnisbildung, als „erinnernde Spines“ und werden mit dem Langzeitgedächtnis assoziiert<sup>74</sup>. Es wird darüber hinaus postuliert, dass der Verlust von pilzförmigen Spines ein relevanter zellbiologischer Marker für den Gedächtnisverlust während der AD-Pathologie ist<sup>406,407,389</sup>. Unterstrichen wird diese Aussage unter anderem durch Studien, die nach der Applikation von synthetischen A $\beta$ 42-Peptiden in neuronalen Wildtypkulturen<sup>389</sup> sowie in transgenen AD-Mausmodellen ein Verlust von pilzförmigen Spines beobachten konnten, der im Mausmodell zudem zu einer Beeinträchtigung der kognitiven Leistung führte<sup>408</sup>. Eine mögliche Hypothese ist, dass der Rückgang der pilzförmigen

gen Spines aus einer Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität resultiert. Die Induktion einer synaptischen Langzeit-Potenzierung (LTP), wobei die Präsynapse hochfrequent erregt wird, bewirkt neben der Neubildung von Spines<sup>65,66</sup> eine Volumenzunahme bestehender Spines<sup>69</sup>. Durch die hochfrequente Erregung der Präsynapse erfährt der Spine ebenfalls einen massiven Calciumstrom. In Folge dessen werden neue AMPA-Rezeptoren an der Membranoberfläche des Spines ausgebildet und somit die PSD des Spines ausgebaut. Dies bewirkt insgesamt eine Verstärkung der synaptischen Verbindung von Prä- und Postsynapse<sup>70,71</sup> (siehe Kapitel 1.1.5). Dabei konnte gezeigt werden, dass vor allem dünne Spines solche Volumenvergrößerungen beibehalten und permanent potenziert bleiben können<sup>70</sup>. Der hier beobachtete Rückgang in der Dichte pilzförmiger Spines deutet somit auf eine Beeinträchtigung in der Langzeit-Potenzierung hin, die weiter den verringerten morphologischen Ausbau der PSD der dünnen und neugebildeten Spines bedingt hat.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Studie mittels der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie eine signifikante Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines der Pyramidenzellen des *Stratum oriens* der CA1-Region im Hippocampus in APP-Knock-In Versuchstieren observiert. Bei der *in vivo* Untersuchung wurden Dendriten abseits von FSB gefärbten und somit fibrillären A $\beta$ -Ablagerungen analysiert, um so vorrangig den Einfluss von A $\beta$ -Oligomeren auf die Spine-Kinetik zu untersuchen. Die *in vivo* Untersuchungen zeigten einen signifikanten Rückgang in der Dichte neugebildeter Spines abseits von A $\beta$ -Ablagerungen im APP-Knock-In Mausmodell gegenüber Wildtyptieren (siehe Abbildung 13). Die beeinträchtigte strukturelle Plastizität dendritischer Spines, insbesondere die signifikant reduzierte Dichte neugebildeter Spines, unterstreicht die zuvor getroffene Hypothese, dass eine Beeinträchtigung der Langzeit-Potenzierung im APP-Knock-In Mausmodell vorliegen könnte. Eine Beeinträchtigung der Langzeit-Potenzierung äußerte sich somit im APP-Knock-In Mausmodell abseits von A $\beta$ -Ablagerungen in der vorliegenden Studie *ex vivo* in einem Rückgang in der Dichte von pilzförmigen Spines und *in vivo* in einer verringerten Neubildung von Spines<sup>65,66</sup>. Zusätzlich wurde ein signifikanter Rückgang in der Dichte der abgebauten Spines beobachtet. Dies kann dadurch erklärt werden, dass sich unter physiologischen Bedingungen die Bildung und der Abbau von dendritischen Spines in einem homöostatischen Gleichgewicht befinden<sup>40</sup>. Demnach könnte der reduzierte Spine-Abbau einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, um der verminderten Spine-Bildung entgegenzuwirken. Zudem wurde auch in der Spine-Umsatzrate, die sich aus dem Anteil neugebildeter und abgebauter Spines in Relation zur totalen Spine-Anzahl zusammensetzt, ein signifikanter Rückgang gegenüber Wildtyptieren observiert.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Untersuchungen zur strukturellen Plastizität dendritischer Spines der CA1-Region im APP-Knock-In Mausmodell haben bisher keine Vergleichsstudien in der aktuellen Literatur und stellen daher neue Erkenntnisse für das Verständnis dieses AD-Mausmodells dar.

Die, basierend auf den in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse, aufgestellte Hypothese, dass eine Beeinträchtigung der Langzeit-Potenzierung im APP-Knock-In Mausmodell vorliegt, konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden. In sechs Monate alten APP-Knock-In Versuchstieren wurden Beeinträchtigungen bei der Aufrechterhaltung sowie in der Ma-

gnitude des CA1-LTPs observiert<sup>409</sup>. Als Ursache werden die neurotoxischen A $\beta$ -Oligomere, aus denen die A $\beta$ -Ablagerungen im APP-Knock-In Mausmodell vorrangig bestehen, angesehen. Allerdings bedarf es zur endgültigen Klärung noch weiteren Untersuchungen. Die negative Wirkung von A $\beta$ -Oligomeren auf die synaptische Plastizität konnte allerdings in früheren Studien bereits gezeigt werden. Unter anderem wurde beobachtet, dass lösliche A $\beta$ -Oligomere in Wildtyptieren LTP inhibieren können<sup>410,206,411,412</sup> und stattdessen LTD induzieren<sup>208,196</sup>. Zudem konnte in einem APP-transgenen Rattenmodell vor der Akkumulation von A $\beta$ -Plaques gezeigt werden, dass A $\beta$ -Oligomere eine Hemmung des LTP an den apikalen Synapsen in der CA1-Region bewirken<sup>413</sup>. Eine Erhöhung der A $\beta$ -Konzentration an den Endköpfen von Synapsen führt darüber hinaus zu einer Beeinträchtigung der Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen, was morphologische und physiologische Veränderungen wie Verdünnung der synaptischen Endpunkte, Änderung der molekularen Zusammensetzung der PSD und schlussendlich die Unterbrechung der synaptischen Signalwege bedingt<sup>414,222,415,416,417</sup>. Des Weiteren wurden A $\beta$ -Oligomere in hohen Konzentrationen aus den Gehirnen von AD-Patienten isoliert, wobei ihre Konzentration signifikant mit dem Grad des Verlustes der kognitiven Fähigkeiten der AD-Patienten korrelierte<sup>153,154,155</sup>. Darüber hinaus ist bekannt, dass A $\beta$ -Oligomere in AD-Patienten und Mausmodellen eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Synapsen aufweisen<sup>203,204</sup> und gebunden an Synapsen eine Vielzahl von aberranten Signalwegen auslösen (siehe Kapitel 1.2.3 und 1.2.5). Unter anderem bewirken gebundene A $\beta$ -Oligomere den Abbau von NMDA- und AMPA-Rezeptoren in der PSD der Spines, was sich negativ auf die Signalübertragung sowie Plastizität auswirkt<sup>253,207</sup>. Ein gravierender Verlust von AMPA und NMDA-Rezeptoren kann darüber hinaus zum Abbau der PSD sowie im weiteren Verlauf zur Degeneration des gesamten Spines führen<sup>203</sup>. Bei einem Alter von fünf Monaten ist die A $\beta$ -Last im APP-Knock-In Mausmodell zwar deutlich erhöht (siehe Abbildung 10), allerdings wurden *in vivo* und *ex vivo* keine Beeinträchtigung der Spine-Dichte abseits von fibrillären A $\beta$ -Ablagerungen im Vergleich zu Wildtyptieren beobachtet (siehe Abbildung 12 und 14).

Die Abweichung in der absoluten Spine-Dichte des APP-Knock-In Mausmodells der *ex vivo* (circa  $1,7 \mu\text{m}^{-1}$ ) und *in vivo* (circa  $1,1 \mu\text{m}^{-1}$ ) Untersuchungen ist der unterschiedlichen Methodik geschuldet. Die immunhistochemischen *ex vivo* Aufnahmen von dendritischen Spines wurden mit einem inversen konfokalen Mikroskop (LSM780) durchgeführt (siehe Kapitel 4.6.4). Die Konfokalmikroskopie ist zwar limitiert in ihrer Eindringtiefe, je nach Präparat beträgt diese 50 - 80  $\mu\text{m}$ , allerdings ermöglicht die hohe Tiefenschärfe sowie die Z-Auflösung von circa 0,39  $\mu\text{m}$  sogar eine präzise morphologische Unterscheidung der Spine-Arten. Die *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie mittels eines LSM880 ermöglicht dagegen intravitalmikroskopische Analysen bis zu einer Tiefe von 800  $\mu\text{m}$ <sup>387,388</sup>. Da allerdings die Z-Auflösung *in vivo* auf 1  $\mu\text{m}$  limitiert ist, wurden nur die Spines erfasst, die lateral vom Dendriten abzweigen, was die niedrigere Spine-Dichte *in vivo* gegenüber den *ex vivo* Untersuchungen erklärt.

Die zuvor diskutierten Ergebnisse wurden in männlichen APP-Knock-In Versuchstieren observiert. Für das APP-Knock-In Mausmodell wurde in der A $\beta$ -Last allerdings ein Unterschied

zwischen männlichen und weiblichen Tieren beobachtet. In zwölf Monate alten Weibchen war die A $\beta$ -Last doppelt so hoch wie bei männlichen Tieren<sup>380</sup>. Im Folgenden wurde deshalb überprüft, ob ebenfalls ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der dendritischen Spine-Plastizität im APP-Knock-In Mausmodell vorliegt. Analog zu den Untersuchungen in männlichen APP-Knock-In Versuchstieren wurde die strukturelle Plastizität dendritischer Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region ab einem Alter von dreieinhalb Monaten über sechs Wochen verfolgt. Dabei wurde festgestellt, dass die Spine-Kinetik abseits von A $\beta$ -Ablagerungen in weiblichen APP-Knock-In Versuchstieren ebenfalls beeinträchtigt war (siehe Abbildung 15). Allerdings konnte eine signifikant höhere Spine-Umsatzrate in weiblichen gegenüber männlichen APP-Knock-In Versuchstieren observiert werden.

Die höhere Spine-Umsatzrate ergab sich vorrangig aus dem ebenfalls signifikant erhöhten Anteil abgebauter Spines. Der Anteil neugebildeter Spines unterschied sich über die Zeit in männlichen und weiblichen Versuchstieren dagegen nicht.

In weiblichen APP-Knock-In Versuchstieren wurde *in vivo* allerdings eine höhere FSB-positive A $\beta$ -Last beobachtet, was den gestiegenen Anteil abgebauter Spines erklären könnte. Einen signifikanten Unterschied in der Spine-Dichte in weiblichen APP-Knock-In Versuchstieren wurde allerdings nicht beobachtet. In weiblichen APP-Knock-In Versuchstieren wurde zudem eine höhere Anzahl eGFP-positiver Neurone observiert, wodurch die mikroskopische Aufnahme von einzelnen Dendriten abseits von A $\beta$ -Ablagerungen erschwert wurde. Aus diesem Grund wurden in den nachfolgenden Therapiestudien nur männliche Versuchstiere verwendet.

Zusammenfassend zeigten die *ex* und *in vivo* Observierungen zur Spine-Morphologie und Dichte sowie zur strukturellen dendritischen Spine-Plastizität im *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus abseits von A $\beta$ -Ablagerungen, dass die strukturelle Plastizität der Spines des APP-Knock-In Mausmodells ab einem Alter von dreieinhalb Monaten beeinträchtigt sowie die Dichte der pilzförmigen Spines signifikant erniedrigt war. Ein Verlust von Spines wurde allerdings weder bei den *in vivo* noch *ex vivo* Untersuchungen beobachtet.

### **3.1.4 Fazit: Das APP-Knock-In Mausmodell eignet sich für die Evaluierung präventiver therapeutischer Interventionen gegen AD**

Die vorgenommene Charakterisierung der APP-Knock-In Linie im Rahmen dieser Arbeit konnte herausstellen, dass dieses AD-Mausmodell ein valides Modell der Frühphase der Alzheimer ähnlichen Demenz darstellt. Im Gegensatz zu vielen traditionell generierten transgenen AD-Mausmodellen, die überwiegend bereits nach wenigen Monaten eine sehr hohe fibrilläre A $\beta$ -Last aufweisen<sup>381</sup>, zeigte die Untersuchung der diffusen A $\beta$ -Ablagerungen des APP-Knock-In Mausmodells, dass diese überwiegend aus A $\beta$ -Oligomeren bestanden. Zu einem sehr geringen Anteil wurden ebenfalls A $\beta$ -Fibrillen observiert, die einen nicht kompakten A $\beta$ -Plauekern bildeten (siehe Abbildung 9). Es wird vermutet, dass die kompakten und großen fibrillären A $\beta$ -Plaques primär aufgrund der Überexpression von APP bereits nach wenigen Monaten bei transgenen AD-Mausmodellen entstehen und vorrangig

die A $\beta$ -Plaques Pathologie von AD-Patienten im fortgeschrittenem AD-Stadium widerspiegeln<sup>381,399</sup>. Die vorwiegend aus A $\beta$ -Oligomeren bestehenden A $\beta$ -Ablagerungen im APP-Knock-In Mausmodell ähneln in ihrer Beschaffenheit dagegen eher humanen A $\beta$ -Ablagerungen des frühen AD-Stadiums<sup>400,381</sup>. Die diffusen A $\beta$ -Ablagerungen des APP-Knock-In Mausmodells stellten zwar eine Limitation für das A $\beta$ - $\mu$ PET dar, da sich der verwendete Radiotracer [<sup>18</sup>F]-FBB hauptsächlich an A $\beta$ -Fibrillen anlagert, trotzdem konnte, durch eine geeignete Pseudo-Referenzregion, eine robuste A $\beta$ - $\mu$ PET-Signal Auswertung erzielt werden. Es wurde kortikal ein signifikanter Anstieg des A $\beta$ - $\mu$ PET-Signals ab siebeneinhalb Monaten gegenüber dem Referenzwert bei zweieinhalb Monaten gemessen, wobei ein signifikanter Anstieg im TSPO- $\mu$ PET-Signal schon ab einem Alter von fünf Monaten beobachtet wurde. Der Anstieg des TSPO- $\mu$ PET-Signals zeigte sich über das Alter stärker ausgeprägt als der Anstieg des A $\beta$ - $\mu$ PET-Signals (siehe Kapitel 3.1.1). Die Aggregation von A $\beta$ 42-Peptiden zu A $\beta$ -Oligomeren stellt den ersten Schritt in der Amyloid-Kaskaden-Hypothese dar<sup>138,139</sup> und der geringe Anteil an A $\beta$ -Fibrillen im APP-Knock-In Mausmodell unterstreicht das frühe Stadium der AD-Pathologie des APP-Knock-In Mausmodells.

Darüber hinaus wurde *in vivo* eine Beeinträchtigung der strukturellen Spine-Plastizität der basalen Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus abseits von A $\beta$ -Ablagerungen beobachtet, wohingegen die Spine-Dichte nicht reduziert war. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass durch die akkumulierten A $\beta$ -Oligomere die synaptische Funktion im APP-Knock-In Mausmodell zwar signifikant beeinträchtigt wurde, was sich im Rückgang der strukturellen Plastizität dendritischer Spines äußerte, ein Verlust von Postsynapsen aber noch nicht stattgefunden hat, was ein spätes Stadium der AD kennzeichnen würde<sup>203,244,245,246</sup>. Als ein weiteres Charakteristikum der fortgeschrittenen AD werden Defizite in der kognitiven Leistung angesehen<sup>418</sup>. Im APP-Knock-In Mausmodell sind die Beobachtungen diesbezüglich nicht ganz eindeutig (siehe Kapitel 3.1.2). Im Rahmen dieser Studie wurden allerdings Beeinträchtigungen in der hippocampusabhängigen Lernfähigkeit und der Gedächtnisleistung observiert.

Für die vorklinische Untersuchung therapeutischer Ansätze gegen AD gilt es zu bedenken, dass die Speziesunterschiede zwischen Nagetieren und Menschen in Bezug auf Neuroanatomie, Genetik und Verhalten bei jedem AD-Modell gegeben sind und sich im Mausmodell gewonnene Erkenntnisse nie direkt auf den Menschen übertragen lassen<sup>419,420,421,422</sup>. Das APP-Knock-In Mausmodell entwickelt zudem, vermutlich aufgrund der kurzen Lebenszeit von durchschnittlich zweieinhalb Jahren, keine Tau-Pathologie<sup>381,379</sup>. Dadurch bildet es auf der einen Seite zwar nicht das komplette Krankheitsbild der AD ab, allerdings unterstreicht das Fehlen der Tau-Pathologie auch das frühe AD-Stadium des Mausmodells. Beim Menschen wird ebenfalls erst im späteren Verlauf der AD eine Tau-Pathologie beobachtet<sup>418,139,138</sup>. Darüber hinaus wurden auch einige der multiplen Mutationen der APP-Knock-In Linie im APP-Gen bei AD-Patienten nicht beobachtet und könnten prinzipiell in einigen Fällen miteinander interagieren und dadurch möglicherweise nicht exakt die klinische FAD widerspiegeln. Dies gilt es weiter zu untersuchen.

Zusammenfassend zeigte die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Charakterisierung des APP-Knock-In Mausmodells, dass dieses Mausmodell eine frühe Phase der AD wider-

spiegelt, was ebenfalls im Einklang mit der Literatur ist<sup>381</sup>. Dadurch eignet es sich für die Untersuchung präventiver Therapieansätze, die darauf abzielen, die A $\beta$ 42-Generation zu hemmen und somit die A $\beta$ -Aggregation zu A $\beta$ -Oligomeren und A $\beta$ -Fibrillen zu verringern, wodurch deren toxische Wirkung auf Synapsen und Postsynapsen eingedämmt werden würde. Nach dem aktuellen Forschungsstand wird der Erfolg der BACE-Inhibition zur Behandlung der Alzheimer Demenz in einem präventiven Therapieansatz gesehen. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde deshalb unter Verwendung des APP-Knock-In Mausmodells die Effektivität einer präventiven BACE-Inhibitor Intervention mittels einer niedrigen und einer hohen Inhibitor-Dosierung evaluiert.

### **3.2 Evaluierung der BACE-Inhibition mittels NB-360 als präventive therapeutische Intervention im AD-Mausmodell APP-Knock-In**

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese postuliert, dass die Akkumulation und Aggregation des A $\beta$ 42-Peptides das initiale Ereignis der Alzheimer Erkrankung darstellt<sup>135,136,137</sup>. Wie im Kapitel 1.2.2 näher beschrieben, wird das A $\beta$ 42-Protein durch die sequenzielle, proteolytische Spaltung APPs generiert<sup>135</sup>. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses amyloidogenen Prozessierungsweges ist die Spaltung APPs durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1. Auf Grundlage dieser Hypothese wurde in den letzten Jahrzehnten der Therapieansatz der BACE1-Inhibition verfolgt. Allerdings scheiterten vielversprechende BACE-Inhibitoren verschiedener Pharmafirmen in klinischen Studien daran, kognitive Störungen, die im Verlauf der AD-Pathologie auftreten, signifikant zu verbessern<sup>371,372</sup>. Darüber hinaus wurden während den klinischen Studien bei Probanden Nebenwirkungen, wie unter anderem Leiden an Leberinsuffizienz<sup>369</sup> oder eine Verschlechterung der kognitiven Leistung<sup>373,369,370</sup>, bedingt durch die BACE-Inhibitor Behandlung beobachtet. Im Kontext der humanen klinischen Studien konnte in Wildtypieren ebenfalls ein signifikant negativer Effekt auf die strukturelle Plastizität sowie Dichte dendritischer Spines unter BACE-Inhibition im somatosensorischen Cortex festgestellt werden<sup>376,377,375</sup>. Einen möglichen Erklärungsansatz für die im Wildtyp beobachteten Ergebnisse stellt die verminderte Prozessierung der weiteren circa 40 Substrate von BACE1 unter BACE-Inhibition dar<sup>368</sup>. Ein exklusives BACE1-Substrat ist das postsynaptisch lokalisierte Typ-1-Membranprotein Sez6, dessen genetische Deletion zu einer Reduktion in der dendritischen Spine-Dichte führt<sup>377,349</sup>. Im Wildtyp konnte allerdings gezeigt werden, dass die Reduktion der Spine-Dichte im somatosensorischen Cortex unter BACE-Inhibition vorrangig durch eine verminderte Neubildung dendritischer Spines bedingt ist<sup>376,375</sup>. Die strukturelle Plastizität dendritischer Spines, insbesondere ihre Neubildung, stellt einen zentralen zellulären Mechanismus beim Prozess des Lernens und der Gedächtnisbildung dar<sup>53,54,52,51</sup> (siehe Kapitel 1.1.5). Die observierte Beeinträchtigung der Spine-Kinetik sowie die Reduzierung der Spine-Dichte unter BACE-Inhibition im Wildtyp wird ebenfalls als potentieller Erklärungsansatz für die beobachteten kognitiven Defizite unter BACE-Inhibitor Behandlung in den humanen klinischen Studien postuliert<sup>376,375,350,377</sup>. Es gilt allerdings zu beachten, dass sich die A $\beta$ - und BACE1-Konzentrationen sowie die Aktivität und Affinität der BACE1-Sekretase unter pathologischen AD-Bedingungen sehr

wahrscheinlich von denen unter physiologischen Bedingungen unterscheiden<sup>368</sup>. In dieser Studie wurde deshalb davon ausgegangen, dass eine therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition im AD-Kontext andere Effekte bewirkt als unter physiologischen Bedingungen. Darüber hinaus wurde im ersten Teil dieser Studie eine signifikante Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines für das AD-Mausmodell APP-Knock-In im Vergleich zu Wildtyptieren beobachtet (siehe Kapitel 3.1.3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb zunächst evaluiert ob und mit welcher Inhibitor-Dosierung eine präventive Intervention mittels BACE-Inhibition die zuvor observierte Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines im APP-Knock-In Mausmodell verbessern konnte. Zu diesem Zweck wurden in dreieinhalb Monate alten, männlichen APP-Knock-In Versuchstieren dendritische Spines des *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus abseits von FSB-positiven fibrillären A $\beta$ -Ablagerungen ( $>50\ \mu\text{m}$ ) über einen Zeitraum von sechs Wochen mittels der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie verfolgt. Nach dem zweiten Beobachtungszeitpunkt startete die BACE-Inhibitor Behandlung mittels einer hohen (0,29 g/kg) sowie einer niedrigen (0,05 g/kg) Dosierung des Inhibitors NB-360 von Novartis über einen Zeitraum von vier Wochen.

Der Ansatz einer präventiven Intervention mittels BACE-Inhibition würde zukünftig für AD-Patienten eine langfristige Therapiedauer bedeuten. Deshalb wurden anschließend die Auswirkungen einer langfristigen BACE-Inhibitionstherapie, mittels der zuvor im APP-Knock-In Mausmodell als therapeutisch effektiv evaluierten NB-360-Dosierung, untersucht. Analog zu dem im Kapitel 2.1.2 dargestellten Versuch wurde mittels A $\beta$ - $\mu\text{PET}$  sowie TSPO- $\mu\text{PET}$  im APP-Knock-In Mausmodell ab einem Alter von zweieinhalb Monaten longitudinal die A $\beta$ -Last sowie die Neuroinflammation unter BACE-Inhibition detektiert. Die Behandlung mit dem BACE-Inhibitor NB-360 erfolgte über acht Monate. Anschließend wurde die kognitive Leistung der Versuchstiere anhand des Morris-Wasserlabyrinth-Tests untersucht.

Ziel war es zu evaluieren, ob eine präventive, längerfristige BACE-Inhibition die AD-Pathologie signifikant verlangsamt ohne dass es zu Nebenwirkungen kommt.

### **3.2.1 Die negative Wirkung der BACE-Inhibition auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines des *Stratum oriens* der hippocampalen CA1-Region von Wildtyptieren ist dosisabhängig**

Zu Beginn wurde die Wirkung zweier unterschiedlicher BACE-Inhibitor Dosierungen auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines der CA1-Region im Hippocampus in Wildtyptieren untersucht, um die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext zu vorherigen Studien diskutieren zu können. In den vorherigen Studien wurde der Effekt der BACE-Inhibierung auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines im somatosensorischen Cortex in Wildtyptieren analysiert<sup>376,377,375</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den untersuchten Wildtyptieren eine signifikante Abnahme in der Bildung von neuen dendritischen Spines der Pyramidenzellen der CA1-Region unter BACE-Inhibitor Behandlung mittels beider NB-360-Dosierungen beobachtet (siehe Abbildung 17).

Dieser Effekt ist möglicherweise dadurch bedingt, dass die Inhibition der BACE1-Sekretase unter physiologischen Bedingungen eine unphysiologische Reduzierung des A $\beta$ -Peptides an Synapsen bewirkte. Wie in Kapitel 3.1.3 bereits beschrieben, konnten frühere Studien zeigen, dass physiologische Konzentrationen von A $\beta$  förderlich für die Gedächtnisbildung sind<sup>196</sup>. Durch Zugabe pikomolarer Konzentrationen von A $\beta$ 42-Monomeren sowie A $\beta$ 42-Oligomeren wird LTP gesteigert, was sich positiv auf die synaptische Plastizität ausübt. Dagegen führen hohe A $\beta$ 42-Konzentrationen im nanomolaren Bereich zu einer Reduzierung der LTP und dadurch zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität<sup>196</sup> (siehe Kapitel 1.1.5). Darüber hinaus wurde für die BACE1-Sekretase, welche hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert ist<sup>316</sup>, gezeigt, dass ihre genetische Deletion sowie eine starke chronische pharmakologische Inhibierung im Wildtyp ebenfalls zu einer LTP-Reduzierung zwischen den Synapsen der Schaffer-Kollateralen und Pyramidenzellen in der CA1-Region im Hippocampus führt<sup>344,376</sup>. Prä- und Postsynapsen beeinflussen sich gegenseitig erheblich<sup>64</sup>. So bewirkt die hochfrequente Erregung der Präsynapsen während der LTP dauerhafte morphologische Veränderungen an ihren Postsynapsen, wie die Vergrößerung des Spine-Kopfes bis hin zur Neubildung von Spines<sup>64,65,66,67,68</sup>. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Beeinträchtigungen der strukturellen Plastizität der Postsynapsen in Wildtyp-Tieren zumindest zum Teil durch die unphysiologische Reduzierung des A $\beta$ 42-Peptides sowie der daraus resultierenden Verminderung der LTP-Phase an den Präsynapsen bedingt wurde (siehe Abbildung 17). Darüber hinaus wurden neben APP mehr als 40 weitere Substrate identifiziert die von BACE1 gespalten werden<sup>368</sup>. Einige dieser Substrate sind wie BACE1 präsynaptisch lokalisiert, wobei gezeigt werden konnte, dass sie teilweise für die synaptische Funktion und Plastizität von entscheidender Bedeutung sind<sup>345,423,424</sup>.

Das präsynaptische BACE1-Substrat NRG1 beispielsweise bindet in seiner löslichen Form an den postsynaptischen Rezeptor ERBB4 (engl. human epidermal growth factor receptor 4)<sup>335,334</sup>. Der NRG1-ERBB4-Signalweg reguliert über postsynaptische Glutamat-Rezeptoren sowie der Interaktion zwischen ERBB4 und PSD-95 die synaptische Plastizität sowie die Ausbildung kortikaler Interneurone<sup>425,426</sup>. PSD-95 (engl. postsynaptic density protein 95) ist ein Protein in der PSD, welches eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität und der Stabilisierung von synaptischen Veränderungen während LTP einnimmt<sup>427</sup>. Die genetische Deletion oder starke Inhibierung von BACE1 vermindert die Spaltung von NRG1 und beeinträchtigt so den NRG1-ERBB4-Signalweg, was zu einer Destabilisierung der postsynaptischen Glutamat-Rezeptoren und zu einer verminderten Interaktion zwischen ERBB4 und PSD-95 führt<sup>428</sup>. Diese Beeinträchtigungen resultieren in einer Verminderung der synaptischen Plastizität und führen schlussendlich zu einem Verlust von dendritischen Spines<sup>425,426</sup>. Ein weiteres präsynaptisches BACE1-Substrat ist das Zelladhensionsmolekül CHL1 (engl. cell adhesion molecule L1-like protein) welches, neben seiner Rolle in der axonalen Verschaltung<sup>347,348</sup>, die Exozytose und Clathrin-vermittelte Endozytose von synaptischen Vesikeln reguliert<sup>429,430</sup>. Die genetische Deletion des Moleküls bewirkte im Mausmodell eine stark beeinträchtigte synaptische Übertragungsleistung<sup>431</sup>. Dieser Effekt konnte auch in BACE1-defizienten Mäusen beobachtet werden<sup>321</sup>. Des Weiteren wurde BACE1 in geringeren Konzentrationen auch postsynaptisch nachgewiesen<sup>432</sup>. Wie im Kapitel 1.3.1 bereits

beschrieben, konnte gezeigt werden, dass BACE1 unter anderem exklusiv Sez6 postsynaptisch spaltet. Sez6 ist in zahlreichen neuronalen Vorgängen involviert<sup>349</sup> und die genetische Deletion bzw. fehlende oder stark gehemmte Prozessierung von Sez6 durch BACE1 führt zu einer Reduktion in der dendritischen Spine-Dichte<sup>377</sup>.

Die Unterdrückung des eigentlich bei physiologischen Konzentrationen positiven Effekts des A $\beta$ 42-Proteins auf die synaptische Plastizität sowie die verminderte Prozessierung der zahlreichen prä- und postsynaptischen Substrate von BACE1, welche teilweise eine kritische Rolle in der synaptischen Plastizität und/oder in der strukturellen Plastizität dendritischer Spines einnehmen, bieten einen Erklärungsansatz für die observierte Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines unter BACE-Inhibition mittels NB-360 in Wildtyptieren. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die hohe NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) zu einer stärkeren Beeinträchtigung in Wildtyptieren führte als die niedrige NB-360-Dosierung (0,05 g/kg). Unter der hohen NB-360-Dosierung sank der Anteil neugebildeter Spines um 35 % bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt, was sich ebenfalls in einer signifikanten Reduzierung der Spine-Dichte um 6,9 % gegenüber der Kontrollgruppe am letzten Beobachtungszeitpunkt widerspiegelte.

Bei der niedrigen Dosierung von NB-360 (0,05 g/kg) war der Effekt der BACE-Inhibierung nicht eindeutig. Der Anteil der neugebildeten Spines ging nach der ersten Behandlungswoche ebenfalls zurück, stieg dann aber bis zur dritten Behandlungswoche fast auf das Niveau der Kontrollgruppe an, um danach erneut stark abzufallen. Insgesamt wurde eine Reduktion im Anteil der neugebildeten Spines um 29,8 % gegenüber der Kontrollgruppe am letzten Beobachtungszeitpunkt observiert. Die Spine-Dichte stieg allerdings unter der niedrigen NB-360-Dosierung gegenüber der Kontrollgruppe signifikant bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt um 8,9 % an (siehe Abbildungen 17 und 18).

Der Anstieg in der Spine-Dichte unter der niedrigen NB-360-Dosierung lässt sich durch den gestiegenen Anteil persistenter Spines erklären. Der Anteil persistenter Spines im Wildtyp war am letzten Beobachtungszeitpunkt gegenüber der Kontrollgruppe signifikant um 4,2 % erhöht. Persistente Spines bleiben nach ihrer Neubildung stabil, wohingegen transiente Spines innerhalb von acht Tagen wieder abgebaut werden<sup>54</sup> (siehe Kapitel 1.1.4). Es wird deshalb vermutet, dass unter der niedrigen NB-360-Dosierung im Wildtyp die Spines die neugebildet wurden stabiler waren, was sich ebenfalls in der geringeren Dichte abgebauter Spines widerspiegelte (siehe Abbildung 18).

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Zunahme der persistenten Spines bei der niedrigen NB-360-Dosierung wäre, dass bei dieser Dosis neben den zuvor besprochenen neurotoxischen ebenfalls auch neuroprotektive BACE1-Inhibitionseffekte erzielt wurden. Durch die Inhibierung der BACE1-Sekretase wird unter anderem die Prozessierung APPs durch die  $\alpha$ -Sekretase indirekt gesteigert. Eine frühere Studie konnten zeigen, dass bei einer Inhibierung von BACE1 das lösliche APP-Spaltprodukt sAPP- $\alpha$  an Synapsen akkumuliert und dort eine neuroprotektive Funktion ausübt sowie einen positiven Effekt auf dendritische Spines bewirkt<sup>433</sup>. Unprozessiertes APP, das durch die Inhibition von BACE1 vermehrt vorliegt, wirkt sich ebenfalls positiv auf die synaptische Aktivität sowie auf die Formation und Stabilisierung von Synapsen und Spines aus<sup>434</sup>. Bei diesem Prozess wird vor allem der extrazellulä-

ren APP-Domäne eine entscheidende Rolle zugeschrieben<sup>435</sup>. Es ist anzunehmen, dass die verminderte Prozessierung von BACE1-Substraten an Prä- und Postsynapsen unter BACE-Inhibition mittels der niedrigen NB-360-Dosierung somit entgegengesetzte neurotoxische und neuroprotektive Inhibitionseffekte zur Konsequenz hatten. Einerseits bewirkte die verringerte proteolytische BACE1-Aktivität im Wildtyp die Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines, welche vorrangig durch die unphysiologisch niedrige A $\beta$ 42-Konzentration und Sez6-Prozessierung ausgelöst wurde. Andererseits bewirkten kompetitive proteolytische Mechanismen, induziert durch die Akkumulation von sAPP- $\alpha$  sowie unprozessiertem APP an Prä- und Postsynapsen, die Stabilisierung der neugebildeten Spines, was den erhöhten Anteil persistenter Spines und den Anstieg in der Spine-Dichte erklärt. Bei der hohen NB-360-Dosierung überwiegen anscheinend die neurotoxischen BACE1-Inhibitionseffekte, wodurch die neuroprotektiven BACE1-Inhibitionseffekte keine Wirkung mehr zeigten. Darüber hinaus fällt bei der hohen NB-360-Dosierung die geringe Spezifität des Inhibitors für BACE1 gegenüber BACE2 ebenfalls schwerer ins Gewicht. Unter der hohen NB-360-Dosierung wird neben BACE1 auch die Sekretase BACE2 stärker inhibiert. Dies bewirkt ebenfalls eine geringere Prozessierung der Substrate der BACE2-Sekretase, was die neurotoxischen Inhibitionseffekte weiter verstärkt haben könnte (siehe Kapitel 1.3.2).

Des Weiteren kann durch eine starke BACE1-Inhibierung zudem die APP-Prozessierung durch die  $\eta$ -Sekretase angeregt werden. Bei der  $\eta$ -Prozessierung von APP wird gleichzeitig auch eine Erhöhung der A $\eta$ - $\alpha$  Aktivität bewirkt, was sich im weiteren Verlauf unter anderem negativ auf die neuronale Aktivität auswirkt<sup>436</sup>. Vorherige Studien zeigten bei einer niedrig dosierten BACE-Inhibition nur einen positiven Trend aber keinen signifikanten Effekt auf die Spine-Dichte sowie auf die Bildung neuer Spines im somatosensorischen Cortex von Wildtyp-Tieren<sup>376</sup>. Filser *et al.* verwendete allerdings einen BACE-Inhibitor der das A $\beta$ 40-Level im Cortex um 45 % senkte. Die niedrige Dosierung des in dieser Arbeit verwendeten BACE-Inhibitors NB-360 verringerte das A $\beta$ 40-Level allerdings um 78 % im Cortex von Wildtyp-Tieren<sup>390</sup>. Als Limitation der vorliegenden Studie ist zu erwähnen, dass schon während der ersten beiden Beobachtungszeitpunkte die Spine-Dichte der Versuchsgruppe der niedrigen NB-360-Dosierung gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war, obwohl noch keine Therapie stattfand. Dieser Umstand ist der aufwändigen Methodik geschuldet. Die *in vivo* 2-Photonen Untersuchung ist sehr zeitintensiv und erstreckte sich bei der untersuchten Anzahl an Versuchstieren im Rahmen dieser Studie auf knapp anderthalb Jahre. In dieser Zeit musste der Laser des 2-Photonen Mikroskop gewartet werden, was wahrscheinlich zu einer höheren Laserleistung führte, was den Unterschied zwischen den Versuchsgruppen an den ersten beiden Beobachtungszeitpunkten erklärt.

Zusammenfassend deuten die erzielten Ergebnisse darauf hin, dass der negative Effekt der BACE1-Inhibition auf die strukturelle Plastizität und teilweise auch auf die Dichte dendritischer Spines im Wildtyp das Resultat eines A $\beta$ 42-Mangels an Synapsen sowie einer beeinträchtigten Prozessierung weiterer prä- und postsynaptischer BACE1-Substrate darstellte und im Einklang mit der Literatur ist<sup>376,350,377,375</sup>. Des Weiteren wurde gezeigt, dass dieser Effekt von der NB-360-Dosierung abhängig war, wobei bei einer niedrigen Dosierung sogar eine signifikante Zunahme in der Spine-Dichte observiert wurde. Deshalb wird ange-

nommen, dass bei einer niedrigen BACE-Inhibierung neben neurotoxischen, ebenfalls neuroprotektive BACE1-Inhibitionseffekte im Wildtyp wirken. Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterführend die dosisabhängige Wirkung einer präventiven BACE-Inhibition im pathologischen AD-Kontext unter Verwendung des APP-Knock-In Mausmodells evaluiert.

### **3.2.2 Die präventive therapeutische Intervention mittels der hohen NB-360-Dosierung steigerte die reduzierte strukturelle Plastizität dendritischer Spines der hippocampalen CA1-Region im APP-Knock-In Mausmodell**

Die BACE-Inhibierung mittels der hohen NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) bewirkte eine signifikante Steigerung in der Bildung neuer dendritischer Spines im *Stratum oriens* der CA1-Region des Hippocampus abseits von fibrillären A $\beta$ -Ablagerungen. Dieser Effekt spiegelte sich ebenfalls in der Erhöhung der Spine-Umsatzrate im APP-Knock-In Mausmodell wieder. Dagegen konnte die niedrige NB-360-Dosierung (0,05 g/kg) keinen signifikanten Effekt erzielen (siehe Abbildung 19).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten somit, dass eine präventive BACE-Inhibierung mittels einer Inhibitor-Dosierung, die das A $\beta$ 42-Level in Wildtyptieren um circa 84 % senkte<sup>390</sup>, potent genug war Beeinträchtigungen der Spine-Kinetik zu beheben und dadurch dem Verlauf der AD-Pathologie im APP-Knock-In Mausmodell entgegenzuwirken. Dies steht im Gegensatz zu den beobachteten neurotoxischen BACE-Inhibitionseffekten im Wildtyp, wo mittels der hohen NB-360-Dosierung eine Erniedrigung im Anteil neugebildeter Spines zu beobachten war. Einen möglichen Erklärungsansatz bieten die signifikant erhöhten A $\beta$ 40- sowie A $\beta$ 42-Konzentrationen im APP-Knock-In Mausmodell gegenüber dem Wildtyp<sup>437</sup>. Das A $\beta$ -Level liegt im APP-Knock-In Mausmodell weit über der neuroprotektiven A $\beta$ -Konzentration und wirkt dadurch neurotoxisch auf Präsynapsen, was sich unter anderem in einer Erniedrigung des LTPs widerspiegelt<sup>196,409</sup> (siehe Kapitel 3.1.3). Zudem wurde gezeigt, dass hohe A $\beta$ -Konzentrationen das Gleichgewicht reaktiver Sauerstoffspezies in synaptischen Boutons stören sowie die Expression von Dynamin, ein für die Endozytose synaptischer Vesikel kritisches Protein, herunterreguliert. Dadurch wird das Recycling synaptischer Vesikel unterbrochen sowie der Calcium-Einstrom in die Präsynapse gehemmt, was zu einer verminderten synaptischen Funktion führt<sup>438,439</sup>.

Vorklinische Studien im Mausmodell zeigten schon kurz nach der Identifizierung der BACE1-Sekretase, dass eine partielle BACE1-Inhibierung den Verlauf der AD-Pathologie signifikant hemmt. Es konnte gezeigt werden, dass die genetische Deletion eines einzelnen BACE1-Allels in transgenen APP-überexprimierenden Mausmodellen ausreicht, um das A $\beta$ -Level signifikant zu senken<sup>351</sup>. Durch die Senkung des A $\beta$ -Levels wurde das Voranschreiten der A $\beta$ -assoziierten Pathologie verlangsamt. Beispielsweise wurden Beeinträchtigungen der hippocampusabhängigen Lern und Gedächtnisleistung, unter anderem durch die Erhöhung des CA1-LTPs, signifikant verbessert<sup>342,440,441</sup>, ohne hierbei negative Effekte wie im homozygoten BACE1-Knock-Out Mausmodell zu induzieren<sup>344,351</sup>. Wie in Kapitel 1.3.1 bereits beschrieben, führt eine vollständige Deletion des BACE1-Gens zu einem Phänotyp der von Hy-

peraktivität, epileptischen Anfällen, Lern- und Gedächtnisstörungen sowie von Schizophrenie assoziierten Verhaltensänderungen geprägt ist<sup>428,321</sup>. Zudem zeigt das BACE1-Knock-Out Mausmodell Defizite in der synaptischen Plastizität und der Signalübertragung zwischen den hippocampalen Schaffer-Kollateralen zu Synapsen der CA1-Region<sup>344</sup>, als auch eine Verkürzung des Infrapyramidalen Bündel der Moosfasern<sup>442,443</sup>. Allerdings wurde auch gezeigt, dass die observierten Effekte einer genetischen BACE1-Deletion nicht gleichzusetzen sind mit der BACE1-Inhibition im adulten Alter, da die BACE1-Sekretase vor allem in der Entwicklung und der Neurogenese eine bedeutende Rolle einnimmt und ihre Konzentration in diesem Stadium deutlich erhöht ist<sup>334</sup>. Dass eine partielle Inhibition von BACE1 auch im Menschen effektiv gegenüber AD wirken kann wurde spätestens nach der Entdeckung einer APP-Punktmutation (Ala673Thr) wissenschaftlich anerkannt. Diese Mutation ist an der Schnittstelle von BACE1 lokalisiert und bewirkt im Menschen eine lebenslange Reduktion der A $\beta$ -Produktion um 28 %, wodurch das Risiko an der AD zu erkranken stark reduziert wird<sup>353,444</sup>.

BACE1 zeigt allerdings generell eine höhere Affinität zur Spaltung der nicht-amyloidogenen Substrate wie NRG1 und Sez6, die eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität einnehmen<sup>445</sup>. Dieser Aspekt könnte die Inhibition der Sekretase zur Hemmung der A $\beta$ -Generierung teilweise in Frage stellen. Die zuvor beschriebenen und diskutierten Ergebnisse im Wildtyp deuten allerdings darauf hin, dass dies vor allem unter physiologischen Bedingungen gilt (siehe Kapitel 3.2.1). In AD-Patienten sowie AD-Mausmodellen konnte dagegen gezeigt werden, dass das Expressionsniveau<sup>378</sup> und die Aktivität der BACE1-Sekretase signifikant erhöht ist<sup>307,151,378</sup>. Dies liegt unter anderem daran, dass die Ubiquitinierung von BACE1, was den Abbau der Sekretase einleiten würde, in AD signifikant beeinträchtigt ist<sup>446,447</sup>. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass A $\beta$ 42-Peptide die Calpain-vermittelte Spaltung von p35 bis p25 aktivieren können<sup>448</sup>, die wiederum die mRNA- und Proteinexpression der BACE1-Sekretase hochregulieren<sup>449,450</sup>. Im weiteren Verlauf der AD-Pathologie akkumuliert BACE1 zudem an dystrophen Neuronen die von A $\beta$ -Ablagerungen umgeben sind und treibt dort die A $\beta$ -Generierung weiter an<sup>451,452,453</sup>. Des Weiteren führt die schwedische FAD-Mutation (K670M671- zu N670L671-Mutation auf der Schnittstelle von BACE1), die ebenfalls vom APP-Knock-In Mausmodell exprimiert wird, sowie die Italienische FAD-Mutation (A673V)<sup>454</sup> zu einer Verschiebung der Prozessierungsaffinität von BACE1. Die BACE1-Affinität wird durch die Mutationen weg von nicht-amyloidogenen Substraten wie NRG1 oder Sez6 und hin zu APP verschoben. Dabei wurde eine mutationsbedingte Steigerung der APP-Prozessierung um das 10-50-fache beobachtet, was zu einem früheren Ausbruch der AD-Pathologie führt<sup>147</sup>.

Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass durch die partielle Inhibition der BACE1-Sekretase mittels der hohen NB-360-Dosierung im APP-Knock-In Mausmodell zunächst vor allem die Prozessierung von APP gehemmt wurde. Dies bewirkte eine signifikante Erniedrigung der zuvor erhöhten A $\beta$ -Generierung, die unter anderem mutationsbedingt durch die gestiegene Affinität der BACE1-Sekretase gegenüber APP bedingt war, sowie durch die allgemein gesteigerte Aktivität der BACE1-Sekretase im APP-Knock-In Mausmodell. Die Hemmung der zuvor erhöhten APP-Prozessierung führte wahrscheinlich zu einer Reduzierung

der A $\beta$ -Konzentration an den Synapsen, wodurch die A $\beta$ -induzierte neurotoxische Wirkung, wie beispielsweise Reduzierung des CA1-LTP<sup>409</sup>, an Prä- sowie Postsynapsen wegfiel. Diese Effekte spiegelten sich im signifikant gesteigerten Anteil neugebildeter Spines um 16,7 % gegenüber Kontrolltieren bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt wider (siehe Abbildung 19). Durch Steigerung der Bildung neuer Spines wurde zudem eine höhere Spine-Dichte unter der höheren NB-360-Dosierung um 5 % bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt gegenüber Kontrolltieren observiert. Die niedrige NB-360-Dosierung bewirkte dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Neubildung der Spines im APP-Knock-In Mausmodell, wodurch ebenfalls kein Effekt auf die Spine-Dichte zu beobachten war. Die ausbleibende Wirkung liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die niedrige NB-360-Dosierung nicht potent genug war, um die A $\beta$ -Konzentration an den Synapsen soweit zu senken, als dass ein sichtbar positiver Effekt auf die beeinträchtigte strukturelle Plastizität dendritischer Spines im APP-Knock-In Mausmodell erwirkt werden konnte.

Zusammenfassend zeigten die vorgenommenen Untersuchungen, dass unter BACE-Inhibition mittels der hohen NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) die Umsatzrate sowie vor allem die Neubildung von Spines im APP-Knock-In Mausmodell signifikant gesteigert werden konnten. Da das APP-Knock-In Mausmodell eine frühe Phase der AD ähnlichen Pathologie widerspiegelt, bei der ein Verlust von Spines nicht im Vordergrund steht, zeigte sich zudem eine Erhöhung der Spine-Dichte. Die Steigerung der zuvor reduzierten strukturellen Spine-Kinetik im APP-Knock-In Mausmodell lässt Rückschlüsse darauf ziehen, dass die pathologisch hohe A $\beta$ -Konzentration an den Synapsen durch die BACE-Inhibierung soweit reduziert werden konnte, dass die A $\beta$ -induzierten neurotoxischen Wirkungen an den Synapsen<sup>409</sup> zumindest teilweise aufgehoben werden konnten. Die präventive BACE-Inhibition mittels der hohen NB-360-Dosierung wirkte somit dem weiteren Verlauf der AD-Pathologie des APP-Knock-In Mausmodell entgegen. Zudem ist denkbar, dass bedingt durch die schwedische Mutation im APP-Knock-In Mausmodell, die zu einer Affinitätsverschiebung der BACE1-Sekretase hin zu APP führt, sich die Inhibition der BACE1-Sekretase nicht so gravierend auf die Prozessierung der nicht-amyloidogenen BACE1-Substrate wie Sez6 und NRG1 auswirkte, wie im Wildtyp. Dies bietet auch einen Erklärungsansatz dafür, dass die hohe NB-360-Dosierung im APP-Knock-In Mausmodell eine signifikante Steigerung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines erzielte, obwohl diese im Wildtyp eine Reduktion der Spine-Kinetik bewirkte.

Nachdem eine effektive NB-360-Dosierung im APP-Knock-In Mausmodell evaluiert wurde, wurde anschließend die Auswirkungen einer präventiven, langfristigen Applikation dieser auf die A $\beta$ -Last, die Neurinflammation sowie auf die kognitive Leistung untersucht.

### **3.2.3 Die präventive sowie langfristige therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition induziert eine Aktivitätssenkung der Mikrogliazellen durch Reduktion der fibrillären A $\beta$ -Last und bedingt eine signifikante Verbesserung der kognitiven Leistung im APP-Knock-In Mausmodell**

Die Langzeittherapie über acht Monate mittels der hohen NB-360-Dosierung (0,29 g/kg) konnte den kortikalen Anstieg der im A $\beta$ - $\mu$ PET gemessenen fibrillären A $\beta$ -Last im APP-Knock-In Mausmodell signifikant reduzieren. Im Hippocampus unterschied sich die A $\beta$ -Last zwischen den Gruppen nicht signifikant. Darüber hinaus wurde das TSPO- $\mu$ PET-Signal im Cortex sowie im Hippocampus unter der BACE-Inhibitor Behandlung über die Zeit signifikant gesenkt (siehe Abbildung 21 und 22). Der MWM-Test zeigte einen positiven Effekt der BACE-Inhibitor Behandlung auf die kognitive Leistung im APP-Knock-In Mausmodell. Des Weiteren wurde über den Behandlungszeitraum von acht Monaten keine erhöhte Mortalitätsrate der NB-360 behandelten Versuchstiere im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt. Wie im Versuch zur strukturellen Plastizität dendritischer Spines, wurde allerdings eine Änderung in der Fellpigmentierung nach siebentägiger NB-360-Behandlung observiert. Die im A $\beta$ - $\mu$ PET gemessene Reduktion der fibrillären A $\beta$ -Last im Cortex von NB-360 behandelten APP-Knock-In Versuchstieren ist auf eine verminderte A $\beta$ -Generierung über den Behandlungszeitraum zurückzuführen. In der Literatur wird postuliert, dass die Bildung neuer fibrillärer A $\beta$ -Plaques einen Aggregationskeim voraussetzt. Dieser Aggregationskeim besteht vorwiegend aus aggregierten A $\beta$ -Oligomeren. Die Entstehung eines Keimes ist thermodynamisch allerdings unvorteilhaft und findet nur statt, wenn die A $\beta$ -Konzentration signifikant erhöht ist<sup>231</sup>. Nach Bildung dieses Keimes ist die weitere Polymerisation zu A $\beta$ -Fibrillen thermodynamisch vorteilhaft. Eine exponentielle Wachstumsphase, bei der sich stetig weitere A $\beta$ -Peptide an die bestehenden A $\beta$ -Fibrillen anlagern, schließt sich an. Nach einer kurzen Übergangsphase wird schlussendlich eine Sättigung erreicht<sup>233</sup>. Die Vermutung liegt nahe, dass im APP-Knock-In Mausmodell, welches bei Therapiestart mit zweieinhalb Monaten eine sehr geringe fibrilläre A $\beta$ -Last aufwies, durch die frühe therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition die A $\beta$ -Generierung soweit gehemmt wurde, dass die Bildung neuer Aggregationskeime ebenfalls signifikant reduziert wurde. Diese Hypothese sowie die im Rahmen dieser Arbeit observierten Ergebnisse sind mit der Literatur im Einklang. Frühere Studien konnten zeigen, dass unter NB-360-Behandlung die Bildung neuer A $\beta$ -Plaques im transgenen AD-Mausmodell verhindert werden konnte, wohingegen das Wachstum bestehender A $\beta$ -Plaques nur reduziert, nicht aber vollständig gestoppt wurde<sup>234</sup>. Zudem postuliert eine weitere  $\mu$ PET-Studie, dass eine therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition das Fortschreiten einer Amyloidose nur in Hirnregionen mit einer geringen initialen A $\beta$ -Last effektiv reduzieren kann<sup>455</sup>. Diese Observierungen unterstreichen die Notwendigkeit einer frühen, wenn nicht sogar präventiven Verabreichung eines BACE-Inhibitors.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine signifikante Reduzierung des A $\beta$ - $\mu$ PET-Signals im Hippocampus unter BACE-Inhibition beobachtet. Wie im Kapitel 3.1.1 bereits diskutiert, ist dies teilweise der verwendeten Methodik geschuldet. Aufgrund der diffusen Beschaffen-

heit der A $\beta$ -Ablagerungen des APP-Knock-In Mausmodells wurden diese mittels des A $\beta$ - $\mu$ PET-Tracers [<sup>18</sup>F]-FBB nicht vollständig detektiert, weshalb im Hippocampus ein nur geringfügig höherer Anstieg der A $\beta$ -Last über das Alter in APP-Knock-In Versuchstieren im Vergleich zu Wildtypen beobachtet wurde. Es wird weiter angenommen, dass durch die geringe Detektion der hippocampalen A $\beta$ -Ablagerungen der therapeutische Effekt der BACE-Inhibition im Hippocampus nicht eruiert werden konnte.

Darüber hinaus wurde eine signifikante Reduktion der Neuroinflammation unter BACE-Inhibition im Cortex sowie im Hippocampus in APP-Knock-In Versuchstieren observiert. Es ist anzunehmen, dass der Rückgang der Neuroinflammation aus der direkten Senkung der fibrillären A $\beta$ -Last resultiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass aktivierte anti-inflammatorische Mikrogliazellen zu A $\beta$ -Ablagerungen hinwandern<sup>294</sup>, um dort die Phagozytose des A $\beta$ -Peptides einzuleiten<sup>284,286,285</sup>. In den meisten AD-Mausmodellen wurde des Weiteren ein nahezu identischer Anstieg des A $\beta$ - sowie TSPO- $\mu$ PET-Signals observiert<sup>295,398</sup>. Bei einer fortgeschrittenen Amyloidose wurde allerdings eine Stagnation im Anstieg des TSPO- $\mu$ PET-Signals sowie ein signifikanter Aktivitätsverlust der anti-inflammatorischen Mikrogliazellen beobachtet<sup>295,456,298</sup>. Im weiteren Verlauf der AD-Pathologie gehen anti-inflammatorische Mikrogliazellen, bedingt durch die wachsende fibrilläre A $\beta$ -Last, in einen pro-inflammatorischen Aktivierungszustand über<sup>128,296,298</sup>. Im pro-inflammatorischen Zustand verstärken aktivierte Mikrogliazellen die von A $\beta$ -Plaques induzierte Neurotoxizität, wodurch die toxische Umgebung des A $\beta$ -Plaques noch weiter verstärkt wird<sup>299,300</sup>. Es wird postuliert, dass der Übergang in die zweite Aktivitätsphase aus einer Überforderung der Mikrogliazellen resultiert. Diese These wird dadurch unterstrichen, dass sich Plaque-assoziierte Mikrogliazellen durch eine erniedrigte Prozessmobilität<sup>297</sup> sowie einer erniedrigten Expression von A $\beta$ -bindenden Rezeptoren auszeichnen<sup>296</sup>. Zudem zeigen Plaque-assoziierte Mikrogliazellen eine dreifach höhere Sterblichkeit als nicht Plaque-assoziierte Mikrogliazellen<sup>294</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die AD-Pathologie keine erhöhte Bildungsrate von Mikrogliazellen bedingt sondern, ausgelöst durch die Abwanderung der Mikrogliazellen zum A $\beta$ -Plaque, zu einer Reduktion der Mikroglia-Dichte in der Peripherie führt<sup>295</sup>. Im APP-Knock-In Mausmodell konnte ebenfalls eine starke Aktivitätszunahme der Mikrogliazellen bis zu einem Alter von zehn Monaten kortikal um 22,5 % und hippocampal um 14,2 % gegenüber Wildtypen beobachtet werden. Eine Stagnation des TSPO- $\mu$ PET-Signals wurde über den Beobachtungszeitraum noch nicht beobachtet. Parallel zur steigenden A $\beta$ -Last wäre allerdings eine weitere Aktivitätszunahme der Mikrogliazellen über den Beobachtungszeitraum hinaus zu erwarten, die fortführend eine Stagnation und einen Wechsel der Mikrogliazellen in einen pro-inflammatorischen Zustand bedingen würde. Die therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition senkte indirekt die starke Aktivitätszunahme der Mikrogliazellen bis zu einem Alter von zehn Monaten im APP-Knock-In Mausmodell kortikal um 11,3 % und hippocampal um 11,5 % und wirkte somit dem Wechsel der Mikrogliazellen in den pro-inflammatorischen Zustand entgegen (siehe Abbildung 22).

Die Reduktion der kortikalen A $\beta$ -Last und der Neuroinflammation unter BACE-Inhibition bewirkte zudem eine Verbesserung der kognitiven Leistung, wie anhand des MWM-Tests

im Rahmen dieser Studie gezeigt werden konnte. Im APP-Knock-In Mausmodell wurde zunächst eine beeinträchtigte hippocampusabhängige Lernfähigkeit sowie eine verminderte Abrufbarkeit des Referenzgedächtnisses im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Die hippocampusabhängige Lernfähigkeit wurde im APP-Knock-In Mausmodell durch die langfristige therapeutische BACE-Inhibitor Intervention mittels NB-360 gesteigert und ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Gedächtnisleistung erzielt (siehe Abbildung 23). Einen Erklärungsansatz für die observierten positiven Auswirkungen der BACE-Inhibierung auf die Lern- und Gedächtnisleistung bieten die beobachteten Effekte der BACE-Inhibition mittels NB-360 auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines. Wie im vorherigen Kapitel 3.2.2 bereits diskutiert, bewirkte die BACE-Inhibition im APP-Knock-In Mausmodell eine signifikant gesteigerte Neubildung dendritischer Spines der CA1-Region im Hippocampus. Dendritische Spines gelten als physikalisches Korrelat für die Gedächtnisformation und ihre Plastizität sowie vor allem die Neubildung von Spines korreliert signifikant mit dem Erlernen und Abspeichern neuer Fähigkeiten im Wildtyp<sup>88,89</sup>.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der  $\mu$ PET-Studie, dass eine frühe und langfristige BACE-Inhibitor Intervention mittels der NB-360-Dosierung von 0,29 g/kg das Voranschreiten der AD-Pathologie im APP-Knock-In Mausmodell durch Reduzierung der A $\beta$ -Last sowie der daraus bedingten Senkung der Neuroinflammation hemmen sowie signifikant die kognitiven Fähigkeiten verbessern konnte.

### **3.2.4 Herausforderungen der pharmakologischen BACE1-Inhibition als präventive Intervention gegen AD**

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist seit vielen Jahren der Eckpfeiler für die Entwicklung von Pharmazeutika gegen die Alzheimer Demenz. Die umfangreiche Forschung hat zur Entwicklung potenter, nicht-peptidischer, niedermolekularer BACE-Inhibitoren geführt, deren Effektivität bezüglich ihrer senkenden Wirkung auf die A $\beta$ -Generierung in zahlreichen vor-klinischen und klinischen Studien getestet und bewiesen wurden. Dennoch scheiterten bisher ausnahmslos alle klinischen BACE-Inhibitor Studien bis Ende des Jahres 2019 an unvorhergesehenen Nebenwirkungen und/oder am Verfehlen des angestrebten Zieles bei der Behandlung von AD. Dennoch bleibt die BACE-Inhibition trotz der Rückschläge ein erfolgsversprechender Therapieansatz gegen AD. Deshalb ist eine fundierte Evaluierung, welche Anforderungen an einen zukünftigen BACE-Inhibitor gestellt werden müssen und welche Änderungen in der Applikation des Therapeutikums erfolgen müssen, um eine möglichst zielgerichtete, erfolgreiche therapeutische Intervention zu gewährleisten, elementar.

Wie in Kapitel 1.3.3 bereits angesprochen, inhibieren pharmakologische BACE-Inhibitoren des aktuellen Forschungsstandes, aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen BACE1 und BACE2, stets beide  $\beta$ -Sekretasen. Die höchste Selektivität von klinisch getesteten, nicht-peptidischen BACE-Inhibitoren zeigte CNP520 von Novartis. Dieser weist eine dreifach höhere Affinität zu BACE1 gegenüber BACE2 auf<sup>364</sup>. Die klinische Studie musste allerdings in Phase 2/3 aufgrund von kognitiven Verschlechterungen der Probanden vorzeitig abgebrochen werden<sup>457</sup>. Über die Funktion der BACE2-Sekretase ist vergleichsweise wenig be-

kannt. Es konnte gezeigt werden, dass BACE2 eine wichtige Funktion in der Melanogenese und Prozessierung von PMEL einnimmt<sup>362</sup> (siehe Kapitel 1.3.2). In vorklinischen Studien zur therapeutischen Intervention mittels BACE-Inhibition wurde als Nebenwirkung eine Depigmentierung beobachtet<sup>376,458</sup>. Eine Änderung der Fellpigmentierung wurde auch in Rahmen dieser Studie nach einer siebentägigen Behandlung mit dem BACE-Inhibitor NB-360 observiert (siehe Abbildung 16). Darüber hinaus konnten *in vitro* Studien belegen, dass sowohl BACE1- als auch BACE2-Substrate zumindest teilweise durch beide BACE-Sekretasen prozessiert werden können<sup>459</sup>. Bei einer erhöhten Selektivität der Inhibitoren gegenüber BACE1 wäre es somit möglich, dass die Prozessierung von BACE1-Substraten teilweise durch BACE2 ausgeführt werden. Im Umkehrschluss liegt deshalb auch die Vermutung nahe, dass die gleichzeitige Hemmung der BACE2-Sekretase zu einigen der beobachteten Nebenwirkungen während der BACE-Inhibition beiträgt. Eine Studie an humanen Gerhirnschnitten konnte zudem zeigen, dass BACE2 womöglich selbst eine Rolle in der Pathophysiologie von AD einnimmt<sup>460</sup>. Huentelman *et al.* observierten, dass einige Variationen am BACE2-Locus mit dem AD-Risiko assoziiert sind und eine veränderte Prozessierung von A $\beta$  bewirken können. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die A $\beta$ -Domäne von APP durch BACE2 unter physiologischen Bedingungen proteolytisch auf einem nicht-amyloidogenen APP-Prozessierungsweg gespalten wird<sup>461</sup>. Für den Erfolg zukünftiger Studien wird es zudem wichtig sein die Funktionsweise sowie Rolle von BACE2 *in vivo* und im AD-Kontext besser zu verstehen. Vom aktuellen Forschungsstand aus betrachtet würde eine gesteigerte BACE1-Selektivität der BACE-Inhibitoren erstens Nebenwirkungen senken, welche durch die gleichzeitige Hemmung von BACE2 bedingt werden, sowie zweitens die Prozessierung einiger BACE1-Substrate durch BACE2 steigern können. Peptidische BACE-Inhibitoren zeigten beispielsweise eine tausendfach höhere Selektivität zu BACE1 gegenüber BACE2. Aufgrund ihrer geringen Stabilität sowie einer mangelhaften Liquorgängigkeit schafften es peptidische BACE-Inhibitoren allerdings nicht in die klinische Testphase<sup>365,366</sup> (siehe Kapitel 1.3.2).

Neben der Selektivität muss ebenfalls die Applikation zukünftiger BACE-Inhibitoren grundlegend überdacht werden. Die bisherigen wissenschaftlichen Befunde sprechen dafür, dass eine Behandlung mit BACE-Inhibitoren am effektivsten präventiv und noch vor der Aggregation und Akkumulation des A $\beta$ -Proteins wirken würde. Die Akkumulation des A $\beta$ -Proteins beginnt mindestens zwei Jahrzehnte vor der kortikalen Tau-Pathologie und dem Auftreten klinischer Symptome<sup>418</sup>. Bei der Manifestierung erster klinischer Symptome, wie dem Verlust kognitiver Fähigkeiten und Stimmungsveränderungen, ist davon auszugehen, dass eine Degenerierung von Neuronen sowie die Beeinträchtigung neuronaler Schaltkreise bereits stattfand. Das Aufhalten der Erkrankung ist nach dem aktuellen Wissensstand in diesem Stadium nicht mehr realisierbar<sup>381,366</sup>. Der Ansatz einer präventiven BACE-Inhibitor Therapie wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt, die zeigen konnte, dass die therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition die Neubildung von A $\beta$ -Plaques signifikant hemmt. Das Wachstum bestehender A $\beta$ -Plaques dagegen wurde zwar reduziert aber nicht vollständig gestoppt<sup>234</sup>. Um den Ansatz der präventiven BACE-Inhibitor Intervention weiter zu untersuchen wurde im Rahmen dieser Arbeit das APP-Knock-In Mausmodell verwendet. In der vorliegenden Studie konnte zunächst gezeigt werden, dass das APP-Knock-In Maus-

modell eine frühe Phase der AD widerspiegelt. Zu Therapiebeginn wiesen APP-Knock-In Versuchstiere eine sehr geringe fibrilläre A $\beta$ -Last sowie eine Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines der CA1-Region des Hippocampus auf (siehe Kapitel 3.1.4). Die präventive Behandlung unter der hohen Dosierung des BACE-Inhibitors NB-360 bewirkte im APP-Knock-In Mausmodell eine signifikante Reduktion der A $\beta$ -Last gegenüber unbehandelten Kontrolltieren sowie eine signifikante Hemmung der Neuroinflammation. Darüber hinaus wurde mittels der frühen BACE-Intervention die Beeinträchtigung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines behoben und dadurch insgesamt dem weiteren Verlauf der AD-Pathologie im APP-Knock-In Mausmodell entgegenwirkt (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3). Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse unterstreichen somit die Wirksamkeit einer BACE-Inhibitor Behandlung im frühen AD-Stadium. Bei fortgeschrittenen Stadien der AD wurden, bedingt durch die fortgeschrittene neuronale und synaptische Degeneration, zudem stark verminderte BACE1-Konzentrationen beobachtet<sup>462,463,464</sup>. Bei geringen BACE1-Konzentrationen ist damit zu rechnen, dass eine BACE-Inhibitor Intervention ebenfalls die Prozessierung der nicht-amyloiden BACE1-Substrate stärker beeinträchtigt, wodurch die Effizienz einer BACE-Inhibitor Behandlung bei einer fortgeschrittenen AD-Pathologie weiter in Frage gestellt wird.

Neben dem Zeitpunkt stellt die richtige Dosierung der BACE-Inhibitoren einen entscheidenden Faktor dar. Die bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, dass eine therapeutische BACE1-Inhibitor Dosierung evaluiert werden muss, die Wirksamkeit sowie klinische Sicherheit gewährleisten kann. Die Vermutung wurde geäußert, dass die bisherigen Dosierungen der BACE-Inhibitoren möglicherweise zu hoch waren und dass eine fünfzigprozentige Hemmung der Sekretase ausreichen würde, um dieses Gleichgewicht zu erreichen<sup>342,440,441,368</sup>. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass es von entscheidendem Vorteil sein könnte, die Dosierung des BACE-Inhibitors an den Grad der A $\beta$ -Last, der Neuroinflammation sowie der synaptischen Schädigung individuell anzupassen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine zu niedrige Dosierung des BACE-Inhibitors NB-360 bei erhöhter A $\beta$ -Konzentration keinen signifikant positiven Effekt auf die bereits beeinträchtigte strukturelle Plastizität dendritischer Spines im APP-Knock-In Mausmodell erzielen konnte. Eine höhere Dosierung, die im Wildtyp einen signifikant negativen Effekt auf die Plastizität dendritischer Spines ausübte, hatte im APP-Knock-In Mausmodell dagegen einen signifikant positiven Effekt.

Neben der Möglichkeit einer ausbalancierten sowie individuell angepassten BACE-Inhibitor Dosierung wäre eine Zellkompartiment gerichtete BACE1-Inhibition in frühen Endosomen eine weitere denkbare Option. Wie in Kapitel 1.3.1 bereits beschrieben, prozessiert die pH-abhängige BACE1-Sekretase APP aufgrund des sauren Milieus im Endosom (pH 4,5-6,0)<sup>328,316,329,330</sup>. Die Prozessierung der nicht-amyloiden BACE1-Substrate ist vom Prozess der Endozytose unabhängig und würde bei einer gerichteten BACE-Inhibition nicht beeinträchtigt werden<sup>445</sup>. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine sterolverknüpfte, membranständige Version eines ansonsten löslichen Inhibitors die APP-Prozessierung spezifisch im Endosom hemmen konnte<sup>465,466,467</sup>. Allerdings wurden die meisten Vorversuche *in vitro* durchgeführt, weshalb der aktuelle Forschungsstand noch weit von klinischen

Studien entfernt ist. Dagegen könnte die Ermittlung einer effektiven BACE-Inhibitor Dosierung, die das benötigte Gleichgewicht zwischen Inhibition und Aktivität der BACE1-Sekretase bietet, durch eine individuelle Spaltproduktmessung nicht-amyloidogener BACE1-Substrate bereits in den nächsten klinischen Studien angewendet werden<sup>468,469</sup>. Eine in vorklinischen Studien etablierte Methode wäre beispielsweise das Messen von Sez6-Spaltprodukten in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF)<sup>470</sup>. Durch das individuelle Anpassen der BACE-Inhibitor Dosierung sowie die stetige Überprüfung ihrer Effektivität mittels Sez6-Spaltproduktmessungen im CSF, würde ein wichtiger Grundstein für eine therapeutische Sicherheit zukünftiger klinischer BACE-Inhibitor Studien gelegt werden.

Zukünftige humane BACE-Inhibitor Studien sollten zudem stets mit zwei Patientengruppen durchgeführt werden. Dabei sollte zwischen Patienten der familiären Alzheimer Demenz (FAD) sowie Patienten der sporadischen Alzheimer Demenz (SAD) unterschieden werden. Die molekularen Mechanismen, die zu einer erhöhten A $\beta$ -Last führen, unterscheiden sich zwischen den beiden AD-Formen<sup>366</sup>. Der Hauptunterschied besteht darin, dass die FAD durch bestimmte Mutationen und somit genetisch bedingt ist. Die schwedische Mutation beispielsweise verschiebt die Affinität der BACE1-Sekretase fort von seinen nicht-amyloidogenen Substraten und hin zu APP, wodurch die A $\beta$ -Generierung erheblich gesteigert wird<sup>147</sup>. Bei der SAD ist ein verminderter A $\beta$ -Abbau wahrscheinlich die Hauptursache für die steigende A $\beta$ -Last<sup>471</sup>. Die Wahrscheinlichkeit an der sporadischen AD zu erkranken wird durch den Einfluss bestimmter genetischer Faktoren zudem erhöht<sup>131</sup>. Obwohl FAD-Fälle weniger als 1% der gesamten AD-Fälle ausmachen<sup>125</sup> sind die in der vorklinischen Forschung verwendeten Krankheitsmodelle, wie auch das in dieser Arbeit verwendete APP-Knock-In Mausmodell, Modelle welche die Mechanismen der FAD widerspiegeln. Diese Aspekte erklären teilweise die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen vorklinischen und klinischen BACE-Inhibitor Studien. Deshalb ist eine strikte Differenzierung zwischen FAD und SAD sowie die Einführung zweier AD-Patientengruppen für den Erfolg klinischer BACE-Inhibitor Studien wichtig.

Damit eine präventive Intervention mittels BACE-Inhibition für SAD-Patienten realisiert werden kann müssen zudem die Diagnoseverfahren verbessert werden. Die Verwendung der Kombination verschiedener Biomarker, die *in vivo* noch vor dem Auftreten klinischer Demenzsymptome eine AD-Diagnose ermöglichen, sind im klinischen Umfeld aufgrund der fehlenden Therapieoption, der hohen Kosten und der Invasivität mancher Beurteilungsmethoden noch kein Standard<sup>472</sup>. Die limitierten Diagnosemöglichkeiten beim asymptomatischen Patienten führen jedoch dazu, dass SAD überwiegend in einem zu späten Stadium festgestellt wird, als dass die BACE-Inhibition nach dem aktuellen Forschungsstand erfolgreich sein könnte<sup>473,366</sup>.

### **3.2.5 Fazit: Eine individualisierte, präventive BACE-Inhibition könnte eine therapeutische Intervention bei Patienten mit hohem Risiko eine AD zu entwickeln darstellen**

Die hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren, dass die präventive BACE-Inhibitor Intervention mittels einer hohen NB-360-Dosierung den Verlauf der AD Pathologie im APP-Knock-In Mausmodell, welches eine frühe Phase der AD widerspiegelt, entgegenwirken kann. Der BACE-Inhibitor NB-360 in hoher Dosierung führte zu einer signifikanten Steigerung der strukturellen Plastizität dendritischer Spines der CA1-Region. Des Weiteren wurde die Akkumulation und Aggregation von A $\beta$ -Fibrillen gehemmt sowie die Neuroinflammation eingedämmt. Dies steht im Zusammenhang mit der insgesamt signifikant verbesserten kognitiven Leistung im APP-Knock-In Mausmodell. Diese Beobachtungen unterstreichen die Hypothese, dass eine präventive therapeutische Intervention mittels BACE-Inhibition effektiv den Verlauf der AD-Pathologie hemmen kann. Für zukünftige klinische BACE-Inhibitor Studien wird es allerdings unerlässlich sein zwischen FAD- und SAD-Patienten zu unterscheiden und diese unabhängig voneinander zu untersuchen. Darüber hinaus ist hinlänglich bekannt, dass BACE1 eine wesentliche physiologische Rolle in der Regulation synaptischer und kognitiver Funktionen erfüllt, die durch eine zu starke therapeutische Inhibition beeinträchtigt wird. Für eine erfolgreiche Therapie sollte die Dosierung des BACE-Inhibitors für FAD und SAD-Patienten individuell und abhängig von der individuellen A $\beta$ -Last und Neuroinflammation angepasst werden. Therapiebegleitend sollte der Inhibitionsgrad der BACE1-Sekretase durch Sez6-Spaltproduktmessung im CSF überprüft und verfolgt werden. Dieses Vorgehen würde ein Gleichgewicht zwischen Wirksamkeit und klinischer Sicherheit der BACE-Inhibitor Behandlung gewährleisten können. Wie im vorherigen Kapitel 3.2.4 ausführlich dargelegt, steht die BACE-Inhibition als pharmakologische AD-Therapie vor einigen Herausforderungen und muss weiterentwickelt werden. Doch auch nach dem Scheitern von vielversprechenden BACE-Inhibitoren in klinischen Studien sollte BACE1 als pharmakologisches Ziel nicht aufgegeben werden. Es sollte allerdings zukünftig berücksichtigt werden, dass eine Therapie mittels BACE1-Inhibition wohl nicht in der Lage sein wird in symptomatischen Patienten eine Verbesserung der Kognition zu bewirken, da die Ablagerung von A $\beta$  sowie der Verlust von Synapsen und Neuronen in den meisten Fällen bereits zu fortgeschritten ist. Im frühen AD-Stadium kann allerdings durch eine therapeutische Intervention mittels BACE1-Inhibition der AD-Pathologie noch signifikant entgegengewirkt werden, weshalb die BACE1-Inhibition unter individueller therapeutischer Dosierung als präventiver Therapieansatz bei AD möglicherweise eine Chance darstellt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Transgene Mäuse und deren Genotypisierung

#### 4.1.1 Maushaltung

Die Mäuse wurden in einem pathogenfreien Zuchtbereich einer zentralen Tierhaltung verpaart und aufgezogen, bis sie in einen ebenfalls pathogenfreien Experimentalbereich überführt wurden. Im Zuchtbereich wurden sie in GreenLine-IVC GM500-Käfigen in einer Gruppe von bis zu sechs Tieren gehalten. Es wurde ein zwölf-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus simuliert und sie hatten ständigen Zugang zu Futter (Sniff) sowie Wasser *ad libitum*. Durch optische Kontrollen überprüften Tierpfleger täglich den Gesundheitszustand der Tiere. Zur Identifizierung wurden die Mäuse mit Ohrmarken versehen, wobei das ausgestanzte Gewebe zur Genotypisierung verwendet wurde. Mit einem Alter von ungefähr anderthalb Monaten wurden die Tiere in den pathogenfreien Experimentalbereich der zentralen Tierhaltung überführt, wo die gleichen Bedingungen herrschten wie im Zuchtbereich. Nach der Implantation des hippocampalen Fensters wurden die Tiere jedoch einzeln gehalten. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde im Experimentalbereich täglich überprüft. Für den Umgang mit den Tieren und für alle Versuche galt der Grundsatz, die Mäuse möglichst schonend und mit möglichst geringer Schmerzbelastung zu untersuchen. Es wurde entsprechend den Richtlinien des Deutschen Zentrums für Neurodegenerative Erkrankungen e. V. (DZNE) und der Regierung von Oberbayern zum Schutz der Tiere gearbeitet.

#### 4.1.2 Transgene Mauslinien

##### C57BL/6J

Unter den Labormäusen stellt die C57BL/6J-Linie den am häufigsten verwendeten Inzuchtstamm zur Untersuchung von menschlichen Krankheiten dar. Die Mauslinie zeichnet sich durch eine hohe Fertilität sowie einem definierten genetischen Hintergrund aus, wobei das gesamte Genom dieses Stammes entschlüsselt und publiziert wurde<sup>474</sup>. Der C57BL/6J-Stamm wurde von Jackson Laboratory (Maine, Vereinigte Staaten) bezogen.

##### Thy1.2 GFP-M

Die transgene Mauslinie B6.Cg-Tg (Thy1.2 GFP-M)MJrs/J (Synonym: GFP-M) wurde ebenfalls von Jackson Laboratory bezogen und auf dem Hintergrund der C57BL/6J-Linie gezüchtet. Die Mäuse exprimieren das grün fluoreszierende Protein eGFP (engl. enhanced green fluorescent protein) unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy1.2-Promotor. Dabei handelt es sich bei Thy1.2 um ein Glycosylphosphatidylinositol verankertes Zelloberflächen-Glykoprotein, welches vor allem im Thymus und im Nervensystem exprimiert wird. Die Mauslinie zeichnet sich durch eine starke eGFP-Expression in hippocampalen und kortikalen Nervenzellen, besonders der neokortikalen Schicht-V, sowie der hippocampalen CA1-Region aus<sup>374</sup>.

### **APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell**

Dieses Mausmodell wurde 2014 in Takaomi Saido's Labor in Japan mittels eines Knock-in Verfahrens generiert. Ihr größter Vorteil ist, dass APP auf einem endogenen Niveau exprimiert wird. Beim Knock-in wurde zwischen Exon 16 und 17 des endogenen murinen APP-Gens die A $\beta$ -Sequenz humanisiert sowie drei AD-assoziierte Mutationen: Die schwedische, die Beyreuther/iberische sowie die arktische Mutation ausgelöst<sup>379</sup>. Die schwedische Mutation (APP KM670/671NL) initiiert die Erhöhung der totalen A $\beta$ -Generierung. Die Beyreuther/iberische (I716F) Mutation bewirkt ein erhöhtes Verhältnis von A $\beta$ 42 gegenüber A $\beta$ 40 und die arktische (APP E693G) Mutation verursacht die Aggregation des A $\beta$ -Peptides was zusätzlich zu einem verminderten Abbau von A $\beta$  führt<sup>379,475</sup>. Für eine eigene Zucht am Institut wurden zwei Zuchtpaare von Saito bezogen. Die Mäuse wurden homozygot auf dem genetischen Hintergrund C57BL/6J wie in der Originalpublikation<sup>379</sup> gezüchtet.

### **APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M und APP<sup>wt</sup>GFP-M**

Für die Intravitaluntersuchung dendritischer Spines wurden die APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie mit der Thy1.2-GFP-M-Mauslinie verkreuzt. In dieser Arbeit wird diese Verkreuzung als APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Linie oder APP-Knock-In Linie bezeichnet. Als Kontrolllinie wurden fünffach auf C57BL/6J zurückgekreuzte APP<sup>NL-G-F</sup>-Mäuse (APP<sup>wt</sup>) gekreuzt mit der Thy1.2-GFP-M-Linie verwendet. Diese Verkreuzung wird in dieser Arbeit weiter als APP<sup>wt</sup>GFP-M-Linie oder Wildtyp bezeichnet. Die APP<sup>wt</sup>GFP-M-Linie war nur noch für eGFP transgen. Für den Therapieversuch mittels BACE-Inhibition wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet.

#### **4.1.3 Genotypisierung**

##### **DNS Isolierung aus Ohrstanzbiopsien**

Die Genotypisierung der Mauslinien erfolgte mittels genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS) die mit dem Invisorb<sup>®</sup> Spin Tissue Mini Kit (Invitek Molecular GmbH, Deutschland) aus entsprechenden Ohrstanzbiopsien isoliert wurde. Alle in diesem Protokoll verwendeten Puffer stammen aus diesem Kit. Die Gewebeproben wurden in Mikrotiterplatten transferiert und mit 400  $\mu$ L Lyse-Puffer-G über Nacht bei 52 °C lysiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation, mittels der Eppendorf-Zentrifuge 508 (Eppendorf, Deutschland) bei 10 000  $\text{min}^{-1}$  wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 200  $\mu$ L DNS-Bindepuffer wurden hinzugefügt. Das Lysat wurde im Anschluss auf DNS-Bindungsplatten transferiert und erneut bei 10 000  $\text{min}^{-1}$  für fünf Minuten abzentrifugiert. Danach wurden die Proben mit 550  $\mu$ L Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach einer erneuten Abzentrifugation ohne Waschpuffer und bei 15 000  $\text{min}^{-1}$  für 15 Minuten erfolgte die Elution der gefällten DNS durch 200  $\mu$ L vorgewärmtem Elutionspuffer. Die extrahierte DNS wurde für zehn Minuten bei 10 000  $\text{min}^{-1}$  von der Säule getrennt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

##### **Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR und deren Auftrennung**

Die Gensequenzen der Mauslinien wurden mittels PCR (engl. polymerase chain reaction)

amplifiziert und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Anhand des Bandenmusters ließ sich der jeweilige Genotyp bestimmen. Die PCR wurden mit dem Thermozykler Mastercycler Pro (Eppendorf) durchgeführt. Für den PCR-Ansatz der APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie wurden die Primer1 und Primer2 (Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet und für den PCR-Ansatz der GFP-M-Linie die Primer IMR-872 und IMR-1416 (Eurofins, Deutschland).

**Tabelle 1:** Primer für die Genotypisierung der APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie

Primer	Hin/zurück	Sequenz (5' → 3')
P1	hin	CTC CTT GTG GCT GGC GGT CAC AC
P2	zurück	CTA TCG TGG ACC GAG AAT GGT CAT G
IMR 872	hin	AAG TTC ATC TGC ACC ACC G
IMR 1416	zurück	TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG

Der PCR-Ansatz pro Probe der APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie sowie der GFP-M-Linie wurden getrennt angesetzt und anschließend direkt zur Vervielfältigung in den Thermozykler gegeben.

**Tabelle 2:** Reagenzien und Konzentration für die Genotypisierung von APP<sup>NL-G-F</sup>- sowie der GFP-M-Linie

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ L]	Konzentration [ $\mu$ M]
Template DNA	1	
P1 / IMR 872	0,5	10
P2/ IMR 1416	0,5	10
OneTaq HotStart QuickLoad Polymerase	12,5	
ddH <sub>2</sub> O	ad 25	

Die PCR-Protokolle sind in Tabelle 3 und 4 aufgelistet:

**Tabelle 3:** PCR-Programm zur Verifizierung der APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Wiederholungen
94 $^{\circ}$ C	3 min	
98 $^{\circ}$ C	10 s	27x
60 $^{\circ}$ C	30 s	27x
68 $^{\circ}$ C	50 s	27x
68 $^{\circ}$ C	2 min	
10 $^{\circ}$ C	$\infty$	

**Tabelle 4:** PCR-Programm zur Verifizierung GFP-M-Linie

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Wiederholungen
94 °C	3 min	
94 °C	30 s	27x
60 °C	1 min	27x
68 °C	20 s	27x
68 °C	2 min	
10 °C	∞	

Auf einem SYBR-Gold-Agarosegel wurden die PCR-Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose (1,5 % w/v) wurde dazu in 1x TAE-Puffer (Roth, Deutschland) durch Aufkochen gelöst und mit 0,1 µg/mL SYBR-Gold (New England Biolabs, Vereinigte Staaten) versetzt. Die Lösung wurde im Anschluss in eine Gelkammer (Fisher Scientific, Vereinigte Staaten) überführt und mit einem Geltaschenkamm bestückt. Die dadurch entstandenen Kammern wurden mit TAE-Puffer befüllt. In einem Verhältnis von 1:5 wurden die PCR-Produkte mit einem sechsfachen Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem Quick-Load® Purple 1kb-DNS-Marker (New England Biolabs) auf das Gel aufgetragen. Bei einer Spannung von 40 mV erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNS-Fragmente über zwei bis vier Stunden. Das Bandenmuster wurde im Anschluss durch Illumination auf dem UV-Tisch UV-Transilluminator (Fisher Scientific) mit einer Anregungswellenlänge von 258 nm sichtbar gemacht. Dokumentiert wurden sie durch das Kamerasystem Canon Powershot G1 (Canon, Japan).

## 4.2 Applikation, Formulierung und Wirksamkeit des BACE-Inhibitors

### NB-360

Der BACE-Inhibitor NB-360 wurde von Novartis synthetisiert und freundlicherweise für die vorklinischen Studien zur Verfügung gestellt. Die pharmakologischen Eigenschaften des Inhibitors wurden von Neumann und Kollegen charakterisiert<sup>363</sup>. Den Versuchstieren standen zu jeder Zeit Futterpellets zur Verfügung, die eine Kontrollsubstanz ohne Inhibitor enthielten oder den Inhibitor NB-360 mit einer hohen Dosierung von 0,29 g/kg oder mit einer niedrigen Dosierung von 0,05 g/kg. Die *in vivo* Wirksamkeit der verschiedenen BACE-Inhibitor Dosen wurde durch Quantifizierung des BACE1-Spaltproduktes Aβ40 im Blutplasma und Gehirngewebe von Novartis ermittelt, wobei die vergleichbare Dosis 0,25 g/kg des BACE-Inhibitors NB-360 eine Aβ40-Hemmung von 84,4 % und die niedrige Dosis von 0,05 g/kg NB-360 eine Aβ40-Hemmung von 78 % nach einer sechstägigen Behandlung in Wildtyp-Tieren bewirkte<sup>390</sup>.

## 4.3 Intravitalmikroskopie

Bei der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie handelt es sich um ein lichtmikroskopisches Fluoreszenzverfahren, das die nichtlineare Anregung von Fluorophoren durch quasi gleichzeitige Absorption zweier energieärmerer Photonen nutzt. Dafür ist eine hohe Intensität bezie-

ungsweise eine hohe Photonenflussdichte notwendig. Zudem wird energiearmes infrarotes Licht verwendet (870 - 1000 nm), welches sehr tief in lebendes Gewebe eindringen kann<sup>387</sup>. Bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie besitzt das anregende Photon eine kürzere Wellenlänge, eine höhere Frequenz und damit mehr Energie als das abgestrahlte Photon. Der Wellenlängenabstand der beiden Photonen wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Bei der 2-Photonen Mikroskopie wird mit Photonen angeregt, die eine deutlich größere Wellenlänge, eine niedrigere Frequenz und somit pro Photon weniger Energie haben. Durch die quasi simultane Anregung der zwei Photonen kommt es zu einer Summierung der Anregungsenergien. Die Anregungswahrscheinlichkeit nimmt mit dem Quadrat der Photonendichte zu, weshalb eine Fluoreszenz nur in dem winzigen Volumen des Laserfokus erzeugt wird. Um die notwendige Photonendichte zu erreichen wird ein pulsierender Laser verwendet. Ein solcher Laser sendet sehr kurze intensive Laserpulse aus (<100 fs), die z.B. 80 Millionen Mal pro Sekunde wiederholt werden. Dabei werden Spitzenleistungen von mehreren 100 kW erzielt, während die Durchschnittsleistung mit weniger als 2,5 W niedrig bleibt. So wird eine hohe Photonendichte erzielt, ohne dass die Probe unter dem Mikroskop beschädigt wird. Als großer Vorteil gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie ist zu nennen, dass sich die Anregung der Fluorophore auf ein sehr begrenztes Volumen beschränkt, wodurch sich die unspezifische Anregung der Probe außerhalb der Fokusebene minimiert und Gewebeschäden durch Phototoxizität verhindert werden. Um neuronale Strukturen mikroskopieren zu können, muss die Gehirnoberfläche optisch zugänglich gemacht werden. Dies kann unter anderem durch die Implantation eines hippocampalen Fensters realisiert werden. Im Folgenden wird die Methodik der hippocampalen Fensterimplantation, welche im Rahmen dieser Arbeit im Labor erstmalig etabliert wurde, erörtert sowie der Ablauf der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie näher beschrieben.

#### 4.3.1 Implantation eines hippocampalen Fensters

Für das hippocampale Fenster wurden Tunnel aus rostfreiem Edelstahl benötigt die eine Länge von 1,7 mm, einen Außendurchmesser von 3 mm sowie einen Innendurchmesser von 2,5 mm aufwiesen. Zudem besaßen die Tunnel an einer Seite einen 0,5 mm breiten Rand, der nach der Implantation planar auf der Schädeldecke auflag. Die Tunnel wurden in der institutseigenen Werkstatt hergestellt. Am randlosen Ende des Tunnels wurden runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 3 mm (Paul Marienfeld, Deutschland) durch einen UV-Licht aushärtenden Kleber (Norland Products, Vereinigte Staaten) befestigt. Die Tunnel mit den aufgeklebten Deckgläschen wurden 20 min in einem DIAS-III (Serva, Deutschland) mit UV-Licht bestrahlt, bis der Kleber vollkommen ausgehärtet war. Vor der Implantation wurden die Tunnel bei 250 °C sterilisiert (Hot Bead Sterilizer, Fine Science Tools, Vereinigte Staaten). Die Implantation des hippocampalen Fensters wurde unter Öffnung der Schädeldecke durchgeführt<sup>476</sup>.

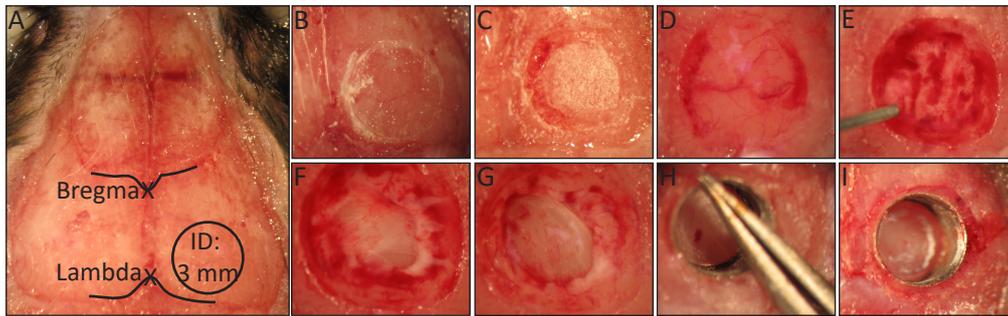
Im Vorfeld wurde das Operationsbesteck sowie die hippocampalen Tunnel sterilisiert. Anschließend wurde das zu operierende Versuchstier gewogen und durch eine intraperitoneale (ip) Injektion mit einem Ketamin/Xylazin-Gemisch ( 13,0 /1,0 µg/g, Bayer, Deutschland)

anästhesiert. Nach zehn Minuten wurde die Tiefe der Narkose durch den Zwischenzehenreflex überprüft. Bei einer ausreichenden Narkose wurde der Kopf des Versuchstiers in einem selbst angefertigten Stereotakten eingespannt. Zudem wurde dem Versuchstier Rimadyl (7,5 µg/g, Pfizer, Deutschland) und Baytil (2,5 µg/g, Pharmore, Deutschland) zur analgetischen bzw. antibiotischen Behandlung subkutan verabreicht. Die Körpertemperatur des Versuchstieres wurde während der Operation mithilfe eines Heizkissens (Fine Science Tools) konstant gehalten. Zudem wurden die Augen durch das Auftragen von Bepanthen-Salbe (Bayer) vor dem Austrocknen geschützt.

Zunächst wurde der Kopf des Versuchstieres oberflächlich rasiert und mit 70 % Ethanol (Sigma-Aldrich) gesäubert. Anschließend wurde unter einem Stereomikroskop (SZ51 mit Kaltlichtschwanenhalslampe KL1500LED, Olympus, Japan) die Kopfhaut mithilfe einer Pinzette und einer Operationsschere (beides Fisher scientific) angehoben und trapezförmig entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Muskelgewebe des Versuchstiers nicht verletzt wurde. Die Schnittstelle wurde mit in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Fisher scientific) getränkten Wattestäbchen (Böttger, Deutschland) gesäubert, sowie restliches Gewebe vom Schädelknochen mit einem Skalpell entfernt. Zusätzlich wurde der Schädelknochen mit dem Skalpell aufgeraut und mit einer Schicht Dentalkleber (Cyano Veneer, Hager Werken, Deutschland) überzogen. Die Stelle des hippocampalen Fensters wurde dabei ausgespart. Mit einer Hautstanze (McFarlane, Vereinigte Staaten), mit einem Durchmesser von 3 mm, wurde das Fenster über dem Hippocampus markiert. Anhand der Markierung wurde der Schädelknochen mit einem Dentalbohrer (Schick C1-Master, Weithas; mit rundem Stahlbohrer, Komet Dental, Deutschland) soweit ausgedünnt, dass der Knochen vorsichtig mit einer Pinzette entfernt werden konnte. Knochenspäne sowie Blut wurden regelmäßig mit Hilfe einer Vakuumpumpe (KNF Laboport, Deutschland) mit aufgesetzter Pipettenspitze entfernt. Die Kraniotomie wurde ebenfalls mit sterilem PBS gesäubert und die *Dura mater*, die äußere Hirnhaut, mit einer spitzen Pinzette entfernt. Auf die Vakuumpumpe wurde nun eine sterile, stumpfe Spitze (Cellink, Vereinigte Staaten) angebracht und der Cortex, bis zum Erreichen des kapselförmigen Hippocampus, abgesaugt. Die Blutungen wurden mit Hilfe von sterilen Tupfern (Kettenbach, Deutschland) und kontinuierlicher Spülung mit PBS gestoppt.

Die Hippocampus-Kapsel wird von zwei gegensätzlich verlaufenden Myelinschichten umgeben, die beide vorsichtig entfernt wurden. Sobald keine Blutungen mehr auftraten, wurde der Tunnel so eingelassen, dass das Deckgläschen auf dem Hippocampus auflag. Dabei musste darauf geachtet werden, dass sich weder Blut noch Luftbläschen unter dem Deckgläschen befanden. Auftretende Blutungen wurden ebenfalls mit sterilen Tupfern entfernt. Der Tunnel wurde durch Sekundenkleber (Pattex, Deutschland) fixiert. Sobald der Sekundenkleber vollständig getrocknet war, wurde dieser zusätzlich mit Dentalzement (Cyano Veneer, Hager Werken) fixiert, bevor die gesamte freigelegte Schädeldecke mit dem Dentalzement bedeckt wurde. Um das Versuchstier später unter dem Mikroskop zu fixieren, wurde ein Stift aus Metall parallel zur Oberfläche des Fensters ausgerichtet und mit Dentalzement fixiert. Es wurde versucht die Operation innerhalb einer Stunde durchzuführen. Nach der Operation wurde das Versuchstier im Heimkäfig noch mindestens zwei Stunden

auf einem Heizblock (Fine Science Tools) gewärmt, damit es sich von der Operation erholen konnte.

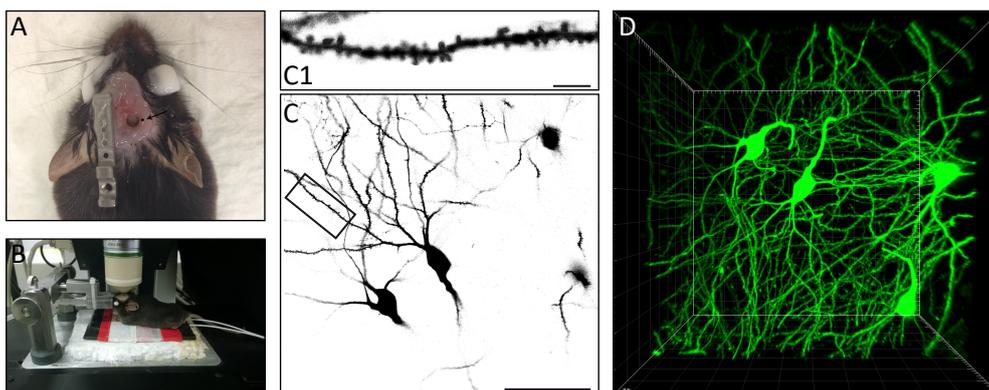


**Abbildung 24:** Implantation des hippocampalen Fensters. A) die Position des Fensters wurde anhand der interhemisphärischen Fissur sowie Bregma und Lambda bestimmt. B) Markierung des Fensters mittels einer Hautstanze. C) Ausdünnung des Schädelknochens mittels eines Dentalbohrers. D) Nach Entfernung des Schädelknochens wurde die äußere Hirnhaut sichtbar. E) Die äußere Hirnhaut wurde mit einer Pinzette entfernt und der Cortex unter Verwendung einer Vakuumpumpe abgesaugt. F) Die zwei gegensätzlich verlaufenden Myelinschichten der Hippocampus-Kapsel. G) Nach Entfernung dieser Myelinschichten wurde der Hippocampus sichtbar. H) Einlassen des Tunnels. I) Fixieren des Tunnels.

#### 4.3.2 *In vivo* 2-Photonen Mikroskopie

Nach der Operation wurde dem Versuchstier, aufgrund der erhöhten Gefahr einer Gliose, eine Erholungszeit von vier Wochen eingeräumt bevor der erste Aufnahmezeitpunkt durchgeführt wurde. Dadurch wurde auch gewährleistet, dass die intrinsische Immunreaktion auf die Implantation des Tunnels abgeklungen war<sup>54</sup>. Vor der *in vivo* 2-Photonen Mikroskopie wurden die Tiere mittels eines Gasgemisches aus 5 % Isofluran (Abbot, Vereinigte Staaten) in 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> anästhesiert (Isofluranverdampfer: Trajan 808, Dräger, Deutschland). Anschließend wurde das Versuchstier in eine spezielle Halterung mittels des angebrachten Metallstiftes am Kopf fixiert (siehe Abbildung 25B). Die Augen wurden hierbei wieder zum Schutz mit Bepanthen-Salbe (Bayer) bedeckt. Der hippocampale Tunnel wurde mit Hilfe einer Pipette und destilliertem Wasser von Verschmutzungen gesäubert. Anschließend wurde das Versuchstier, eingespannt in der speziellen Halterung, unter dem Mikroskop positioniert. Experimentbegleitend wurde dem Versuchstier durch ein um die Schnauze gelegtes Kunststoffrohr 1 % Isofluran zugeführt. Um die Körpertemperatur konstant bei 37 °C zu halten wurde das Versuchstier, während des maximal einstündigen Versuches, auf ein Heizkissen (Fine Science Tools) gelegt. Die Körpertemperatur wurde rektal mit einem Sensor (Fine Science Tools) stetig kontrolliert. Der Aufbau des Mikroskop setzte sich wie folgt zusammen: Ein LSM-880 (Zeiss, Deutschland) in Verbindung mit einem Axio Examiner Z1 Stativ samt integrierten, in X-, Y- und Z-verstellbaren, motorisiertem Tisch (Zeiss), einem CFI LWD Plan Fluorite 16x/0,8 DIC Immersionsobjektiv (Nikon, Japan) und einem eingekoppelten Ti:Sapphire Laser Chameleon Vision S (Coherent, Vereinigte Staaten). Die 2-Photonenanregung von eGFP erfolgte bei einer Wellenlänge von 920 nm. Die Anregung von FSB bei 800 nm. Die emittierten Fluoreszenzsignale wurden durch einen Hauptfarbtei-

ler (dichroitischer Spiegel Kurszpass 690, Zeiss) und im Detektionsstrahlengang durch einen Sperrfilter (Kurzpassfilter 690, Zeiss) vom Anregungslicht getrennt. Die Detektion erfolgte über einen direkt nachgeschalteten Galliumarsenidphosphid (GaAsP)-Detektor (Zeiss). Insgesamt wurden drei Positionen je Versuchstier ausgewählt und dreidimensionale Übersichtsaufnahmen in der Größe von  $209 \times 209 \times 180 \mu\text{m}$  mit  $0.205 \times 0.205 \times 1.0 \mu\text{m}$  in X-, Y- und Z-Auflösung angefertigt. In diesen Übersichtsaufnahmen wurden die Somata der Pyramidenzellen der hippocampalen CA1-Region erfasst, sodass der Ursprung und der Verzweigungsgrad der basalen Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region durch Nachverfolgen bis zum Zellkörper unterschieden werden konnte. Dabei wurde darauf geachtet, dass Dendriten des zweiten Verzweigungsgrad aufgenommen wurden (siehe Abbildung 25C). Zudem wurde überprüft ob sich A $\beta$ -Ablagerungen im Umkreis der Dendriten befanden und vorwiegend Positionen ausgewählt, wo keine FSB-positiven A $\beta$ -Ablagerungen detektiert werden konnten. Innerhalb der Übersichtsaufnahmen wurden nun einzelne, zur Gehirnoberfläche parallel verlaufende, basale Dendriten des *Stratum Oriens* ausgewählt und hochauflösende Aufnahmen ( $0.082 \times 0.082 \times 1.0 \mu\text{m}$  in X, Y und Z bei 15-fachen Zoom) ihrer Spines angefertigt (siehe Abbildung 25C1). Zum Wiederfinden der ausgewählten Dendriten wurde am rechten Rand des Tunnels eine Markierung angebracht, anhand derer die Koordinaten der aufgenommenen Übersichtsaufnahmen bestimmt wurden (siehe Abbildung 25A). Zudem wurde wöchentlich die spezifische Anordnung und Position der Zellkörper und Dendriten der eGFP-markierten Neurone der aufzunehmenden Übersichtsaufnahme, anhand eines selbsterstelltes Gitternetzes, mit der Übersichtsaufnahme der vorhergegangenen Woche verglichen und falls notwendig die Position angepasst. Dieses Vorgehen gewährleistete, dass die ausgewählten Dendriten und ihre Spines zu jedem Aufnahmezeitpunkt wiedergefunden wurden.



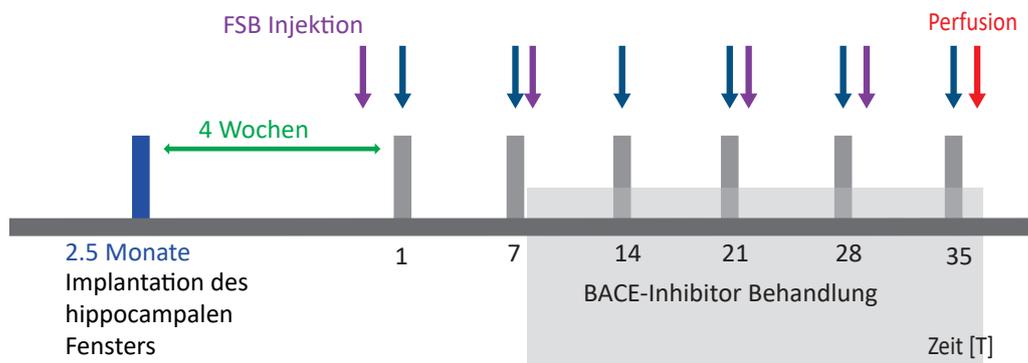
**Abbildung 25:** Chronische *in vivo* 2-Photonen Aufnahmen von Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus. A) Das operierte Versuchstier mit eingelassenem hippocampalen Tunnel. An der rechten Seite des Tunnels wurde eine Markierung angebracht (siehe Pfeil). B) Das Versuchstier wurde mittels eines Metallstiftes in einer speziellen Halterung unterm Objektiv des 2-Photonen Mikroskops fixiert. C) Übersichtsaufnahme der Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus. C1) Hochaufgelöste Aufnahme eines basalen Dendriten des *Stratum oriens* nach der zweiten Verzweigung zur Analyse der Plastizität dendritischer Spines. D) 3D-Übersichtsaufnahme eGFP-positiver Pyramidenzellen der CA1-Region. Die Maßstäbe entsprechen  $5 \mu\text{m}$  in C1,  $50 \mu\text{m}$  in C und  $15 \mu\text{m}$  D.

#### 4.3.3 *In vivo* Färbung von A $\beta$ -Aggregaten

Für die Färbung der A $\beta$ -Ablagerungen im APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Mausmodell wurde den Mäusen fünf Tage vor dem ersten sowie nach dem zweiten, vierten und nach dem fünften Aufnahmezeitpunkt (siehe Abbildung 26) ein 1:10 Gemisch aus einer 1 % FSB ((E,E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene)-Lösung (Sigma-Aldrich) und einer 2 % Albumin in PBS-Lösung (Sigma-Aldrich) ip injiziert.

#### 4.3.4 Versuchsablauf der *In vivo* 2-Photonen Mikroskopie

In der folgenden Abbildung 26 ist der Versuchsablauf der *In vivo* 2-Photonen Mikroskopie dargestellt. Von beiden Genotypen APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M sowie APP<sup>wt</sup>GFP-M wurden jeweils sechs Versuchstiere mit der Kontrollsubstanz sowie mit der hohen (0,29 g/kg) und der niedrigen (0,05 g/kg) NB-360-Dosis behandelt. Der Behandlungszeitraum erstreckte sich über 28 Tage. Vor der Behandlung wurden zwei Zeitpunkte aufgenommen, die als Referenzwert dienten. Um A $\beta$ -Ablagerungen zu detektieren wurden den APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstieren fünf Tage vor dem ersten sowie nach dem zweiten, vierten und nach dem fünften Aufnahmezeitpunkt ein FSB-Albumin-Gemisch injiziert. Nach dem Versuch wurden die Tiere perfundiert. Der Versuchsablauf war für alle Versuchsgruppen gleich, den APP<sup>wt</sup>GFP-M-Versuchstieren wurde allerdings kein FSB injiziert.



**Abbildung 26:** Versuchsablauf der *In vivo* 2-Photonen Mikroskopie. Der Versuchsablauf ist exemplarisch für BACE-Inhibitor behandelte APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M-Versuchstiere dargestellt. Der Behandlungszeitraum der BACE-Inhibition erstreckte sich über 28 Tage, zuvor wurden zwei Zeitpunkte ohne Behandlung als Referenzwert aufgenommen.

#### 4.3.5 Bildanalyse und quantitative Auswertung dendritischer Spines *in vivo*

Um eine unvoreingenommene Auswertung zu gewährleisten, erfolgte die Datenauswertung des *in vivo* Datensatz zur Plastizität dendritischer Spines verblindet. Die Daten wurden so unbenannt, dass nicht daraus hervorgehen konnte welche die Kontroll- und welche die Versuchsgruppe war. Mit Hilfe der ZEN-Software (black edition 2011, Zeiss,) wurden die Spines manuell markiert. Durch den Vergleich der aufeinanderfolgenden Aufnahmezeitpunkte wurden stabile, neugebildete und abgebaute Spines, durch die Vergabe von verschiedenen Farben, unterschieden. Dabei wurde weiß für die stabilen Spines, rot für die abgebauten

Spines und grün für die neugebildeten Spines verwendet. Neugebildete Spines erfuhren, je nachdem ob sie in der darauffolgenden Woche noch vorhanden waren, eine Farbveränderung zu Weiß oder zu Rot. Je nach Bedarf wurde die Helligkeit und der Kontrast der Rohdaten angepasst. Als stabile Spines wurden diejenigen definiert, deren Position sich über zwei Aufnahmezeitpunkten nicht mehr als 1  $\mu\text{m}$  entlang des Dendriten veränderten. Es wurden primär die lateral von den Dendriten ausgehenden Fortsätze erfasst, da die Z-Auflösung auf 1  $\mu\text{m}$  limitiert war. Um die Spine-Dichte (Spines/ $\mu\text{m}$ ) zu bestimmen, wurde zudem die Länge des Dendriten definiert. Durch das Programm SpineMiner XT<sup>477</sup> wurden die Spines ausgezählt und so die Spine-Dichte und die strukturelle Plastizität der dendritischen Spines im Hippocampus ausgewertet. Dabei setzte sich die Spine-Umsatzrate aus folgender Formel zusammen:  $[(N_{\text{neue}} + N_{\text{abgebaute}})/2 \times N_{\text{total}}]/IT$ .  $N_{\text{neue}}$  gibt dabei die Anzahl neugebildeter Spines,  $N_{\text{abgebaute}}$  die Anzahl abgebauter Spines,  $N_{\text{total}}$  die Anzahl aller vorhandenen Spines eines Zeitpunktes und IT die Anzahl an Tagen zwischen den Aufnahmezeitpunkten an<sup>60,478</sup>. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad PRISM 7 (Graphpad Software, Vereinigte Staaten).

#### 4.4 Kleintier-PET-Untersuchungen

Die speziell entwickelten Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographen ( $\mu\text{PET}$ ) ermöglichen trotz kleiner Untersuchungsvolumina eine hohe Sensitivität und eine hohe räumliche Auflösung<sup>479</sup>. Zudem bietet die nicht invasive  $\mu\text{PET}$ -Untersuchung die Möglichkeit im Mausmodell, neben der Analyse von Ausgangs- und Endwerten, wie bei histologischen Untersuchungen, *in vivo* die individuelle Kinetik zu erfassen und dadurch die hohe Variabilität in Einzeltieren zu berücksichtigen<sup>480</sup>.

Alle  $\mu\text{PET}$ -Untersuchungen wurden in Kooperation mit Matthias Brendel, AG Molekulare Bildgebung Neurodegenerativer Erkrankungen der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, sowie Christian Sacher durchgeführt und mit ihrer freundlichen Genehmigung in die Arbeit aufgenommen.

##### 4.4.1 Radiosynthese

Die Radiosynthese für  $^{18}\text{F}$ -GE180 erfolgte nach einem standardisierten Verfahren unter der eine radiochemische Reinheit von über 98 % und eine spezifische Aktivität von 400 - 1400  $\pm$  500 GBq/ $\mu\text{mol}$  am Ende der Synthese erreicht werden konnte<sup>398</sup>. Mit dem verwendeten standardisierten Protokoll für die Radiosynthese von  $^{18}\text{F}$ -FBB wurde ebenfalls eine Reinheit größer als 98 % erzielt sowie eine finale spezifische Aktivität von 30 - 80  $\pm$  20 GBq/mmol<sup>480</sup>.

##### 4.4.2 $\mu\text{PET}$ -Datenakquisition, Bildrekonstruktion und Co-Registrierung

Die  $\mu\text{PET}$ -Untersuchungen wurden anhand eines etablierten und standardisierten Protokolls durchgeführt<sup>398</sup>. Die Versuchstiere wurden zunächst mit Isofloran (1,5 %, Flussgeschwindigkeit von 3,5 L/min in Sauerstoff) betäubt, zu viert in die speziell angefertigte Kleintier-

untersuchungsbox gelegt und anschließend in den  $\mu$ PET-Scanner (Inveon DPET, Siemens, Deutschland) platziert<sup>480</sup>. Den narkotisierten Versuchstieren wurde ein Schwanzvenenkatheter in eine der beiden lateralen Schwanzvenen implantiert. Über den Schwanzvenenkatheter wurden den vier Versuchstieren zeitgleich die Radiotracer  $^{18}\text{F}$ -GE180 mit einer Aktivität von  $13,4 \pm 1,6$  MBq in 150  $\mu\text{L}$  Kochsalz, sowie  $^{18}\text{F}$ -FBB mit einer Aktivität von  $12,9 \pm 1,7$  MBq in 150  $\mu\text{L}$  Salin injiziert. Zunächst wurden dynamische Messungen mit elf Monate alten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren mit einem Zeitfenster von 0 – 90 min nach  $^{18}\text{F}$ -GE180-Injektion sowie 0 – 60 min nach  $^{18}\text{F}$ -FBB-Injektion durchgeführt, um das optimale Zeitfenster nach der Injektion für das Mausmodell APP<sup>NL-G-F</sup> zu definieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich ab 50 Minuten nach  $^{18}\text{F}$ -GE180-Injektion und 25 Minuten nach  $^{18}\text{F}$ -FBB-Injektion das  $\mu$ PET-Signal stabilisierte. Darüber hinaus zeigten die Messungen, dass sich ein Zeitfenster von 60 – 90 min nach  $^{18}\text{F}$ -GE180-Injektion sowie ein Zeitfenster von 30 – 60 min nach  $^{18}\text{F}$ -FBB-Injektion am besten eignet, um APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstiere von Kontrolltieren (C57BL/6J) zu unterscheiden.

Des Weiteren wurden statische Untersuchungen mit einem Emissionsfenster von 60 – 90 min für  $^{18}\text{F}$ -GE180 und mit einem Emissionsfenster von 30 – 60 min Minuten für  $^{18}\text{F}$ -FBB und anschließend ein 15-minütiger Transmissionsscan zur Schwächungskorrektur unter Benutzung einer rotierenden [ $^{57}\text{Co}$ ]-Quelle durchgeführt. Die Versuchstiere blieben bis zum Versuchsende in Narkose und wurden nach dem Aufwachen in ihre Käfige zurückgebracht.

Vor der weiteren Verarbeitung der  $\mu$ PET-Daten zur Bildrekonstruktion wurden zahlreiche Korrekturen angewandt. Unter anderem wurde die Detektorsensitivität normiert, eine Totzeitkorrektur für die Detektoren sowie Streuungs- und Schwächungskorrekturen durchgeführt, um dadurch Integrale der Radiotracerverteilung zu erhalten. Die Bildrekonstruktion der  $\mu$ PET-Daten erfolgte nach den Korrekturen anhand des dreidimensionalen OSEM (engl. ordered-subsets-expectation maximization) -Algorithmus mit vier Iterationen sowie dem MAP (maximum a posteriori) -Algorithmus mit 32 Iterationen. Es wurde ein Zoomfaktor von 1,0 angewendet, wodurch final eine Bildpunktgröße von 0.78 x 0.78 x 0.8 mm erzielt wurde<sup>398</sup>. Die dynamischen und statischen  $\mu$ PET-Bilddaten wurden anschließend, nach individueller Bewegungskorrektur, durch eine rigide manuelle Co-Registrierung mittels des Programms PMOD (Version 3,303, PMOD Technologies Ltd., Zürich, Schweiz) auf ein standardisiertes anatomisches Template des kranialen Magnetresonanztomografie-Atlas des Mäusehirnes fusioniert<sup>481</sup>. Daraufhin wurden die Versuchstierdaten verblindet und die exakte Erstausrichtung, zwecks weiterer Verblindung, von jemandem durchgeführt, der nicht am Experiment beteiligt war.

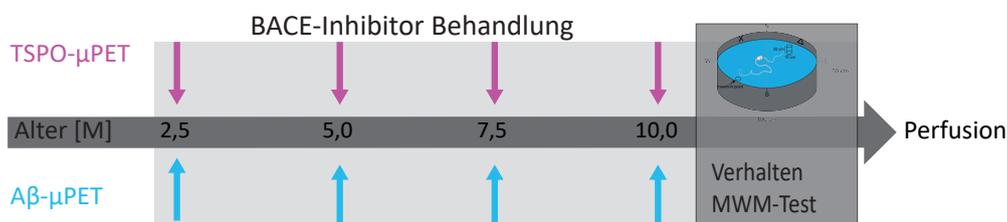
Im zweiten Schritt wurden die räumlich normalisierten  $\mu$ PET-Bilddaten auf die injizierte Radiotracer-Dosis skaliert und mit dem individuellen Körpergewicht multipliziert um den standardisierten Aufnahmewertanteil SUV (engl. standardized uptake value) zu erhalten. Für das A $\beta$ - $\mu$ PET wurde anschließend eine Co-Registrierung auf Radiotracer-spezifische Templates anhand eines etablierten Protokolls durchgeführt<sup>398</sup>. Dabei wurden zunächst, altersgruppenabhängig, die räumlich normalisierten Daten summiert. Dadurch wurde ein Template geschaffen, welches für die exakte Co-Registrierung der Folgedaten verwendet werden konnte. Dabei wurden die anfänglichen manuellen  $\mu$ PET-zu-MRT-Fusionsbilder mit-

tels des Programms PMOD nichtlinear und mit standardisierten Einstellungen auf das  $^{18}\text{F}$ -FBB-Radiotracer spezifische Template normalisiert<sup>398</sup>. Für  $^{18}\text{F}$ -GE180 wurde eine Normalisierung mittels der standardisierten, extrazerebralen Myokardkorrekturmethode durchgeführt<sup>482</sup>.

#### 4.4.3 $\mu\text{PET}$ -Studienablauf

In dieser longitudinalen Studie wurden die beiden radioaktiv markierten Trägerstoffe  $^{18}\text{F}$ -Florbetaben ( $^{18}\text{F}$ -FBB) sowie  $^{18}\text{F}$ -GE180 verwendet.  $^{18}\text{F}$ -FBB ermöglichte die Untersuchung von  $\text{A}\beta$ -Ablagerungen<sup>382</sup> und  $^{18}\text{F}$ -GE180 die Untersuchung der Neuroinflammation, wobei der Radiotracer  $^{18}\text{F}$ -GE180 das 18kDa Translokator-Protein (TSPO) bindet<sup>383</sup>. TSPO ist ein Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran und wird im gesunden Gehirn unter anderem von Mitochondrien der Mikrogliazellen auf einem geringen Niveau exprimiert. Bei neuroinflammatorischen Prozessen wird die Expression von TSPO allerdings stark hochreguliert<sup>392</sup>, weshalb das Expressionsniveau von TSPO in einer engen Verbindung zur Neuroinflammation steht<sup>391</sup>.

Zunächst wurde mittels  $\mu\text{PET}$  longitudinal die Neuroinflammation sowie die  $\text{A}\beta$ -Ablagerungen von homozygoten  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren ( $n=20$ ) gegenüber gleichaltrigen Wildtypstieren (C57BL/6J,  $n=6$ ) untersucht und dadurch das  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Mausmodell weiter charakterisiert. Zudem wurden gemischtgeschlechtliche  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstiere ( $n=16$ ), ab einem Alter von neun Wochen und über einen Zeitraum von acht Monaten, mittels der hohen Dosis des BACE-Inhibitors NB-360 (0,29 g/kg) behandelt und der Effekt auf die Neuroinflammation sowie auf die  $\text{A}\beta$ -Ablagerungen untersucht. Die erste  $\mu\text{PET}$ -Untersuchung bei  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren mit zweieinhalb Monaten diente als Vergleichswert für die darauffolgenden Untersuchungen mit fünf sowie siebeneinhalb Monaten. Die finale Untersuchung wurde mit zehn Monaten durchgeführt (siehe Abbildung 27). Zwei Wochen nach der finalen Untersuchung wurde die Gedächtnisleistung des  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Mausmodells gegenüber Wildtypstieren sowie gegenüber den behandelten  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren im Morris-Wasserlabyrinth (engl. Morris Water Maze (MWM)) getestet (siehe Kapitel 4.5). Anschließend wurden die Versuchstiere perfundiert um immunhistologische *ex vivo* Analysen anfertigen zu können (siehe Kapitel 4.6.3).

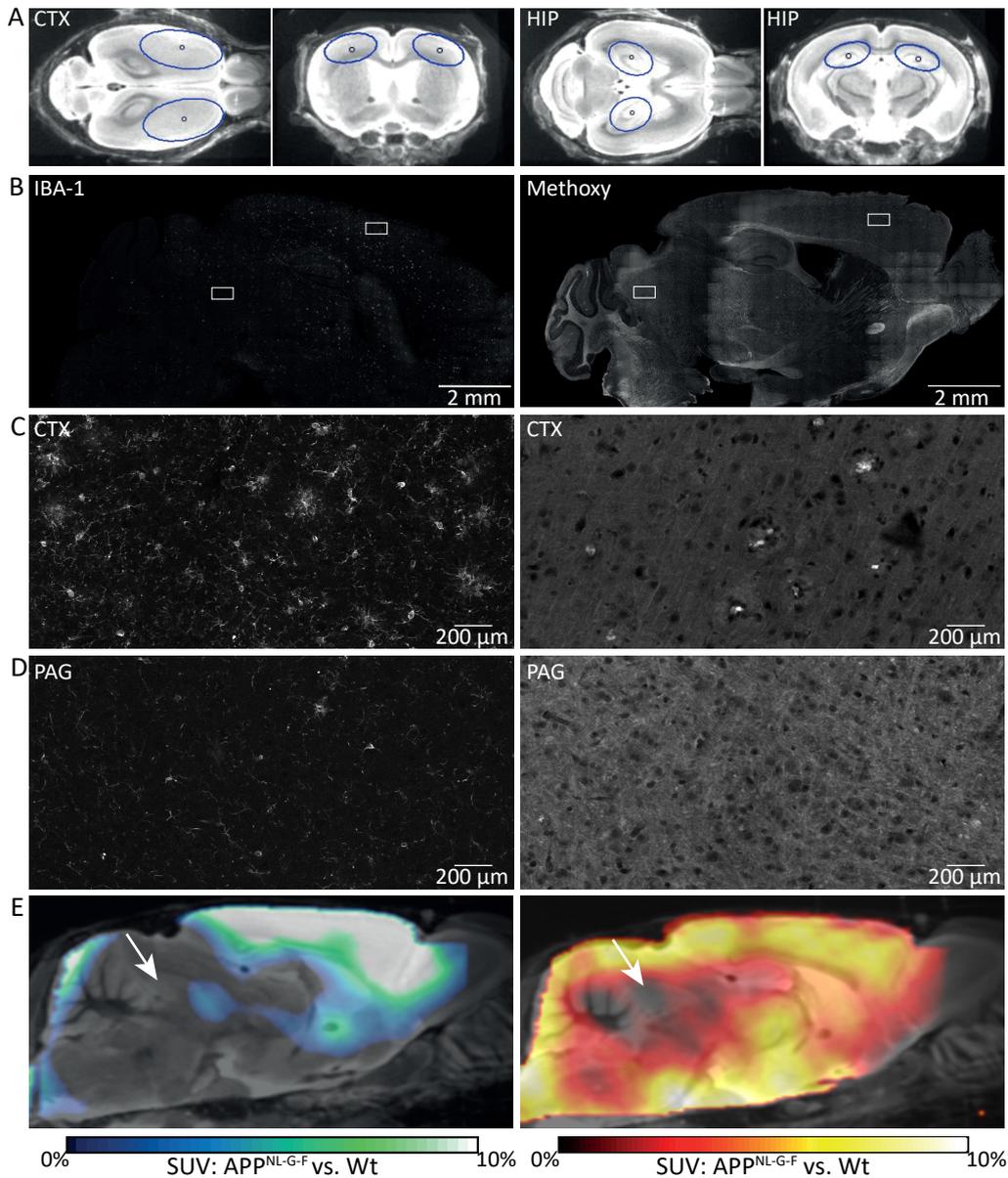


**Abbildung 27:** TSPO und  $\text{A}\beta$ - $\mu\text{PET}$ -Untersuchungen im  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Mausmodell. Die erste Untersuchung der longitudinalen  $\mu\text{PET}$ -Studie erfolgte mit einem Alter von zweieinhalb Monaten und diente als Vergleichswert für die darauffolgenden Untersuchungen mit fünf, siebeneinhalb und zehn Monaten. Die BACE-Inhibition erfolgte in  $\text{APP}^{\text{NL-G-F}}$ -Versuchstieren ab neun Wochen und über einen Zeitraum von acht Monaten. Zwei Wochen nach der letzten  $\mu\text{PET}$ -Untersuchung wurden die Versuchstiere im MWM getestet und anschließend perfundiert.

#### 4.4.4 $\mu$ PET-Datenanalyse

Für die  $\mu$ PET-Datenanalyse wurden zunächst dreidimensionale Zielvolumina (engl. volumes of interest (VOI)) in der Anatomie des MRT-Atlas festgelegt (siehe Abbildung 28A). Dabei wurden im frontalen Cortex bilateral Zielvolumina mit einem jeweiligen Volumen von  $22 \text{ mm}^3$  gewählt. Bilateral im Hippocampus wurden VOI mit einem jeweiligen Volumen von  $10 \text{ mm}^3$  bestimmt. Die ermittelten SUVs der  $\mu$ PET-Untersuchung wurden anhand einer Referenzregion normalisiert. Dies ermöglicht eine verbesserte Vergleichbarkeit der erfassten Werte bei einer longitudinalen Studie<sup>483</sup>. Zudem können dadurch die Varianzen der ermittelten Messwerte verringert werden<sup>484</sup>. Eine geeignete zerebrale Vergleichsregion zeichnet sich dadurch aus, dass sie keine spezifische Radiotracer-Bindung zeigt bzw. frei von jeglicher Pathologie ist. Dadurch kann diese Region als Divisor zur Berechnung des standardisierten Aufnahmewertanteil SUVR dienen. Anhand dieser Kriterien wurde für das Mausmodell APP<sup>NL-G-F</sup> das Kernkomplex periaquäduktales Grau (PAG) im Mittelhirn als Pseudo-Referenzregion, mit einer VOI von  $20 \text{ mm}^3$ , in Rahmen dieser Arbeit etabliert<sup>437</sup>.

Durch SUV-Analysen nach der finalen Untersuchung mit zehn Monaten, konnte gezeigt werden, dass das periaquäduktale Grau eine sehr geringe Tracer-Bindung für  $^{18}\text{F}$ -GE180 (SUV nach Myokardkorrektur APP<sup>NL-G-F</sup> =  $0,22 \pm 0,02$  vs. Wildtyptiere (Wt) =  $0,23 \pm 0,02$ ) sowie für  $^{18}\text{F}$ -FBB (SUV APP<sup>NL-G-F</sup> =  $0,47 \pm 0,08$  vs. Wt =  $0,46 \pm 0,09$ ) im Vergleich zu Wildtyptieren aufweist (siehe Abbildung 28E). Diese Beobachtung wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen fibrilläres A $\beta$  (Methoxy-X04) und Mikroglia Aktivierung (IBA-1-Antikörper) in zehn Monate alten APP<sup>NL-G-F</sup>-Versuchstieren validiert. Die Färbungen zeigten eine weit verbreitete fibrilläre A $\beta$ -Ablagerungen und aktivierte Mikrogliazellen vor allem in den Regionen des Vorderhirns (siehe Abbildung 28B,C), während im periaquäduktalen Grau kaum IBA-1 sowie Methoxy-X04-Signal detektiert wurde (siehe Abbildung 28D). Der in dieser Arbeit verwendete Zielparameter besteht aus dem Verhältnis des standardisierten Aufnahmewertes im Cortex/Hippocampus gegenüber dem Aufnahmewert der Referenzregion dem periaquäduktalen Grau (SUVR<sub>CTX/PAG</sub>; SUVR<sub>HIP/PAG</sub>). Um diskrete Veränderungen außerhalb der festgelegten Zielvolumina feststellen zu können, wurden statistische parametrische Bildpunkt-basierte Vergleiche der auf die Referenzregion skalierten SUVR-Bildaten zwischen APP<sup>NL-G-F</sup> und gleichaltrigen Wildtyptieren mittels des Programms SPM5 (Statistical Parametric Mapping; Wellcome Department of Cognitive Neurology, Vereinigtes Königreich) anhand eines etablierten Protokolls<sup>485,480</sup> durchgeführt. Bei dieser Methodik wurden die einzelnen Bildpunkte (Voxel) untersucht und festgelegt, inwieweit die Wahrscheinlichkeit bestand, dass es sich um graue oder weiße Substanz handelte. Diese Wahrscheinlichkeitskarten wurden dann, nach einer Glättung, zwischen gleichaltrigen APP<sup>NL-G-F</sup>- und Wildtyptieren mit einfachen statistischen Verfahren (Zweistichproben-*t*-Test) verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad PRISM7 (Graphpad Software).



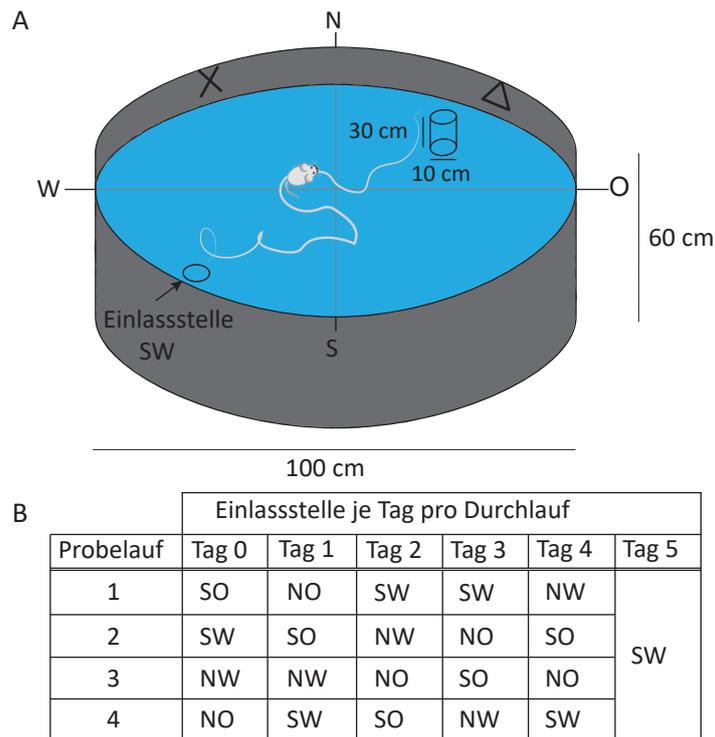
**Abbildung 28:** Bestimmung der VOIs sowie einer geeigneten Referenzregion für die  $\mu$ PET-Datenanalyse im Mausmodell  $APP^{NL-G-F}$ . A) Definitionen der kortikalen (CTX) und hippocampalen (HIP) dreidimensionalen Zielregionen (VOI) in koronalen und axialen Schnitten anhand eines MRT-Atlas. B) Immunfluoreszenzfärbungen gegen aktivierte Mikrogliazellen (IBA-1) sowie fibrilläres  $A\beta$  (Methoxy-X04) zeigten eine erhöhte Aktivierung der Mikrogliazellen sowie eine weitgestreute Amyloidosis im gesamten Hirn von zehn Monaten alten  $APP^{NL-G-F}$ -Versuchstieren. B, C) Besonders im Cortex (CTX) wurde ein hohes Signal der beiden Antikörper detektiert, wohingegen im periaquäduktalen Grau (PAG) nur eine sehr geringe Anzahl IBA-1-positive Mikrogliazellen, sowie nahezu kein Methoxy-X04-Signal observiert wurde. D) Die Eignung des PAG als Pseudo-Referenzgewebe wurde zudem durch den Vergleich von SUVs von  $A\beta$ - und TSPO- $\mu$ PET-Daten zwischen  $APP^{NL-G-F}$  und Wildtyptieren weiter überprüft [ $^{18}F$ -GE180 (SUV nach Myokardkorrektur  $APP^{NL-G-F} = 0,22 \pm 0,02$  vs. Wt =  $0,23 \pm 0,02$ ) sowie für  $^{18}F$ -FBB (SUV  $APP^{NL-G-F} = 0,47 \pm 0,08$  vs. Wt =  $0,46 \pm 0,09$ ).

## 4.5 Verhaltensversuche MWM-Test

Um die hippocampusabhängige Lernfähigkeit und das Referenzgedächtnis von Nagetieren zu untersuchen wurde, in einer etwas modifizierten Version, der 1984 von Richard Morris etablierte Versuchsaufbau des MWM verwendet. Dabei wurde ein großes, rundes Becken ( $d=100\text{ cm}$ ,  $h=60\text{ cm}$ ) bis zu einer Höhe von 29 - 31 cm mit Wasser gefüllt. Innerhalb des Beckens befand sich ca. 1 cm über und ab dem ersten Trainingstag unter der Wasseroberfläche eine durchsichtige Plattform ( $d=10\text{ cm}$ ,  $h=30\text{ cm}$ ). Das Becken wurde methodisch in vier gleich große Quadranten eingeteilt, wobei mittig in jedem Quadranten an der Innenwand des Beckens sichtbare Markierungen gehängt wurden. Mittels dieser Markierungen sollte sich das Versuchstier im Wasser orientieren und sich die Position der Plattform im Becken merken, um diese in nachfolgenden Durchläufen wieder zu finden. Alle Wände im Raum waren weiß und eventuelle Steckdosen oder ähnliches wurden abgeklebt um nicht als Orientierungspunkte dienen zu können. An der Decke war eine Kamera angebracht, die eine volle Einsicht in den gesamten Versuchsbereich hatte und alle Bewegungen im Wasserbecken mit Hilfe des Programms EthoVision (Noldus, Niederlande) aufzeichnete. Der Versuchsleiter sowie der angeschlossene Computer wurden vom Wasserbecken durch einen weißen Sichtschutz getrennt, sodass das Versuchstier nicht abgelenkt wurde. Mit dem MWM-Test wird vor allem das räumliche Denkvermögen sowie die Merk- bzw. Lernfähigkeit der Versuchstiere analysiert<sup>486</sup>. Der MWM-Test hat sich als robuster und zuverlässiger Verhaltenstest etabliert, der stark mit der synaptischen Plastizität des Hippocampus und der NMDA-Rezeptorfunktion korreliert ist<sup>486</sup>.

### 4.5.1 Versuchsablauf des MWM-Tests

Nach einer längeren Eingewöhnung der Versuchstiere an den Versuchsleiter wurde zunächst überprüft, ob die Versuchstiere schwimmen konnten oder ob motorische Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen vorlagen. Zu diesem Zweck wurde ein Probelauf durchgeführt. Bei diesem Probelauf hatten die Versuchstiere im Wasserbecken fünf Minuten Zeit, um die noch sichtbare Plattform im Wasser zu finden. Nach Ablauf der Zeit wurden die Versuchstiere vom Versuchsleiter zur Plattform geführt. Wurden keine motorischen Beeinträchtigungen festgestellt, wurden die Versuchstiere weiter im MWM-Test analysiert. Am nächsten Tag startete das fünftägige Training mit jeweils vier Durchläufen, wobei die Startposition des Versuchstieres bei jedem Lauf anhand des Schemas in Abbildung 29 variiert wurde. An Tag Null war das Wasser durchsichtig und die Plattform ragte 1 cm über der Wasseroberfläche heraus. Dieser Eingewöhnungstag wurde in der Auswertung später nicht mit reingenommen. Ab dem ersten statistisch ausgewerteten Trainingstag wurde das Wasser weiß gefärbt und der Wasserspiegel soweit angehoben, dass die Plattform gerade 1 cm unter der Wasseroberfläche lag. Jeder Lauf im Labyrinth hatte in dieser Versuchskonstellation ein Zeitfenster von 70 Sekunden. In dieser Zeit sollte das Versuchstier die versteckte Plattform finden. Geling dies nicht, wurde die Zeit mit 71 Sekunden bewertet und das Versuchstier für 15 Sekunden auf die Plattform in das Becken gesetzt<sup>486</sup>.



**Abbildung 29:** Versuchsaufbau des Morris-Wasserlabyrinths. A) Das Versuchsbecken wurde in vier gleichgroße Quadranten eingeteilt, in dessen Mitte ein visuelles Zeichen (Ein X, ein Dreieck, ein Viereck und ein Kreis) angebracht wurde. Die Plattform besaß einen Durchmesser von 10 cm und eine Höhe von 30 cm. B) Die Einlassstelle des Versuchstieres variierte an jedem Tag sowie bei jedem Durchlauf. SO=Südosten, SW=Südwesten, NW=Nordwesten und NO=Nordosten. Während des Trainings wurde die Plattform im Quadranten Nordosten platziert. Beim Transfer-Test (Tag 5) wurde die Plattform aus dem Becken entfernt.

Am fünften Tag fand der Transfer-Test statt, um das Referenzgedächtnis des Versuchstieres zu testen. An diesem Tag wurde die Plattform entfernt und nur ein Durchlauf durchgeführt. Das Versuchstier startete beim Transfer-Test im SW-Quadranten. Dieser Quadrant lag der früheren Plattformposition gegenüber und wies somit die weiteste Strecke zur früheren Plattformposition auf. Das Versuchstier wurde 70 Sekunden im Becken gelassen.

#### 4.5.2 Auswertung des MWM-Tests

Die Auswertung fand mittels des Programms EthoVision (Noldus) statt. Dabei erfolgte die Auswertung der im Versuch aufgezeichneten Videos der Versuchstiere im Wasserlabyrinth, mittels zuvor festgelegter Parameter im Programm, automatisiert und dementsprechend verblindet. Neben der benötigten Zeit zur Plattform (Latenzzeit) wurde die zurückgelegte Schwimmstrecke der Versuchstiere analysiert. Beim Transfer-Test wurde zudem festgestellt wie oft die Versuchstiere die Stelle kreuzten wo früher die Plattform war. Es wurde stets der Median der vier Durchläufe eines Tieres pro Tag zur Auswertung herangezogen<sup>487</sup>. Da am Tag Null die Plattform noch zu sehen war, wurden die Ergebnisse nicht in die Statistik mit aufgenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad PRISM7 (Graphpad Software).

## 4.6 Immunfluoreszenz

### 4.6.1 Transkardinale Perfusion

Um die Erhaltung der Probenstruktur zu gewährleisten wurde eine Gewebefixierung mittels transkardinaler Perfusion durchgeführt. Bei dieser Methodik wurden zudem Erythrozyten entfernt, deren Autofluoreszenz lichtmikroskopische Untersuchungen beeinträchtigen könnten. Die Versuchstiere wurden mit einem Gemisch aus Ketamin/Xylazin (13,0 / 1,0 µg/g) per Injektion in die Bauchhöhle anästhesiert. Nach der Überprüfung der Narkosetiefe, mittels Zwischenzehenreflex, wurden die Versuchstiere auf dem Rücken liegend an allen vier Gliedmaßen fixiert. Durch Öffnen des Brustkorbes wurde das Herz freigelegt und in die linke Herzkammer eine Flügelkanüle eingeführt. Die absteigende Aorta wurde durchtrennt, um den Abfluss des Blutes zu ermöglichen. Mittels einer peristaltischen Pumpe (Harvard Apparatus, Vereinigtes Königreich) wurden nun über einen Zeitraum von fünf Minuten 40 mL PBS durch die Flügelkanüle in den Blutkreislauf eingeleitet. Das gesamte Blut des Organismus wurde so mit der isotonischen PBS-Lösung ersetzt. Im Anschluss erfolgte eine achtmünütige Perfusion mit 70 mL Formaldehydlösung (4 % Paraformaldehyd in 0,1M PB, Roth). Formaldehyd ist ein additives Fixativ, welches mittels seiner Aldehyd-Gruppe eine kovalente Quervernetzung der Proteine im Gewebe durch Bildung von Methylenbrücken bewirkt und dadurch das Gewebe fixiert. Nach Abschluss der Perfusion wurde der Kopf des Versuchstiers abgetrennt, das Gehirn freipräpariert und über Nacht bei 4 °C in 4 % Formaldehydlösung postfixiert. Anschließend wurden die fixierten Gehirne in PBS überführt und bei 4 °C gelagert.

### 4.6.2 Anfertigung von Gehirn-Schnitten mittels Vibratom

Mit Hilfe eines VT1000S Vibratom (Leica Microsystems, Deutschland) konnten von den fixierten Gehirnen Schnitte angefertigt werden. Dazu wurde zunächst das Gehirn mit Hilfe einer Rasierklinge zurechtgetrimmt und mit Sekundenkleber auf der Vibratombühne fixiert. Die Wanne des Vibratoms wurde mit PBS gefüllt, um zu gewährleisten, dass das Präparat stets mit Flüssigkeit bedeckt war. Bei niedriger Schnittgeschwindigkeit und hoher Vibrationsfrequenz wurden sagittale 50 µm dicke Schnitte vom Gehirn angefertigt. Diese wurden in PBS befüllte Multiwell-Platten (VWR, Vereinigte Staaten) überführt um anschließend für immunhistochemische-Färbungen verwendet zu werden.

### 4.6.3 IF-Färbeprotokolle

Um in der APP<sup>NL-G-F</sup>-Linie die Spine-Dichte *ex vivo* am und abseits von A $\beta$ -Ablagerungen zu bestimmen, wurde zur Verstärkung des intrinsischen eGFP-Signals der Antikörper Anti-GFP gekoppelt mit Alexa488 (A-21 311, Invitrogen, Vereinigte Staaten) verwendet. Zur Färbung der A $\beta$ -Ablagerungen selbst, wurde der Antikörper NAB228 (sc-32 277, Santa Cruz, Vereinigte Staaten)<sup>488</sup> sowie FSB (CAS 891 180 931, Merck, Deutschland) eingesetzt, wobei der NAB228-Antikörper A $\beta$ -Oligomere immunofärbt und FSB an A $\beta$ -Fibrillen bindet. Zunächst wurden die Schnitte auf einem Plattformschüttler (Titramax 1000, Heidolph, Deutschland)

über Nacht bei Raumtemperatur mittels 2 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend durch eine einstündige Inkubation in einer Lösung aus 5 % Normalziegenserum (Vector Laboratories, Vereinigte Staaten) und 0,5 % Triton X-100 in PBS blockiert. Der Primärantikörper NAB228 wurde im Verhältnis 1:500 hinzugegeben und zwei Nächte bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde anschließend der Zweitantikörper Alexa647 (Abcam, Vereinigtes Königreich) 1:500 gegen Maus in einer Lösung aus 5 % Normalziegenserum und 0,5 % Triton X-100 für vier Stunden inkubiert und der ungebundene Antikörper wieder durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der Alexa488 gebundene Primärantikörper anti-GFP wurde anschließend im Verhältnis 1:300 hinzugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation und drei folgenden Waschschrritten wurde zudem 500 µL einer FSB-Lösung (FSB 1:1000 in PBS) auf die Schnitte gegeben. Nach erneuten 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Schnitte zweimal gewaschen und anschließend lichtgeschützt auf Objektträger aufgezogen und mit einem Eindeckmedium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Aligent, Vereinigte Staaten) bedeckt. Anstelle der FSB-Lösung wurde teilweise auch 10 µg/mL Methoxy-X04 (Tocris, Vereinigtes Königreich) in 50 % Ethanol verwendet. Zudem wurden noch Färbungen gegen aktivierte Mikrogliazellen angefertigt. Dazu wurde der IBA-1 Antikörper (Wako, Vereinigte Staaten) 1:500 in einer Lösung aus 5 % Normalziegenserum und 0,5 % Triton X-100 in PBS für zwei Nächte bei 4 °C inkubiert. Als Zweitantikörper wurde Alexa555 (Abcam) gegen Kaninchen 1:500 in einer Lösung aus 5 % Normalziegenserum und 0,5 % Triton X-100 in PBS verwendet und für vier Stunden inkubiert. Nach erneuten 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Schnitte zweimal gewaschen und anschließend lichtgeschützt auf Objektträger (Objektträger Superfrost Plus, VWR) aufgezogen und mit dem Eindeckmedium bedeckt. Um die Präparate vor Austrocknung zu schützen wurden die Objektträger mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

#### 4.6.4 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Die Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Gehirnschnitte wurden an einem inversen Konfokalmikroskop LSM780 (Zeiss) durchgeführt. Bei den Aufnahmen zur *ex vivo* Analyse der dendritischen Spines wurden Anregungswellenlängen von 405, 488 und 633 nm verwendet. Die Emission von Methoxy-X04 und FSB lag bei 410 - 585 nm, für NAB228 bei 638-755 nm und für GFP bei 490-633 nm. Pro Versuchstier wurden drei Positionen am sowie drei Positionen abseits von A $\beta$ -Ablagerungen aufgenommen, wobei ein PlanApochromat 40x/1,4 Ölimmersionsobjektiv (Zeiss) verwendet wurde. Zunächst wurden Übersichtsbilder in der Größe von 216.37 x 216.37 x 90 µm mit 0,423 x 0,423 x 1,0 µm in X-, Y- und Z-Auflösung angefertigt. In diesen Übersichtsaufnahmen wurden die Somata der Pyramidenzellen erfasst, sodass der Ursprung der basalen Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region durch Nachverfolgen bis zum Zellkörper unterschieden werden konnte. Innerhalb der Übersichtsaufnahmen wurden nun einzelne, zur Gehirnoberfläche parallel verlaufende, basale Dendriten des *Stratum oriens* ausgewählt und hochauflösende mikroskopische Aufnahmen (0,104 x 0,104 x 0.395 µm in X-, Y- und Z-Auflösung bei einem vierfachen Zoom)

angefertigt. Für die Übersichtsbilder zur  $\mu$ PET-Studie zur Überprüfung der Aktivität der Mikrogliazellen sowie der A $\beta$ -Ablagerungen im gesamten Maushirn wurden Bildstapel mit einer Größe von 216.37 x 216.37 x 90  $\mu$ m mit 0,423 x 0,423 x 1,0  $\mu$ m in X-, Y- und Z-Auflösung angefertigt, wobei die Emission von IBA-1 bei 540 - 560 nm lag. Darüber hinaus wurden für die Analyse zur Beschaffenheit von A $\beta$ -Ablagerungen im APP<sup>NL-G-F</sup>-Mausmodell Bildstapel von NAB228 und Methoxy-X04-Färbungen mit einer Größe von 216.37 x 216.37 x 90  $\mu$ m mit 0,423 x 0,423 x 1,0  $\mu$ m in X-, Y- und Z-Auflösung angefertigt.

#### 4.6.5 Bildanalysen und quantitative Auswertung dendritischer Spines *ex vivo*

Die Datenauswertung erfolgte verblindet und mittels des Programmes ZEN black (siehe Kapitel 4.3.5). In den dreidimensionalen konfokalen Bildstapeln wurde zunächst die Länge des Dendriten definiert. Die Spines wurden anschließend manuell einzeln markiert, wodurch eine Maske (.ovl) entstand, die später durch das Programm SpineMiner (Ochs, 2014) ausgewertet wurde. Im Gegensatz zum *in vivo* Datensatz konnte bei dem *ex vivo* Datensatz ebenfalls die Morphologie der Spines bestimmt werden. Die Spines wurden in pilzförmige, stummelförmige sowie dünne Spines anhand der im Kapitel 1.1.4 beschriebenen Merkmale unterteilt.

#### 4.6.6 Bildanalysen und Quantitative Auswertung von A $\beta$ -Plaques *ex vivo*

Ein speziell geschriebenes MATLAB-Skript (MathWorks, Vereinigte Staaten) wurde zur Identifizierung von A $\beta$ -Plaques in dreidimensionalen Bildstapeln mit NAB228 sowie Methoxy-X04-Immunfluoreszenzintensitäten angewendet. Kurzzeitig wurden Intensitätsschwankungen zwischen verschiedenen Stapeln und in verschiedenen Tiefen durch Normalisierung der Voxel-Intensität in jeder Z-Schicht auf die 70igste-Perzentile ausgeglichen. Anschließend wurde die 90igste-Perzentile als Schwellenwert angewandt und eine Analyse der verbundenen Komponenten durchgeführt, um einzelne A $\beta$ -Plaques zu identifizieren. Es wurde eine quasieuklidische dreidimensionale Distanztransformation mit einer Auflösung von 1  $\mu$ m vom Rand jedes A $\beta$ -Plaques in das umgebende Gewebe sowie in das Innere jedes A $\beta$ -Plaques durchgeführt. Voxeln innerhalb der A $\beta$ -Plaques wurde ein negativer Abstand vom Rand des A $\beta$ -Plaques zugewiesen. Anschließend wurde die mittlere NAB228- und Methoxy-X04-Fluoreszenzintensität in unterschiedlichen Abständen zum A $\beta$ -Plaque-Kern berechnet und das normalisierte mittlere Intensitätsprofil angegeben. Für jedes Versuchstier wurden mindestens 41 A $\beta$ -Plaques analysiert.

### 4.7 Statistische Auswertung

Die erhobenen Messdaten wurden mittels Prism Software 7 (Graphpad, Vereinigte Staaten) statistisch ausgewertet. Zunächst wurden die Daten stets auf Normalverteilung (Gauß-Verteilung) überprüft. Dazu wurde der D'Agostino & Pearson-Test sowie Shapiro-Wilk-Test angewendet. Nach Bestätigung der Normalverteilung wurden parametrische Tests angewendet. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mittels ungepaarten, Zwei-

stichproben-*t*-Test geprüft. Veränderungen über die Zeit einer Versuchsgruppe wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA, engl. analysis of variance) mit anschließendem Turkey-post-hoc-test evaluiert. Wurden mehr als zwei Gruppen über einen zeitlichen Verlauf miteinander verglichen, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-post-hoc-test durchgeführt. Soweit nicht anders deklariert, wurden die Ergebnisse als Mittelwert der Versuchsgruppen  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM, engl. standard error of mean) dargestellt. Die ermittelten P-Werte geben an mit welcher Wahrscheinlichkeit sich zwei Ereignisse signifikant unterscheiden. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert von  $<0,05$  definiert.

## 4.8 Programme

**Tabelle 5:** Programme

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems
EthoVision (Noldus)	Noldus
GraphPad PRISM 7	Graphpad Software
ImageJ 1.52v	Wayne Rasband national institutes of health
Latex	
LSM Image Browser 4.2.0	Zeiss
MATLAB	MathWorks
Microsoft Excel	Microsoft
PMOD Version 3.303	PMOD Technologies Ltd., Zürich, Schweiz
SpineMiner XT	(Ochs 2014)
SPM5	Statistical Parametric Mapping; Wellcome Department of Cognitive Neurology
Zen 2011	Zeiss
Zen 2016	Zeiss

## Literaturverzeichnis

- [1] Squire, L. R., Hrsg.: Encyclopedia of neuroscience. London: Academic Elsevier, 2009.
- [2] Andersen, P., Hrsg.: The hippocampus book. Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. URL: <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0725/2006007088-d.html>.
- [3] Buzsáki, G.: Two-stage model of memory trace formation: A role for “noisy” brain states. In: *Neuroscience* 31.3 (1989), S. 551–570. DOI: 10.1016/0306-4522(89)90423-5.
- [4] Braak, H.; Braak, E.: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. In: *Acta neuropathologica* 82.4 (1991), S. 239–259. DOI: 10.1007/bf00308809.
- [5] Braak, H.; Braak, E. et al.: Staging of Alzheimer-related cortical destruction. In: *European neurology* 33.6 (1993), S. 403–408. DOI: 10.1159/000116984.
- [6] West, M. J.; Kawas, C. H. et al.: The CA1 region of the human hippocampus is a hot spot in Alzheimer’s disease. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 908 (2000), S. 255–259. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06652.x.
- [7] West, M.; Coleman, P. et al.: Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer’s disease. In: *The Lancet* 344.8925 (1994), S. 769–772. DOI: 10.1016/S0140-6736(94)92338-8.
- [8] Jillian J. Kril; Smita Patel et al.: Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer’s disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. In: *Acta Neuropathologica* 103.4 (2002), S. 370–376. DOI: 10.1007/s00401-001-0477-5. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-001-0477-5>.
- [9] Liana G. Apostolova; Lisa Mosconi et al.: Subregional hippocampal atrophy predicts Alzheimer’s dementia in the cognitively normal. In: *Neurobiology of Aging* (2010).
- [10] Blackstad, T. W.; Brink, K. et al.: Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. In: *The Journal of comparative neurology* 138.4 (1970), S. 433–449. DOI: 10.1002/cne.901380404.
- [11] Swanson, L. W.; Wyss, J. M. et al.: An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. In: *The Journal of comparative neurology* 181.4 (1978), S. 681–715. DOI: 10.1002/cne.901810402.
- [12] Witter, M. P.: Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. In: *Hippocampus* 3 Spec No (1993), S. 33–44.
- [13] Andersen, P.: Synaptic integration in hippocampal CA1 pyramids. In: *Progress in brain research* 83 (1990), S. 215–222.
- [14] Doller, H. J.; Weight, F. F.: Perforant pathway activation of hippocampal CA1 stratum pyramidale neurons: Electrophysiological evidence for a direct pathway. In: *Brain Research* 237.1 (1982), S. 1–13. DOI: 10.1016/0006-8993(82)90553-4.
- [15] Amaral, D. G.; Witter, M. P.: The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. In: *Neuroscience* 31.3 (1989), S. 571–591. DOI: 10.1016/0306-4522(89)90424-7.
- [16] Tamamaki, N.; Nojyo, Y.: Preservation of topography in the connections between the subiculum, field CA1, and the entorhinal cortex in rats. In: *The Journal of comparative neurology* 353.3 (1995), S. 379–390. DOI: 10.1002/cne.903530306.

- [17] Lacaille, J. C.; Schwartzkroin, P. A.: Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology. In: *The Journal of Neuroscience* 8.4 (1988), S. 1400–1410. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.08-04-01400.1988.
- [18] Andersen, P.; Bliss, T. et al.: Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. In: *Experimental Brain Research* 13.2 (1971). DOI: 10.1007/BF00234087.
- [19] Witter, M. P.; Griffioen, A. W. et al.: Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: An underestimated pathway. In: *Neuroscience Letters* 85.2 (1988), S. 193–198. DOI: 10.1016/0304-3940(88)90350-3.
- [20] Amaral, D. G.: Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. In: *Current Opinion in Neurobiology* 3.2 (1993), S. 225–229. DOI: 10.1016/0959-4388(93)90214-J.
- [21] Gloveli, T.; Egorov, A. V. et al.: Carbachol-induced changes in excitability and [Ca<sup>2+</sup>]i signalling in projection cells of medial entorhinal cortex layers II and III. In: *European Journal of Neuroscience* 11.10 (1999), S. 3626–3636. DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00785.x.
- [22] White, T. D.; Tan, A. M. et al.: Functional reciprocal connections of the rat entorhinal cortex and subicular complex with the medial frontal cortex: an in vivo intracellular study. In: *Brain Research* 533.1 (1990), S. 95–106. DOI: 10.1016/0006-8993(90)91801-m.
- [23] Jay, T. M.; Witter, M. P.: Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. In: *The Journal of comparative neurology* 313.4 (1991), S. 574–586. DOI: 10.1002/cne.903130404.
- [24] Chrobak, J. J.; Lrincz, A. et al.: Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. In: *Hippocampus* 10.4 (2000), S. 457–465. DOI: 10.1002/1098-1063(2000)10:4<457::AID-HIP012>3.0.CO;2-Z.
- [25] Shibata, H.: Direct projections from the entorhinal area to the anteroventral and laterodorsal thalamic nuclei in the rat. In: *Neuroscience research* 26.1 (1996), S. 83–87.
- [26] Swanson, L. W.; Cowan, W. M.: An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. In: *The Journal of comparative neurology* 172.1 (1977), S. 49–84. DOI: 10.1002/cne.901720104.
- [27] Sørensen, K. E.: Projections of the entorhinal area to the striatum, nucleus accumbens, and cerebral cortex in the guinea pig. In: *The Journal of comparative neurology* 238.3 (1985), S. 308–322. DOI: 10.1002/cne.902380306.
- [28] Thierry, A.-M.; Gioanni, Y. et al.: Hippocampo-prefrontal cortex pathway: Anatomical and electrophysiological characteristics. In: *Hippocampus* 10.4 (2000), S. 411–419. DOI: 10.1002/1098-1063(2000)10:4<411::AID-HIP07>3.0.CO;2-A.
- [29] Neves, G.; Cooke, S. F. et al.: Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. In: *Nature reviews. Neuroscience* 9.1 (2008), S. 65–75. DOI: 10.1038/nrn2303.
- [30] Lorente De Nó, R.: Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. In: *Journal für Psychologie und Neurologie* 1934.46 (1934), S. 113–177.

- [31] Freund, T. F.; Buzsáki, G.: Interneurons of the hippocampus. In: *Hippocampus* 6.4 (1996), S. 347–470. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIP01>3.0.CO;2-I.
- [32] Megías, M.; Emri, Z. et al.: Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. In: *Neuroscience* 102.3 (2001), S. 527–540. DOI: 10.1016/S0306-4522(00)00496-6.
- [33] Lacaille, J. C.; Mueller, A. L. et al.: Local circuit interactions between oriens/alveus interneurons and CA1 pyramidal cells in hippocampal slices: electrophysiology and morphology. In: *The Journal of Neuroscience* 7.7 (1987), S. 1979–1993.
- [34] Ramón y Cajal S.: Estructura de los centros nerviosos de las aves. In: *Rev. Trim. Histol. Norm. Patol.* 1888.1 (1888), S. 1–10.
- [35] Chklovskii, D. B.; Schikorski, T. et al.: Wiring Optimization in Cortical Circuits. In: *Neuron* 34.3 (2002), S. 341–347. DOI: 10.1016/S0896-6273(02)00679-7.
- [36] Bohlen und Halbach, O. von: Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 191.6 (2009), S. 518–531. DOI: 10.1016/j.aanat.2009.08.006.
- [37] Yuste, R.: Electrical compartmentalization in dendritic spines. In: *Annual review of neuroscience* 36 (2013), S. 429–449. DOI: 10.1146/annurev-neuro-062111-150455.
- [38] Sorra, K. E.; Harris, K. M.: Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. In: *Hippocampus* 10.5 (2000), S. 501–511. DOI: 10.1002/1098-1063(2000)10:5<501::AID-HIP01>3.0.CO;2-T.
- [39] Nimchinsky, E. A.; Sabatini, B. L. et al.: Structure and function of dendritic spines. In: *Annual review of physiology* 64 (2002), S. 313–353. DOI: 10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008.
- [40] Harris, K. M.; Kater, S. B.: Dendritic spines: Cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. In: *Annual review of neuroscience* 17 (1994), S. 341–371. DOI: 10.1146/annurev.ne.17.030194.002013.
- [41] Spacek, J.; Harris, K. M.: Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. In: *The Journal of Neuroscience* 17.1 (1997), S. 190–203.
- [42] Ostroff, L. E.; Fiala, J. C. et al.: Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. In: *Neuron* 35.3 (2002), S. 535–545.
- [43] Peters, A.; Kaiserman-Abramof, I. R.: The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. In: *The American journal of anatomy* 127.4 (1970), S. 321–355. DOI: 10.1002/aja.1001270402.
- [44] Harris, K. M.; Jensen, F. E. et al.: Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. In: *The Journal of Neuroscience* 12.7 (1992), S. 2685–2705.
- [45] Sorra, K. E.; Fiala, J. C. et al.: Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. In: *The Journal of comparative neurology* 398.2 (1998), S. 225–240. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19980824)398:2<225::AID-CNE5>3.0.CO;2-2.

- [46] Lohmann, C.; Bonhoeffer, T.: A role for local calcium signaling in rapid synaptic partner selection by dendritic filopodia. In: *Neuron* 59.2 (2008), S. 253–260. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.05.025.
- [47] Fiala, J. C.; Spacek, J. et al.: Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? In: *Brain research. Brain research reviews* 39.1 (2002), S. 29–54.
- [48] Hering, H.; Sheng, M.: Dendritic spines: Structure, dynamics and regulation. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2.12 (2001), S. 880–888. DOI: 10.1038/35104061.
- [49] Fischer, M.; Kaech, S. et al.: Rapid Actin-Based Plasticity in Dendritic Spines. In: *Neuron* 20.5 (1998), S. 847–854. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80467-5.
- [50] Bonhoeffer, T.; Yuste, R.: Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. In: *Neuron* 35.6 (2002), S. 1019–1027.
- [51] Yang, G.; Pan, F. et al.: Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. In: *Nature* 462.7275 (2009), S. 920–924. DOI: 10.1038/nature08577.
- [52] Xu, T.; Yu, X. et al.: Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. In: *Nature* 462.7275 (2009), S. 915–919. DOI: 10.1038/nature08389.
- [53] Chklovskii, D. B.; Mel, B. W. et al.: Cortical rewiring and information storage. In: *Nature* 431.7010 (2004), S. 782–788. DOI: 10.1038/nature03012.
- [54] Holtmaat, A.; Svoboda, K.: Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. In: *Nature reviews. Neuroscience* 10.9 (2009), S. 647–658. DOI: 10.1038/nrn2699.
- [55] Takumi, Y.; Ramírez-León, V. et al.: Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. In: *Nature neuroscience* 2.7 (1999), S. 618–624. DOI: 10.1038/10172.
- [56] Nusser, Z.; Lujan, R. et al.: Cell Type and Pathway Dependence of Synaptic AMPA Receptor Number and Variability in the Hippocampus. In: *Neuron* 21.3 (1998), S. 545–559. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80565-6.
- [57] Kharazia, V. N.; Weinberg, R. J.: Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. In: *The Journal of comparative neurology* 412.2 (1999), S. 292–302. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9861(19990920)412:2<292::AID-CNE8>3.0.CO;2-G.
- [58] Matsuzaki, M.; Ellis-Davies, G. C. et al.: Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. In: *Nature neuroscience* 4.11 (2001), S. 1086–1092. DOI: 10.1038/nm736.
- [59] Ganeshina, O.; Berry, R. W. et al.: Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions. In: *Neuroscience* 125.3 (2004), S. 615–623. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.02.025.
- [60] Holtmaat, A. J. G. D.; Trachtenberg, J. T. et al.: Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. In: *Neuron* 45.2 (2005), S. 279–291. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.01.003.
- [61] Roo, M. de; Klausner, P. et al.: Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 18.1 (2008), S. 151–161. DOI: 10.1093/cercor/bhm041.

- [62] Yasumatsu, N.; Matsuzaki, M. et al.: Principles of long-term dynamics of dendritic spines. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28.50 (2008), S. 13592–13608. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0603-08.2008.
- [63] Mezey, S.; Doyère, V. et al.: Long-term synaptic morphometry changes after induction of long-term potentiation and long-term depression in the dentate gyrus of awake rats are not simply mirror phenomena. In: *The European journal of neuroscience* 19.8 (2004), S. 2310–2318. DOI: 10.1111/j.0953-816X.2004.03334.x.
- [64] Hebb, D. O.: *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. John Wiley and Sons, Inc., 1949.
- [65] Engert, F.; Bonhoeffer, T.: Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. In: *Nature* 399.6731 (1999), S. 66–70. DOI: 10.1038/19978.
- [66] Nägerl, U. V.; Eberhorn, N. et al.: Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. In: *Neuron* 44.5 (2004), S. 759–767. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.11.016.
- [67] Shi, S. H.; Hayashi, Y. et al.: Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. In: *Science (New York, N.Y.)* 284.5421 (1999), S. 1811–1816. DOI: 10.1126/science.284.5421.1811.
- [68] Maletic-Savatic, M.; Malinow, R. et al.: Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. In: *Science (New York, N.Y.)* 283.5409 (1999), S. 1923–1927. DOI: 10.1126/science.283.5409.1923.
- [69] Heine, M.; Groc, L. et al.: Surface Mobility of Postsynaptic AMPARs Tunes Synaptic Transmission. In: *Science (New York, N.Y.)* 320.5873 (2008), S. 201–205. DOI: 10.1126/science.1152089.
- [70] Matsuzaki, M.; Honkura, N. et al.: Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. In: *Nature* 429.6993 (2004), S. 761–766. DOI: 10.1038/nature02617.
- [71] Okamoto, K.-I.; Nagai, T. et al.: Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. In: *Nature neuroscience* 7.10 (2004), S. 1104–1112. DOI: 10.1038/nn1311.
- [72] Zhou, Q.; Homma, K. J. et al.: Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. In: *Neuron* 44.5 (2004), S. 749–757. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.11.011.
- [73] Kamikubo, Y.; Egashira, Y. et al.: Long-lasting synaptic loss after repeated induction of LTD: independence to the means of LTD induction. In: *The European journal of neuroscience* 24.6 (2006), S. 1606–1616. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.05032.x.
- [74] Bourne, J.; Harris, K. M.: Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? In: *Current Opinion in Neurobiology* 17.3 (2007), S. 381–386. DOI: 10.1016/j.conb.2007.04.009.
- [75] Nägerl, U. V.; Köstinger, G. et al.: Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27.30 (2007), S. 8149–8156. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0511-07.2007.
- [76] Grutzendler, J.; Kasthuri, N. et al.: Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. In: *Nature* 420.6917 (2002), S. 812–816. DOI: 10.1038/nature01276.

- [77] Trachtenberg, J. T.; Chen, B. E. et al.: Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. In: *Nature* 420.6917 (2002), S. 788–794. DOI: 10.1038/nature01273.
- [78] Knott, G. W.; Holtmaat, A. et al.: Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. In: *Nature neuroscience* 9.9 (2006), S. 1117–1124. DOI: 10.1038/nn1747.
- [79] Zuo, Y.; Lin, A. et al.: Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. In: *Neuron* 46.2 (2005), S. 181–189. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.001.
- [80] Altschuler, R. A.: Morphometry of the effect of increased experience and training on synaptic density in area CA3 of the rat hippocampus. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 27.11 (1979), S. 1548–1550. DOI: 10.1177/27.11.512348.
- [81] Briones, T. L.; Suh, E. et al.: Changes in number of synapses and mitochondria in presynaptic terminals in the dentate gyrus following cerebral ischemia and rehabilitation training. In: *Brain Research* 1033.1 (2005), S. 51–57. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.11.017.
- [82] Moser, M. B.; Trommald, M. et al.: An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91.26 (1994), S. 12673–12675. DOI: 10.1073/pnas.91.26.12673.
- [83] Jung, C. K. E.; Herms, J.: Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: an in vivo imaging study. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 24.2 (2014), S. 377–384. DOI: 10.1093/cercor/bhs317.
- [84] Paola, V. de; Holtmaat, A. et al.: Cell type-specific structural plasticity of axonal branches and boutons in the adult neocortex. In: *Neuron* 49.6 (2006), S. 861–875. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.02.017.
- [85] Yamahachi, H.; Marik, S. A. et al.: Rapid axonal sprouting and pruning accompany functional reorganization in primary visual cortex. In: *Neuron* 64.5 (2009), S. 719–729. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.11.026.
- [86] Marik, S. A.; Yamahachi, H. et al.: Axonal dynamics of excitatory and inhibitory neurons in somatosensory cortex. In: *PLoS biology* 8.6 (2010), e1000395. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000395.
- [87] Keck, T.; Scheuss, V. et al.: Loss of sensory input causes rapid structural changes of inhibitory neurons in adult mouse visual cortex. In: *Neuron* 71.5 (2011), S. 869–882. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.06.034.
- [88] Kasai, H.; Matsuzaki, M. et al.: Structure–stability–function relationships of dendritic spines. In: *Trends in Neurosciences* 26.7 (2003), S. 360–368. DOI: 10.1016/S0166-2236(03)00162-0.
- [89] Fu, M.; Zuo, Y.: Experience-dependent structural plasticity in the cortex. In: *Trends in Neurosciences* 34.4 (2011), S. 177–187. DOI: 10.1016/j.tins.2011.02.001.
- [90] Squire, L. R.: Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. In: *Psychological review* 99.2 (1992), S. 195–231.

- [91] Squire, L. R.; Zola, S. M.: Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93.24 (1996), S. 13515–13522. DOI: 10.1073/pnas.93.24.13515.
- [92] Rugg, M. D.: Memory and consciousness: A selective review of issues and data. In: *Neuropsychologia* 33.9 (1995), S. 1131–1141. DOI: 10.1016/0028-3932(95)00053-6.
- [93] Verfaellie, M.; Keane, M. M.: The neural basis of aware and unaware forms of memory. In: *Seminars in neurology* 17.2 (1997), S. 153–161. DOI: 10.1055/s-2008-1040925.
- [94] Squire, L. R.: Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. In: *Neurobiology of learning and memory* 82.3 (2004), S. 171–177. DOI: 10.1016/j.nlm.2004.06.005.
- [95] McGaugh, J. L.: Memory—a century of consolidation. In: *Science (New York, N.Y.)* 287.5451 (2000), S. 248–251. DOI: 10.1126/science.287.5451.248.
- [96] Rasch, B. H.; Born, J. et al.: Combined blockade of cholinergic receptors shifts the brain from stimulus encoding to memory consolidation. In: *Journal of cognitive neuroscience* 18.5 (2006), S. 793–802. DOI: 10.1162/jocn.2006.18.5.793.
- [97] McClelland, J. L.; McNaughton, B. L. et al.: Why there are complementary learning systems in the hippocampus and neocortex: insights from the successes and failures of connectionist models of learning and memory. In: *Psychological review* 102.3 (1995), S. 419–457. DOI: 10.1037/0033-295X.102.3.419.
- [98] Scoville, W. B.; Milner, B.: Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20.1 (1957), S. 11–21. DOI: 10.1136/jnnp.20.1.11.
- [99] Squire, L. R.; Zola-Morgan, S.: The medial temporal lobe memory system. In: *Science (New York, N.Y.)* 253.5026 (1991), S. 1380–1386. DOI: 10.1126/science.1896849.
- [100] Eichenbaum, H.: A cortical-hippocampal system for declarative memory. In: *Nature reviews. Neuroscience* 1.1 (2000), S. 41–50. DOI: 10.1038/35036213.
- [101] Wiltgen, B. J.; Brown, R. A. M. et al.: New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. In: *Neuron* 44.1 (2004), S. 101–108. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.09.015.
- [102] Ji, J.; Maren, S.: Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. In: *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 15.4 (2008), S. 244–251. DOI: 10.1101/lm.794808.
- [103] Lee, I.; Yoganarasimha, D. et al.: Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. In: *Nature* 430.6998 (2004), S. 456–459. DOI: 10.1038/nature02739.
- [104] Fyhn, M.; Molden, S. et al.: Hippocampal Neurons Responding to First-Time Dislocation of a Target Object. In: *Neuron* 35.3 (2002), S. 555–566. DOI: 10.1016/S0896-6273(02)00784-5.
- [105] Hasselmo, M. E.; Schnell, E.: Laminar selectivity of the cholinergic suppression of synaptic transmission in rat hippocampal region CA1: computational modeling and brain slice physiology. In: *The Journal of Neuroscience* 14.6 (1994), S. 3898–3914.

- [106] McEwen, B. S.; Sapolsky, R. M.: Stress and cognitive function. In: *Current Opinion in Neurobiology* 5.2 (1995), S. 205–216. DOI: 10.1016/0959-4388(95)80028-X.
- [107] Morris, R. G.: Spatial localization does not require the presence of local cues. In: *Learning and Motivation* 12.2 (1981), S. 239–260. DOI: 10.1016/0023-9690(81)90020-5.
- [108] Morris, R.: Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. In: *Journal of Neuroscience Methods* 11.1 (1984), S. 47–60. DOI: 10.1016/0165-0270(84)90007-4.
- [109] McNamara, R. K.; Skelton, R. W.: The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. In: *Brain Research Reviews* 18.1 (1993), S. 33–49. DOI: 10.1016/0165-0173(93)90006-L.
- [110] Jeffery, K. J.; Morris, R. G.: Cumulative long-term potentiation in the rat dentate gyrus correlates with, but does not modify, performance in the water maze. In: *Hippocampus* 3.2 (1993), S. 133–140. DOI: 10.1002/hipo.450030205.
- [111] Bannerman, D. M.; Good, M. A. et al.: Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. In: *Nature* 378.6553 (1995), S. 182–186. DOI: 10.1038/378182a0.
- [112] McGeer, P. L.; Rogers, J. et al.: Neuroimmune mechanisms in Alzheimer disease pathogenesis. In: *Alzheimer Disease & Associated Disorders* 8.3 (1994), S. 149–158. DOI: 10.1097/00002093-199408030-00001.
- [113] Scheff, S. W.; Price, D. A.: Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. In: *Annals of neurology* 33.2 (1993), S. 190–199. DOI: 10.1002/ana.410330209.
- [114] Clinton, J.; Blackman, S. E. et al.: Differential synaptic loss in the cortex in Alzheimer's disease: a study using archival material. In: *Neuroreport* 5.4 (1994), S. 497–500. DOI: 10.1097/00001756-199401120-00032.
- [115] Mann, D. M.: Pyramidal nerve cell loss in Alzheimer's disease. In: *Neurodegeneration : a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration* 5.4 (1996), S. 423–427. DOI: 10.1006/neur.1996.0057.
- [116] Jack, C. R.; Petersen, R. C. et al.: The Rate of Medial Temporal Lobe Atrophy in Typical Aging and Alzheimer's Disease. In: *Neurology* 51.4 (1998), S. 993–999.
- [117] Alois Alzheimer: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. In: *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* 1907.64 (1907).
- [118] Holtzman, D. M.; Morris, J. C. et al.: Alzheimer's disease: the challenge of the second century. In: *Science translational medicine* 3.77 (2011), 77sr1. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002369.
- [119] Glenner, G. G.; Wong, C. W.: Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120.3 (1984), S. 885–890. DOI: 10.1016/S0006-291X(84)80190-4.
- [120] Mandybur, T. I.: The incidence of cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. In: *Neurology* 25.2 (1975), S. 120–126. DOI: 10.1212/wnl.25.2.120.
- [121] Wischik, C. M.; Novak, M. et al.: Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85.12 (1988), S. 4506–4510. DOI: 10.1073/pnas.85.12.4506.

- [122] Ferri, C. P.; Prince, M. et al.: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. In: *Lancet* 366.9503 (2005), S. 2112–2117. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67889-0.
- [123] Bertram, L.; Lill, C. M. et al.: The genetics of Alzheimer disease: back to the future. In: *Neuron* 68.2 (2010), S. 270–281. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.10.013.
- [124] O'Brien, R. J.; Wong, P. C.: Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. In: *Annual review of neuroscience* 34 (2011), S. 185–204. DOI: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613.
- [125] Campion, D.; Dumanchin, C. et al.: Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. In: *American journal of human genetics* 65.3 (1999), S. 664–670. DOI: 10.1086/302553.
- [126] Sundström, A.; Nilsson, L.-G. et al.: Increased risk of dementia following mild head injury for carriers but not for non-carriers of the APOE epsilon4 allele. In: *International psychogeriatrics* 19.1 (2007), S. 159–165. DOI: 10.1017/S1041610206003498.
- [127] Savva, G. M.; Stephan, B. C. M.: Epidemiological studies of the effect of stroke on incident dementia: a systematic review. In: *Stroke* 41.1 (2010), e41–6. DOI: 10.1161/STROKEAHA.109.559880.
- [128] Lee, C. Y. D.; Landreth, G. E.: The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 117.8 (2010), S. 949–960. DOI: 10.1007/s00702-010-0433-4.
- [129] Valenzuela, M. J.; Sachdev, P.: Brain reserve and dementia: a systematic review. In: *Psychological medicine* 36.4 (2006), S. 441–454. DOI: 10.1017/S0033291705006264.
- [130] Reiman, E. M.; Chen, K. et al.: Fibrillar amyloid-beta burden in cognitively normal people at 3 levels of genetic risk for Alzheimer's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.16 (2009), S. 6820–6825. DOI: 10.1073/pnas.0900345106.
- [131] Gatz, M.; Reynolds, C. A. et al.: Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. In: *Archives of general psychiatry* 63.2 (2006), S. 168–174. DOI: 10.1001/archpsyc.63.2.168.
- [132] Jack, C. R.; Knopman, D. S. et al.: Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. In: *The Lancet Neurology* 9.1 (2010), S. 119–128. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70299-6.
- [133] Marcus, C.; Mena, E. et al.: Brain PET in the diagnosis of Alzheimer's disease. In: *Clinical nuclear medicine* 39.10 (2014), e413–22, quiz e423–6. DOI: 10.1097/RLU.0000000000000547.
- [134] Alzheimer's Disease International: World Alzheimer Report 2018: The state of the art of dementia research: New frontiers. In: *Alzheimer's Disease International* (2018).
- [135] Hardy, J.; Allsop, D.: Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. In: *Trends in pharmacological sciences* 12.10 (1991), S. 383–388.
- [136] Hardy, J. A.; Higgins, G. A.: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 256.5054 (1992), S. 184–185. DOI: 10.1126/science.1566067.
- [137] Selkoe, D. J.: The molecular pathology of Alzheimer's disease. In: *Neuron* 6.4 (1991), S. 487–498.

- [138] Haass, C.; Selkoe, D. J.: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8.2 (2007), S. 101–112. DOI: 10.1038/nrm2101.
- [139] Hardy, J.; Selkoe, D. J.: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. In: *Science (New York, N.Y.)* 297.5580 (2002), S. 353–356. DOI: 10.1126/science.1072994.
- [140] Karran, E.; Mercken, M. et al.: The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. In: *Nature reviews. Drug discovery* 10.9 (2011), S. 698–712. DOI: 10.1038/nrd3505.
- [141] Masters, C. L.; Simms, G. et al.: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82.12 (1985), S. 4245–4249. DOI: 10.1073/pnas.82.12.4245.
- [142] D Goldgaber; MI Lerman et al.: Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. In: *Science* 235.4791 (1987), S. 877–880. DOI: 10.1126/science.3810169.
- [143] Lai, F.; Williams, R. S.: A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. In: *Archives of neurology* 46.8 (1989), S. 849–853. DOI: 10.1001/archneur.1989.00520440031017.
- [144] Wisniewski, K. E.; Wisniewski, H. M. et al.: Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. In: *Annals of neurology* 17.3 (1985), S. 278–282. DOI: 10.1002/ana.410170310.
- [145] Olson, M. I.; Shaw, C.-M.: Presenile dementia and Alzheimer's Disease in mongolism. In: *Brain* 92.1 (1969), S. 147–156. DOI: 10.1093/brain/92.1.147.
- [146] Goate, A.; Chartier-Harlin, M. C. et al.: Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. In: *Nature* 349.6311 (1991), S. 704–706. DOI: 10.1038/349704a0.
- [147] Mullan, M.; Crawford, F. et al.: A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. In: *Nature genetics* 1.5 (1992), S. 345–347. DOI: 10.1038/ng0892-345.
- [148] Levy-Lahad, E.; Wasco, W. et al.: Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. In: *Science (New York, N.Y.)* 269.5226 (1995), S. 973–977. DOI: 10.1126/science.7638622.
- [149] Sherrington, R.; Rogaeve, E. I. et al.: Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. In: *Nature* 375.6534 (1995), S. 754–760. DOI: 10.1038/375754a0.
- [150] Gómez-Isla, T.; Hollister, R. et al.: Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. In: *Annals of neurology* 41.1 (1997), S. 17–24. DOI: 10.1002/ana.410410106.
- [151] Haass, C.; Schlossmacher, M. G. et al.: Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. In: *Nature* 359.6393 (1992), S. 322–325. DOI: 10.1038/359322a0.
- [152] Terry, R. D.; Masliah, E. et al.: Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. In: *Annals of neurology* 30.4 (1991), S. 572–580. DOI: 10.1002/ana.410300410.

- [153] Lue, L.-F.; Kuo, Y.-M. et al.: Soluble Amyloid  $\beta$  Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. In: *The American Journal of Pathology* 155.3 (1999), S. 853–862. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65184-X.
- [154] McLean, C. A.; Cherny, R. A. et al.: Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. In: *Annals of neurology* 46.6 (1999), S. 860–866.
- [155] Wang, J.; Dickson, D. W. et al.: The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. In: *Experimental neurology* 158.2 (1999), S. 328–337. DOI: 10.1006/exnr.1999.7085.
- [156] Cleary, J. P.; Walsh, D. M. et al.: Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. In: *Nature neuroscience* 8.1 (2005), S. 79–84. DOI: 10.1038/nn1372.
- [157] Kamenetz, F.; Tomita, T. et al.: APP processing and synaptic function. In: *Neuron* 37.6 (2003), S. 925–937.
- [158] Townsend, M.; Shankar, G. M. et al.: Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. In: *The Journal of physiology* 572.Pt 2 (2006), S. 477–492. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.103754.
- [159] Hutton, M.; Lendon, C. L. et al.: Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. In: *Nature* 393.6686 (1998), S. 702–705. DOI: 10.1038/31508.
- [160] Goedert, M.; Ghetti, B. et al.: Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2.2 (2012), a006254. DOI: 10.1101/cshperspect.a006254.
- [161] Nussbaum, J. M.; Schilling, S. et al.: Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- $\beta$ . In: *Nature* 485.7400 (2012), S. 651–655. DOI: 10.1038/nature11060.
- [162] Roberson, E. D.; Scarce-Levie, K. et al.: Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. In: *Science (New York, N.Y.)* 316.5825 (2007), S. 750–754. DOI: 10.1126/science.1141736.
- [163] Roberson, E. D.; Halabisky, B. et al.: Amyloid- $\beta$ /Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31.2 (2011), S. 700–711. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4152-10.2011.
- [164] Lewis, J.; Dickson, D. W. et al.: Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. In: *Science (New York, N.Y.)* 293.5534 (2001), S. 1487–1491. DOI: 10.1126/science.1058189.
- [165] Wasco, W.; Gurubhagavatula, S. et al.: Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. In: *Nature genetics* 5.1 (1993), S. 95–100. DOI: 10.1038/ng0993-95.
- [166] Wasco, W.; Bupp, K. et al.: Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89.22 (1992), S. 10758–10762. DOI: 10.1073/pnas.89.22.10758.
- [167] van Nostrand, W. E.; Wagner, S. L. et al.: Protease nexin-II, a potent antichymotrypsin, shows identity to amyloid beta-protein precursor. In: *Nature* 341.6242 (1989), S. 546–549. DOI: 10.1038/341546a0.

- [168] Smith, R. P.; Higuchi, D. A. et al.: Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 248.4959 (1990), S. 1126–1128. DOI: 10.1126/science.2111585.
- [169] Priller, C.; Bauer, T. et al.: Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26.27 (2006), S. 7212–7221. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006.
- [170] Turner, P. R.; O'Connor, K. et al.: Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. In: *Progress in neurobiology* 70.1 (2003), S. 1–32. DOI: 10.1016/S0301-0082(03)00089-3.
- [171] Duce, J. A.; Tsatsanis, A. et al.: Iron-export ferroxidase activity of  $\beta$ -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. In: *Cell* 142.6 (2010), S. 857–867. DOI: 10.1016/j.cell.2010.08.014.
- [172] Bittner, T.; Burgold, S. et al.: Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. In: *Acta neuropathologica* 124.6 (2012), S. 797–807. DOI: 10.1007/s00401-012-1047-8.
- [173] Nikolaev, A.; McLaughlin, T. et al.: APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. In: *Nature* 457.7232 (2009), S. 981–989. DOI: 10.1038/nature07767.
- [174] Young-Pearse, T. L.; Suth, S. et al.: Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30.31 (2010), S. 10431–10440. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1445-10.2010.
- [175] Ring, S.; Weyer, S. W. et al.: The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27.29 (2007), S. 7817–7826. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1026-07.2007.
- [176] Esch, F. S.; Keim, P. S. et al.: Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. In: *Science (New York, N.Y.)* 248.4959 (1990), S. 1122–1124. DOI: 10.1126/science.2111583.
- [177] Kahle, P. J.; Strooper, B. de: Attack on amyloid. In: *EMBO reports* 4.8 (2003), S. 747–751. DOI: 10.1038/sj.embor.embor905.
- [178] Chen, G.-F.; Xu, T.-H. et al.: Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. In: *Acta pharmacologica Sinica* 38.9 (2017), S. 1205–1235. DOI: 10.1038/aps.2017.28.
- [179] Haass, C.; Hung, A. Y. et al.: Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 695 (1993), S. 109–116. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb23037.x.
- [180] Harrington, C. R.: The molecular pathology of Alzheimer's disease. In: *Neuroimaging clinics of North America* 22.1 (2012), S. 11–22, vii. DOI: 10.1016/j.nic.2011.11.003.
- [181] Olsson, F.; Schmidt, S. et al.: Characterization of intermediate steps in amyloid beta (A $\beta$ ) production under near-native conditions. In: *The Journal of biological chemistry* 289.3 (2014), S. 1540–1550. DOI: 10.1074/jbc.M113.498246.

- [182] Takami, M.; Nagashima, Y. et al.: gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29.41 (2009), S. 13042–13052. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009.
- [183] Haass, C.; Kaether, C. et al.: Trafficking and proteolytic processing of APP. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2.5 (2012), a006270. DOI: 10.1101/cshperspect.a006270.
- [184] Lu, P.; Bai, X.-C. et al.: Three-dimensional structure of human  $\gamma$ -secretase. In: *Nature* 512.7513 (2014), S. 166–170. DOI: 10.1038/nature13567.
- [185] Strooper, B. de; Saftig, P. et al.: Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. In: *Nature* 391.6665 (1998), S. 387–390. DOI: 10.1038/34910.
- [186] Strooper, B. de: Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. In: *Physiological reviews* 90.2 (2010), S. 465–494. DOI: 10.1152/physrev.00023.2009.
- [187] Takasugi, N.; Tomita, T. et al.: The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. In: *Nature* 422.6930 (2003), S. 438–441. DOI: 10.1038/nature01506.
- [188] Carter, D. B.; Dunn, E. et al.: Changes in gamma-secretase activity and specificity caused by the introduction of consensus aspartyl protease active motif in Presenilin 1. In: *Molecular neurodegeneration* 3 (2008), S. 6. DOI: 10.1186/1750-1326-3-6.
- [189] Yankner, B. A.; Duffy, L. K. et al.: Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. In: *Science (New York, N.Y.)* 250.4978 (1990), S. 279–282. DOI: 10.1126/science.2218531.
- [190] Zou, K.; Gong, J.-S. et al.: A Novel Function of Monomeric Amyloid  $\beta$ -Protein Serving as an Antioxidant Molecule against Metal-Induced Oxidative Damage. In: *The Journal of Neuroscience* 22.12 (2002), S. 4833–4841. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-12-04833.2002.
- [191] Zou, K.; Kim, D. et al.: Amyloid beta-protein (A $\beta$ )<sub>1-40</sub> protects neurons from damage induced by A $\beta$ <sub>1-42</sub> in culture and in rat brain. In: *Journal of neurochemistry* 87.3 (2003), S. 609–619. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.02018.x.
- [192] Cook, D. G.; Sung, J. C. et al.: Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93.17 (1996), S. 9223–9228. DOI: 10.1073/pnas.93.17.9223.
- [193] Hartmann, T.; Bieger, S. C. et al.: Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A $\beta$ <sub>40/42</sub> amyloid peptides. In: *Nature medicine* 3.9 (1997), S. 1016–1020.
- [194] Kummer, M. P.; Hermes, M. et al.: Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid  $\beta$  aggregation and plaque formation. In: *Neuron* 71.5 (2011), S. 833–844. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.07.001.
- [195] Selkoe, D. J.: Molecular pathology of amyloidogenic proteins and the role of vascular amyloidosis in Alzheimer's disease. In: *Neurobiology of aging* 10.5 (1989), S. 387–395.
- [196] Puzzo, D.; Privitera, L. et al.: Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28.53 (2008), S. 14537–14545. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008.

- [197] Schmidt, S. D.; Nixon, R. A. et al.: ELISA method for measurement of amyloid-beta levels. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 299 (2005), S. 279–297.
- [198] Giedraitis, V.; Sundelöf, J. et al.: The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. In: *Neuroscience Letters* 427.3 (2007), S. 127–131. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.09.023.
- [199] Wasling, P.; Daborg, J. et al.: Synaptic retrogenesis and amyloid-beta in Alzheimer's disease. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 16.1 (2009), S. 1–14. DOI: 10.3233/JAD-2009-0918.
- [200] López-Toledano, M. A.; Shelanski, M. L.: Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24.23 (2004), S. 5439–5444. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0974-04.2004.
- [201] Puzzo, D.; Gulisano, W. et al.: The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A $\beta$  physiology. In: *Neuroscience* 307 (2015), S. 26–36. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.039.
- [202] Giuffrida, M. L.; Caraci, F. et al.: The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. In: *Reviews in the neurosciences* 21.2 (2010), S. 83–93.
- [203] Koffie, R. M.; Meyer-Luehmann, M. et al.: Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.10 (2009), S. 4012–4017. DOI: 10.1073/pnas.0811698106.
- [204] Bjorklund, N. L.; Reese, L. C. et al.: Absence of amyloid  $\beta$  oligomers at the postsynapse and regulated synaptic Zn<sup>2+</sup> in cognitively intact aged individuals with Alzheimer's disease neuropathology. In: *Molecular neurodegeneration* 7 (2012), S. 23. DOI: 10.1186/1750-1326-7-23.
- [205] Lazo, N. D.; Grant, M. A. et al.: On the nucleation of amyloid beta-protein monomer folding. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 14.6 (2005), S. 1581–1596. DOI: 10.1110/ps.041292205.
- [206] Lambert, M. P.; Barlow, A. K. et al.: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.11 (1998), S. 6448–6453. DOI: 10.1073/pnas.95.11.6448.
- [207] Lacor, P. N.; Buniel, M. C. et al.: Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27.4 (2007), S. 796–807. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007.
- [208] Shankar, G. M.; Bloodgood, B. L. et al.: Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27.11 (2007), S. 2866–2875. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007.
- [209] Rowan, M. J.; Klyubin, I. et al.: Synaptic plasticity disruption by amyloid beta protein: modulation by potential Alzheimer's disease modifying therapies. In: *Biochemical Society transactions* 33.Pt 4 (2005), S. 563–567. DOI: 10.1042/BST0330563.

- [210] Fowler, S. W.; Chiang, A. C. A. et al.: Genetic modulation of soluble A $\beta$  rescues cognitive and synaptic impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34.23 (2014), S. 7871–7885. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0572-14.2014.
- [211] Cheng, I. H.; Scarce-Levie, K. et al.: Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. In: *The Journal of biological chemistry* 282.33 (2007), S. 23818–23828. DOI: 10.1074/jbc.M701078200.
- [212] Ferreira, S. T.; Lourenco, M. V. et al.: Soluble amyloid- $\beta$  oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 9 (2015), S. 191. DOI: 10.3389/fncel.2015.00191.
- [213] Zhao, W.-Q.; Santini, F. et al.: Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. In: *The Journal of biological chemistry* 285.10 (2010), S. 7619–7632. DOI: 10.1074/jbc.M109.057182.
- [214] Renner, M.; Lacor, P. N. et al.: Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. In: *Neuron* 66.5 (2010), S. 739–754. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.04.029.
- [215] Magdesian, M. H.; Carvalho, M. M. V. F. et al.: Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 283.14 (2008), S. 9359–9368. DOI: 10.1074/jbc.M707108200.
- [216] Dinamarca, M. C.; Weinstein, D. et al.: The synaptic protein neuroligin-1 interacts with the amyloid  $\beta$ -peptide. Is there a role in Alzheimer's disease? In: *Biochemistry* 50.38 (2011), S. 8127–8137. DOI: 10.1021/bi201246t.
- [217] Wu, H.-Y.; Hudry, E. et al.: Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30.7 (2010), S. 2636–2649. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4456-09.2010.
- [218] Paula-Lima, A. C.; Adasme, T. et al.: Amyloid  $\beta$ -peptide oligomers stimulate RyR-mediated Ca<sup>2+</sup> release inducing mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons and prevent RyR-mediated dendritic spine remodeling produced by BDNF. In: *Antioxidants & redox signaling* 14.7 (2011), S. 1209–1223. DOI: 10.1089/ars.2010.3287.
- [219] Felice, F. G. de; Velasco, P. T. et al.: A $\beta$  oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. In: *The Journal of biological chemistry* 282.15 (2007), S. 11590–11601. DOI: 10.1074/jbc.M607483200.
- [220] Ma, Q.-L.; Yang, F. et al.: Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29.28 (2009), S. 9078–9089. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1071-09.2009.
- [221] Hsieh, H.; Boehm, J. et al.: AMPAR removal underlies A $\beta$ -induced synaptic depression and dendritic spine loss. In: *Neuron* 52.5 (2006), S. 831–843. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.10.035.

- [222] Roselli, F.; Tirard, M. et al.: Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25.48 (2005), S. 11061–11070. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3034-05.2005.
- [223] Jürgensen, S.; Antonio, L. L. et al.: Activation of D1/D5 dopamine receptors protects neurons from synapse dysfunction induced by amyloid-beta oligomers. In: *The Journal of biological chemistry* 286.5 (2011), S. 3270–3276. DOI: 10.1074/jbc.M110.177790.
- [224] Bomfim, T. R.; Forny-Germano, L. et al.: An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. In: *The Journal of clinical investigation* 122.4 (2012), S. 1339–1353. DOI: 10.1172/JCI57256.
- [225] Ramser, E. M.; Gan, K. J. et al.: Amyloid- $\beta$  oligomers induce tau-independent disruption of BDNF axonal transport via calcineurin activation in cultured hippocampal neurons. In: *Molecular biology of the cell* 24.16 (2013), S. 2494–2505. DOI: 10.1091/mbc.E12-12-0858.
- [226] Brito-Moreira, J.; C. Paula-Lima, A. et al.: A $\beta$  Oligomers Induce Glutamate Release from Hippocampal Neurons. In: *Current Alzheimer Research* 8.5 (2011), S. 552–562. DOI: 10.2174/156720511796391917.
- [227] Zhang, Y.; Kurup, P. et al.: Reduced levels of the tyrosine phosphatase STEP block  $\beta$  amyloid-mediated GluA1/GluA2 receptor internalization. In: *Journal of neurochemistry* 119.3 (2011), S. 664–672. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07450.x.
- [228] Cruz, L.; Urbanc, B. et al.: Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94.14 (1997), S. 7612–7616. DOI: 10.1073/pnas.94.14.7612.
- [229] Kaye, R.; Head, E. et al.: Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 300.5618 (2003), S. 486–489. DOI: 10.1126/science.1079469.
- [230] Fändrich, M.; Schmidt, M. et al.: Recent progress in understanding Alzheimer's  $\beta$ -amyloid structures. In: *Trends in biochemical sciences* 36.6 (2011), S. 338–345. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.02.002.
- [231] Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T.: Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? In: *Cell* 73.6 (1993), S. 1055–1058. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90635-4.
- [232] Teplow, D. B.: Structural and kinetic features of amyloid  $\beta$ -protein fibrillogenesis. In: *Amyloid* 5.2 (1998), S. 121–142. DOI: 10.3109/13506129808995290.
- [233] Burgold, S.; Filser, S. et al.: In vivo imaging reveals sigmoidal growth kinetic of  $\beta$ -amyloid plaques. In: *Acta neuropathologica communications* 2 (2014), S. 30. DOI: 10.1186/2051-5960-2-30.
- [234] Peters, F.; Salihoglu, H. et al.: BACE1 inhibition more effectively suppresses initiation than progression of  $\beta$ -amyloid pathology. In: *Acta neuropathologica* 135.5 (2018), S. 695–710. DOI: 10.1007/s00401-017-1804-9.
- [235] Eisenberg, D.; Jucker, M.: The amyloid state of proteins in human diseases. In: *Cell* 148.6 (2012), S. 1188–1203. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.022.
- [236] Fändrich, M.: On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64.16 (2007), S. 2066–2078. DOI: 10.1007/s00018-007-7110-2.

- [237] Cummings, J. L.; Vinters, H. V. et al.: Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. In: *Neurology* 51.1 Suppl 1 (1998), S2–17, discussion S65–7. DOI: 10.1212/wnl.51.1{\textunderscore }suppl{\textunderscore }1.s2.
- [238] Dickson, D. W.: The pathogenesis of senile plaques. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56.4 (1997), S. 321–339. DOI: 10.1097/00005072-199704000-00001.
- [239] Thal, D. R.; Braak, H.: Postmortale Diagnosestellung bei Morbus Alzheimer. Stadiengliederungen der kennzeichnenden Hirnveränderungen. In: *Der Pathologe* 26.3 (2005), S. 201–213. DOI: 10.1007/s00292-004-0695-4.
- [240] Selkoe, D. J.: Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. In: *Physiological reviews* 81.2 (2001), S. 741–766. DOI: 10.1152/physrev.2001.81.2.741.
- [241] Thal, D. R.; Rüb, U. et al.: Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. In: *Neurology* 58.12 (2002), S. 1791–1800. DOI: 10.1212/wnl.58.12.1791.
- [242] Carlisle, H. J.; Kennedy, M. B.: Spine architecture and synaptic plasticity. In: *Trends in Neurosciences* 28.4 (2005), S. 182–187. DOI: 10.1016/j.tins.2005.01.008.
- [243] Segal, M.: Dendritic spines and long-term plasticity. In: *Nature reviews. Neuroscience* 6.4 (2005), S. 277–284. DOI: 10.1038/nrn1649.
- [244] Ferrer, I.; Gullotta, F.: Down's syndrome and Alzheimer's disease: dendritic spine counts in the hippocampus. In: *Acta neuropathologica* 79.6 (1990), S. 680–685. DOI: 10.1007/bf00294247.
- [245] Moolman, D. L.; Vitolo, O. V. et al.: Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. In: *Journal of neurocytology* 33.3 (2004), S. 377–387. DOI: 10.1023/B:NEUR.0000044197.83514.64.
- [246] Spires, T. L.; Meyer-Luehmann, M. et al.: Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25.31 (2005), S. 7278–7287. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1879-05.2005.
- [247] Jacobsen, J. S.; Wu, C.-C. et al.: Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.13 (2006), S. 5161–5166. DOI: 10.1073/pnas.0600948103.
- [248] Mishizen-Eberz, A. J.; Rissman, R. A. et al.: Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. In: *Neurobiology of Disease* 15.1 (2004), S. 80–92. DOI: 10.1016/j.nbd.2003.09.016. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996103001918>.
- [249] Sze, C. I.; Troncoso, J. C. et al.: Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56.8 (1997), S. 933–944. DOI: 10.1097/00005072-199708000-00011.
- [250] Meyer-Luehmann, M.; Spires-Jones, T. L. et al.: Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Nature* 451.7179 (2008), S. 720–724. DOI: 10.1038/nature06616.

- [251] Tsai, J.; Grutzendler, J. et al.: Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. In: *Nature neuroscience* 7.11 (2004), S. 1181–1183. DOI: 10.1038/nn1335.
- [252] Bhatt, D. H.; Zhang, S. et al.: Dendritic spine dynamics. In: *Annual review of physiology* 71 (2009), S. 261–282. DOI: 10.1146/annurev.physiol.010908.163140.
- [253] Tong, L.; Thornton, P. L. et al.: Beta -amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. In: *The Journal of biological chemistry* 276.20 (2001), S. 17301–17306. DOI: 10.1074/jbc.M010450200.
- [254] Mokin, M.; Lindahl, J. S. et al.: Immediate-early gene-encoded protein Arc is associated with synaptic delivery of GluR4-containing AMPA receptors during in vitro classical conditioning. In: *Journal of neurophysiology* 95.1 (2006), S. 215–224. DOI: 10.1152/jn.00737.2005.
- [255] Volianskis, A.; France, G. et al.: Long-term potentiation and the role of N-methyl-D-aspartate receptors. In: *Brain Research* 1621 (2015), S. 5–16. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.01.016.
- [256] Dalva, M. B.; Takasu, M. A. et al.: EphB Receptors Interact with NMDA Receptors and Regulate Excitatory Synapse Formation. In: *Cell* 103.6 (2000), S. 945–956. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00197-5.
- [257] Biber, K.; Neumann, H. et al.: Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. In: *Trends in Neurosciences* 30.11 (2007), S. 596–602. DOI: 10.1016/j.tins.2007.08.007.
- [258] Lawson, L. J.; Perry, V. H. et al.: Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. In: *Neuroscience* 39.1 (1990), S. 151–170. DOI: 10.1016/0306-4522(90)90229-W.
- [259] Gómez-Nicola, D.; Fransen, N. L. et al.: Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33.6 (2013), S. 2481–2493. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4440-12.2013.
- [260] Graeber, M. B.; López-Redondo, F. et al.: The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. In: *Brain Research* 813.2 (1998), S. 241–253. DOI: 10.1016/S0006-8993(98)00859-2.
- [261] Spalding, K. L.; Bergmann, O. et al.: Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. In: *Cell* 153.6 (2013), S. 1219–1227. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.002.
- [262] Tremblay, M.-È.; Lowery, R. L. et al.: Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. In: *PLoS biology* 8.11 (2010), e1000527. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000527.
- [263] Wake, H.; Moorhouse, A. J. et al.: Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. In: *Trends in Neurosciences* 36.4 (2013), S. 209–217. DOI: 10.1016/j.tins.2012.11.007.
- [264] Crotti, A.; Ransohoff, R. M.: Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. In: *Immunity* 44.3 (2016), S. 505–515. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.02.013.
- [265] Prinz, M.; Priller, J.: Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. In: *Nature reviews. Neuroscience* 15.5 (2014), S. 300–312. DOI: 10.1038/nrn3722.

- [266] Ransohoff, R. M.: How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. In: *Science (New York, N.Y.)* 353.6301 (2016), S. 777–783. DOI: 10.1126/science.aag2590.
- [267] Ajami, B.; Bennett, J. L. et al.: Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. In: *Nature neuroscience* 10.12 (2007), S. 1538–1543. DOI: 10.1038/nn2014.
- [268] Mildner, A.; Schmidt, H. et al.: Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. In: *Nature neuroscience* 10.12 (2007), S. 1544–1553. DOI: 10.1038/nn2015.
- [269] Nimmerjahn, A.; Kirchhoff, F. et al.: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. In: *Science (New York, N.Y.)* 308.5726 (2005), S. 1314–1318. DOI: 10.1126/science.1110647.
- [270] Kettenmann, H.; Hanisch, U.-K. et al.: Physiology of microglia. In: *Physiological reviews* 91.2 (2011), S. 461–553. DOI: 10.1152/physrev.00011.2010.
- [271] Davalos, D.; Grutzendler, J. et al.: ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. In: *Nature neuroscience* 8.6 (2005), S. 752–758. DOI: 10.1038/nn1472.
- [272] Sieger, D.; Moritz, C. et al.: Long-range Ca<sup>2+</sup> waves transmit brain-damage signals to microglia. In: *Developmental cell* 22.6 (2012), S. 1138–1148. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.04.012.
- [273] Hanisch, U.-K.; Kettenmann, H.: Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. In: *Nature neuroscience* 10.11 (2007), S. 1387–1394. DOI: 10.1038/nn1997.
- [274] Kim, H. J.; Ifergan, I. et al.: Type 2 monocyte and microglia differentiation mediated by glatiramer acetate therapy in patients with multiple sclerosis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172.11 (2004), S. 7144–7153. DOI: 10.4049/jimmunol.172.11.7144.
- [275] Chiu, I. M.; Morimoto, E. T. et al.: A neurodegeneration-specific gene expression signature and immune profile of acutely isolated microglia from an ALS mouse model. In: *Cell reports* 4.2 (2013), S. 385–401. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.06.018.
- [276] Biswas, S. K.; Mantovani, A.: Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. In: *Nature immunology* 11.10 (2010), S. 889–896. DOI: 10.1038/ni.1937.
- [277] David, S.; Kroner, A.: Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. In: *Nature reviews. Neuroscience* 12.7 (2011), S. 388–399. DOI: 10.1038/nrn3053.
- [278] Kigerl, K. A.; Gensel, J. C. et al.: Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29.43 (2009), S. 13435–13444. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009.
- [279] Hu, X.; Li, P. et al.: Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. In: *Stroke* 43.11 (2012), S. 3063–3070. DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.659656.

- [280] Wang, G.; Zhang, J. et al.: Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33.12 (2013), S. 1864–1874. DOI: 10.1038/jcbfm.2013.146.
- [281] Choi, S.-H.; Aid, S. et al.: Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. In: *Journal of neurochemistry* 120.2 (2012), S. 292–301. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07572.x.
- [282] Bolmont, T.; Haiss, F. et al.: Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28.16 (2008), S. 4283–4292. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4814-07.2008.
- [283] Meyer-Luehmann, M.; Coomaraswamy, J. et al.: Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. In: *Science (New York, N.Y.)* 313.5794 (2006), S. 1781–1784. DOI: 10.1126/science.1131864.
- [284] Bamberger, M. E.; Harris, M. E. et al.: A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23.7 (2003), S. 2665–2674.
- [285] Stewart, C. R.; Stuart, L. M. et al.: CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. In: *Nature immunology* 11.2 (2009), S. 155–161. DOI: 10.1038/ni.1836.
- [286] Paresce, D. M.; Ghosh, R. N. et al.: Microglial Cells Internalize Aggregates of the Alzheimer's Disease Amyloid  $\beta$ -Protein Via a Scavenger Receptor. In: *Neuron* 17.3 (1996), S. 553–565. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80187-7.
- [287] Yeh, F. L.; Hansen, D. V. et al.: TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. In: *Trends in molecular medicine* 23.6 (2017), S. 512–533. DOI: 10.1016/j.molmed.2017.03.008.
- [288] Bailey, C. C.; DeVaux, L. B. et al.: The Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Binds Apolipoprotein E. In: *The Journal of biological chemistry* 290.43 (2015), S. 26033–26042. DOI: 10.1074/jbc.M115.677286.
- [289] Wang, Y.; Cella, M. et al.: TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. In: *Cell* 160.6 (2015), S. 1061–1071. DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.049.
- [290] Yeh, F. L.; Wang, Y. et al.: TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. In: *Neuron* 91.2 (2016), S. 328–340. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.06.015.
- [291] Atagi, Y.; Liu, C.-C. et al.: Apolipoprotein E Is a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2). In: *The Journal of biological chemistry* 290.43 (2015), S. 26043–26050. DOI: 10.1074/jbc.M115.679043.
- [292] Guerreiro, R.; Bilgic, B. et al.: Novel compound heterozygous mutation in TREM2 found in a Turkish frontotemporal dementia-like family. In: *Neurobiology of aging* 34.12 (2013), 2890.e1–5. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.005.
- [293] Bradshaw, E. M.; Chibnik, L. B. et al.: CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. In: *Nature neuroscience* 16.7 (2013), S. 848–850. DOI: 10.1038/nn.3435.

- [294] Füger, P.; Hefendehl, J. K. et al.: Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term in vivo single-cell imaging. In: *Nature neuroscience* 20.10 (2017), S. 1371–1376. DOI: 10.1038/nn.4631.
- [295] Blume, T.; Focke, C. et al.: Microglial response to increasing amyloid load saturates with aging: a longitudinal dual tracer in vivo  $\mu$ PET-study. In: *Journal of neuroinflammation* 15.1 (2018), S. 307. DOI: 10.1186/s12974-018-1347-6.
- [296] Hickman, S. E.; Allison, E. K. et al.: Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28.33 (2008), S. 8354–8360. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008.
- [297] Krabbe, G.; Halle, A. et al.: Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. In: *PLoS one* 8.4 (2013), e60921. DOI: 10.1371/journal.pone.0060921.
- [298] Fan, Z.; Brooks, D. J. et al.: An early and late peak in microglial activation in Alzheimer's disease trajectory. In: *Brain : a journal of neurology* 140.3 (2017), S. 792–803. DOI: 10.1093/brain/aww349.
- [299] Yan, S. D.; Chen, X. et al.: RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. In: *Nature* 382.6593 (1996), S. 685–691. DOI: 10.1038/382685a0.
- [300] Xie, Z.; Wei, M. et al.: Peroxynitrite mediates neurotoxicity of amyloid beta-peptide-1-42- and lipopolysaccharide-activated microglia. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22.9 (2002), S. 3484–3492.
- [301] Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. et al.: Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. In: *The Journal of biological chemistry* 261.13 (1986), S. 6084–6089.
- [302] Khatoon, S.; Grundke-Iqbal, I. et al.: Brain levels of microtubule-associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease: a radioimmuno-slot-blot assay for nanograms of the protein. In: *Journal of neurochemistry* 59.2 (1992), S. 750–753. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb09432.x.
- [303] Pritchard, S. M.; Dolan, P. J. et al.: The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics. In: *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15.8 (2011), S. 1621–1635. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01273.x.
- [304] Mandelkow, E.-M.; Biernat, J. et al.: Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. In: *Neurobiology of aging* 16.3 (1995), S. 355–362. DOI: 10.1016/0197-4580(95)00025-A.
- [305] Ihara, Y.; Nukina, N. et al.: Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. In: *Alzheimer Disease & Associated Disorders* 1.3 (1987), S. 201. DOI: 10.1097/00002093-198701030-00016.
- [306] Braak, H.; Braak, E.: Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. In: *Neurobiology of aging* 18.4 (1997), S. 351–357.
- [307] Vassar, R.; Bennett, B. D. et al.: Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. In: *Science (New York, N.Y.)* 286.5440 (1999), S. 735–741. DOI: 10.1126/science.286.5440.735.
- [308] Hussain, I.; Powell, D. et al.: Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. In: *Molecular and cellular neurosciences* 14.6 (1999), S. 419–427. DOI: 10.1006/mcne.1999.0811.

- [309] Sinha, S.; Anderson, J. P. et al.: Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. In: *Nature* 402.6761 (1999), S. 537–540. DOI: 10.1038/990114.
- [310] Yan, R.; Bienkowski, M. J. et al.: Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. In: *Nature* 402.6761 (1999), S. 533–537. DOI: 10.1038/990107.
- [311] Lin, X.; Koelsch, G. et al.: Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the  $\beta$ -secretase site of  $\beta$ -amyloid precursor protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.4 (2000), S. 1456–1460.
- [312] Schmidt, B.; Baumann, S. et al.: Modulators and inhibitors of gamma- and beta-secretases. In: *Neuro-degenerative diseases* 3.4-5 (2006), S. 290–297. DOI: 10.1159/000095269.
- [313] Acquati, F.; Accarino, M. et al.: The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the Down critical region. In: *FEBS Letters* 468.1 (2000), S. 59–64. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01192-3.
- [314] Hong, L.; Koelsch, G. et al.: Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. In: *Science (New York, N.Y.)* 290.5489 (2000), S. 150–153. DOI: 10.1126/science.290.5489.150.
- [315] Ostermann, N.; Eder, J. et al.: Crystal structure of human BACE2 in complex with a hydroxyethylamine transition-state inhibitor. In: *Journal of molecular biology* 355.2 (2006), S. 249–261. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.10.027.
- [316] Vassar, R.; Kovacs, D. M. et al.: The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29.41 (2009), S. 12787–12794. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009.
- [317] Cai, H.; Wang, Y. et al.: BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. In: *Nature neuroscience* 4.3 (2001), S. 233–234. DOI: 10.1038/85064.
- [318] Dominguez, D.; Tournoy, J. et al.: Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. In: *The Journal of biological chemistry* 280.35 (2005), S. 30797–30806. DOI: 10.1074/jbc.M505249200.
- [319] Roberds, S. L.; Anderson, J. et al.: BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. In: *Human molecular genetics* 10.12 (2001), S. 1317–1324. DOI: 10.1093/hmg/10.12.1317.
- [320] Nawrot, B.: Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids - a future for Alzheimer's disease therapy? In: *Acta biochimica Polonica* 51.2 (2004), S. 431–444.
- [321] Hitt, B.; Riordan, S. M. et al.:  $\beta$ -Site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1 (BACE1)-deficient mice exhibit a close homolog of L1 (CHL1) loss-of-function phenotype involving axon guidance defects. In: *The Journal of biological chemistry* 287.46 (2012), S. 38408–38425. DOI: 10.1074/jbc.M112.415505.
- [322] Kinoshita, A.; Fukumoto, H. et al.: Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. In: *Journal of cell science* 116.Pt 16 (2003), S. 3339–3346. DOI: 10.1242/jcs.00643.

- [323] Haniu, M.; Denis, P. et al.: Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. In: *The Journal of biological chemistry* 275.28 (2000), S. 21099–21106. DOI: 10.1074/jbc.M002095200.
- [324] Charlwood, J.; Dingwall, C. et al.: Characterization of the glycosylation profiles of Alzheimer's beta -secretase protein Asp-2 expressed in a variety of cell lines. In: *The Journal of biological chemistry* 276.20 (2001), S. 16739–16748. DOI: 10.1074/jbc.M009361200.
- [325] Benjannet, S.; Elagoz, A. et al.: Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. In: *The Journal of biological chemistry* 276.14 (2001), S. 10879–10887. DOI: 10.1074/jbc.M009899200.
- [326] Bennett, B. D.; Denis, P. et al.: A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. In: *The Journal of biological chemistry* 275.48 (2000), S. 37712–37717. DOI: 10.1074/jbc.M005339200.
- [327] Pastorino, L.; Ikin, A. F. et al.: The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A(beta). In: *Molecular and cellular neurosciences* 19.2 (2002), S. 175–185. DOI: 10.1006/mcne.2001.1065.
- [328] Koo, E. H.; Squazzo, S. L.: Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 269.26 (1994), S. 17386–17389.
- [329] Fukumoto, H.:  $\beta$ -Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease. In: *Archives of neurology* 59.9 (2002), S. 1381. DOI: 10.1001/archneur.59.9.1381.
- [330] Yamashiro, D. J.; Maxfield, F. R.: Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 26.4 (1984), S. 231–246. DOI: 10.1002/jcb.240260404.
- [331] Mitterreiter, S.; Page, R. M. et al.: Bepiridil and amiodarone simultaneously target the Alzheimer's disease beta- and gamma-secretase via distinct mechanisms. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30.26 (2010), S. 8974–8983. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1199-10.2010.
- [332] Li, Q.; Südhof, T. C.: Cleavage of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta precursor-like protein by BACE 1. In: *The Journal of biological chemistry* 279.11 (2004), S. 10542–10550. DOI: 10.1074/jbc.M310001200.
- [333] Pastorino, L.; Ikin, A. F. et al.: BACE (beta-secretase) modulates the processing of APLP2 in vivo. In: *Molecular and cellular neurosciences* 25.4 (2004), S. 642–649. DOI: 10.1016/j.mcn.2003.12.013.
- [334] Willem, M.; Garratt, A. N. et al.: Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. In: *Science (New York, N.Y.)* 314.5799 (2006), S. 664–666. DOI: 10.1126/science.1132341.
- [335] Hu, X.; Hicks, C. W. et al.: Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. In: *Nature neuroscience* 9.12 (2006), S. 1520–1525. DOI: 10.1038/nn1797.
- [336] Cheret, C.; Willem, M. et al.: Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. In: *The EMBO journal* 32.14 (2013), S. 2015–2028. DOI: 10.1038/emboj.2013.146.

- [337] Lichtenthaler, S. F.; Dominguez, D.-I. et al.: The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. In: *The Journal of biological chemistry* 278.49 (2003), S. 48713–48719. DOI: 10.1074/jbc.M303861200.
- [338] Wong, H.-K.; Sakurai, T. et al.: beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. In: *The Journal of biological chemistry* 280.24 (2005), S. 23009–23017. DOI: 10.1074/jbc.M414648200.
- [339] Isom, L. L.; Scheuer, T. et al.: Functional co-expression of the beta 1 and type IIA alpha subunits of sodium channels in a mammalian cell line. In: *The Journal of biological chemistry* 270.7 (1995), S. 3306–3312. DOI: 10.1074/jbc.270.7.3306.
- [340] Hu, X.; Zhou, X. et al.: BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30.26 (2010), S. 8819–8829. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1334-10.2010.
- [341] Kim, D. Y.; Carey, B. W. et al.: BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. In: *Nature cell biology* 9.7 (2007), S. 755–764. DOI: 10.1038/ncb1602.
- [342] Ohno, M.; Sametsky, E. A. et al.: BACE1 Deficiency Rescues Memory Deficits and Cholinergic Dysfunction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. In: *Neuron* 41.1 (2004), S. 27–33. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00810-9.
- [343] Harrison, S. M.; Harper, A. J. et al.: BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. In: *Molecular and cellular neurosciences* 24.3 (2003), S. 646–655.
- [344] Laird, F. M.; Cai, H. et al.: BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25.50 (2005), S. 11693–11709. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2766-05.2005.
- [345] Kuhn, P.-H.; Koroniak, K. et al.: Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. In: *The EMBO journal* 31.14 (2012), S. 3157–3168. DOI: 10.1038/emboj.2012.173.
- [346] Naus, S.; Richter, M. et al.: Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. In: *The Journal of biological chemistry* 279.16 (2004), S. 16083–16090. DOI: 10.1074/jbc.M400560200.
- [347] Heyden, A.; Angenstein, F. et al.: Abnormal axonal guidance and brain anatomy in mouse mutants for the cell recognition molecules close homolog of L1 and NgCAM-related cell adhesion molecule. In: *Neuroscience* 155.1 (2008), S. 221–233. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.04.080.
- [348] Montag-Sallaz, M.; Schachner, M. et al.: Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation, and altered behavior in mice deficient for the close homolog of L1. In: *Molecular and cellular biology* 22.22 (2002), S. 7967–7981. DOI: 10.1128/mcb.22.22.7967-7981.2002.
- [349] Gunnensen, J. M.; Kim, M. H. et al.: Sez-6 proteins affect dendritic arborization patterns and excitability of cortical pyramidal neurons. In: *Neuron* 56.4 (2007), S. 621–639. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.09.018.

- [350] Zhu, K.; Peters, F. et al.: Consequences of Pharmacological BACE Inhibition on Synaptic Structure and Function. In: *Biological psychiatry* 84.7 (2018), S. 478–487. DOI: 10.1016/j.biopsych.2018.04.022.
- [351] McConlogue, L.; Buttini, M. et al.: Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. In: *The Journal of biological chemistry* 282.36 (2007), S. 26326–26334. DOI: 10.1074/jbc.M611687200.
- [352] Salzer, J. L.: Axonal regulation of Schwann cell ensheathment and myelination. In: *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 17 Suppl 3 (2012), S. 14–19. DOI: 10.1111/j.1529-8027.2012.00425.x.
- [353] Jonsson, T.; Atwal, J. K. et al.: A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. In: *Nature* 488.7409 (2012), S. 96–99. DOI: 10.1038/nature11283.
- [354] Kornacker, M. G.; Lai, Z. et al.: An inhibitor binding pocket distinct from the catalytic active site on human beta-APP cleaving enzyme. In: *Biochemistry* 44.34 (2005), S. 11567–11573. DOI: 10.1021/bi0509321.
- [355] Hong, L.; Turner, R. T. et al.: Crystal structure of memapsin 2 (beta-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. In: *Biochemistry* 41.36 (2002), S. 10963–10967. DOI: 10.1021/bi026232n.
- [356] May, P. C.; Dean, R. A. et al.: Robust central reduction of amyloid- $\beta$  in humans with an orally available, non-peptidic  $\beta$ -secretase inhibitor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31.46 (2011), S. 16507–16516. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3647-11.2011.
- [357] Thakker, D. R.; Sankaranarayanan, S. et al.: Centrally Delivered BACE1 Inhibitor Activates Microglia, and Reverses Amyloid Pathology and Cognitive Deficit in Aged Tg2576 Mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35.17 (2015), S. 6931–6936. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2262-14.2015.
- [358] Yan, R.; Vassar, R.: Targeting the  $\beta$  secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. In: *The Lancet Neurology* 13.3 (2014), S. 319–329. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70276-X.
- [359] Yuan, J.; Venkatraman, S. et al.: Structure-based design of  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. In: *Journal of medicinal chemistry* 56.11 (2013), S. 4156–4180. DOI: 10.1021/jm301659n.
- [360] May, P. C.; Willis, B. A. et al.: The potent BACE1 inhibitor LY2886721 elicits robust central A $\beta$  pharmacodynamic responses in mice, dogs, and humans. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35.3 (2015), S. 1199–1210. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4129-14.2015.
- [361] Kennedy, M. E.; Stamford, A. W. et al.: The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS  $\beta$ -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. In: *Science translational medicine* 8.363 (2016), 363ra150. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad9704.
- [362] Rochin, L.; Hurbain, I. et al.: BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.26 (2013), S. 10658–10663. DOI: 10.1073/pnas.1220748110.

- [363] Neumann, U.; Rueeger, H. et al.: A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile and robust reduction of amyloid- $\beta$  and neuroinflammation in APP transgenic mice. In: *Molecular neurodegeneration* 10 (2015), S. 44. DOI: 10.1186/s13024-015-0033-8.
- [364] Neumann, U.; Ufer, M. et al.: The BACE-1 inhibitor CNP520 for prevention trials in Alzheimer's disease. In: *EMBO molecular medicine* 10.11 (2018). DOI: 10.15252/emmm.201809316.
- [365] Al-Tel, T. H.; Semreen, M. H. et al.: Design, synthesis, and qualitative structure-activity evaluations of novel  $\beta$ -secretase inhibitors as potential Alzheimer's drug leads. In: *Journal of medicinal chemistry* 54.24 (2011), S. 8373–8385. DOI: 10.1021/jm201181f.
- [366] Moussa-Pacha, N. M.; Abdin, S. M. et al.: BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease. In: *Medicinal research reviews* (2019). DOI: 10.1002/med.21622.
- [367] Cummings, J.; Lee, G. et al.: Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. In: *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)* 4 (2018), S. 195–214. DOI: 10.1016/j.trci.2018.03.009.
- [368] Hampel, H.; Vassar, R. et al.: The  $\beta$ -secretase BACE1 in Alzheimer's disease. In: *Biological psychiatry* (2020). DOI: 10.1016/j.biopsych.2020.02.001.
- [369] Piton, M.; Hirtz, C. et al.: Alzheimer's Disease: Advances in Drug Development. In: *Journal of Alzheimer's Disease* 65.1 (2018), S. 3–13. DOI: 10.3233/JAD-180145.
- [370] Knopman, D. S.: Lowering of Amyloid-Beta by  $\beta$ -Secretase Inhibitors — Some Informative Failures. In: *New England Journal of Medicine* 380.15 (2019), S. 1476–1478. DOI: 10.1056/NEJMe1903193.
- [371] Hawkes, N.: Merck ends trial of potential Alzheimer's drug verubecestat. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 356 (2017), j845. DOI: 10.1136/bmj.j845.
- [372] Egan, M. F.; Kost, J. et al.: Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. In: *The New England journal of medicine* 378.18 (2018), S. 1691–1703. DOI: 10.1056/NEJMoa1706441.
- [373] Egan, M. F.; Kost, J. et al.: Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. In: *The New England journal of medicine* 380.15 (2019), S. 1408–1420. DOI: 10.1056/NEJMoa1812840.
- [374] Feng, G.; Mellor, R. H. et al.: Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. In: *Neuron* 28.1 (2000), S. 41–51. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)00084-2.
- [375] Blume, T.; Filser, S. et al.: BACE1 Inhibitor MK-8931 Alters Formation but Not Stability of Dendritic Spines. In: *Frontiers in Aging Neuroscience* 10 (2018). DOI: 10.3389/fnagi.2018.00229.
- [376] Filser, S.; Ovsepian, S. V. et al.: Pharmacological inhibition of BACE1 impairs synaptic plasticity and cognitive functions. In: *Biological psychiatry* 77.8 (2015), S. 729–739. DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.10.013.
- [377] Zhu, K.; Xiang, X. et al.: Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Inhibition Impairs Synaptic Plasticity via Seizure Protein 6. In: *Biological psychiatry* 83.5 (2018), S. 428–437. DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.12.023.

- [378] Yang, L.-B.; Lindholm, K. et al.: Elevated  $\beta$ -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. In: *Nature medicine* 9.1 (2003), S. 3–4. DOI: 10.1038/nm0103-3.
- [379] Saito, T.; Matsuba, Y. et al.: Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. In: *Nature neuroscience* 17.5 (2014), S. 661–663. DOI: 10.1038/nn.3697.
- [380] Masuda, A.; Kobayashi, Y. et al.: Cognitive deficits in single App knock-in mouse models. In: *Neurobiology of learning and memory* 135 (2016), S. 73–82. DOI: 10.1016/j.nlm.2016.07.001.
- [381] Sasaguri, H.; Nilsson, P. et al.: APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. In: *The EMBO journal* 36.17 (2017), S. 2473–2487. DOI: 10.15252/embj.201797397.
- [382] Barthel, H.; Gertz, H.-J. et al.: Cerebral amyloid- $\beta$  PET with florbetaben (18F) in patients with Alzheimer's disease and healthy controls: a multicentre phase 2 diagnostic study. In: *The Lancet Neurology* 10.5 (2011), S. 424–435. DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70077-1.
- [383] Dickens, A. M.; Vainio, S. et al.: Detection of microglial activation in an acute model of neuroinflammation using PET and radiotracers 11C-(R)-PK11195 and 18F-GE-180. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 55.3 (2014), S. 466–472. DOI: 10.2967/jnumed.113.125625.
- [384] Bittner, T.; Fuhrmann, M. et al.: Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. In: *PloS one* 5.11 (2010), e15477. DOI: 10.1371/journal.pone.0015477.
- [385] Grutzendler, J.; Helmin, K. et al.: Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1097 (2007), S. 30–39. DOI: 10.1196/annals.1379.003.
- [386] Knafo, S.; Alonso-Nanclares, L. et al.: Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 19.3 (2009), S. 586–592. DOI: 10.1093/cercor/bhn111.
- [387] Denk, W.; Strickler, J. H. et al.: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. In: *Science (New York, N.Y.)* 248.4951 (1990), S. 73–76. DOI: 10.1126/science.2321027.
- [388] Helmchen, F.; Denk, W.: Deep tissue two-photon microscopy. In: *Nature methods* 2.12 (2005), S. 932–940. DOI: 10.1038/nmeth818.
- [389] Zhang, H.; Wu, L. et al.: Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease. In: *The Journal of Neuroscience* 35.39 (2015), S. 13275–13286. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1034-15.2015.
- [390] Neumann, U.; Machauer, R. et al.: The  $\beta$ -secretase (BACE) inhibitor NB-360 in preclinical models: From amyloid- $\beta$  reduction to downstream disease-relevant effects. In: *British journal of pharmacology* 176.18 (2019), S. 3435–3446. DOI: 10.1111/bph.14582.
- [391] Brown, R. C.; Papadopoulos, V.: Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in adrenal and brain steroidogenesis. In: *Neurosteroids and brain functions developmental encephalopathy*. Hrsg. von Biggio, G.; Purdy, R. H. Bd. 46. International Review of Neurobiology. New York: Academic Press, 2001, S. 117–143. DOI: 10.1016/S0074-7742(01)46061-2.

- [392] Chaney, A.; Williams, S. R. et al.: In vivo molecular imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease. In: *Journal of neurochemistry* 149.4 (2019), S. 438–451. DOI: 10.1111/jnc.14615.
- [393] Zhang, R.; Miller, R. G. et al.: Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. In: *Journal of neuroimmunology* 256.1-2 (2013), S. 38–42. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2013.01.002.
- [394] Carter, S. F.; Schöll, M. et al.: Evidence for astrogliosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracers PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 53.1 (2012), S. 37–46. DOI: 10.2967/jnumed.110.087031.
- [395] Calsolaro, V.; Edison, P.: Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. In: *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 12.6 (2016), S. 719–732. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.02.010.
- [396] Hiroshi Hama; Hiroyuki Hioki et al.: ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. In: *Nature Neuroscience* 18.10 (2015), S. 1518–1529. DOI: 10.1038/nn.4107.
- [397] Castillo, E.; Leon, J. et al.: Comparative profiling of cortical gene expression in Alzheimer's disease patients and mouse models demonstrates a link between amyloidosis and neuroinflammation. In: *Scientific reports* 7.1 (2017), S. 17762. DOI: 10.1038/s41598-017-17999-3.
- [398] Brendel, M.; Probst, F. et al.: Glial Activation and Glucose Metabolism in a Transgenic Amyloid Mouse Model: A Triple-Tracer PET Study. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 57.6 (2016), S. 954–960. DOI: 10.2967/jnumed.115.167858.
- [399] Sebastian Monasor, L.; Müller, S. A. et al.: Fibrillar A $\beta$  triggers microglial proteome alterations and dysfunction in Alzheimer mouse models. In: *eLife* 9 (2020). DOI: 10.7554/eLife.54083.
- [400] Saido, T. C.; Iwatsubo, T. et al.: Dominant and differential deposition of distinct  $\beta$ -amyloid peptide species, A $\beta$ N3(pE), in senile plaques. In: *Neuron* 14.2 (1995), S. 457–466. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90301-1.
- [401] Catafau, A. M.; Bullich, S. et al.: Cerebellar Amyloid- $\beta$  Plaques: How Frequent Are They, and Do They Influence 18F-Florbetaben SUV Ratios? In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 57.11 (2016), S. 1740–1745. DOI: 10.2967/jnumed.115.171652.
- [402] Yasufumi Sakakibara; Michiko Sekiya et al.: Amyloid- $\beta$  plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. In: *BMC Neuroscience* 20.1 (2019), S. 1–14. DOI: 10.1186/s12868-019-0496-6.
- [403] Pervolaraki, E.; Hall, S. P. et al.: Insoluble A $\beta$  overexpression in an App knock-in mouse model alters microstructure and gamma oscillations in the prefrontal cortex, affecting anxiety-related behaviours. In: *Disease models & mechanisms* 12.9 (2019). DOI: 10.1242/dmm.040550.
- [404] Sakakibara, Y.; Sekiya, M. et al.: Cognitive and emotional alterations in App knock-in mouse models of A $\beta$  amyloidosis. In: *BMC neuroscience* 19.1 (2018), S. 46. DOI: 10.1186/s12868-018-0446-8.

- [405] Merino-Serrais, P.; Knafo, S. et al.: Layer-specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Hippocampus* 21.10 (2011), S. 1037–1044. DOI: 10.1002/hipo.20861.
- [406] Popugaeva, E.; Bezprozvanny, I.: Role of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 6 (2013), S. 29. DOI: 10.3389/fnmo.2013.00029.
- [407] Popugaeva, E.; Supnet, C. et al.: Presenilins, Deranged Calcium Homeostasis, Synaptic Loss and Dysfunction in Alzheimer's Disease. In: *Messenger* 1.1 (2012), S. 53–62. DOI: 10.1166/msr.2012.1002.
- [408] Tackenberg, C.; Ghorri, A. et al.: Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease. In: *Current Alzheimer research* 6.3 (2009), S. 261–268. DOI: 10.2174/156720509788486554.
- [409] Latif Hernandez, A.; Ahmed, T. et al.: *APP knock-in (NLGF) model of Alzheimer's disease: accelerated A $\beta$  pathology leads to cognitive, synaptic and neuronal synchrony deficits*. 2016.
- [410] Cullen, W. K.; Suh, Y. H. et al.: Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. In: *Neuroreport* 8.15 (1997), S. 3213–3217. DOI: 10.1097/00001756-199710200-00006.
- [411] Hu, N.-W.; Smith, I. M. et al.: Soluble amyloid-beta peptides potently disrupt hippocampal synaptic plasticity in the absence of cerebrovascular dysfunction in vivo. In: *Brain : a journal of neurology* 131.Pt 9 (2008), S. 2414–2424. DOI: 10.1093/brain/awn174.
- [412] Klyubin, I.; Ondrejcek, T. et al.: Neurotransmitter receptor and time dependence of the synaptic plasticity disrupting actions of Alzheimer's disease A $\beta$  in vivo. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369.1633 (2014). DOI: 10.1098/rstb.2013.0147.
- [413] Qi, Y.; Klyubin, I. et al.: Pre-plaque A $\beta$ -Mediated Impairment of Synaptic Depotentiation in a Transgenic Rat Model of Alzheimer's Disease Amyloidosis. In: *Frontiers in neuroscience* 13 (2019), S. 861. DOI: 10.3389/fnins.2019.00861.
- [414] Almeida, C. G.; Tampellini, D. et al.: Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. In: *Neurobiology of Disease* 20.2 (2005), S. 187–198. DOI: 10.1016/j.nbd.2005.02.008.
- [415] Roselli, F.; Hutzler, P. et al.: Disassembly of shank and homer synaptic clusters is driven by soluble beta-amyloid(1-40) through divergent NMDAR-dependent signalling pathways. In: *PloS one* 4.6 (2009), e6011. DOI: 10.1371/journal.pone.0006011.
- [416] Lulu W. Wang; Elizabeth Berry-Kravis et al.: Fragile X: Leading the way for targeted treatments in autism. In: *Neurotherapeutics* 7.3 (2010), S. 264–274. DOI: 10.1016/j.nurt.2010.05.005.
- [417] Golovyashkina, N.; Penazzi, L. et al.: Region-specific dendritic simplification induced by A $\beta$ , mediated by tau via dysregulation of microtubule dynamics: a mechanistic distinct event from other neurodegenerative processes. In: *Molecular Neurodegeneration* 10.1 (2015), S. 1–17. DOI: 10.1186/s13024-015-0049-0.
- [418] Bateman, R. J.; Xiong, C. et al.: Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. In: *New England Journal of Medicine* 367.9 (2012), S. 795–804. DOI: 10.1056/NEJMoa1202753.

- [419] Emes, R. D.; Goodstadt, L. et al.: Comparison of the genomes of human and mouse lays the foundation of genome zoology. In: *Human molecular genetics* 12.7 (2003), S. 701–709. DOI: 10.1093/hmg/ddg078.
- [420] Molnár, Z.; Clowry, G.: Cerebral cortical development in rodents and primates. In: *Progress in brain research* 195 (2012), S. 45–70. DOI: 10.1016/B978-0-444-53860-4.00003-9.
- [421] Nithianantharajah, J.; Grant, S. G. N.: Cognitive components in mice and humans: combining genetics and touchscreens for medical translation. In: *Neurobiology of learning and memory* 105 (2013), S. 13–19. DOI: 10.1016/j.nlm.2013.06.006.
- [422] Kaas, J. H.: The evolution of brains from early mammals to humans. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Cognitive science* 4.1 (2013), S. 33–45. DOI: 10.1002/wcs.1206.
- [423] Dislich, B.; Wohlrab, F. et al.: Label-free Quantitative Proteomics of Mouse Cerebrospinal Fluid Detects  $\beta$ -Site APP Cleaving Enzyme (BACE1) Protease Substrates In Vivo. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 14.10 (2015), S. 2550–2563. DOI: 10.1074/mcp.M114.041533.
- [424] Zhou, L.; Barão, S. et al.: The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. In: *Journal of Biological Chemistry* 287.31 (2012), S. 25927–25940. DOI: 10.1074/jbc.M112.377465.
- [425] Li, B.; Woo, R.-S. et al.: The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. In: *Neuron* 54.4 (2007), S. 583–597. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.03.028.
- [426] Huang, Y. Z.; Won, S. et al.: Regulation of Neuregulin Signaling by PSD-95 Interacting with ErbB4 at CNS Synapses. In: *Neuron* 26.2 (2000), S. 443–455. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)81176-9.
- [427] Meyer, D.; Bonhoeffer, T. et al.: Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. In: *Neuron* 82.2 (2014), S. 430–443. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.031.
- [428] Savonenko, A. V.; Melnikova, T. et al.: Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.14 (2008), S. 5585–5590. DOI: 10.1073/pnas.0710373105.
- [429] Leshchyn'ska, I.; Sytnyk, V. et al.: The adhesion molecule CHL1 regulates uncoating of clathrin-coated synaptic vesicles. In: *Neuron* 52.6 (2006), S. 1011–1025. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.10.020.
- [430] Andreyeva, A.; Leshchyn'ska, I. et al.: CHL1 is a selective organizer of the presynaptic machinery chaperoning the SNARE complex. In: *PloS one* 5.8 (2010), e12018. DOI: 10.1371/journal.pone.0012018.
- [431] Nikonenko, A. G.; Sun, M. et al.: Enhanced perisomatic inhibition and impaired long-term potentiation in the CA1 region of juvenile CHL1-deficient mice. In: *The European journal of neuroscience* 23.7 (2006), S. 1839–1852. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.04710.x.
- [432] Das, U.; Wang, L. et al.: Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway. In: *Nature neuroscience* 19.1 (2016), S. 55–64. DOI: 10.1038/nn.4188.
- [433] Fol, R.; Braudeau, J. et al.: Viral gene transfer of APP $\alpha$  rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. In: *Acta neuropathologica* 131.2 (2016), S. 247–266. DOI: 10.1007/s00401-015-1498-9.

- [434] Klevanski, M.; Herrmann, U. et al.: The APP Intracellular Domain Is Required for Normal Synaptic Morphology, Synaptic Plasticity, and Hippocampus-Dependent Behavior. In: *The Journal of Neuroscience* 35.49 (2015), S. 16018–16033. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2009-15.2015.
- [435] Wang, Z.; Wang, B. et al.: Presynaptic and Postsynaptic Interaction of the Amyloid Precursor Protein Promotes Peripheral and Central Synaptogenesis. In: *The Journal of Neuroscience* 29.35 (2009), S. 10788–10801. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2132-09.2009.
- [436] Willem, M.; Tahirovic, S. et al.:  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. In: *Nature* 526.7573 (2015), S. 443–447. DOI: 10.1038/nature14864.
- [437] Sacher, C.; Blume, T. et al.: Longitudinal PET Monitoring of Amyloidosis and Microglial Activation in a Second-Generation Amyloid- $\beta$  Mouse Model. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 60.12 (2019), S. 1787–1793. DOI: 10.2967/jnumed.119.227322.
- [438] Wang, H.; Megill, A. et al.: Postsynaptic target specific synaptic dysfunctions in the CA3 area of BACE1 knockout mice. In: *PLoS one* 9.3 (2014), e92279. DOI: 10.1371/journal.pone.0092279.
- [439] Kelly, B. L.; Vassar, R. et al.: Beta-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons. A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. In: *The Journal of biological chemistry* 280.36 (2005), S. 31746–31753. DOI: 10.1074/jbc.M503259200.
- [440] Ohno, M.; Chang, L. et al.: Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. In: *The European journal of neuroscience* 23.1 (2006), S. 251–260. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04551.x.
- [441] Kimura, R.; Devi, L. et al.: Partial reduction of BACE1 improves synaptic plasticity, recent and remote memories in Alzheimer's disease transgenic mice. In: *Journal of neurochemistry* 113.1 (2010), S. 248–261. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06608.x.
- [442] Malinow, R.; Malenka, R. C.: AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. In: *Annual review of neuroscience* 25 (2002), S. 103–126. DOI: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758.
- [443] Barria, A.; Derkach, V. et al.: Identification of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 272.52 (1997), S. 32727–32730. DOI: 10.1074/jbc.272.52.32727.
- [444] Martiskainen, H.; Herukka, S.-K. et al.: Decreased plasma  $\beta$ -amyloid in the Alzheimer's disease APP A673T variant carriers. In: *Annals of neurology* 82.1 (2017), S. 128–132. DOI: 10.1002/ana.24969.
- [445] Ben Halima, S.; Mishra, S. et al.: Specific Inhibition of  $\beta$ -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein. In: *Cell reports* 14.9 (2016), S. 2127–2141. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.076.
- [446] Kang, E. L.; Cameron, A. N. et al.: Ubiquitin Regulates GGA3-mediated Degradation of BACE1\*. In: *The Journal of biological chemistry* 285.31 (2010), S. 24108–24119. DOI: 10.1074/jbc.M109.092742.

- [447] Kang, E. L.; Biscaro, B. et al.: BACE1 Protein Endocytosis and Trafficking Are Differentially Regulated by Ubiquitination at Lysine 501 and the Di-leucine Motif in the Carboxyl Terminus\*. In: *The Journal of biological chemistry* 287.51 (2012), S. 42867–42880. DOI: 10.1074/jbc.M112.407072.
- [448] Ming-sum Lee; Young T. Kwon et al.: Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. In: *Nature* 405.6784 (2000), S. 360–364. DOI: 10.1038/35012636.
- [449] Wen, Y.; Yu, W. H. et al.: Transcriptional regulation of  $\beta$ -secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. In: *Neuron* 57.5 (2008), S. 680–690. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.02.024.
- [450] Liang, B.; Duan, B.-Y. et al.: Calpain Activation Promotes BACE1 Expression, Amyloid Precursor Protein Processing, and Amyloid Plaque Formation in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer Disease\*. In: *The Journal of biological chemistry* 285.36 (2010), S. 27737–27744. DOI: 10.1074/jbc.M110.117960.
- [451] Zhao, J.; Fu, Y. et al.:  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Levels Become Elevated in Neurons around Amyloid Plaques: Implications for Alzheimer's Disease Pathogenesis. In: *The Journal of Neuroscience* 27.14 (2007), S. 3639–3649. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4396-06.2007.
- [452] Kandalepas, P. C.; Sadleir, K. R. et al.: The Alzheimer's  $\beta$ -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. In: *Acta Neuropathologica* 126.3 (2013), S. 329–352. DOI: 10.1007/s00401-013-1152-3.
- [453] Sadleir, K. R.; Kandalepas, P. C. et al.: Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A $\beta$  generation in Alzheimer's disease. In: *Acta Neuropathologica* 132 (2016), S. 235–256. DOI: 10.1007/s00401-016-1558-9.
- [454] Di Fede, G.; Catania, M. et al.: A Recessive Mutation in the APP Gene with Dominant-Negative Effect on Amyloidogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 323.5920 (2009), S. 1473–1477. DOI: 10.1126/science.1168979.
- [455] Brendel, M.; Jaworska, A. et al.: Efficacy of chronic BACE1 inhibition in PS2APP mice depends on the regional A $\beta$  deposition rate and plaque burden at treatment initiation. In: *Theranostics* 8.18 (2018), S. 4957–4968. DOI: 10.7150/thno.27868.
- [456] López-Picón, F. R.; Snellman, A. et al.: Neuroinflammation Appears Early on PET Imaging and Then Plateaus in a Mouse Model of Alzheimer Disease. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 59.3 (2018), S. 509–515. DOI: 10.2967/jnumed.117.197608.
- [457] *Statement on discontinuation of BACE 1 inhibitor CNP520 in the Alzheimer's Prevention Initiative Generation Study 1: Statement on discontinuation of BACE 1 inhibitor CNP520 in the Alzheimer's Prevention Initiative Generation Study 1*. 8.4.2020. URL: <https://www.nia.nih.gov/news/statement-discontinuation-bace-1-inhibitor-cnp520-alzheimers-prevention-initiative-generation>.
- [458] Ewers, M.; Cheng, X. et al.: Increased CSF-BACE1 activity associated with decreased hippocampus volume in Alzheimer's disease. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 25.2 (2011), S. 373–381. DOI: 10.3233/JAD-2011-091153.
- [459] Stützer, I.; Selevsek, N. et al.: Systematic Proteomic Analysis Identifies  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) Substrates in Pancreatic  $\beta$ -Cells\*. In: *The Journal of biological chemistry* 288.15 (2013), S. 10536–10547. DOI: 10.1074/jbc.M112.444703.

- [460] Huentelman, M.; Both, M. de et al.: Common BACE2 Polymorphisms are Associated with Altered Risk for Alzheimer's Disease and CSF Amyloid Biomarkers in APOE  $\epsilon$ 4 Non-Carriers. In: *Scientific reports* 9.1 (2019), S. 9640. DOI: 10.1038/s41598-019-45896-4.
- [461] Sun, X.; He, G. et al.: BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20.9 (2006), S. 1369–1376. DOI: 10.1096/fj.05-5632com.
- [462] Alexopoulos, P.; Thierjung, N. et al.: Cerebrospinal Fluid BACE1 Activity and sA $\beta$ PP $\beta$  as Biomarker Candidates of Alzheimer's Disease. In: *Dementia and geriatric cognitive disorders* 45.3-4 (2018), S. 152–161. DOI: 10.1159/000488481.
- [463] Rosén, C.; Andreasson, U. et al.: Cerebrospinal fluid profiles of amyloid  $\beta$ -related biomarkers in Alzheimer's disease. In: *Neuromolecular medicine* 14.1 (2012), S. 65–73. DOI: 10.1007/s12017-012-8171-4.
- [464] Decourt, B.; Sabbagh, M. N.: BACE1 as a potential biomarker for Alzheimer's disease. In: *Journal of Alzheimer's Disease* 24.Suppl 2 (2011), S. 53–59. DOI: 10.3233/JAD-2011-110017.
- [465] Rajendran, L.; Schneider, A. et al.: Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. In: *Science (New York, N.Y.)* 320.5875 (2008), S. 520–523. DOI: 10.1126/science.1156609.
- [466] Eehalt, R.; Keller, P. et al.: Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. In: *The Journal of Cell Biology* 160.1 (2003), S. 113–123. DOI: 10.1083/jcb.200207113.
- [467] Gouras, G. K.; Tampellini, D. et al.: Intraneuronal  $\beta$ -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. In: *Acta neuropathologica* 119.5 (2010), S. 523–541. DOI: 10.1007/s00401-010-0679-9.
- [468] Khoonsari, P. E.; Häggmark, A. et al.: Analysis of the Cerebrospinal Fluid Proteome in Alzheimer's Disease. In: *PloS one* 11.3 (2016), e0150672. DOI: 10.1371/journal.pone.0150672.
- [469] Maccarrone, G.; Ditzen, C. et al.: Psychiatric patient stratification using biosignatures based on cerebrospinal fluid protein expression clusters. In: *Journal of psychiatric research* 47.11 (2013), S. 1572–1580. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2013.07.021.
- [470] Martina Pigoni; Johanna Wanngren et al.: Seizure protein 6 and its homolog seizure 6-like protein are physiological substrates of BACE1 in neurons. In: *Molecular Neurodegeneration* 11.1 (2016), S. 1–18. DOI: 10.1186/s13024-016-0134-z.
- [471] Mawuenyega, K. G.; Sigurdson, W. et al.: Decreased Clearance of CNS Amyloid- $\beta$  in Alzheimer's Disease. In: *Science (New York, N.Y.)* 330.6012 (2010), S. 1774. DOI: 10.1126/science.1197623.
- [472] Khoury, R.; Ghossoub, E.: Diagnostic biomarkers of Alzheimer's disease: A state-of-the-art review. In: *Biomarkers in Neuropsychiatry* 1 (2019), S. 100005. DOI: 10.1016/j.bionps.2019.100005.
- [473] Vassar, R.: BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's Research & Therapy* 6.9 (2014), S. 89. DOI: 10.1186/s13195-014-0089-7.
- [474] Boguski, M. S.: Comparative genomics: the mouse that roared. In: *Nature* 420.6915 (2002), S. 515–516. DOI: 10.1038/420515a.

- [475] Nilsson, P.; Saito, T. et al.: New Mouse Model of Alzheimer's. In: *ACS Chemical Neuroscience* 5.7 (2014), S. 499–502. DOI: 10.1021/cn500105p.
- [476] Gu, L.; Kleiber, S. et al.: Long-term in vivo imaging of dendritic spines in the hippocampus reveals structural plasticity. In: *The Journal of Neuroscience* 34.42 (2014), S. 13948–13953. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1464-14.2014.
- [477] Ochs, S.: Die Rolle von GSK-3 $\beta$  in der strukturellen Spine-Plastizität. München, Ludwig-Maximilians-Universität, Diss., 2014. München: Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität, 2014.
- [478] Fuhrmann, M.; Mitteregger, G. et al.: Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27.23 (2007), S. 6224–6233. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5062-06.2007.
- [479] Visser, E. P.; Disselhorst, J. A. et al.: Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET scanner. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 50.1 (2009), S. 139–147. DOI: 10.2967/jnumed.108.055152.
- [480] Rominger, A.; Brendel, M. et al.: Longitudinal assessment of cerebral  $\beta$ -amyloid deposition in mice overexpressing Swedish mutant  $\beta$ -amyloid precursor protein using 18F-florbetaben PET. In: *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 54.7 (2013), S. 1127–1134. DOI: 10.2967/jnumed.112.114660.
- [481] Dorr, A.; Sled, J. G. et al.: Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: a magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. In: *NeuroImage* 35.4 (2007), S. 1409–1423. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2006.12.040.
- [482] Deussing, M.; Blume, T. et al.: Coupling between physiological TSPO expression in brain and myocardium allows stabilization of late-phase cerebral 18FGE180 PET quantification. In: *NeuroImage* 165 (2018), S. 83–91. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2017.10.006.
- [483] Yakushev, I.; Landvogt, C. et al.: Choice of reference area in studies of Alzheimer's disease using positron emission tomography with fluorodeoxyglucose-F18. In: *Psychiatry research* 164.2 (2008), S. 143–153. DOI: 10.1016/j.psychres.2007.11.004.
- [484] Minoshima, S.; Frey, K. A. et al.: Preserved pontine glucose metabolism in Alzheimer disease: a reference region for functional brain image (PET) analysis. In: *Journal of computer assisted tomography* 19.4 (1995), S. 541–547. DOI: 10.1097/00004728-199507000-00006.
- [485] Sawiak, S. J.; Wood, N. I. et al.: Voxel-based morphometry in the R6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2D morphometry. In: *Neurobiology of Disease* 33.1 (2009), S. 20–27. DOI: 10.1016/j.nbd.2008.09.016.
- [486] Vorhees, C. V.; Williams, M. T.: Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. In: *Nature protocols* 1.2 (2006), S. 848–858. DOI: 10.1038/nprot.2006.116.
- [487] Wellmer, A.; Noeske, C. et al.: Spatial memory and learning deficits after experimental pneumococcal meningitis in mice. In: *Neuroscience Letters* 296.2-3 (2000), S. 137–140. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)01645-1.

- [488] Abner, E. L.; Neltner, J. H. et al.: Diffuse Amyloid- $\beta$  Plaques, Neurofibrillary Tangles, and the Impact of APOE in Elderly Persons' Brains Lacking Neuritic Amyloid Plaques. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 64.4 (2018), S. 1307–1324. DOI: 10.3233/JAD-180514.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Schaltkreis der Hippocampusformation. . . . .	3
Abbildung 2: Aufbau des Ammonshorns und die verschiedenen Schichten der CA1-Region. . . . .	4
Abbildung 3: Efferenzen und Afferenzen der Pyramidenzelle der CA1-Region. . . . .	5
Abbildung 4: Ablauf der glutamatergen Signaltransmission. . . . .	6
Abbildung 5: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese. . . . .	14
Abbildung 6: Sequenzielle Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP). . . . .	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung der $\beta$ -Sekretase BACE1. . . . .	24
Abbildung 8: Einführung des verwendeten AD-Mausmodells APP <sup>NL-G-F</sup> GFP-M. . . . .	31
Abbildung 9: A $\beta$ -Ablagerungen des APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodells bestanden hauptsächlich aus A $\beta$ -Oligomeren. . . . .	32
Abbildung 10: Altersabhängiger Anstieg der A $\beta$ -Last und der Neuroinflammation im frontalen Cortex sowie Hippocampus der APP <sup>NL-G-F</sup> -Linie. . . . .	34
Abbildung 11: Die Lernfähigkeit sowie das Abfragen des Referenzgedächtnisses war in APP <sup>NL-G-F</sup> -Versuchstieren signifikant beeinträchtigt. . . . .	37
Abbildung 12: Die Dichte pilzförmiger Spines der APP <sup>NL-G-F</sup> GFP-M-Linie war im <i>Stratum Oriens</i> der hippocampalen CA1-Region in der Nähe sowie abseits von A $\beta$ -Ablagerungen signifikant erniedrigt. . . . .	39
Abbildung 13: Die strukturelle Plastizität dendritischer Spines von APP <sup>NL-G-F</sup> GFP-M-Versuchstieren war abseits von A $\beta$ -Ablagerungen signifikant beeinträchtigt. . . . .	43
Abbildung 14: Die Spine-Dichte von basalen Dendriten des <i>Stratum oriens</i> der CA1-Region der APP <sup>NL-G-F</sup> GFP-M-Linie ist abseits von A $\beta$ -Ablagerungen nicht beeinträchtigt. . . . .	44
Abbildung 15: Die Spine-Umsatzrate in weiblichen APP <sup>NL-G-F</sup> GFP-M-Versuchstieren ist bedingt durch einen erhöhten Anteil an abgebauten Spines signifikant erhöht. . . . .	46
Abbildung 16: Auswirkung der chronischen pharmakologischen BACE-Inhibition mittels NB-360 auf die Fellpigmentierung der APP <sup>NL-G-F</sup> GFP-M-Versuchstiere. . . . .	48
Abbildung 17: Die Bildung neuer dendritischer Spines im <i>Stratum oriens</i> der CA1-Region ist in APP <sup>wt</sup> GFP-M-Versuchstieren unter BACE-Inhibition signifikant erniedrigt. . . . .	50
Abbildung 18: Die Spine-Dichte basaler Dendriten des <i>Stratum oriens</i> der CA1-Region des Hippocampus in APP <sup>wt</sup> GFP-M-Versuchstieren ist unter BACE-Inhibition signifikant beeinträchtigt. . . . .	51
Abbildung 19: Die BACE-Inhibitor Intervention mittels der hohen NB-360-Dosierung bewirkte eine signifikante Steigerung der Spine-Umsatzrate im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell. . . . .	53
Abbildung 20: Die Spine-Dichte basaler Dendriten des <i>Stratum oriens</i> der CA1-Region von APP <sup>NL-G-F</sup> GFP-M-Versuchstieren stieg unter der hohen NB-360-Dosierung signifikant an. . . . .	54
Abbildung 21: Die langfristige BACE-Inhibitionstherapie mittels NB-360 senkt signifikant die kortikale A $\beta$ -Last im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell. . . . .	56
Abbildung 22: Die langfristige BACE-Inhibitionstherapie mittels NB-360 senkt signifikant die Neuroinflammation im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell. . . . .	58
Abbildung 23: Die langfristige BACE-Inhibitionstherapie mittels NB-360 steigert signifikant die Lernfähigkeit und das Abrufen von Erlerntem im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell. . . . .	60
Abbildung 24: Implantation des hippocampalen Fensters. . . . .	92

---

Abbildung 25: Chronische <i>in vivo</i> 2-Photonen Aufnahmen von Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus. . . . .	93
Abbildung 26: Versuchsablauf der <i>In vivo</i> 2-Photonen Mikroskopie. . . . .	94
Abbildung 27: TSPO und A $\beta$ - $\mu$ PET-Untersuchungen im APP <sup>NL-G-F</sup> -Mausmodell. . . . .	97
Abbildung 28: Bestimmung der VOIs sowie einer geeigneten Referenzregion für die $\mu$ PET-Datenanalyse im Mausmodell APP <sup>NL-G-F</sup> . . . . .	99
Abbildung 29: Versuchsaufbau des Morris-Wasserlabyrinths. . . . .	101

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer für die Genotypisierung der APP <sup>NL-G-F</sup> -Linie . . . . .	88
Tabelle 2: Reagenzien und Konzentration für die Genotypisierung von APP <sup>NL-G-F</sup> - sowie der GFP-M-Linie . . . . .	88
Tabelle 3: PCR-Programm zur Verifizierung der APP <sup>NL-G-F</sup> -Linie . . . . .	88
Tabelle 4: PCR-Programm zur Verifizierung GFP-M-Linie . . . . .	89
Tabelle 5: Programme . . . . .	105

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A<math>\beta</math></b>	Amyloid-beta, Spaltprodukt von APP
<b>ADAM10</b>	a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
<b>ADDL</b>	A $\beta$ -derivated diffusible ligands
<b>AICD</b>	intrazelluläre Domäne von APP (APP intracellular domain)
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
<b>ANOVA</b>	analysis of variance
<b>Aph-1</b>	anterior pharynx defective 1
<b>APLP1/2</b>	amyloid precursor like protein 1/2
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein E
<b>APP</b>	Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein)
<b>APP<sup>NL-G-F</sup>GFP-M</b>	Alzheimer Mausmodell das eGFP expremiert
<b>APP<sup>wt</sup>GFP-M</b>	Wildtyp Mausmodell das eGFP expremiert
<b>Arc</b>	activity-regulated cytoskeleton-associated protein
<b>AS</b>	Aminosäuren
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>AV</b>	Alveus
<b>BACE1</b>	beta-site APP-cleaving enzyme 1
<b>Bq</b>	Becquerel
<b>C57BL/6J</b>	Wildtyp Mauslinie
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium Ionen
<b>CA</b>	cornu ammonis
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CatD</b>	Cathepsin-D
<b>CD</b>	cluster of differentiation
<b>CHL1</b>	close homolog of L1
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CREB</b>	cAMP response element-binding protein
<b>CSF</b>	Cerebrospinalflüssigkeit
<b>CTX</b>	Cortex
<b>DAMPs</b>	Schadenassoziierte molekulare Marker (engl. damage-associated molecular patterns)
<b>DG</b>	Gyrus dentatus
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EC</b>	entorhinalen Cortex
<b>eGFP</b>	enhanced green fluorescent protein
<b>engl.</b>	englisch
<b>EphB2</b>	Ephrin-B2-Liganden
<b>ER</b>	endoplasmatische Retikulums
<b>ERBB4</b>	human epidermal growth factor receptor 4
<b>FAD</b>	familiäre Alzheimer Demenz
<b>FTLD</b>	Frontotemporale Demenz
<b>FSB</b>	(E,E)-1-fluoro-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene)
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure ( $\gamma$ -aminobutyric acid)
<b>GWAS</b>	Genomweite Assoziationsstudie (engl. genome wide association study)
<b>HIP</b>	Hippocampus
<b>IBA-1</b>	ionized calcium-binding adapter molecule 1
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>LMol</b>	Stratum lacunosum-moleculare
<b>LSM</b>	Laser-Scanning Mikroskopie
<b>LTD)</b>	Langzeit-Depression
<b>LTP</b>	Langzeit-Potenzierung
<b>MAP</b>	maximum a posteriori
<b>mGluR5</b>	metabotroper Glutamatrezeptor 5
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MWM</b>	Morris-Wasserlabyrinth (engl. morris water maze)
<b>NFT</b>	neurofibrillary tangles
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat
<b>NRG1</b>	Neuregulin-1 Typ-3
<b>nSOC</b>	neuronal store-operated calcium entry
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>OP</b>	Operation
<b>or</b>	Stratum oriens
<b>OSEM</b>	ordered-subsets-expectation maximization
<b>P3</b>	Peptid 3
<b>PAG</b>	periaquäduktales Grau
<b>PAMPs</b>	Pathogenassoziierte molekulare Marker (engl. pathogen-associated molecular patterns)
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PEN-2</b>	Präsenilin-Verstärker 2
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pH</b>	potentia Hydrogenii
<b>PMEL</b>	cell specific melanocyte protein
<b>PS-1</b>	Präseniline-1
<b>PS-2</b>	Präseniline-2
<b>PSD</b>	postsynaptische Dichte
<b>PSG-L1</b>	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
<b>PrPC</b>	cellular prion protein
<b>Py</b>	Pyramidenzellschicht
<b>Rad</b>	Stratum radiatum
<b>SAD</b>	sporadische Alzheimer Demenz
<b>SCARA 1</b>	scavenger receptor class A-member-1
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwertes (engl. standard error of mean)
<b>Sez6</b>	seizure-related gene 6
<b>siRNA</b>	small interference ribonucleic acid
<b>SK</b>	Schaffer-Kollateralen
<b>STIM2</b>	stromal interaction molecule 2
<b>SUB</b>	Subiculum
<b>SUV</b>	standardized uptake value
<b>SUVR</b>	standardized uptake value ratio
<b>TAE</b>	TRIS-Acetat-EDTA
<b>TGN</b>	Trans-Golgi-Netzwerk
<b>TLR</b>	Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. toll like receptor)
<b>TM</b>	Transmembransegmenten
<b>TREM2</b>	triggering receptor expressed on myeloid cells-2

<b>TSPO</b>	tryptophan-rich sensory protein)
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VOI</b>	Zielvolumina (engl. volumes of interest)
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>μPET</b>	Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie

## Manuskripte in Vorbereitung

**Blume T.**, Sacher C., Peters F., Sgobio C., Neumann U., Saito T., Saido T.C., Brendel M., Herms J.; „The APP knock-in mouse model shows a significant impairment of the structural plasticity of dendritic spines in the hippocampal CA1-region.“

**Blume T.**, Filser S., Peters F., Sgobio C., Neumann U., Saito T., Saido T.C.; Brendel M., Haass C., Herms J.; „Inhibition of BACE1 rescues Synaptic Plasticity and Cognitive Functions in early AD-stage reflected by knock-in mouse model APP-NL-G-F.“

**Blume T.**, Sacher C., Peters F., Sgobio C., Neumann U., Saito T., Saido T.C., Brendel M., Haass C., Herms J.; (Jul. 2018) „Preventive and long-term therapeutic intervention using BACE inhibition induces a reduction in neuroinflammation by reducing fibrillary A $\beta$  load and leads to a significant improvement in cognitive performance.“

## Eigene Veröffentlichungen

**Blume T.**, Filser S., Jaworska A., Blain J.F., Koenig G., Moschke K., Lichtenthaler S.F., Herms J.; (Jul. 2018) „BACE1 Inhibitor MK-8931 Alters Formation but Not Stability of Dendritic Spines.“ *Front Aging Neurosci*; doi: 10.3389/fnagi.2018.00229

**Blume T.**, Focke C., Peters F., Deussing M., Albert N.L., Lindner S., Gildehaus F.J., von Ungern-Sternberg B., Ozmen L., Baumann K., Bartenstein P., Rominger A., Herms J., Brendel M.; (Nov. 2018) „Microglial response to increasing amyloid load saturates with aging: a longitudinal dual tracer in vivo  $\mu$ PET-study.“ *J Neuroinflammation*; doi: 10.1186/s12974-018-1347-6

Sacher C., **Blume T.**, Beyer L., Peters F., Eckenweber F., Sgobio C., Deussing M., Albert N.L., Unterrainer M., Lindner S., Gildehaus F.J., von Ungern-Sternberg B., Brzak I., Neumann U., Saito T., Saido T.C., Bartenstein P., Rominger A., Herms J., Brendel M.; (Dez. 2019) „Longitudinal PET Monitoring of Amyloidosis and Microglial Activation in a Second-Generation Amyloid- $\beta$  Mouse Model.“ *J Nucl Med*; doi: 10.2967/jnumed.119.227322  
(geteilte Erstautorenschaft)

Sacher C., **Blume T.**, Beyer L., Biechele G., Sauerbeck J., Eckenweber F., Deussing M., Focke C., Parhizkar S., Lindner S., Gildehaus F.J., von Ungern-Sternberg B., Baumann K., Tahirovic S., Kleinberger G., Willem M., Haass C., Bartenstein P., Cumming P., Rominger A., Herms J., Brendel M.; (Mai. 2020) „Asymmetry of fibrillar plaque burden in amyloid mouse models.“ *J Nucl Med*; doi: 10.2967/jnumed.120.242750

Focke C., **Blume T.**, Zott B., Shi Y., Deussing M., Peters F., Schmidt C., Kleinberger G., Lindner S., Gildehaus F.J., Beyer L., von Ungern-Sternberg B., Bartenstein P., Ozmen L., Baumann K., Dorostkar M.M., Haass C., Adelsberger H., Herms J., Rominger A., Brendel M.; (April 2019) „Early and Longitudinal Microglial Activation but Not Amyloid Accumulation Predicts Cognitive Outcome in PS2APP Mice.“ *J Nucl Med*; doi: 10.2967/jnumed.118.217703

Deussing M., **Blume T.**, Vomacka L., Mahler C., Focke C., Todica A., Unterrainer M., Albert N.L., Lindner S., von Ungern-Sternberg B., Baumann K., Zwergal A., Bartenstein P., Herms J., Rominger A., Brendel M.; (Jan. 2018) „Coupling between physiological TSPO expression in brain and myocardium allows stabilization of late-phase cerebral [ $^{18}$ F]GE180 PET quanti-

fication." *Neuroimage*; doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.10.006

Deussing M., **Blume T.**, Vomacka L., Mahler C., Focke C., Todica A., Unterrainer M., Albert N.L., Lindner S., von Ungern-Sternberg B., Baumann K., Zwergal A., Bartenstein P., Herms J., Rominger A., Brendel M.; (Mai 2018) „Data on specificity of <sup>[18F]</sup>GE180 uptake for TSPO expression in rodent brain and myocardium." *Data Brief*; doi: 10.1016/j.dib.2018.04.133

Brendel M., Focke C., **Blume T.**, Peters F., Deussing M., Probst F., Jaworska A., Overhoff F., Albert N., Lindner S., von Ungern-Sternberg B., Bartenstein P., Haass C., Kleinberger G., Herms J., Rominger A.; (Dez. 2017) „Time Courses of Cortical Glucose Metabolism and Microglial Activity Across the Life Span of Wild-Type Mice: A PET Study." *J Nucl Med.*; doi: 10.2967/jnumed.117.195107

Eckenweber F., Medina-Luque J., **Blume T.**, Sacher C., Biechele G., Wind K., Deussing M., Briehl N., Lindner S., Boening G., von Ungern-Sternberg B., Unterrainer M., Albert N.L., Zwergal A., Levin J., Bartenstein P., Cumming P., Rominger A., Höglinger G.U., Herms J., Brendel M.; (Juli 2020) „Longitudinal TSPO expression in tau transgenic P301S mice predicts increased tau accumulation and deteriorated spatial learning." *J Neuroinflammation*; doi: 10.1186/s12974-020-01883-5

Brendel M., Deussing M., **Blume T.**, Kaiser L., Probst F., Overhoff F., Peters F., von Ungern-Sternberg B., Ryazanov S., Leonov A., Griesinger C., Zwergal A., Levin J., Bartenstein P., Yakushev I., Cumming P., Boening G., Ziegler S., Herms J., Giese A., Rominger A.; (Aug. 2019) „Late-stage Anle138b treatment ameliorates tau pathology and metabolic decline in a mouse model of human Alzheimer's disease tau." *Alzheimers Res Ther.*; doi: 10.1186/s13195-019-0522-z

Brendel M., Yousefi B.H., **Blume T.**, Herz M., Focke C., Deussing M., Peters F., Lindner S., von Ungern-Sternberg B., Drzezga A., Bartenstein P., Haass C., Okamura N., Herms J., Yakushev I., Rominger A.; (Juni 2018) „Comparison of 18F-T807 and 18F-THK5117 PET in a Mouse Model of Tau Pathology." *Front Aging Neurosci.*; doi: 10.3389/fnagi.2018.00174

Peters F., Salihoglu H., Rodrigues E., Herzog E., **Blume T.**, Filser S., Dorostkar M., Shimshek D.R., Brose N., Neumann U., Herms J.; (Mai 2018) „BACE1 inhibition more effectively suppresses initiation than progression of  $\beta$ -amyloid pathology." *Acta Neuropathol.*; doi: 10.1007/s00401-017-1804-9

Brendel M., Jaworska A., Overhoff F., **Blume T.**, Probst F., Gildehaus F.J., Bartenstein P., Haass C., Bohrmann B., Herms J., Willem M., Rominger A.; (Sep. 2018) „Efficacy of chronic BACE1 inhibition in PS2APP mice depends on the regional A $\beta$  deposition rate and plaque burden at treatment initiation." *Theranostics*; doi: 10.7150/thno.27868

Brendel M., Kleinberger G., Probst F., Jaworska A., Overhoff F., **Blume T.**, Albert N.L., Carlsen J., Lindner S., Gildehaus F.J., Ozmen L., Suárez-Calvet M., Bartenstein P., Baumann K., Ewers M., Herms J., Haass C., Rominger A.; (Jan. 2017) „Increase of TREM2 during Aging of an Alzheimer's Disease Mouse Model Is Paralleled by Microglial Activation and Amyloidosis." *Front Aging Neurosci.*; doi: 10.3389/fnagi.2017.00008

## Danksagung

Ein besonders großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Christian Haass für die langjährige Unterstützung und für das Schaffen eines hervorragenden wissenschaftlichen Umfeld, das mir half, mich wissenschaftlich und persönlich stetig weiterzuentwickeln.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Jochen Herms für das entgegengebrachte Vertrauen, seine stetige Motivation und dafür, dass ich stets mit Fragen zu Ihm kommen konnte.

Besonders dankbar bin ich für die spannenden Forschungsprojekte und für die vielen Möglichkeiten und Erfahrungen die ich während meiner Doktorarbeit hatte und nutzen konnte.

Ein weiterer großer Dank geht an Dr. Matthias Brendel für die spannende und sehr gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren, für die vielen wissenschaftlichen und interessanten Diskussionen und für seine stetige Unterstützung und Geduld.

Ich möchte auch allen Mitgliedern der Prüfungskommission für Ihre kostbare Zeit und für Ihr Interesse an dieser Arbeit danken.

Darüber hinaus möchte ich bei meinen weiteren Kooperationspartnern für die Zusammenarbeit und für die fruchtbaren Diskussionen danken. Besonderer Dank gilt Dr. Ulf Neumann, Dr. Derya Shimshek, Christian Sacher und Gloria Bichele. Manuell Mittag möchte ich für seine Bereitschaft bedanken mir die Hippocampale Fensterimplantation zu zeigen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Severin Filser, er war mir stets ein Vorbild und seine Unterstützung, sein Rat und seine Meinung waren für mich von unschätzbarem Wert. Danke, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest.

Bei Dr. Carmelo Sgobio und Dr. Finn Peters möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung, die Zusammenarbeit und den großartigen wissenschaftlichen Austausch bedanken. Danke, dass ich immer auf euch zählen konnte.

Bei Dr. Sophie Crux und Dr. Julia Herber möchte ich mich ebenfalls für ihre ausdauernde Unterstützung, ihren Rat, für die vielen Diskussionen und Juli für das Korrekturlesen bedanken. Danke, dass ihr mir während dieser Zeit so gute Freunde geworden seid.

Meinen Kollegen Jose und Katrin gilt ebenfalls ein großer Dank für ihre Unterstützung und das Schaffen eines sehr positiven Laborklimas. Danke, dass ihr mit mir den Laboralltag gemeistert habt. Bedanken möchte ich mich aber auch bei allen anderen Mitgliedern der AG Herms, für ihr Feedback und ihre Kollegialität. Ich danke ebenfalls Nadine Lachner und Rachele Trevisi für die tatkräftige Unterstützung beim Genotypisieren sowie dem Tierstall, hier besonders Claudia Ihbe, Ekrem Göcmenoglu und Stefanie Wurster für die herausragende Betreuung meiner Maus-Linien und für ihre endlose Unterstützung.

Ein großer Dank gilt ebenfalls Sonja Einhaus und Marcel Matt für die tolle Organisation ohne die einfach nichts funktionieren würde.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und Yannic meinen tief empfundenen Dank dafür aussprechen, dass sie mich bedingungslos unterstützt haben und darüber hinaus bereit waren, meine Arbeit Korrektur zu lesen. Danke, dass ihr immer für mich da wart und Danke, dass ich eure Geduld teilweise sehr auf die Probe stellen durfte und ihr mir trotzdem Halt gegeben habt.