

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

**Effekt der intrazerebroventrikulären Injektion von
Amyloid-Beta auf Kognition, Verhalten und
motorische Fähigkeiten in einem Maus-Modell
des frühen Morbus Alzheimer**

von Verena Gehlert, geb. Grimm

aus Bad Schlema

München 2024

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

Institut für Tierpathologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Angefertigt am: Klinikum rechts der Isar der TU München in der Klinik für
Anästhesiologie

Mentor: Prof. Dr. Gerhard Rammes

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 10. Februar 2024

„Unsere Generation wird nicht so sehr die Untaten
böser Menschen zu beklagen haben,
als vielmehr das erschreckende Schweigen der Guten.“
Martin Luther King (1929-1968)

„Kleine Dinge können die Welt verändern...
Sei Du selbst die Veränderung,
die Du dir wünschst für diese Welt.“
Mahatma Gandhi (1869-1948)

Gewidmet in grenzenloser Dankbarkeit meinen Lieben...
und meiner Liebe!

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis.....	XVII
Abkürzungs-, Akronyme- und Einheitenverzeichnis	XIX
I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht.....	5
1. Morbus Alzheimer	5
1.1. Epidemiologie und Pathophysiologie.....	5
1.1.1. Epidemiologie	6
1.1.2. Ursachen und Pathophysiologie	7
1.1.3. Amyloid-Beta (A β)-Peptid	10
1.1.4. Tau-Protein	12
1.1.5. Zusammenwirken von Amyloid-Beta (A β)-Peptid und Tau-Protein	16
1.2. Diagnostik	16
1.3. Prävention	19
1.4. Therapie	20
1.4.1. Medikamentöse Behandlung	21
1.4.2. Nicht-medikamentöse Behandlung	22
1.4.3. Experimentelle Therapieansätze	22
2. Kognition und Verhalten.....	24
2.1. Das Arbeits- und Kurzzeitgedächtnis.....	25
2.2. Das Langzeitgedächtnis	27
2.2.1. Deklaratives Gedächtnis.....	29
2.2.2. Nicht-deklaratives Gedächtnis	30
2.3. Aβ und Kognition.....	31
2.4. Verhaltensuntersuchungen am Tiermodell	33
2.4.1. Verhaltenstests im Bereich tierexperimenteller Forschung	33
2.4.2. Die Maus als Tiermodell	35
2.4.3. Open-Field-Test	37
2.4.4. Einfache Labyrinth-Tests	37
2.4.5. Der modifizierte Hole-Board-Test	38
III. Material und Methoden.....	41
1. Ziel dieser Arbeit.....	41
2. Eigene Untersuchungen	43

2.1.	Versuchstiere	43
2.1.1.	Herkunft	43
2.1.2.	Haltungsbedingungen	43
2.2.	Versuchsaufbau	44
2.3.	Chirurgische Verfahren	47
2.3.1.	Implantation der intrazerebroventrikulären Führungskanüle	47
2.3.2.	Intrazerebroventrikuläre Injektion des löslichen A β ₁₋₄₂	52
2.4.	Der modifizierter Hole-Board-Test	53
2.4.1.	Vorbereitung des modifizierten Hole-Board-Test	53
2.4.2.	Aufbau des modifizierten Hole-Board-Test	53
2.4.3.	Versuchsablauf	56
2.4.4.	Mit dem modifizierten Hole-Board-Test erhobene Parameter	57
2.5.	Euthanasie und Probennahme	59
2.5.1.	Präanalytische Probenbehandlung und Euthanasie	59
2.5.2.	Analytik der A β ₁₋₄₂ -Konzentration, Apoptose und Inflammation	61
2.5.3.	Postanalytische Probenbehandlung	68
2.6.	Statistische Bewertung der Befunde	70
IV.	Ergebnisse	73
1.	Physiologische Parameter	74
1.1.	Körpergewichtsentwicklung	74
2.	Modifizierter Hole-Board-Test	78
2.1.	Kognitive Parameter	78
2.1.1.	Gesamtdurchlaufzeit (<i>Time Trial</i>)	78
2.1.2.	Fehlbesuche (<i>Wrong Choices</i>)	81
2.1.3.	Auslassungsfehler (<i>Omission Error</i>)	83
2.1.4.	Gesamtfehler eines Durchlaufes (<i>Wrong Choices total</i>)	84
2.1.5.	Wiederholungsfehler (<i>Repeated Choices</i>)	86
2.2.	Motorische Parameter	88
2.2.1.	Linienüberschreitung (<i>Line Crossing</i>)	88
2.2.2.	Fresszeit (<i>Time Food Intake</i>)	90
2.3.	Verhaltensparameter	92
2.3.1.	Angstverhalten (<i>Latency First Board Entry, Time on Board, Immobility</i>)	92
2.3.2.	Erkundungsverhalten (<i>Latency First Hole Visit, Correct Hole Visits, Rearing</i>)	97
2.3.3.	Erregung (<i>Grooming, Boli</i>)	102
2.4.	Zusammenfassung der erhobenen Parameter im mHBT	106
2.4.1.	Physiologische Parameter	106
2.4.2.	Modifizierter Hole-Board-Test	106
3.	Entnahme und Präparation des Gehirns	109
3.1.	Präanalytische Probenbehandlung	109
3.1.1.	Liquor cerebrospinalis-Entnahme	109
3.1.2.	Toluidinblau-Färbung	109
3.2.	Analytik der Aβ₁₋₄₂-Konzentration, Apoptose und Inflammation ...	110

3.2.1.	Messung von Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α im Western-Blot- Verfahren.....	110
3.2.2.	Messung der A β ₁₋₄₂ -Konzentration mittels ELISA	115
3.3.	Postanalytische Probenbehandlung.....	116
3.3.1.	Kontrolle der Implantat Tiefe mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	116
3.3.2.	Färbung mittels Methoxy-X04-Lösung.....	117
3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	117
V.	Diskussion	119
1.	Überblick über aktuelle Modelle von Morbus Alzheimer	119
2.	Diskussion der Methoden	125
2.1.	Tiermodell Maus und ICV-A β ₁₋₄₂ -Modell.....	125
2.1.1.	C57BL/6N als Tiermodell.....	125
2.1.2.	ICV-A β ₁₋₄₂ -Modell.....	126
2.2.	Haltung und chirurgisches Verfahren	128
2.3.	Der Modifizierter Hole-Board-Test.....	130
3.	Diskussion der Ergebnisse.....	133
3.1.	Physiologische Parameter.....	133
3.1.1.	Allgemeinuntersuchung	133
3.1.2.	Körpergewichtsentwicklung	133
3.2.	Modifizierter Hole-Board-Test	134
3.2.1.	Kognitive Parameter.....	135
3.2.2.	Motorische Parameter	140
3.2.3.	Verhaltensparameter	141
3.3.	Entnahme und Präparation des Gehirns	147
3.3.1.	Präanalytische Probenbehandlung	147
3.3.2.	Analytik der A β ₁₋₄₂ -Konzentration, Apoptose und Inflammation.....	149
3.4.	Postanalytische Probenbehandlung.....	155
3.4.1.	Kontrolle der Implantat Tiefe mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	156
3.4.2.	Färbung mittels Methoxy-X04-Lösung.....	156
4.	Abschließende Betrachtung und Ausblicke.....	159
VI.	Zusammenfassung.....	163
VII.	Summary	165
VIII.	Literaturverzeichnis.....	167
IX.	Anhang	185
1.	Zusätzliche Tabellen und Abbildungen der untersuchten Parameter im mHBT	185
1.1.	Kognitive Parameter.....	185
1.1.1.	Gesamtdurchlaufzeit (<i>Time Trial</i>).....	185

1.1.3.	Auslassungsfehler (<i>Omission Error</i>)	189
1.1.4.	Gesamtfehler eines Durchlaufes (<i>Wrong Choices total</i>)	191
1.1.5.	Wiederholungsfehler (<i>Repeated Choices</i>)	193
1.2.	Motorische Parameter	195
1.2.1.	Linienüberschreitung (<i>Line Crossing</i>)	195
1.2.1.	Fresszeit (<i>Time Food Intake</i>)	197
1.3.	Verhaltensparameter	199
1.3.1.	Angstverhalten	199
1.3.2.	Erkundungsverhalten	205
1.3.3.	Erregung	211
2.	Rezepte Verzeichnis	215
2.1.	Proteinaufbereitung der Proben	215
2.2.	Gelelektrophorese	215
2.3.	ELISA	216
X.	Danksagung	217

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese bei MA	9
Abbildung 2:	Amyloidogene und nicht-amyloidogene APP-Prozessierung	11
Abbildung 3:	Tau-Phosphorylierung und Bildung von NFTs	14
Abbildung 4:	Neurofibrilläre Veränderungen im Kortex bei fortschreitendem MA und Braak-Stadien	15
Abbildung 5:	Therapeutische Strategien bei Morbus-Alzheimer	23
Abbildung 6:	Erweitertes " Drei-Komponenten-Modell "	26
Abbildung 7:	Taxonomie des Langzeitgedächtnisses mit zugehörigen Gehirnstrukturen	28
Abbildung 8:	Serial-Parallel-Independent- Modell (SPI, dt. Seriell-Parallel-Unabhängigkeits-Modell) des deklarativen Gedächtnisses.	29
Abbildung 9:	Einteilung der Tiere für den mHBT	46
Abbildung 10:	Versuchstier im stereotaktischen Rahmen	49
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Bohrlochposition zum Setzen der 23 G-Führungskanüle	51
Abbildung 12:	Modifiziertes Hole-Board	56
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der CSF-Entnahmestelle über die Zisterna magna	60
Abbildung 14:	Schematische Darstellung des " Gel-Sandwiches " beim WB-Verfahre	66
Abbildung 15:	Graphische Darstellung des Körpergewichts in Gramm (g) von der Ankunft der Tiere bis zur ICV-Injektion	75
Abbildung 16:	Graphische Darstellung des Körpergewichts in Gramm (g) während des mHBT	76
Abbildung 17:	Graphische Darstellung zum Vergleich der benötigten Gesamtdurchlaufzeit (Time Trial) in Sekunden (s) pro Durchlauf	80
Abbildung 18:	Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Fehlbesuche (Wrong Choices) pro Durchlauf	82
Abbildung 19:	Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Auslassungsfehler (Omission Errors) pro Durchlauf	84
Abbildung 20:	Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Gesamtfehler (Wrong Choices total) pro Durchlauf	85
Abbildung 21:	Graphische Darstellung zum Vergleich der Wiederholungsfehler (Repeated Choices) pro Durchlauf	87
Abbildung 22:	Graphische Darstellung zum Vergleich der Linienüberschreitungen (Line Crossing) pro Durchlauf	89
Abbildung 23:	Graphische Darstellung zum Vergleich der benötigten Fresszeit einer Futterbelohnung (Time Food Intake) in Sekunden (s) pro Durchlauf	91
Abbildung 24:	Graphische Darstellung zum Vergleich der Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (Latency First Board Entry) in Sekunden (s) pro Durchlauf	93

Abbildung 25: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit auf dem Board (<i>Time on Board</i>) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf.....	95
Abbildung 26: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit der Immobilitätsphase (<i>Immobility</i>) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf	96
Abbildung 27: Graphische Darstellung zum Vergleich der Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch mit Markierung (<i>Latency First Hole Visit</i>) in Sekunden (s) pro Durchlauf	98
Abbildung 28: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der besuchten markierten Zylinder (<i>Correct Hole Visits</i>) pro Durchlauf.....	100
Abbildung 29: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (<i>Rearing</i>) pro Durchlauf	101
Abbildung 30: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit der Putzphase (<i>Grooming</i>) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf	104
Abbildung 31: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl des Kotabsatzes (<i>Boli</i>) pro Durchlauf.....	105
Abbildung 32: Nachweisführung des korrekten Sitzes der Führungskanüle am Beispiel eines Kontrolltieres mit einer Färbung mittels Toluidinblau.	110
Abbildung 33: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von Caspase 3 im Hippokampus und MPFK.....	112
Abbildung 34: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von Tau im Hippokampus und im MPFK	112
Abbildung 35: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von P-Tau im Hippokampus und im MPFK	114
Abbildung 36: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von TNFα im Hippokampus und im MPFK	115
Abbildung 37: Beispiele für Hämatoxylin-Eosin (HE)- gefärbte 7 μ m starke histologische Schnitte der Kontrolltiere aus dem relevanten Hirnbereich.....	116
Anhang:	
Abbildung 38: Graphische Darstellung zum Vergleich der benötigten Gesamtdurchlaufzeit (<i>Time Trial</i>) in Sekunden (s) je Gruppeneinteilung.	186
Abbildung 39: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Fehlbesuche (<i>Wrong Choices</i>) je Gruppeneinteilung.....	188
Abbildung 40: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Auslassungsfehler (<i>Omission Errors</i>) je Gruppeneinteilung.....	190
Abbildung 41: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Gesamtfehler (<i>Wrong Choices total</i>) je Gruppeneinteilung.....	192
Abbildung 42: Graphische Darstellung zum Vergleich der Wiederholungsfehler (<i>Repeated Choices</i>) je Gruppeneinteilung.	194
Abbildung 43: Graphische Darstellung zum Vergleich der Linienüberschreitungen (<i>Line Crossing</i>) je Gruppeneinteilung.	196
Abbildung 44: Graphische Darstellung zum Vergleich der benötigten Fresszeit einer Futterbelohnung (<i>Time Food Intake</i>) in Sekunden (s) je Gruppeneinteilung	198

Abbildung 45: Graphische Darstellung zum Vergleich der Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (<i>Latency First Board Entry</i>) in Sekunden (s) je Gruppeneinteilung.	200
Abbildung 46: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit auf dem Board (<i>Time on Board</i>) in % der Gesamtzeit je Gruppeneinteilung.	202
Abbildung 47: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit der Immobilitätsphase (<i>Immobility</i>) in % der Gesamtzeit je Gruppeneinteilung.	204
Abbildung 48: Graphische Darstellung zum Vergleich der Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch mit Markierung (<i>Latency First Hole Visit</i>) in Sekunden (s) je Gruppeneinteilung.	206
Abbildung 49: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der besuchten markierten Zylinder (<i>Correct Hole Visits</i>) je Gruppeneinteilung.	208
Abbildung 50: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (<i>Rearing</i>) je Gruppeneinteilung.	210
Abbildung 51: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit der Putzphase (<i>Grooming</i>) in % der Gesamtzeit je Gruppeneinteilung.	212
Abbildung 52: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl des Kotabsatzes (<i>Boli</i>) je Gruppeneinteilung.	214

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Häufige degenerative Demenzerkrankungen (nach SVITEK et al. (2008)).....	5
Tabelle 2:	Tastaturbefehle und deren Bedeutung für den mHBT.....	54
Tabelle 3:	Randomisierte Lochkombinationen der markierten Zylinder im mHBT.....	56
Tabelle 4:	Mit Hilfe des mHBT erhobene Parameter	59
Tabelle 5:	Körpergewicht in Gramm (g) on der Ankunft der Tiere bis zur ICV-Injektion	74
Tabelle 6:	Körpergewicht in Gramm (g) während des mHBT	76
Tabelle 7:	Anzahl und Menge in μl der gewonnenen Liquor cerebrospinalis-Proben nach dem mHBT.....	109
Tabelle 8:	Benötigte Gesamtdurchlaufzeit (Time Trial) in Sekunden (s) im mHBT.....	185
Tabelle 9:	Anzahl der Fehlbesuche (Wrong Choices) im mHBT	187
Tabelle 10:	Anzahl der Auslassungsfehler (Omission Errors) im mHBT.....	189
Tabelle 11:	Anzahl der Gesamtfehler (Wrong Choices total) in einem Durchgang im mHBT.....	191
Tabelle 12:	Anzahl der Wiederholungsfehler (Repeated Choices) im mHBT.....	193
Tabelle 13:	Anzahl der Linienüberschreitungen (Line Crossing) im mHBT.....	195
Tabelle 14:	Fresszeit einer Futterbelohnung (Time Food Intake) in Sekunden (s) im mHBT	197
Tabelle 15:	Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (Latency First Board Entry) in Sekunden (s) im mHBT	199
Tabelle 16:	Gesamtzeit auf dem Board (Time on Board) in % der Gesamtzeit im mHBT.....	201
Tabelle 17:	Gesamtzeit der Immobilitätsphasen (Immobility) % der Gesamtzeit im mHBT.....	203
Tabelle 18:	Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch (Latency First Hole Visit) in Sekunden (s) im mHBT	205
Tabelle 19:	Anzahl der besuchten markierten Zylinder (Correct Hole Visits) im mHBT.....	207
Tabelle 20:	Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (Rearing) im mHBT	209
Tabelle 21:	Gesamtzeit der Putzphasen (Grooming) in % der Gesamtzeit im mHBT	211
Tabelle 22:	Anzahl des Kotabsatzes (Boli) im mHBT	213
Tabelle 23:	Übersicht über die Rezeptorproteine mit ihren jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern in den gewählten Verdünnungsstufen	216

ABKÜRZUNGS-, AKRONYME- UND EINHEITENVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ADP	Adenosindiphosphat
AEP	Asparaginyln-Endopeptidase
AICD	APP Intracellular Domain
ANOVA	Analysis of Variance, dt. Varianzanalyse
APP	engl. β -Amyloid-Precursor-Protein, dt. Amyloid-Vorläufer-Protein
ApoE	Apolipoprotein E (ApoE)
Aqua dest.	Aqua destillata
Arl8b	engl. ADP-ribosylation factor-like protein 8b, dt. ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliche Protein 8b
A β	Amyloid-Beta ₁₋₄₂ (A β)-Peptid (A β ₄₂)
A β O	Amyloid-Beta-Oligomer
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
Ca ²⁺	Chemisches Zeichen für Calciumionen, Calcium
CSF	engl. cerebrospinal fluid, lat. Liquor cerebrospinalis
°C	Grad Celsius
d	Tag
DAM	engl. disease-associated microglia, dt. krankheitsassoziierte Mikroglia
d.h.	das heißt
DNA	engl. Deoxyribonucleic Acid, dt. Desoxyribonukleinsäure
dt.	Deutsch
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, dt. Antikörperbasiertes Nachweisverfahren
engl.	Englisch
Fa.	Firma
FDA	engl. US Food and Drug Administration
g	Gramm
GLM	engl. General Linear Model, dt. allgemein lineares Modell

GTPase	oder auch G-Proteine (heterogene Gruppe von intrazellulären Proteinen, die guaninbasierten Nukleotide binden können)
h	Stunde
HBT	Hole-Board-Test (klassisch)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	engl. Horseradish peroxidase, dt. Meerrettichperoxidase
IDP	engl. intrinsically disordered proteins, dt. intrinsisch ungeordneten Proteine
ICV	engl. intracerebroventricular, dt. intrazerebroventrikulär
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
KZG	Kurzzeitgedächtnis
LZG	Langzeitgedächtnis
M	lat. Musculus, dt. Muskel
MA	lat. Morbus Alzheimer, dt. Alzheimer-Krankheit
MANOVA	Analysis of multivariate Variance, dt. multivariate Varianzanalyse
MCI	engl. mild cognitive impairment, dt. leichter kognitiver Beeinträchtigung
mg	Milligramm
mHBT	modifizierter Hole-Board-Test
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMF	Kombinationspräparat aus Midazolam, Medetomidin und Fentanyl
MPFK	medialer präfrontaler Kortex
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
N	Nativ-Tiere (ohne jeglichen chirurgischen Eingriff)
NaCl	Natriumchlorid
NFTs	engl. Neurofibrillary Tangles, dt. intrazelluläre neurofibrilläre Bündel
nm	Nanometer

nmol	Nanomol
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OTF	Open-Field-Test
PBS	engl. Phosphate buffered saline, dt. Phosphat-gepufferte Salzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
pH-Wert	Wasserstoffionen-Wert (Maßzahl für den basischen oder sauren Charakter einer Lösung)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
präf.	präfrontal
PVC	Polyvinylchlorid
s	Sekunde
SD	engl. Standarddeviation, dt. Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEN	Sensitivität
SEM	engl. standard error of the mean, dt. Standardfehler
sog.	sogenannt
SPE	Spezifität
TBS/T	Tween20-haltige Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Thigmotaxis	durch einen Berührungszreiz ausgelöste gerichtete Bewegung, von dem Reiz weg oder auf diesen zu
TM	Tiermodell
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
TREM2	engl. triggering receptor expressed on myeloid cells 2, dt. Transmembranrezeptor
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Trometamol)
TVA	Tierversuch Antrag
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
WB	Western Blot
WRS	engl. Wilcoxon rank-sum Test, dt. Wilcoxon Rangsummen-Test oder auch Mann-Whitney-U-Test
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
%	Prozent

I. EINLEITUNG

Gegenwärtig ist *Morbus Alzheimer* (MA, dt. Alzheimer-Krankheit) mit aktuell 47 Millionen Patienten weltweit die am weitesten verbreitete neurodegenerative Erkrankung und macht den größten Teil der Demenzleiden aus (NUSSBAUM R.L. und C.E., 2003; PRINCE et al., 2016). Die multifaktorielle, genetisch und ökologisch äußerst komplexe Art der Erkrankung begründet wohl ihr vermehrtes Auftreten (BEKRIS et al., 2010). Mit 99 Prozent (%) ist die mit Abstand am häufigsten vorkommende Alzheimer-Form die sporadische, für welche fortschreitendes Alter den Hauptrisikofaktor darstellt. So hat MA schicksalhafte Folgen für die Betroffenen, deren soziales Umfeld sowie beträchtliche sozioökonomische Auswirkungen und gilt aktuell immer noch als unheilbar (HICKMAN et al., 2016).

Ein erkranktes Gehirn ist gekennzeichnet durch aggregiertes Amyloid-Beta (A β)-Peptid, dass sich sowohl intrazellulär ablagert als auch extrazellulär zu sog. senilen Plaques akkumuliert und intrazellulär liegende neurofibrilläre Bündel (engl. neurofibrillary tangles, NFTs). Sie dienen als Reservoir der Amyloid-Beta-Oligomere (A β O), der am meisten neurotoxischen löslichen A β -Spezies, aber auch als Faktor für neuritische Dystrophie und Degeneration der Synapsen (GONG et al., 2003). Zudem induzieren sie sowohl synaptische als auch mitochondriale Dysfunktionen, wodurch es zu einer mit Neuronenverlust charakterisierten Neuroinflammation kommt. In verschiedenen Forschungsarbeiten mit Tierzellen konnte bei der Behandlung von Kulturen des Zentralnervensystems (ZNS) mit A β O oder bei ICV-Injektionen festgestellt werden, dass A β O eine beeinträchtigte synaptische Plastizität, einen Verlust an Gedächtnisfunktion, eine Tau-Hyperphosphorylierung und eine neurofibrilläre Bündelbildung verursacht (CLEARY et al., 2005; DI CHIARA et al., 2017). Speziell bei Mäusen führt die A β -Injektion schnell zu einer reduzierten kognitiven Funktion (MORRONI et al., 2016). Die resultierende Klinik beim Menschen äußert sich in einer progressiven Schwächung aller kognitiven Prozesse, die zunächst langsam und schrittweise beginnen und später zunehmend enorme Belastungen im Alltag der Patienten verursachen: zunehmende Verlust von Gedächtnisleistung, sowohl die Verarbeitung neu hinzukommender, als auch das Wiederabrufen bereits gespeicherter Erinnerungen betreffend; Schwierigkeiten bei der Orientierung; Sprachprobleme; nachlassende Konzentrationsfähigkeit und ein schwindendes Denk- und Urteilsvermögen (PRINCE et al., 2016). Bereits viele Jahre bevor die ersten klinischen Symptome auftreten, beginnt MA meist unentdeckt und die ersten pathologischen

Veränderungen im Gehirn können sich manifestieren (BATEMAN et al., 2012). So sind die irreversiblen Schäden am ZNS bereits weit fortgeschritten, da eine Diagnosestellung im Regelfall erst erfolgt, wenn der Patient durch kognitive Defizite Beschwerden zeigt. Auch ist die Abgrenzung zu anderen Demenzerkrankungen, wie zum Beispiel (z.B.) einer vaskulären- oder der Lewy Körperchen-Demenz immer noch kompliziert (NELSON et al., 2010; JELLINGER und KORCZYN, 2018). Erschwerend kommt hinzu, dass es bis heute kein Heilmittel gibt; aktuell verfügbare Therapeutika sind lediglich im Stande, den Krankheitsverlauf zu verlangsamen und gegebenenfalls die Symptome zu lindern. All diese Tatsachen machen die Forschung zu MA zu einem sozialen wie wirtschaftlich bedeutsamen Unterfangen. Denn das Ziel, die Ursachen und Mechanismen von MA zu verstehen, ist die Grundlage dafür, auf der basierend Therapie-Strategien und Therapeutika entwickelt werden können und müssen. Ein wichtiger Baustein für das Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie und der darauf basierenden Entwicklung wirksamer Therapien sind Tiermodelle. Mit ihrer Hilfe lassen sich die komplexen pathologischen Veränderungen, wie sie bei MA entstehen, unter standardisierten Bedingungen nachvollziehen. Die wichtigsten Modelltiere in der MA-Forschung stellen Mäuse dar, unter anderem (u.a.) aufgrund ihrer kurzen Lebensspanne, der Möglichkeit weitreichender gentechnischer Manipulationen und weil eine standardisierte Haltung möglich ist. Bisherige Mausmodelle eignen sich jedoch nur bedingt, da es oft nur einen sehr schwachen qualitativen Trend zwischen quantifizierten A β -Spiegeln und experimentellen Messungen der kognitiven Funktion gibt. Und die Tiere, bevor sie sinnvoll eingesetzt werden können, ein hohes Alter erreicht haben müssen, in dem sich die neuronalen Schäden entwickeln konnten. Dieser Zeitfaktor stellt eine wichtige Einschränkung bestehender Modelle für die Forschungsgeschwindigkeit dar. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an, die die Optimierung eines Modells beschreibt, dessen Vorteil in der schnellen Reproduzierbarkeit kognitiver Defizite unter Verwendung von Standard-Labormäusen liegt.

In dieser Dissertation soll eine umfassende funktionelle und laboranalytische Charakterisierung der Untersuchungszeitpunkte dieses Modells durchgeführt werden, um deren zukünftige praktische Anwendbarkeit/Bedeutung abzuschätzen. So kann dieser Ansatz unter Umständen dazu beitragen, aktuelle Fragestellungen im Zusammenhang mit frühen Symptomen von MA zeitnah zu bearbeiten. Dadurch kann sich zu einem die Wartezeit, bis die Tiere das entsprechende Alter mit pathologischen

Läsionen erreicht haben, verkürzen. Und zum anderen könnte eine Optimierung der Untersuchungszeitpunkte bei Nutzung dieses Modells einen großen Fortschritt den Tierschutz betreffend darstellen, da der enorme Aufwand in der Zucht hinsichtlich der Tieranzahl stark reduziert werden kann (Transgenträger < 50 %, Mortalitätsrate > 25 %).

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Morbus Alzheimer

1.1. Epidemiologie und Pathophysiologie

Demenz (lat. *dementia*: unvernünftig, ohne Verstand), in etwa mit einem „Nachlassen der Kraft des Verstandes“ zu übersetzen, ist ein bei unterschiedlichen degenerativen und nicht-degenerativen Erkrankungen des Gehirns auftretendes Syndrom. Dabei können emotionale, kognitive und/oder soziale Fähigkeiten betroffen sein, was sich u.a. in Form von Störungen des Kurz- und Langzeitgedächtnisses, des Sprach- und Denkvermögens oder der Motorik äußert. Dies führt bei der Mehrheit der Erkrankten allmählich zu deutlichen Einschränkungen in beruflichen wie sozialen Bereichen. Tabelle 1 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die unterschiedlichen Formen der Demenz, deren Häufigkeit, typische Symptome, diagnostische Möglichkeiten sowie deren Sensitivität (SEN) und Spezifität (SPE).

Tabelle 1: Häufige degenerative Demenzerkrankungen (nach SVITEK et al. (2008))

Ursache	Häufigk. in %	Typische Symptome	Spez. Diagnostik	SEN in %	SPE in %
Morbus Alzheimer	40 - 50	schleichendes Einsetzen Beginn mit KZG- und Orientierungsstörungen	Lumbalpunk- tion	0.8 - 0.9*	> 90
Vaskulär	15 - 20	plötzliches Auftreten oder schrittweise Verschlechterung	Magnetresonanz Tomographie, Ultraschall	0.6	0.8
Frontotemporale Demenz	5 - 10	Verhaltensstörung	keine	0.85	0.97
Lewy-Körperchen-Demenz	5	Parkinsonismus, visuelle Halluzinationen, Fluktuation	keine	0.78	0.85
Chorea Huntington	1 - 2	Bewegungsstörung	DNA	0.99	1
Kortikobasale Degeneration	< 1	Alien-limb-Zeichen	keine	0.33 - 0.40	0.99
Progressive supra-nukleäre Parese	< 1	vertikale Blickparese nach unten, Stürze nach hinten	MRT	0.83	0.93

Nach SVITEK et al. (2008), modifiziert nach Frölich, Kompetenznetz Demenzen. (KZG = Kurzzeitgedächtnis, DNA = engl. Deoxyribonucleic Acid, dt. Desoxyribonukleinsäure, MRT = Magnetresonanztomographie); * inkl. Liquordiagnostik

1.1.1. Epidemiologie

MA ist nach dem deutschen Psychiater und Neurologen Alois Alzheimer (1864 - 1915) benannt, der die Krankheit erstmals 1906 im Rahmen eines Vortrages wissenschaftlich beschrieb (ALZHEIMER, 1907). MA ist heute mit einem Anteil von 40 - 50 % die häufigste Demenzursache (siehe Tabelle 1) und mit 50 - 70 % sogar die häufigste Form der senilen Demenz (MASUHR et al., 2013). Bei einer jährlichen Inzidenz von ein bis zwei Prozent, leiden zum gegenwärtigen Zeitpunkt mehr als 47 Millionen Menschen weltweit an MA (PRINCE et al., 2016; WINBLAD et al., 2016). Neben genetischen Faktoren, die vor allem (v.a.) bei der Ausbildung von MA in vergleichsweise jungen Jahren eine maßgebliche Rolle spielen (weniger als fünf Prozent der Erkrankungen, HERRUP (2010)), gilt heute das Alter als Hauptrisikofaktor für die Entstehung von MA (GARCIA-MATAS et al., 2010). Denn intrazerebrale Ablagerungen von Amyloid-Beta (A β), sog. Amyloidosen, entwickeln sich bei Alzheimer-Patienten altersabhängig, wobei sie bereits im dritten oder vierten Lebensjahrzehnt bei einigen Probanden auftreten und mit zunehmendem Alter steigen (BATEMAN et al., 2012; DE-PAULA et al., 2012). Liegt die Prävalenz von MA bei den über 70-jährigen noch bei 1.5 %, verdoppelt sie sich in den Folgejahren ca. alle fünf Jahre und steigt bei den über 90-jährigen auf mehr als 60 % an (JELLINGER, 2005; PRINCE et al., 2016). Somit ergab sich für Deutschland eine geschätzte Krankenzahl von knapp 1.6 Millionen Menschen (1,9 Prozent der Bevölkerung) für das Jahr 2018 (DEMENTIA IN EUROPE YEARBOOK, 2019), wobei die Prävalenz bei Frauen mit 10.5 % aufgrund der längeren Lebenserwartung und der Abnahme des Östrogenspiegels in den Wechseljahren wesentlich höher ist als bei Männern (7.6 %) (DEUTSCHE ALZHEIMER GESELLSCHAFT E.V., 2018). Richtet man den Blickwinkel rein auf die demographische Entwicklung in Deutschland mit einer fortwährend wachsenden Lebenserwartung, prognostizierte Experten von Alzheimer Europe eine Verdoppelung der an MA erkrankten Menschen bis zum Jahr 2050 auf insgesamt etwa 2,7 Millionen im Jahr 2050 (3,4 Prozent der Bevölkerung) (DEMENTIA IN EUROPE YEARBOOK, 2019). Wider Erwarten zeigten Studien jedoch, dass das Erkrankungsrisiko nicht in dem angenommenen Maße gestiegen ist (NORTON et al., 2014; LUCK und RIEDEL-HELLER, 2016). Als Grund für die leicht rückläufige Erkrankungswahrscheinlichkeit

nimmt man die sich stetig verbessernden Lebensbedingungen mit einer tendenziell gesunderen Ernährung, einer intensiveren medizinischen Versorgung, eine höhere Aktivität im Alter und eine zunehmende Bildung der Bevölkerung an (LUCK und RIEDEL-HELLER, 2016). Nichtsdestoweniger bedeuten die sich in den kommenden Jahren rasch verschiebende Alterspyramide, mit einer Bevölkerungsstruktur, bei der immer mehr ältere Menschen hinzukommen und die mit der Behandlung verbundenen steigenden Gesundheitskosten dieser Krankheitsgruppe, ein sozialmedizinisches und gesundheitspolitisches Problem von hoher Priorität (JELLINGER, 2005).

1.1.2. Ursachen und Pathophysiologie

Nach heutigem Kenntnisstand werden unterschiedlichste Ursachen für MA postuliert. Wobei genetische Veränderungen eine große Rolle zu spielen scheinen:

Tatsächlich machen genetische Faktoren bis zu 80 % des zurechenbaren Risikos bei häufigen MA-Formen aus (GATZ et al., 2006). Bisher ist die vergleichsweise seltene erbliche Form, bei der MA familiär gehäuft bereits deutlich vor dem 60. Lebensjahr auftritt, am besten untersucht und bekannt. Hier kommt es durch diverse Mutationen im Erbgut zu Veränderungen im Stoffwechsel des Amyloid-Vorläufer-Proteins (engl. β -Amyloid-Precursor-Protein, APP).

Dieses Protein spielt im Rahmen von MA eine entscheidende Rolle für die Krankheitsentstehung und den Krankheitsverlauf (unter 1.1.3 detaillierter beschrieben). Mutationen dieses Proteins scheinen qualitativer Natur zu sein: sie erhöhen nicht die Bildung von dem im Rahmen eines MA vermehrt auftretendem pathologischem $A\beta_{42}$ gegenüber dem weniger hydrophoben $A\beta_{40}$, aber sie beeinflussen das Verhältnis zwischen beiden Varianten zugunsten von $A\beta_{42}$ (HAASS und SELKOE, 2007; LEWCZUK et al., 2018). $A\beta_{42}$ hat eine hohe Aggregationstendenz, trägt damit zur Bildung der Plaques bei und weist eine deutliche Neurotoxizität auf. Ein durch Mutationen im APP-Gen auftretendes Ungleichgewicht wirkt sich damit vermutlich unmittelbar auf die MA-Entwicklung aus.

Aktuell sind drei Gene sehr gut untersucht, die autosomal dominant vererbt werden und deren Mutationen mit der Entstehung des früh einsetzenden MA in Verbindung gebracht werden (SCHELLENBERG und MONTINE, 2012):

1. 32 Mutationen das APP-Gen betreffend (Chromosom 21, kodiert für das APP).
2. Im Chromosom 14, kodiert für die Sekretase Präsenilin 1 (PS1-Gen) konnten 179 Mutationen ausgemacht werden.

3. Im Chromosom 1, für Präsenilin 2 (PS2-Gen) konnten weitere 14 Mutationen identifiziert werden (O'BRIEN und WONG, 2011) welche zur Proteolyse von selbigem zugunsten von A β ₁₋₄₂ führen.

Zu 2. und 3.: Bei Präsenilin handelt es sich vermutlich um die katalytische Untereinheit eines Sekretasekomplexes, der die Spaltung von APP beeinflusst (HAASS und SELKOE, 2007). Insgesamt sind die Mutationen in diesen drei Genen jedoch mit einer geschätzten Gesamtprävalenz von < 1 % so selten, dass die meisten MA-Fälle genetisch ungelöst bleiben (VAN CAUWENBERGHE et al., 2016).

Neben diesen genetischen Komponenten, einer positiven Familienanamnese, sowie dem Vorhandensein des APOE ϵ 4-Allels (FRATIGLIONI et al., 1993) birgt das fortgeschrittene Alter das häufigste Erkrankungsrisiko für eine Demenz vom MA-Typ, gefolgt von weiblichem Geschlecht, niedrigem Bildungsniveau, geringer geistiger, körperlicher und/oder sozialer Aktivität, kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 (beziehungsweise insgesamt schlechte medizinische Versorgung) (LEWCZUK et al., 2018). D.h. auch weitaus häufiger als genetisch bedingter MA sind die sporadisch auftretenden Krankheitsfälle, die ca. 99 % aller Alzheimerfälle ausmachen (VAN CAUWENBERGHE et al., 2016).

Summa summarum wird das Zusammenwirken der genannten Umwelteinflüsse während der kompletten Lebensspanne, gepaart mit einer eventuellen genetischen Grundvoraussetzung heute als mögliche, multifaktorielle Ursache gesehen. Intensive Forschung hat zusätzlich gezeigt, dass oft Ko-Pathologien, mit enormen Komplexitäten von multiplen pathologischen Substanzen, in Form von bspw. Hippokampus-Sklerose, Lewy-Körperchen, Neuroinflammation, Nicht-MA-Tauopathie und zerebrovaskuläre Erkrankungen ursächlich ebenfalls an der Entstehung von MA beteiligt sind / sein können (RABINOVICI et al., 2017). Darauf basierend, wird MA aktuell als eine multifaktorielle, genetisch und physiologisch äußerst komplexe Erkrankung angesehen (BEKRIS et al., 2010). Dementsprechend vielfältig und kompliziert stellt sich auch die Pathophysiologie dieser Erkrankung dar. Alle Formen von MA zeichnen sich generell durch eine Veränderung im A β -Metabolismus aus (Abbildung 1). Infolgedessen kommt es zu einem kaskadenartigen Verlauf, gekennzeichnet durch insgesamt drei verschiedene charakteristische Neuropathologien:

- intrazellulär liegende neurofibrilläre Bündel (engl. neurofibrillary tangles, NFTs),
- extrazellulär liegende senile Plaques,

- Verlust von Neuronen (BUTTERFIELD und LAUDERBACK, 2002; SELKOE und SCHENK, 2003).

Die zwei am besten erforschten Hauptläsionen bei MA sind die extrazellulären senilen Plaques (Punkt II.1.1.3) und NFTs (Punkt II.1.1.4). Im Folgenden werden beide Veränderungen zunächst einzeln beschrieben, bevor danach ihr Zusammenwirken näher erläutert wird (Punkt II.1.1.5).

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese bei Morbus Alzheimer

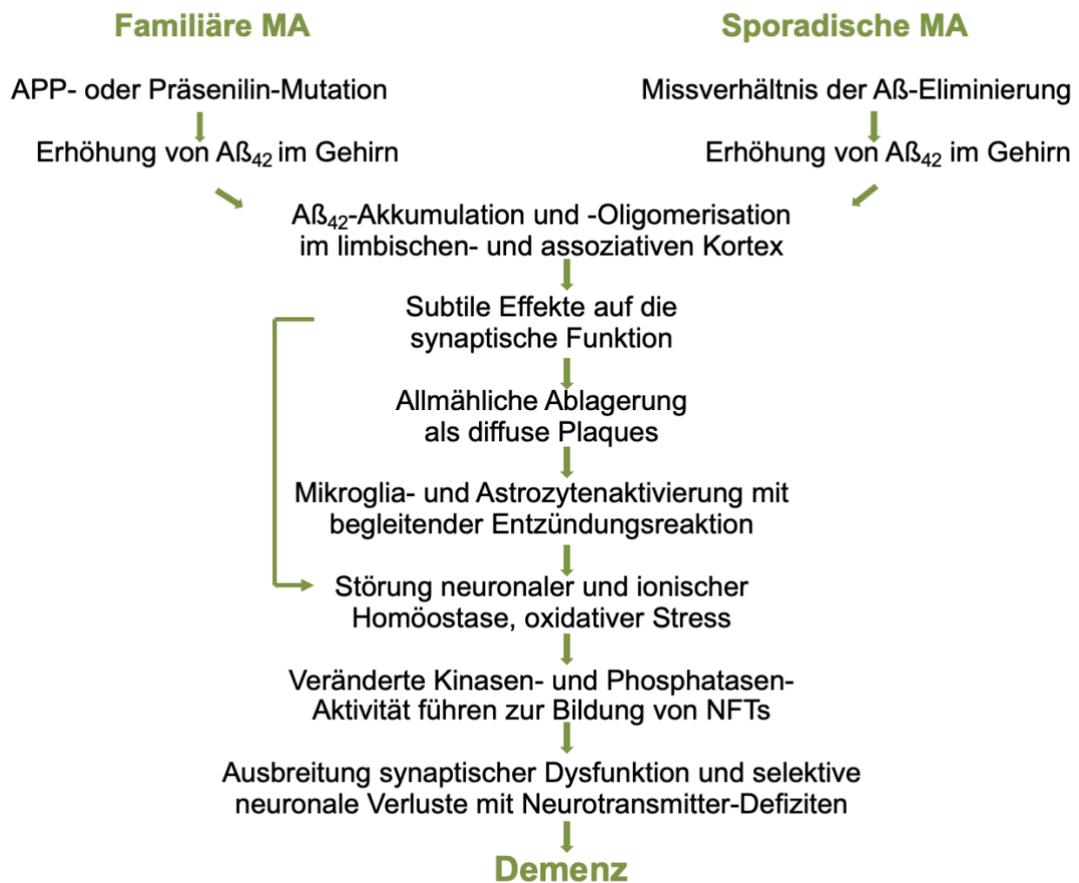


Abbildung 1: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese bei MA (modifiziert nach HERRUP (2010))

Sie stellt die klassische Theorie zum Ursprung von MA dar. Beide Formen, des familiär- und die sporadisch auftretenden MA führen zu Veränderungen im Aβ-Metabolismus. Dieses toxische Aβ₄₂-Peptid löst eine Kaskade von pathologischen Mechanismen aus, die die Symptome von MA verursachen und schlussendlich zur Demenz führen.

1.1.3. Amyloid-Beta (A β)-Peptid

Die sich extrazellulär ablagernden Plaques bestehen aus A β -Peptid, einem Spaltprodukt des APP. APP wird physiologischer Weise im Gehirn und in den verschiedensten Körperzellen synthetisiert und als Typ I-Membranprotein mit einer großen extrazellulären Domäne (A β -Domäne) und einer kurzen zytoplasmatischen Region auf der Oberfläche dieser Zellen exprimiert (SPRECHER et al., 1993). Das membranständige APP kann auf zwei Wegen proteolytisch durch Proteinspaltende Enzyme entstehen, welche in Abbildung 2 schematisch dargestellt sind:

1. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung, dem physiologischen Weg, wird APP innerhalb der A β -Domäne von der Alpha (α)-Sekretase unter Bildung einer großen löslichen Ektodomäne (sAPP α) und eines membranassozierten karboxyl-terminalen Fragments in eine Länge von 83 Aminosäuren (CTF83) gespalten. Die nachfolgende Gamma (γ)-Sekretase, ein in eine Membran eingebetteter Komplex mit Präsenilin als katalytischer Komponente, spaltet das CTF83-Fragment weiter in die löslichen Bruchstücke A β -Peptid (P3) und die sog. APP Intrazelluläre Domäne (engl. APP Intracellular Domain, AICD). Dieser Weg verhindert so die Bildung von unlöslichen A β -Peptiden.

2. Zusätzlich zu diesem physiologischen Abbau von APP gibt es die derzeit als pathologisch relevant eingestufte, amyloidogene Prozessierung. Hier erfolgt ebenfalls eine Spaltung des APP durch zwei Spaltungsereignisse. Bei MA erfolgt dies allerdings durch die Beta (β)-Sekretase statt der α -Sekretase, in der extrazellulären Domäne am N-Terminus. Dadurch wird eine lösliche Ektodomäne (sAPP β) und ein membranständiges karboxyl-terminales Fragment (CTF99) erzeugt. Anschließend setzt die γ -Sekretase im 2. Spaltungsvorgang in der Transmembranregion neben AICD wieder A β -Peptide frei. Da die Stelle der γ -Sekretase-Spaltung willkürlich ist, werden A β -Peptide mit verschiedenen C-Termini erzeugt, darunter A β_{1-40} (A β_{40}) und A β_{1-42} (A β_{42}) und in den Extra-zellularraum abgegeben (WIRTHS und BAYER, 2009). Unter physiologischen Bedingungen ist A β_{40} die am häufigsten erzeugte Variante im amyloidogenen Signalweg. A β_{42} macht normalerweise lediglich zehn Prozent des gesamten A β aus. Allerdings spielt A β_{42} eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von MA und wird als schädliches Peptid angesehen. Sein neurotoxisches Potenzial ergibt sich aus seinen biochemischen Eigenschaften, da A β_{42} eher zur Bildung von unlöslichen Oligomeren neigt und Protofibrillen fördert, die sich in senilen und neuritischen Plaques ansammeln. Diese Prozesse zusammen mit einer Verringerung der A β -Clearance aus dem Gehirn,

stehen wiederum in der Diskussion für die neurokognitiven Defizite verantwortlich zu sein (BRINET et al., 2017). Die Aktivierung der neurotoxischen Kaskaden gipfelt in Zytoskelett Veränderungen, neuronale Dysfunktion und Zelltod.

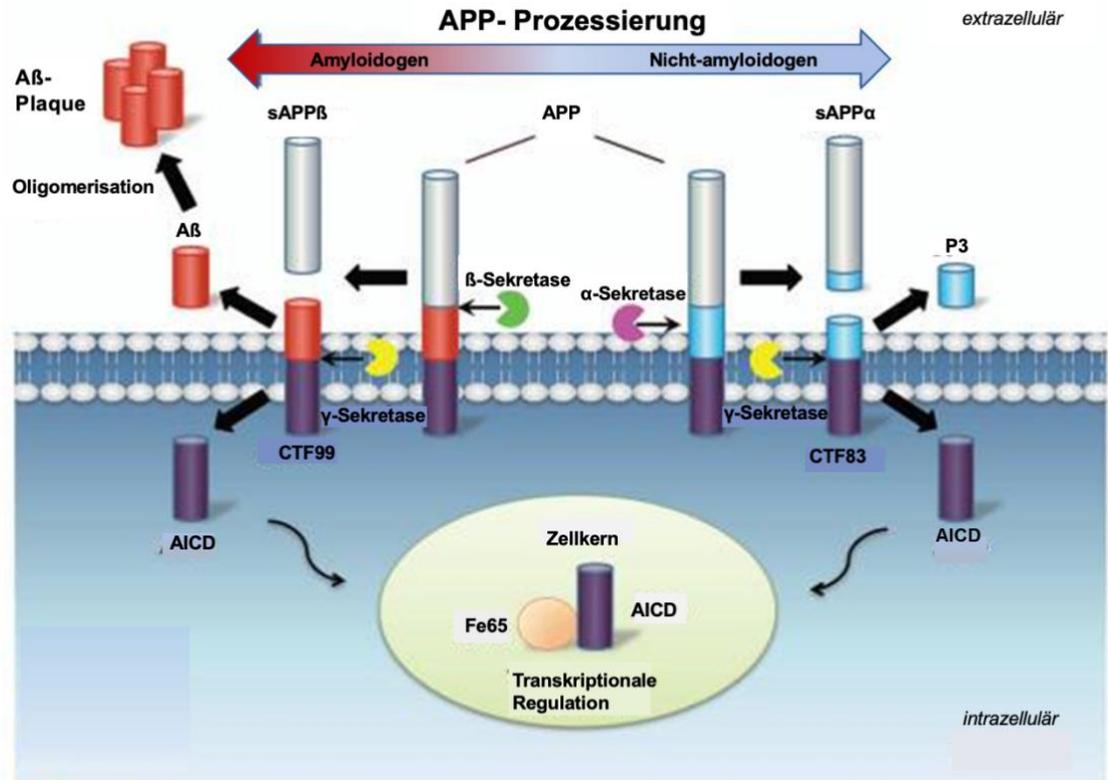


Abbildung 2: Amyloide und nicht-amyloide APP-Prozessierung (Abb. modifiziert nach ZHOU et al. (2014))

Vor Kurzem wurde ein dritter Weg der APP-Spaltung entdeckt. Dabei spaltet die Eta (η)-Sekretase APP an den Aminosäuren 504 -505. Durch die zweite Spaltung mit α - bzw. β -Sekretase bilden sich die karboxyl-terminalen Fragmente $A\eta\text{-}\alpha$ und $A\eta\text{-}\beta$. $A\eta\text{-}\alpha$, enthält das $A\beta_{16}$ -Peptid in seiner Sequenz und soll ebenfalls neurotoxisch wirksam sein (WILLEM et al., 2015).

Im weiteren Verlauf von MA erfolgen Abbau und Abtransport der Bruchstücke dann nicht effektiv genug, sodass ein Ungleichgewicht zwischen einer erhöhten Produktion bei gleichzeitig nicht ausreichendem Abtransport der unlöslichen $A\beta$ -Peptide besteht. Dieser Prozess wird als Hauptursache für eine Akkumulation im Gehirn interpretiert (KUMMER und HENEKA, 2014; TAKAHASHI et al., 2017). Zunächst werden $A\beta$ -Monomere in die Zellmembran eingebettet. Die Aggregate induzieren hier die Permeabilisierung der Zellmembranen durch unspezifische Bindungen und spezifische

Wechselwirkungen mit Rezeptoren. Als Folge durchlaufen sie eine Konformationsänderung. A β bildet charakteristische 3D-Strukturen, die die Ionenkanalaktivität unterstützen und damit die zelluläre ionische Homöostase destabilisieren (LAL et al., 2007; DE et al., 2019). So bald A β die Membran verlässt, neigt es zur Bildung kurzer, nicht nativer β -Faltblatt-Konformationen. Diese Struktur ist die vorherrschende von den neurotoxischen Oligomeren und Fibrillen, die ebenfalls den pathogenen Faktor bei MA bestimmen. Der Hauptbestandteil der später entstehenden Plaques im Gehirn der Patienten sind diese β -Peptide (LAL et al., 2007). Die Ablagerung der Proteine folgt einem bestimmten räumlichen Muster, welches vereinfacht in Abbildung 4 dargestellt ist (MARQUISE DE PERS, 2010).

Die aggregierten und abgelagerten A β -Peptide führen durch die Induktion synaptischer und mitochondrialer Dysfunktionen zu pathophysiologischen Veränderungen innerhalb der Neurone:

- vermehrte Entstehung freier Sauerstoffradikale,
- verminderte oxidative Phosphorylierung und Adenosintriphosphat-Produktion,
- mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl. deoxyribonucleic acid, DNA) -Verarmung,
- Membrandepolarisation,
- und eine insgesamt reduzierte Mitochondrien Zahl (PARMAR et al., 2017).

Neben diesen synaptischen und mitochondrialen Dysfunktionen, die heute als Hauptursachen der neuronalen Toxizität im Zusammenhang mit MA angesehen werden, besitzt A β auch eine direkte zytotoxische Wirkung. Darüber hinaus wurde im Rahmen der Erforschung von MA zusätzlich eine erhöhte Apoptoserate und daraus resultierend vermehrt der Untergang von Neuronen beschrieben (OBULESU und LAKSHMI, 2014). Diese Verluste finden sich im Hippokampus (medial gelegener Abschnitt des Telencephalons (Großhirns)), in der Substantia innominata (Teil des basalen Vorderhirns), dem Locus coeruleus (Kerngebiet im Bereich der Pons) und dem temporoparietalen und frontalen Kortex (Teil des Frontallappens der Großhirnrinde (Kortex cerebri)) (PERL, 2010). Als Folge atrophieren diese Hirnregionen zunehmend.

1.1.4. Tau-Protein

Neben den bei einer MA auftretenden A β -Peptide spielt auch ein zweiter Mechanismus eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung und -progression: eine klassische neuropathologische Hauptveränderung des sogenannten Tau-Proteins. Das Tau-Protein ist im physiologischen Zustand ein 55 - 60 kDalton großes, niedermole-

kulares Protein und gehört zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (GRESSNER und ARNDT, 2012). Es bindet an die Mikrotubuli, die das Zytoskelett der Zelle bilden und stabilisiert sie dadurch. Somit ist es entscheidend für das Wachstum der Axone verantwortlich und letztlich ein wichtiger Faktor für die neuronale Plastizität (GENDRON und PETRUCELLI, 2009). Im menschlichen Organismus wird es in allen Zellkompartimenten der Neurone des zentralen Nervensystems exprimiert (ANDREADIS, 2012). Bei einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen kommt es jedoch zu einer nicht-physiologischen Verknüpfung von Tau zu unlöslichen Aggregaten, den sog. NFTs. Dieser Prozess ist von synaptischen Dysfunktionen und neuronalem Zelltod begleitet (sog. Tauopathie) (GUO et al., 2017). Daneben können noch zwei weitere Formen von Tau-Aggregationen vorkommen (Neuropilfäden und neuritische Flecken) die mit A β -Protein-Ablagerungen assoziiert sind und ebenfalls zu neuronalen Entartungen führen können (PERL, 2010).

Ausschlaggebend für die biologische Aktivität des Tau-Proteins ist der Grad seiner Phosphorylierung (JOHNSON und STOOHOFF, 2004). Um eine normale Tau-Funktionalität zu sichern, liegen physiologisch zwei bis drei mol Phosphat pro Mol Tau-Protein im Zytosol vor. Ein unphysiologisches Verhältnis von bis zu zehn mol Phosphat pro Mol Protein bedeutet jedoch eine Hyperphosphorylierung, die zu einer pathologischen Zusammenlagerung dieses dann hyperphosphorylierten Tau (P-Tau) führt (IQBAL et al., 2005). Bei allen neurodegenerativen Krankheiten, die mit Tau-Pathologien einhergehen, konnte bisher diese nicht-physiologische Phosphorylierung des Tau-Proteins nachgewiesen werden (LEE et al., 2001). In einer intakten Zelle würde das Tau-Protein normalerweise für die physiologisch notwendige Funktion der Mikrotubuli ständig wechselnd phosphoryliert oder dephosphoryliert vorliegen (siehe Abbildung 3) (MAZANETZ und FISCHER, 2007). Offenbar durch Aktivitätsungleichgewichte zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen kommt es zur pathologischen Hyperphosphorylierung (BUÉE et al., 2000). Phosphoryliertes Tau kann die Mikrotubuli nicht binden, sie stabilisieren und den axonalen Stofftransport gewährleisten. Stattdessen polymerisiert es in einem ersten Schritt mit weiteren Tau-Molekülen unter Bildung gerader Filamente und in einem weiteren Schritt unter Bildung von paarigen helikalen Filamenten (NFTs). Durch weitere Quervernetzungen werden diese unlöslich. Kann die betroffene Nervenzelle dies nicht mehr kompensieren, kommt es zum Erliegen des neuronalen Transportes und das Zytoskelett bricht zusammen, was letztlich die Degeneration des Neurons zur Folge hat (BUÉE et al., 2000; WANG et al.,

2007). Gleichzeitig beeinflusst P-Tau auch die A β -Bildung. Es verzögert dessen Zunahme, wodurch eine negative Rückkopplungsschleife entsteht. Dies erklärt, warum in späten Stadien der Krankheit P-Tau weiterhin NFTs bildet, während indes A β -Plaque-Akkumulationsplateaus auftreten (HUBER et al., 2018).

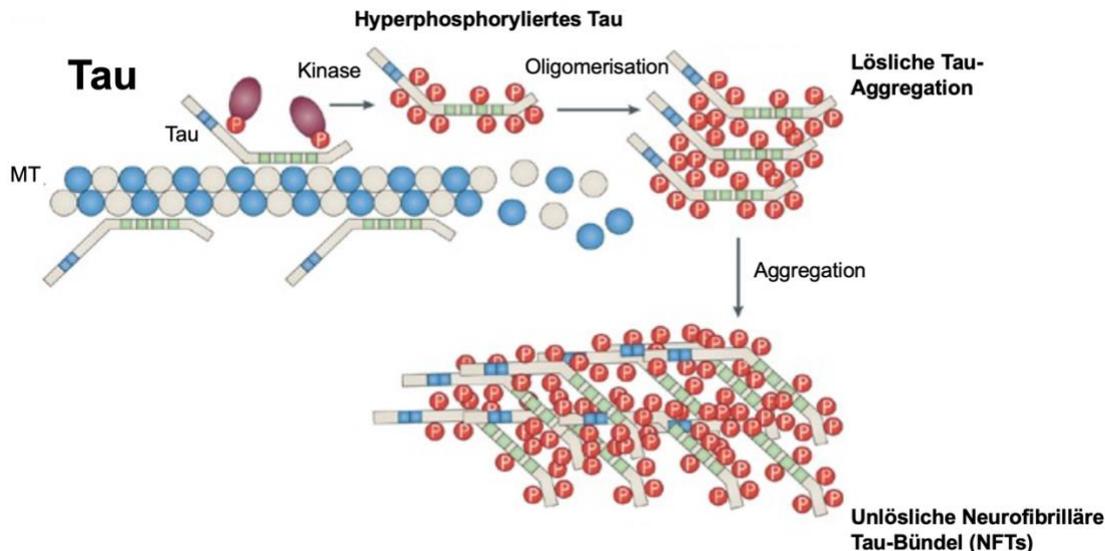


Abbildung 3: Tau-Phosphorylierung und Bildung von NFTs (modifiziert nach (GOTZ und ITTNER, 2008))

Hyperphosphoryliertes Tau dissoziiert von den Mikrotubuli (MT), wodurch diese depolymerisieren, während Tau in Aggregaten wie NFTs abgelagert wird.

Auch die Entstehung und Ablagerung von NFTs v.a. im Inneren von Neuronen als zweite klassische neuropathologische Hauptveränderung von MA folgt einem bestimmten zeitlichen und räumlichen Muster (siehe Abbildung 4). Interessanterweise korreliert während des Fortschreitens von MA die Dichte von NFTs mit dem Grad des regionalen und globalen kognitiven Niederganges und dient als ein guter Marker für den Krankheitsverlauf (BRAAK und BRAAK, 1998; PERL, 2010). Besonders häufig betroffene Bereiche des Gehirns sind Hippokampus, *entorhinaler* Kortex, Amygdala, die Assoziationskortex des frontalen, temporalen und parietalen Lappens und bestimmte *subkortikale* Kerne, die in diese Bereiche hineinragen (SELKOE und SCHENK, 2003). Bereits Mitte der 1990er Jahre wurde dies durch BRAAK et al. (1991), (1994) gezeigt, welche den Verlauf je nach Lokalisation und Ausmaß der Ablagerungen in sechs Stadien differenzierten (ausführliche Beschreibung der Stadien siehe Absatz II. 2.3 A β und Kognition).

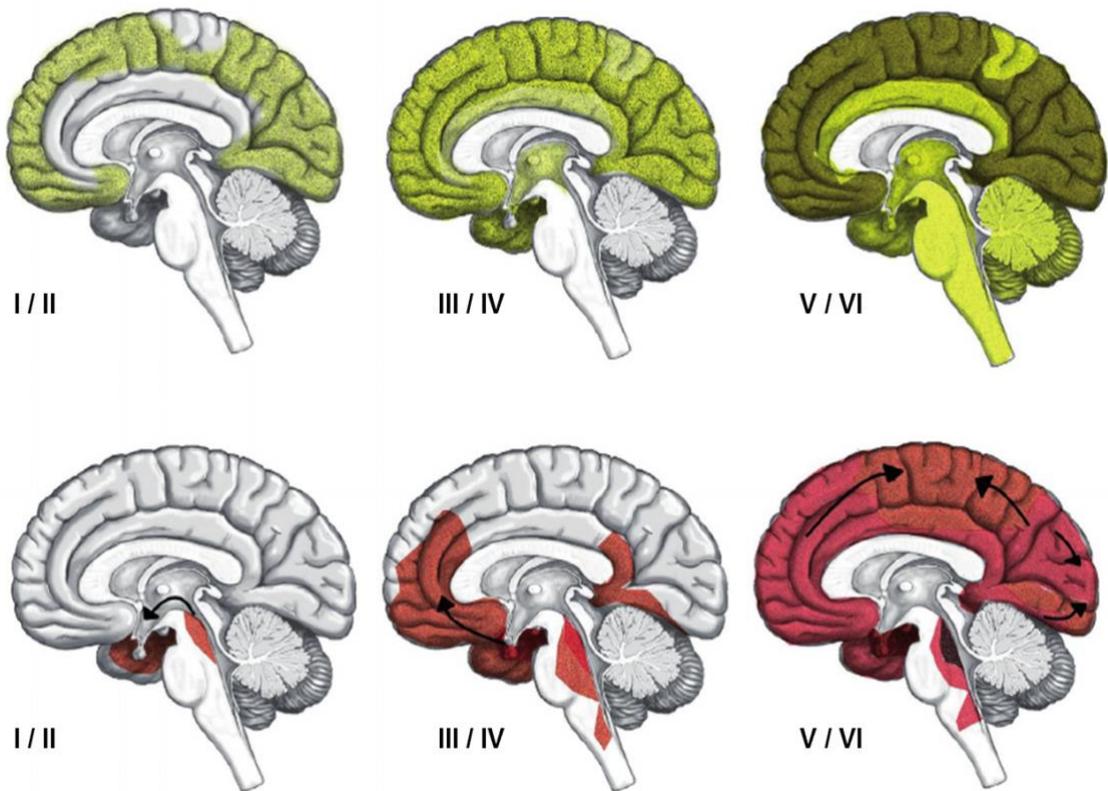


Abbildung 4: Neurofibrilläre Veränderungen im Kortex bei fortschreitendem MA und Braak-Stadien (CANDELA et al., 2013)

Die Ausbreitung der Pathologie bei MA wird durch farbliche Markierung von Amyloid-Plaques (grün) und neurofibrillären Bündeln (rot) an einem paramedianen, sagittalen Schnitt durch die Hirnhemisphäre gezeigt. Die zunehmende Schwere dieser Modifikation wird durch vergrößerte Dichten der Farbgebung gekennzeichnet. Amyloid-Plaques erscheinen im Neokortex und breiten sich in die subkortikalen Bereiche aus. Neurofibrilläre Bündel hingegen treten zuerst im Locus coeruleus und im transentorhinalen Bereich auf, um sich schließlich bis in die Amygdala und miteinander verbundene neokortikale Hirnregionen auszubreiten.

Sowohl NFTs als auch NTs treten in den Braak-Stadien I/II (transentorhinales Stadium) zuerst im *Locus coeruleus*, im *entorhinalen Kortex* und in der Hippokampus-Formation auf. Diese Pathologie ist allein mit einer geringen oder keiner kognitiven Beeinträchtigung verbunden. Im weiteren Verlauf des Braak-Stadiums III/IV mit milden bis mäßig Veränderungen, die die Bereiche des Hippokampus, den neokortikalen Bereich sowie den präfrontalen (präf.) Kortex betreffen (limbisches Stadium), treten Symptome auf. In den Braak-Stadien V/VI werden die Amygdala und miteinander verbundene neokortikale Hirnregionen beeinflusst. Erst hier (neokortikales Stadium) entwickeln sich vollständig, definierte Symptome (KOSS et al., 2016). Nur das primär-motorische Areal, das primär-sensible Areal und der sekundäre auditive

Kortex bleiben mehr oder weniger verschont. Jedoch bleiben die Ursachen und molekularen Mechanismen, denen die Verteilung der pathologischen Tau-Aggregationen unterliegen, noch größtenteils unbekannt (MARTIN et al., 2011).

1.1.5. Zusammenwirken von Amyloid-Beta (A β)-Peptid und Tau-Protein

Nach der sog. Amyloid-Hypothese, welche 2005 von JELLINGER et al. (2005) aufgestellt wurde, ist der erste Schritt von MA der fehlerhafte Abbau des APP, während die Entstehung des P-Tau durch Störungen im A β -Metabolismus erklärt wird. MA gilt somit als „sekundäre“ Tauopathie, wobei man darunter eine neurodegenerative Erkrankung mit neurofibrillären Tau-Ablagerungen im Gehirn versteht (SIMIC et al., 2016). In den letzten 10 Jahren konnten Hinweise gesammelt werden, dass sowohl lösliche Formen von A β als auch Tau-Protein notwendig sind, um gesunde Neurone in einen erkrankten Zustand zu bringen und das für die neurotoxische Wirkung des A β -Peptides auch die Anwesenheit des Tau-Proteins notwendig ist (BLOOM, 2014):

- Die Pathologie, die in transgenen Tauopathie-Mausmodellen gefunden wurde, wird durch erhöhte A β -Spiegel intensiviert (GOTZ et al., 2001; LEWIS et al., 2001; BOLMONT et al., 2007).
- Die A β -Pathologie wird vor der Tau-Pathologie nachgewiesen, was auf die Möglichkeit einer kausalen Beziehung beider Substanzen hindeutet (ODDO et al., 2003; SANTACRUZ et al., 2005), jedoch kann in den Mausmodellen kein schweres kognitives Defizit beobachtet werden, bis die Tau-Pathologie nachgewiesen wird (BILLINGS et al., 2005).
- Mediator-Rolle von Tau: die Anwesenheit von neurofibrillären Tau-Bündeln ist ein starker Indikator dafür, ob die A β -Pathologie mit den kognitiven Defiziten korreliert (BENNETT et al., 2004).

Zusammenfassend dargestellt nimmt man heute die Amyloid-Hypothese als Beginn der pathologischen Prozesse von MA (HARDY und SELKOE, 2002) an, für den weiteren Fortschritt von MA aber ist die Anwesenheit von P-Tau erforderlich (ITTNER et al., 2010).

1.2. Diagnostik

Auch nach Jahrzehnten der intensiven Forschung gibt es keine verlässliche, standardisierte Methode, um zu Lebzeiten MA sicher klinisch diagnostizieren zu können. Als „Goldstandard“ und sicherstes Verfahren gilt auch heute noch die *post mortem* durchgeführte, histologische Aufarbeitung und der Nachweis von A β -

Ablagerungen zusammen mit Anzeichen einer Neurodegeneration im Gehirn, entweder durch Biopsie, Autopsie oder Positronenemissionstomographie (SILVERBERG et al., 2018). Im Zusammenhang mit Anzeichen einer Neurodegeneration treten diese bereits viele Jahre vor den klinischen Symptomen auf (FAGAN et al., 2014). Somit ist eine nahezu gesicherte Diagnosestellung und die Differenzierung von anderen Demenzformen bei Betroffenen immer erst zu einem Zeitpunkt möglich, zu dem schon längst irreversible Schäden vorliegen (EWERS et al., 2011; AMIEVA et al., 2014). Denn obwohl die histologischen Merkmale gut bekannt sind, sind definierte Kriterien für die morphologische Bestimmung von MA aufgrund des Fehlens von spezifischen Markern und der phänotypischen Heterogenität der Krankheit schwierig (JELLINGER, 1998).

Für die Diagnose zu Lebzeiten und anschließende Therapieversuche bei MA ist es von äußerster Wichtigkeit, sowohl den Schweregrad der Symptome als auch die zugrundeliegende Ursache für das Symptombild zu diagnostizieren, denn diese bestimmen entscheidend Prognose und Behandlungsverlauf. Je nach Schweregrad kann die Therapie schwanken. Zunächst muss differenziert werden zwischen einer leichten kognitiven Störung, einer Demenz oder eines temporären Verwirrheitszustandes, da nur so frühestmöglich mit dem Einsatz zugelassener, spezifischer und wirksamer Medikamente/Interventionen begonnen werden kann. Zudem hat jeder Patient ein Recht auf einen Entwurf eines langfristig angelegten, individuell abgestimmten Versorgungsplanes.

Des Weiteren gilt es zu klären, ob behebbare Ursachen, wie sie oft bei nicht-degenerativen oder sekundären Demenzerkrankungen auftreten, vorliegen oder nicht. Sekundäre Demenzerkrankungen können Folge einer anderen organischen Erkrankung, einer Gehirnverletzung oder eines Hirntumors sein. Bei nicht-degenerativen Ursachen, ausgelöst durch bspw. Depressionen, bestimmten Medikamenten, Infektionen, Mangelzuständen oder Abflussstörung des *Liquor cerebrospinalis* (engl. cerebrospinal fluid, CSF) ist die Prognose normalerweise besser zu bewerten als bei degenerativen Ursachen (wie Vaskuläre-, Frontotemporale-, Lewy-Körperchen-Demenz, Chorea Huntington etc.).

Um zur korrekten Diagnose zu gelangen, ist ein strukturierter Diagnoseweg notwendig: Üblicherweise erfolgt für die Differenzierung der verschiedenen Krankheiten als erstes eine sorgfältige Anamneseerhebung und eine körperliche Untersuchung gefolgt von neurophysiologischen Tests oft nach den Richtlinien des sog. „Consortium to Establish

a Registry for Alzheimer's Disease" (CERAD-Testbatterie) mit sieben Untertests (MORRIS et al., 1989). Weiterhin sind heutzutage möglich:

- klinisch-chemische Labortests,
- bildgebende Verfahren des Gehirns mittels Computertomographie,
- Magnetresonanztomographie (MRT),
- Positronenemissionstomographie (PET),
- bis hin zu CSF-Untersuchungen und genetischen Analysen.

Mit Hilfe der bildgebenden Verfahren lassen sich die Veränderungen im Gehirn lokalisieren. Hierbei werden die charakteristischen Gewebsverluste in Folge der neuronalen Degeneration gemessen (FOX et al., 1996). Nachteilig ist, dass die mit dieser Degeneration einhergehenden Unterschiede im Gehirnvolumen erst in einem späten Stadium der Krankheit beobachtet werden. Im Rahmen der genannten CSF-Untersuchungen, die mit der Überarbeitung der MA-Diagnosekriterien vom National Institute on Aging and Alzheimer Association (NIA-AA) seit 2018 als Alternative für die Messung der Amyloidkonzentration vorgeschlagen werden (MULLER et al., 2019), besteht heutzutage die Möglichkeit des Nachweises von Biomarkern wie:

- erhöhte Tau-Protein-Spiegel,
- erniedrigter A β -Protein-Spiegel im *Liquor*,
- ein positiver Amyloid-Nachweis,
- erniedrigte Fluordesoxyglukose-Aufnahmen im PET,
- sowie nachweisbare Atrophie des Temporallappens und des parietalen Kortexes mittels MRT (KANG et al., 2014).

Die meisten dieser Biomarker können im CSF nachgewiesen werden, da dieser fortwährend in unmittelbarem Kontakt mit dem Extrazellulärraum des ZNS steht. Daher konzentrieren sich heutzutage intensivste Forschungsanstrengungen auf die Analyse des CSF. Dazu haben die wissenschaftlichen Fachgesellschaften Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde und die Deutsche Gesellschaft für Neurologie unter Mitwirkung der Deutschen Alzheimer Gesellschaft eine einheitliche Leitlinie publiziert (DEUSCHL und MAIER, 2016), die „in der Erstdiagnostik einer Demenz, die *Liquordiagnostik* zum Ausschluss einer entzündlichen Gehirnerkrankung“ empfiehlt (DEUSCHL und MAIER, 2016). Sie schafft die Voraussetzung für eine frühe Identifizierung von MA bei Patienten mit leichter kognitiver Beeinträchtigung (engl. mild cognitive impairment, MCI). Für diese CSF-Gewinnung ist allerdings ein invasiver Eingriff in Form einer Lumbalpunktion notwendig (HANSSON et al., 2006). Zudem

gibt es immer noch Abweichungen in den Angaben zur diagnostischen Genauigkeit der CSF-Analyse (MATTSSON et al., 2009).

Für MA charakteristische CSF-Veränderungen beinhalten erhöhte Konzentrationen von Gesamt-Tau-Protein und phosphoryliertem Tau und verringerte Mengen von A β ₄₂. Dieselben Veränderungen zeigen aber auch Patienten mit MCI mit und ohne Progression der Symptome oder andere Patienten, die schließlich abweichende Arten von Demenz entwickeln. Allerdings bedeutet die Kombination der beiden Einzelparameter P-Tau und A β ₄₂ bereits schon heute eine SEN von 95 % und eine SPE von 83 % bei der Diagnosestellung eines beginnenden MA (HANSSON et al., 2006). Die Bestimmung weiterer Parameter und deren Kombination z.B. von „Gesamt-“ oder total Tau (Isoformen des Tau-Proteins) und des Quotienten A β ₄₂/Tau phosphoryliert bei Threonin 181 (P-Tau₁₈₁) liefert ähnliche Werte (SEN 95 %, SPE 87 %) (HANSSON et al., 2006). Somit liefert die Kombination dieser Parameter aktuell die besten Werte für die präziseste Diagnosestellung eines MA und kann darüber hinaus die Kosten in der Arzneimittelentwicklung durch eine angepasste, krankheitsmodifizierte Therapie reduzieren (STRUYFS et al., 2015).

1.3. Prävention

Heutige präventive Maßnahmen zielen auf das Vermeiden beziehungsweise (bzw.) auch Herausögern der ersten Symptome durch Risikoreduzierung der modifizierbaren Faktoren ab. Wobei eine breit gefächerte Definition, die immer noch nicht genau bekannten Ursachen bzw. das immer noch lückenhafte Verständnis der präzisen Mechanismen der Krankheitsentstehung, die Trennung zwischen Präventions- und Behandlungsstrategien nur unpräzise zulassen. Ferner unterscheidet man heute die Primärprävention, die das Auftreten von MA verhindern soll mittels allgemeiner Empfehlungen, wie die Aufrechterhaltung einer guten Gesundheit. Die Sekundärprävention versucht zu verhindern, dass die Krankheit in sehr frühen oder präklinischen Phasen in eine manifeste Erkrankung übergeht und die Tertiärprävention schließlich konzentriert sich auf das Management einer bereits bestehenden Manifestation und deren Komplikationen sowie auf die Maximierung der Lebensqualität (SOLOMON et al., 2014).

Aus den Beobachtungen der Risikofaktoren für MA leiten sich die einzigen heute verfügbaren Präventionsmaßnahmen ab:

- regelmäßig geistige und körperliche Fitness (Risikoreduktion bis 15 % und 50 %) (BLONDELL et al., 2014),

- gesunde und ausgewogene Ernährung, entsprechend der mediterranen Küche (Risikoreduktion um 40 % möglich) (ANASTASIOU et al., 2017),
- soziale Kontakte (bis zu 50 % Wahrscheinlichkeitsreduktion für späteren MA) (WILSON et al., 2007),
- medizinische Vorsorge,
- rechtliche Vorsorge.

1.4. Therapie

Es gibt gegenwärtig keine kausale Therapie, die das Fortschreiten der Krankheit stoppen kann, eine Heilung ist nicht möglich. Dennoch stehen eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, die den Verlauf von MA verlangsamen können (GIANNOPOULOS et al., 2018). Daher orientiert sich die Behandlung der Krankheit im Wesentlichen an drei Zielen:

- Stabilisierung der Hirnleistungsstörungen,
- Besserung der Alltagskompetenzen,
- Verminderung der Verhaltensauffälligkeiten (VODERHOLZER und HOHAGEN, 2017).

Neben der medikamentösen Haupttherapie (Punkt II.1.4.1) zur Aufrechterhaltung von Gedächtnisleistungen und der nicht-medikamentösen Behandlung (Punkt II.1.4.2) in Form von psychosozialen Interventionen, ist v.a. eine begleitender Therapie, die aus dem möglichst langen Erhalt der körperlichen Fitness besteht, wichtig (BLONDELL et al., 2014). Die Behandlung von zusätzlich auftretenden körperlichen Beschwerden und Krankheiten ist der zweite große Block der indirekten Alzheimer-Therapie. Nach wie vor gibt es aber keinen Goldstandard für die Messung der Lebensqualität von Alzheimer-Patienten, folglich müssen und sollten die Angehörigen in die Therapieplanung mit einbezogen werden. Abbildung 5 (Seite 23) gibt eine Zusammenfassung über mögliche Ansatzstellen für Therapien im Rahmen einer MA-Behandlung.

Das aktuelle Hauptproblem liegt aber im Fehlen eines verlässlichen, breit einsetzbaren Frühdiagnoseverfahrens. Die Hoffnung liegt v.a. in der Identifizierung veränderter A β - und Tau-Spiegel im ZNS oder anderen Bereichen des Körpers, auf der aufbauend eine therapeutische Behandlung abgestimmt werden kann (BARBER, 2010).

1.4.1. Medikamentöse Behandlung

Die Modulation von Neurotransmittern steht im Mittelpunkt der Behandlung von degenerativen Demenzerkrankungen. Denn einerseits kommt es durch Schädigung im tiefen Vorderhirn zu Funktionsstörungen des cholinergen Systems mit einer verminderten Acetylcholin (ACh)-Synthese, Cholinaufnahme und Cholinacetyltransferase-Aktivität sowie einem veränderten Spiegel von ACh-Rezeptoren (RAJMOHAN und REDDY, 2017). Andererseits kommt es durch den Nervenzelluntergang in der Hirnrinde zu einer ungesteuerten Ausschüttung des Überträgerstoffes Glutamat, welcher u.a. für das Lernen und Gedächtnis benötigt wird (KURZ, 2013). Viele dieser Pathologien korrelieren folglich und nachweislich mit kognitiven Beeinträchtigungen.

Daher beschränken sich die therapeutischen Möglichkeiten bisher auf den medikamentösen Einsatz von Acetylcholinesterase-Hemmern (AChE-I: Rivastigmin, Donepezil und Galantamin) und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA: Memantin)-Rezeptor-Antagonisten (HIREMATHAD und PIEMONTESE, 2017). Eine dritte Möglichkeit ist der Einsatz einer Kombination von Donepezil mit Memantin. Dieses aktuelle Standardtherapiekonzept ist eine rein symptomatische Behandlung, die darauf abzielt, die Neurotransmitterstörungen auszugleichen, um den Verlust kognitiver Fähigkeiten zu verlangsamen.

Cholinesterase-Inhibitoren

Sie hemmen dem Namen nach die AChE im synaptischen Spalt (GAO et al., 2018). Somit wird das dort noch vorhandene ACh nicht abgebaut und dessen Konzentration steigt. Das führt letztendlich zu verbesserten Aufmerksamkeitsleveln. Zurzeit stehen die Wirkstoffe Donepezil, Galantamin und Rivastigmin sowie AChE-I der zweiten Generation zur Verfügung. Sie sind für eine leichte bis mittelschwere Demenzbehandlung bei MA zugelassen und halten die kognitiven Fähigkeiten im Durchschnitt für ein Jahr aufrecht (KURZ, 2013).

Gruppe der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) -Rezeptor-Antagonisten

Memantin als NMDA-Rezeptor Antagonist ist zugelassen für die mittelschweren bis schweren Demenzstadien bei MA und verbessert die Informationsweiterleitung zwischen den Nervenzellen aufgrund der Bindung an Glutamat und die dadurch ausgelöste Erregung. Denn die bei MA vermutete und vermehrte glutamaterge Exzitotoxizität wird dadurch reduziert und kann somit positiv auf die Funktion hippokampaler Neuronen wirken (TASI et al., 2015).

Neben diesen direkt auf MA abzielenden Medikamenten müssen bei Therapiekonzepten oft begleitende somatische Erkrankungen (Diabetes mellitus, Hörschwäche, Hypertonus und Sehschwäche), sowie auftretende Verhaltensstörungen (Unruhe, Depressionen, Aggressionen, Schlafstörungen und Sinnestäuschungen) mitbehandelt werden. Dies sollte aber erst nach der Ausschöpfung des nachfolgend beschriebenen nicht-medikamentösen Weges erfolgen.

1.4.2. Nicht-medikamentöse Behandlung

Diese Behandlungsmethoden können neben den pharmakologischen Ansätzen einen großen Therapiebereich mit abdecken. Vorteil dieser Methodik ist, dass in der Regel keine Nebenwirkungen auftreten. Im Rahmen dieses Behandlungskonzeptes erfolgt eine gezielte geistige und körperliche Aktivierung bspw. durch Verhaltens-, Ergo-, Physio-, Erinnerungs- und Milieuthérapie. Aber auch Logopädie, Musik- und Aromatherapie werden eingesetzt, denn die psychosoziale Intervention erscheint bei diesem Krankheitsbild außerordentlich wichtig (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR PSYCHIATRIE UND PSYCHOTHERAPIE PSYCHOSOMATIK UND NERVENHEILKUNDE et al., 2015). So sollte im besten Fall eine Psychoreduktion durch eine therapeutisch angelegte Vermittlung von Wissen über die Erkrankung, Prognosen, erforderliche Therapien aber auch über die möglichen Selbsthilfestrategien erfolgen (SAVASKAN et al., 2014).

1.4.3. Experimentelle Therapieansätze

Die vielversprechendsten therapeutischen Strategien konzentrieren sich hauptsächlich auf den Amyloid- und Tau-Protein-Stoffwechsel (CHEN et al., 2007). Mehrere Ansätze zur Beeinflussung der Stoffwechsellaskaden, die zu Neuronendegeneration und Apoptose führen, werden ebenso diskutiert. Beispiele sind hier die Hemmung der vermehrten Bildung von A β -Peptid im Gehirn, die Hemmung der Tau-Aggregation oder der Einfluss der A β -induzierten Neurotoxizität (VODERHOLZER und HOHAGEN, 2017). Dies soll bspw. durch die Hemmung von β - und/oder γ -Sekretasen oder durch neue Glykogen-Synthase-Kinase 3-Hemmstoffe erreicht werden (KANG et al., 2014). Oder der Einsatz niedermolekularer A β -Aggregationsmodulator mit neuroprotektiver Aktivität wie GAL 101 (früher MRZ 99030 oder EG-030). Als am aussichtsreichsten wird aber immer noch die aktive (Antigengabe) oder passive (spezifische monoklonale Antikörpergabe) Immuntherapie gegen amyloide Plaques angesehen (VODERHOLZER und HOHAGEN, 2017).

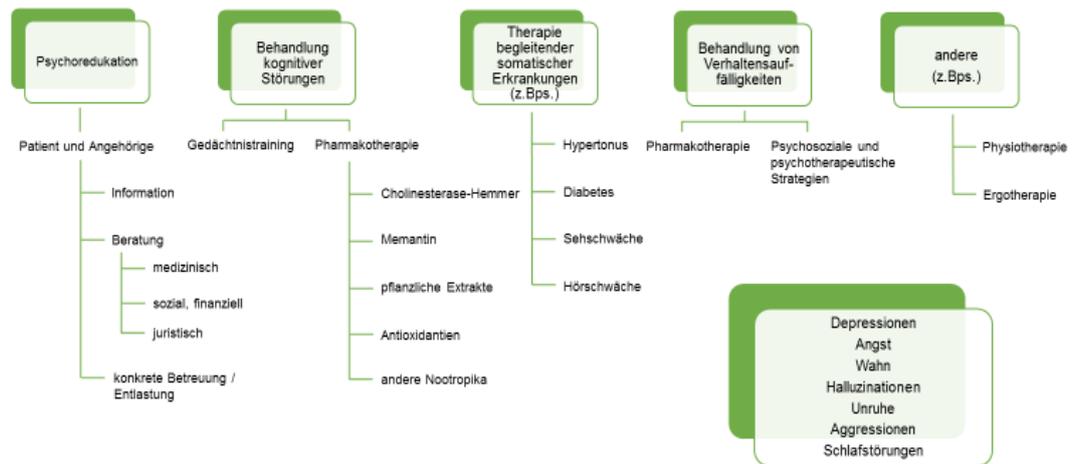


Abbildung 5: Therapeutische Strategien bei Morbus Alzheimer (modifiziert nach VODERHOLZER und HOHAGEN (2017))

Hauptziele bei der Behandlung sind die Verbesserung der Clearance und die Verringerung der zerebralen Akkumulation von Amyloid, die Verringerung von neurofibrillärer Bündelbildung und der Hyperphosphorylierung von Tau, die Minimierung von Entzündungen und schließlich die fortschreitende Neurodegeneration. Trotz des derzeitigen Mangels an Therapien, MA zu verlangsamen oder gar zu stoppen, haben Studien immer wieder gezeigt, dass das aktive Management der Krankheit die Lebensqualität für die Betroffenen verbessert (GAUGLER et al., 2017).

Für das Verständnis der Entstehung und Entwicklung von MA, deren Behandlung und besonders auch der Erforschung von Therapiekonzepten, sowie dem gezielten Einsatz / der Nutzung von spezifischen Tiermodellen ist zudem das Wissen über die Prozesse der Kognition und des Verhaltens essenziell. Dazu soll ein kurzer Überblick im nächsten Abschnitt gegeben werden.

2. Kognition und Verhalten

Kognition (lat. *cognitio*: erkennen, wahrnehmen) wird im heutigen Sinne als Sammelbegriff für die Informationsverarbeitung durch ein verhaltenssteuerndes System, das Gehirn, eingesetzt. Verstanden wird es als geistige Aktivität unter Nutzung informationsgestaltender Strukturen und Prozesse. Dieser Begriff wird für die Gesamtheit aller Abläufe genutzt, die mit dem Wahrnehmen und der Aufmerksamkeit, der Kreativität und der Problemlösung zusammenhängen (KIRCHER et al., 2008). Wichtigstes „Instrument“ der Kognition ist dabei das Gedächtnis. Es setzt sich zusammen aus mehreren Gedächtnistypen, welche charakterisiert sind durch unterschiedliche Speichersysteme und Eigenschaften, die wiederum unterschiedlichen Gehirnstrukturen zugeordnet werden können (SCHWARZ, 1992).

Für die Erforschung des komplexen Feldes des Denkens gibt es eine eigene Fachrichtung, die kognitionspsychologische Forschung, auch als Kognitionswissenschaft bezeichnet. Diese analysiert mit Hilfe der kompletten methodischen Bandbreite an Verhaltenstests den Informationsaustausch, die Arbeitsmechanismen und die Interaktionen der funktionalen Systeme und deren Strukturen im Gehirn. Folglich lassen sich kognitive Prozesse als Basis für das Entstehen von Verhalten, als eine Reaktion auf Umweltreize postulieren. Nach EDELMANN und WITTMANN (2012) wird die Fähigkeit, das Verhalten aufgrund von Erfahrungen zu modifizieren, als Lernen gedeutet. Somit ist es möglich sich in der Umgebung zurechtzufinden, indem Umweltreize wahrgenommen, verstanden und interpretiert werden. Das Verhalten wird angepasst, um zielgerichtet und planerisch handeln zu können. Denn seine vielfältigen Funktionen erfordern die Beteiligung verschiedener Regionen.

Klassifizieren lässt sich das Gedächtnis dennoch, sowohl nach inhaltlichen als auch nach zeitlichen oder prozessspezifischen Gesichtspunkten wie Einspeichern, Transfer, Konsolidieren oder Abruf von Informationen (CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003). In Bezug auf die zeitliche Unterscheidung lassen sich drei Komponenten nach dem „Drei-Komponenten-Modell“ von ATKINSON und SHIFFRIN (1968) differenzieren: ein sensorischer Speicher, ein Kurzzeitgedächtnis (KZG) und ein Langzeitgedächtnis (LZG). Der sensorische Speicher nimmt alle durch die Sinnesorgane und deren entsprechende Rezeptoren aufgenommenen Sinneseindrücke / externen Eindrücke wahr, speichert diese kurzzeitig und leitet sie anschließend an die weiterverarbeitenden Hirnregionen im KZG weiter. Dort erfolgt die aktive, kurzfristige

Speicherung und gleichzeitig die Bearbeitung von Information über ein relativ kurzes Zeitintervall (BADDELEY und HITCH, 1974). Das LZG hingegen stellt für alle unbewusst oder bewusst verarbeiteten Informationen den dauerhaften Speicherort dar, aus dem auch weiter in der Vergangenheit liegende Informationen abgerufen werden können (ATKINSON und SHIFFRIN, 1968; SQUIRE und KANDEL, 2009).

2.1. Das Arbeits- und Kurzzeitgedächtnis

Die erste Definition des KZG, hauptsächlich lokalisiert in der temporoparietalen Kortexregion und im Lobus frontalis, erfolgte Mitte des 20. Jahrhunderts. Damals postulierte BROWN (1958) erstmals einen sogenannten (sog.) „temporären Kurzzeitspeicher“, der Informationen für einen begrenzten Zeitraum verarbeitet. Basierend auf diesen Überlegungen entwickelten zehn Jahre später Atkinson und Shiffrin (1968) das „Drei-Komponenten-Modell“. Laut diesem erfolgt die Verarbeitung von Informationen zunächst in einem sensorischen Register, alle Strukturen, die Sinneseindrücke wahrnehmen, werden später als sensorischer Speicher bezeichnet und anschließend werden sie in einen Kurzzeitspeicher überführt, der wiederum mit einem Langzeitspeicher in Verbindung steht. Mitte der 1970er Jahre bauten Baddeley und Hitch dieses „Drei-Komponenten-Modell“ in ein „Mehr-Komponenten-Modell“ des Arbeitsgedächtnisses aus (BADDELEY und HITCH, 1974). Damit konzipierten sie ein komplexeres Modell, welches sie als „Arbeitsgedächtnis“ bezeichneten. Hier war das vormals von Atkinson und Shiffrin beschriebene, einheitliche KZG in drei separate Komponenten aufgeteilt: die phonologische Schleife (verbale temporärer Speicher für akustische und sprachbasierte Daten in der linken temporoparietalen Region der Kortex (BADDELEY, 1996)), der visuell-räumliche Notizblock (komplexerer Speicher für Informationen wie Farbe und Form, Navigieren, in der rechten Hemisphäre überwiegend im Lobus frontalis lokalisiert (BADDELEY, 2000)) und die zentrale Exekutive (im Lobus frontalis gelegen, koordiniert und kontrolliert sie die beiden anderen Systeme, überwacht Routineprozesse, setzt Prioritäten, beteiligt an der Problemlösung (SMITH und JONIDES, 1997)).

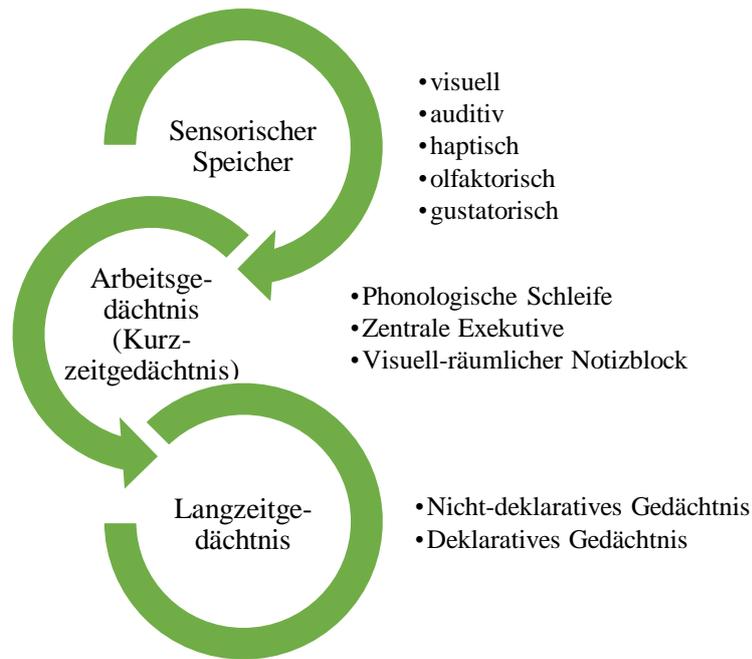


Abbildung 6: Erweitertes „Drei-Komponenten-Modell“ (modifiziert nach WINKEL et al. (2012)) unter Vereinigung der Modelle nach ATKINSON und SHIFFRIN (1968) und BADDELEY und HITCH (1974) sowie inhaltliche Klassifikation des Langzeitgedächtnisses nach SQUIRE und ZOLA (1996)

Durch diese drei Komponenten erfolgt im Arbeitsgedächtnis die aktive, kurzfristige Speicherung und gleichzeitig Bearbeitung von akustischen, verbalen, räumlichen und bildlichen Inhalten. Dieses System bearbeitet und speichert aber nicht nur zeitlich begrenzt Informationen, vielmehr unterliegt und unterstützt es auch körpereigene Denkprozesse, was wiederum für eine Vielzahl komplexer kognitiver Leistungen wichtig ist.

Zwar ist dieses „Mehr-Komponenten-Modell“ in seinen Grundprinzipien weiterhin anerkannt, wird heute aber als zu stark vereinfacht angesehen. Stattdessen spricht man heutzutage eher von einer interferierenden und kontextabhängigen Funktionsweise dieses Systems (BADDELEY et al., 2018). So werden auch die Speicherzeiten und -kapazitäten zusammengefasst. Die aus der Umwelt erhaltenen Sinneseindrücke werden nach aktuellem Kenntnisstand nur für wenige hundert Millisekunden (SPERLING, 1960) in dem KZG vorgeschalteten sensorischen Gedächtnis (entsprechend dem sensorischen Speicher von Atkinson) archiviert und während dieser Zeit auf ihre Wichtigkeit hin überprüft und gefiltert. Nur die ausgewählten, essenziellen und vom Bewusstsein erfassten Angaben, welche im Fokus der Aufmerksamkeit stehen, werden

in Folge weiter in das KZG übermittelt. Dessen Speicherdauer ist mit wenigen Minuten ebenfalls kurz. Zudem ist die Speicherkapazität auf ungefähr sieben Informationseinheiten wie z.B. Ziffern, Objekte und Worte beschränkt, kann allerdings durch Kombination zu größeren Einheiten erweitert und durch Wiederholung länger archiviert werden (WINKEL et al., 2012).

Der Begriff KZG wird gleichfalls für längere Zeiträume gebraucht, in der sich die Erinnerungen zwar bereits konsolidieren, aber noch nicht zu stabilen Inhalten des LZG geworden sind. In diesem Sinn können Kurzzeiterinnerungen viele Minuten oder sogar über eine Stunde aufbewahrt werden, ohne dafür ständig im Arbeitsgedächtnis präsent zu sein. Mitunter wird hier auch vom mittelfristigen Gedächtnis gesprochen (RAAB et al., 2010). Das KZG ist gegründet auf der vorübergehenden Veränderung der Stärke synaptischer Kontakte, elektrochemischer Erregungsmuster in Gruppen mehr oder weniger großen Nervenzellen und von diesen Aktivitäten beginnenden biochemischen Stoffwechsellaskaden (HANSER, 2005). Für das Arbeitsgedächtnis sind insbesondere neuronale Aktivitäten im Frontallappen relevant. Dieser weist reziproke Verbindungen zu vielen sensorischen und motorischen Kortexarealen auf, die sog. „top-down-Rückkopplungen“ und kann durch erhöhte Aktivität Informationen bereit- oder aufrechterhalten, auch wenn die zugehörigen Reize gerade fehlen (HANSER, 2005). Von hier erfolgt ein fließender Kopiervorgang ausgesuchter Informationen in das LZG, wenn die begrenzten Kapazitäten überschritten werden. Dieser Vorgang wird als Konsolidierung bezeichnet (ATKINSON und SHIFFRIN, 1968; JENESON und SQUIRE, 2012). Die zeitliche Ausdehnung des KZG ist das Arbeitsgedächtnis. Hier wird die aktuell verfügbare Menge an Informationen, Such-, Entscheidungs- bzw. Lösungsstrategien während der Beschäftigung mit einer Aufgabe bereitgehalten. Die Gedächtnisinhalte festigen sich durch eine häufig wiederholte Aktivität und führen dauerhaft zu einer strukturellen Veränderung auf neurophysiologischer Ebene (WINKEL et al., 2012). Durch diese strukturellen Veränderungen hat das LZG im Gegensatz zum KZG die Möglichkeit eine sehr große Speicherkapazität aufzubauen und kann Inhalte dauerhaft archivieren (COWAN, 2008).

2.2. Das Langzeitgedächtnis

Das LZG stellt schließlich für alle vom Arbeits- bzw. KZG unbewusst oder bewusst verarbeiteten Informationen den langfristigen Speicherort von Informationen über Tage, Monate oder ein ganzes Leben hinweg dar (BADDELEY, 2000). Wesentliche Bedeutung für das LZG, für Fakten und Ereignisse hat das neuronale System mit seinen

Strukturen rund um den Hippokampus und die benachbarte Amygdala, die Basalganglien und verschiedene neokortikale Bereiche (GABRIELI, 1998).

Seine Funktion beruht auf Veränderungen in den neuronalen Netzen. Diese festigen die Kontaktstellen zwischen den einzelnen feuernden Neuronen physiologisch oder morphologisch, als Folge von Gen- und Proteinaktivierungen. Auf dieser neuronalen Plastizität bzw. synaptischen Bahnung basiert das LZG; Erfahrungen verändern das Gehirn.

Bereits in den 1970er Jahren postulierte TULVING (1972) eine Unterscheidung des LZG in ein episodisches und ein semantisches Gedächtnis und revolutionierte damit die Gedächtnisforschung. Denn somit erfolgte erstmals neben der Zuordnung chronologischer Dimensionen zu verschiedenen Gedächtnistypen eine Klassifikation auch nach inhaltlichen Aspekten (siehe Abbildung 7). Die heute geltende Einteilung in ein deklaratives und ein nicht-deklaratives LZG erfolgte erst Anfang der 1990er Jahre (SQUIRE, 1992). Die Feststellung dieser komplexen Zusammenhänge ist die Grundlage für die Formulierung der zwei Gedächtnis-Hauptformen (SQUIRE und WIXTED, 2011).

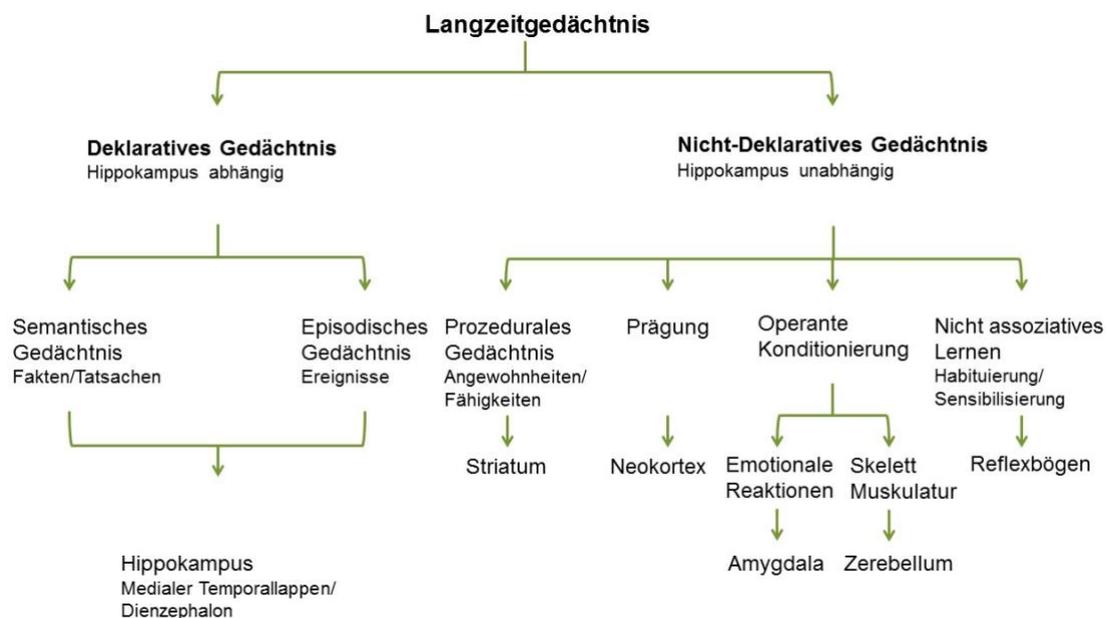


Abbildung 7: Taxonomie des Langzeitgedächtnisses mit zugehörigen Gehirnstrukturen nach Milner, Squire und Kandel (MILNER et al., 1998)

2.2.1. Deklaratives Gedächtnis

Das deklarative, bewusste oder wissentliche Gedächtnis rekrutiert sich aus den Systemen des episodischen und des semantischen Gedächtnisses (SQUIRE und ZOLA, 1996; TULVING und MARKOWITSCH, 1998; CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003). Ersteres enthält autobiographisches Wissen, also persönliche Erinnerungen, die in zeitlichem und räumlichem Kontext stehen. Während dem semantischen Gedächtnis allgemeines Faktenwissen zugeordnet wird, es demnach bewusst Einzelheiten und Ereignisse abspeichert, wird das deklarative Gedächtnis durch die gemeinsamen Eigenschaften des episodischen und semantischen Systems, beruhend auf Größe, Komplexität und Multimodalität, definiert (SQUIRE und ZOLA, 1996). Es kann das Material aus Retrospektiven vergleichen und gegenüberstellen, wobei die gespeicherten Daten dem Bewusstsein zugänglich und damit jederzeit abrufbar sind (GABRIELI, 1998). Daraus resultiert eine sehr hohe Flexibilität: Korrelationen zwischen einzelnen Aspekten können gelernt werden und helfen neuartige Konstellationen zu erfassen (SQUIRE und KANDEL, 2009). Diese Definition des deklarativen Gedächtnisses lässt sich bis auf einige Ausnahmen für Mensch und Tier gleichermaßen anwenden.

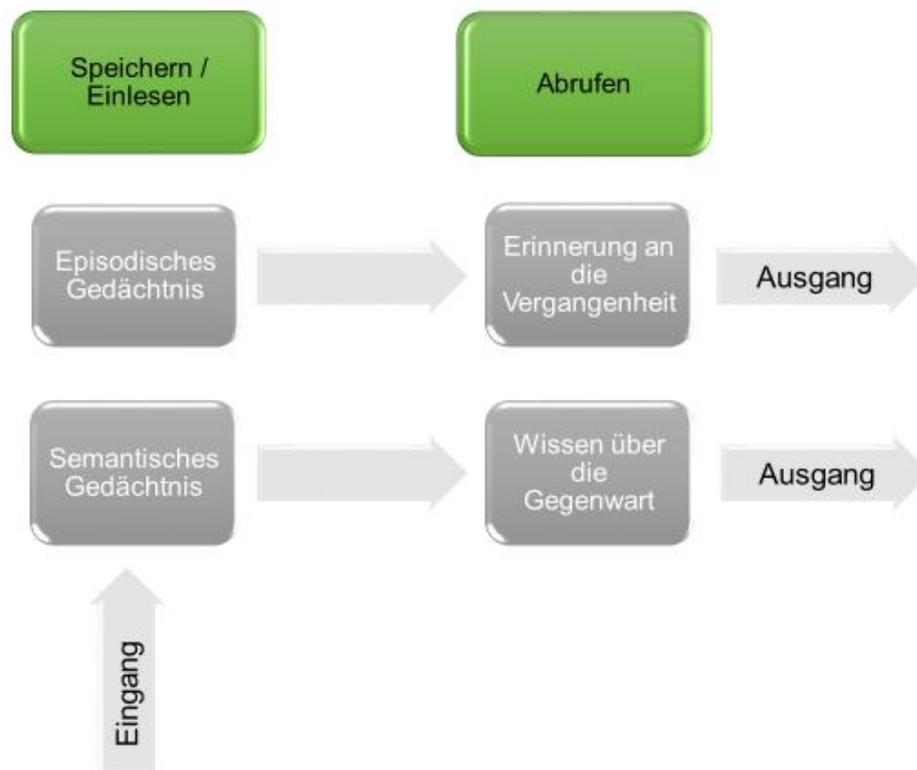


Abbildung 8: Serial-Parallel-Independent-Modell (SPI, dt. Seriell-Parallel-Unabhängigkeits-Modell) des deklarativen Gedächtnisses

(modifiziert nach TULVING und MARKOWITSCH (1998))

Informationen werden unabhängig vom episodischen Teil in das semantische Gedächtnis eingespeichert, gelangen aber nur in Abhängigkeit vom semantischen Gedächtnis in den episodischen Speicher. Beim Abruf der gespeicherten Daten agieren die Systeme aber vollkommen unabhängig voneinander.

Anatomisch zuordnen kann man die für Lern- und Gedächtnisprozesse wichtigen Bestandteile des deklarativen Gedächtnisses den Strukturen des Hippokampus und dessen angrenzenden kortikalen Bereichen, den anatomisch verwandten *entorhinalen*, *perirhinalen* und *parahippokampalen* Kortexen, sowie dem medialen Temporallappen (CLARK und SQUIRE, 2010). Die langfristige Speicherung erfolgt dann im Neokortex (KESNER et al., 1987; CALABRESE und MARKOWITSCH, 2003).

2.2.2. Nicht-deklaratives Gedächtnis

Das nicht-deklarative oder auch unbewusste Gedächtnis umfasst Fähigkeiten wie Bewegungsabläufe und Lernen (BIRBAUMER und SCHMIDT, 2011). Es impliziert alle wahrgenommenen Lernprozesse, ohne dabei ins Bewusstsein zu treten. Dieser Speicher wird durch Leistung, anstatt Erinnerungen ausgedrückt und sorgt so für unzählige, unbewusste Alternativen auf die Umwelt zu reagieren. So entstehen zwar der bewussten Erinnerung unzugängliche aber dennoch von vergangenen Ereignissen geprägte Vorlieben und Gewohnheiten, die unser Erleben und Verhalten bestimmen (SQUIRE und WIXTED, 2011). Das nicht-deklarative Gedächtnis kann gleichermaßen in die Untersysteme prozedurales Lernen, nicht-assoziatives Lernen, operante Konditionierung und Priming gegliedert werden:

Prozedurales Lernen ist der Erwerb motorischer und kognitiver Fähigkeiten und Abläufe (SQUIRE und WIXTED, 2011).

Nicht-assoziatives Lernen ist einerseits geprägt von *Habituation* (lat. *habitare*: sich gewöhnen), die Gewöhnung an einen Reiz und einer sukzessiven Abschwächung der Antwort des Organismus auf diesen spezifischen, aber als nebensächlich eingestuften Reiz. Und zweitens Sensitivierung (lat. *sensificare*: empfindsam machen), hier erfolgt im Gegensatz zur Habituation die Zunahme einer Reaktion auf einen immer wiederkehrenden, unspezifischen Reiz.

Operante Konditionierung ebenso bezeichnet als Belohnungslernen oder Lernen am Erfolg. Bei ihr führt im Gegensatz zur klassischen Konditionierung (= assoziatives Lernen), ein ursprünglich spontanes Verhalten durch Konsequenzen wie Erfolg oder Misserfolg zur Bestärkung oder Verhinderung (= selektiver Lernprozess).

Priming steht für einer verbesserte Verarbeitung von Schlüsselreizen, die zuvor schon einmal unbewusst in der „Prägungsphase“ eines Individuums wahrgenommen wurden (HEISE und ANSORGE, 2014).

2.3. Aβ und Kognition

Gedächtnis und Lernen hängen von einem komplexen Prozess ab, der das Kodieren, Konsolidieren, Speichern und Abrufen von Informationen umfasst. Somit ist klar, dass dieses hochsensible System stark anfällig ist und genauso komplexe Hirnveränderungen als Folge bei Erkrankungen zeigen kann. Die hohe Sensitivität belegen auch die Anzahl der Regionen, die als signifikant mit MA assoziiert identifiziert wurden: Hippokampus, Kortex, *subkortikalen* Regionen und das limbische System (AMOROSO et al., 2018). Die dort zeitlich immer weiter ansteigenden, pathologischen Konzentrationen von Aβ-Aggregationen lösen über Aktivierungen, Fehlfunktionen und Wechselwirkungen mit nachgeschalteten Signalübertragungswegen eine Kaskade von pathologischen Ereignissen aus, die zu synaptischen Störungen und neuronalen Ausfällen führen (Amyloid-Kaskaden-Hypothese, siehe Abbildung 1). Einer der ersten nachweisbaren Befunde in der MA-Pathologie ist der Tod von cholinergen Neuronen. Daher weisen Gebiete im Gehirn mit hohen cholinergen Neuronenpopulationen auch einen starken Verlust ebendieser auf und können mit einer signifikanten Abnahme des Gehirnvolumens im Vergleich zu gesunden Patienten verbunden sein (MATTSON, 2004). Der Hypothalamus bspw. ist wichtig für die Regulation von Appetit, Schlaf, zirkadiane Rhythmen und vermittelt viele Aspekte des emotionalen Erlebens. Die auffälligsten und schon frühzeitig einsetzenden Gedächtnisdefizite werden in der Regel bei Aufgaben des neuen Lernens und des verzögerten Erinnerungsvermögens beobachtet. Sobald diese auftreten, haben Patienten häufig wachsende Schwierigkeiten, Aufgaben im Zusammenhang mit semantischem Gedächtnis, Sprache, exekutiven Funktionen und visuellen/konstruktiven Fähigkeiten auszuführen (WEINTRAUB et al., 2012). Funktionelle und strukturelle Veränderungen der einzelnen Areale, oft schon in sehr frühen Stadien von MA, wurden durch Studien ausführlich belegt (PARMAR et al., 2017; FILIPPI et al., 2020). BALDUCCI et al. (2010) zeigten bspw. in ihren Versuchen, dass eine intrazerebroventrikuläre (engl. intracerebroventricular, ICV) Injektion von AβO vor dem Erwerb der Information, die Kodierung und Konsolidierung derselbigen hemmt. Denn Aβ beeinflusst entscheidende Prozesse, die zur Gedächtnisverarbeitung erforderlich sind:

- Intrazelluläre Signalübertragungen die zu Rezeptor-Synthese neuer Proteine und der Bildung von dendritischen Stacheln führen.
- Präsynaptische Glutamat Freisetzung; sie erzeugt eine tonische Aktivierung des NMDA-Rezeptors (siehe II. 1.4.1 Medikamentöse Behandlung).
- Wechselwirkungen mit der Calciumkanalaktivität oder durch Glutamatrezeptor abhängige Signalwege, die die Langzeitpotenzierung von Synapsen stören.
- Fehlfunktionen der Signalübertragung von Neurotransmittern die γ -Aminobuttersäure freisetzen oder binden.
- Metaboliten Diffusion zwischen den Mitochondrien und dem Zytosol mit mitochondrialen Dysfunktionen als Folge.
- die Gefäßfunktion betreffend mit anatomischen Symptomen einer cerebralen Amyloid-Angiopathie, sowie vaskuläre morphologische und degenerative Veränderungen in den betroffenen Gehirnregionen (Defizite der A β -Clearance, Schwächung der Blut-Hirn-Schranke, entzündungsfördernde Zustände, fehlerhafte Rekrutierung von Immunzellen) (PALOP und MUCKE, 2016; RAJMOHAN und REDDY, 2017; IKEGAWA et al., 2019).

Gegenwärtig können drei klinische Phasen bei MA definiert werden. Diese konnten bereits Mitte der 1990er Jahre Braak und Braak zeigen und den Verlauf je nach Lokalisation und Ausmaß der Ablagerungen in sechs Stadien differenzieren (BRAAK und BRAAK, 1991; BRAAK et al., 1994). Jeweils zwei Stadien können in die nach dem sog. „Clinical Dementia Rating“ (CDR) festgelegten drei Schweregrade (HUGHES et al., 1982) der leichtgradigen, mittelschweren oder schweren Demenz zusammengefasst werden. Jedes dieser drei Demenz-Stadien dauert durchschnittlich drei Jahre (KURZ, 2013):

Stadien I und II (Transentorhinalen Stadien) / leichtgradige Demenz

Der Untergang der Neuronen ist eng begrenzt auf den mittleren Schläfenlappen und verläuft viele Jahre ohne klinische Symptome, bis ein kritischer Wert von A β im Gehirn erreicht wird, der die Amyloid-Kaskade auslöst. Es kann dennoch zu leichtem Nachlass der Leistungsfähigkeit in Bezug auf Aufmerksamkeit, Informationsverarbeitung und Gedächtniskraft kommen.

Stadien III und IV (Limbische Stadien) / mittelschwere Demenz

Diese Stadien beschreiben eine beginnende Erkrankung mit Pathologien im Frühstadium, die sich mit dem Nachlassen der kognitiven Funktionen wie

Denkvermögen, Gedächtnisleistung oder Orientierungsfähigkeit und gegebenenfalls leichten bis mittelschweren Persönlichkeitsveränderungen wie Unruhe und Aggressivität äußern. Diese Stadien führen bis zu einer nicht mehr selbständig möglichen Lebensführung. Dabei dehnt sich der Krankheitsprozess weiter in den Temporallappen und in die Strukturen des Hippokampus hinein aus.

Stadien V und VI (Neokortikale Stadien) / schwere Demenz

Es besteht ein ausgeprägter Verlust aller kognitiven Funktionen mit stark zunehmenden körperlichen Symptomen (Inkontinenz, Krampfanfälle, Verlust der Körperhaltung), die bis zu einer vollständigen Pflegebedürftigkeit führen. In diesem Stadium kann die Diagnose MA durch die markanten Neuropathologien, wie den Befall von Hirnrinde im Bereich des Schläfen- und Scheitellappens mit signifikanter Anhäufung neuritischer Plaques und neurofibrillärer Bündel *post mortem* gestellt werden.

Zusammengefasst ist für die Pathophysiologie von MA charakteristisch, dass nach bisherigem Kenntnisstand durch einen fehlerhaften Metabolismus entstandenes pathologisches A β eine Tau-Hyperphosphorylierung und eine Neuroinflammation mit anschließender synaptischer und neuritischer Schädigung induziert wird (BILLINGS et al., 2005). Das Resultat auf kognitiver Ebene ist eine zunehmende Verschlechterung des Gedächtnisses und der räumlichen Orientierung. Der kaskadenartige und hoch komplexe Verlauf dieser Krankheit macht die erfolgreiche Forschung, Diagnose und Therapie von MA bis heute zu einer Herausforderung.

2.4. Verhaltensuntersuchungen am Tiermodell

2.4.1. Verhaltenstests im Bereich tierexperimenteller Forschung

Verhalten hat immer eine kausale (lat. *causa*: Grund, Ursache) oder eine finale (lat. *finis*: Ende, Ziel) Erklärung, bei der im Zentrum stets die Erkenntnis und das Gedächtnis stehen. Gerade weil Krankheiten wie bspw. MA unsere kognitiven Fähigkeiten einschränken, die Reaktionen auf Umweltreize reduzieren und verändern bzw. im weiteren Verlauf unmöglich machen, wirken sich diese Erkrankungen so umfassend auf die Betroffenen und deren Umfeld aus. Umso wichtiger ist es, die Effekte von pathologischen Veränderungen oder die Wirkung von Therapeutika auf das klinische Bild bei MA möglichst umfassend zu erheben.

Im Bereich der Kognitionsforschung werden dafür häufig Verhaltensuntersuchungen am Tiermodell (TM), sog. Verhaltenstests, angewandt. Ihre Entwicklung und permanente Optimierung haben einen hohen Stellenwert eingenommen. Im Vergleich

zu *in vitro* Untersuchungsmethoden, die mit isolierten Zellen oder Organen arbeiten, bieten TM den Vorteil das Zusammenspiel verschiedener, unterschiedlicher grundlegender Mechanismen betrachten zu können (VAN DER STAAAY et al., 2009). Es können die kausalen Beziehungen einer Krankheit identifiziert und die ätiologische Ursachenforschung mit wissenschaftlichen Studien vorangetrieben werden. Dies schließt aber auch den Einsatz einer Vielzahl von Untersuchungen wie biochemische, elektrophysiologische, genetische und morphologische Verfahren zur Beurteilung mit ein (MARKOWITSCH, 2009). Insofern ist die biologische Relevanz dieser Modelle nur in validen Testsystemen gegeben, die es dem Versuchstier ermöglicht ein breites Spektrum an Verhaltensmustern zu zeigen und die im Idealfall gleichzeitig Verhaltensdimensionen wie Angst, lokomotorische Aktivität, exploratives Verhalten und soziale Affinität erfassen können (RODGERS, 1997). So sind bspw. erst durch die Nutzung von (transgenen) Mausmodellen die Entwicklung und die präklinische Überprüfung von Therapiekonzepten, wie die aktive oder passive A β -Immunisierung, möglich geworden (ELDER et al., 2010).

Ziel dabei ist immer, die möglichen molekularen Mechanismen, die ausschlaggebend für die Krankheit sind, zu analysieren oder in vielen Fällen zunächst erst einmal zu detektieren, um in weiteren Schritten darauf basierend erfolgreiche Therapiekonzepte für den Menschen zu entwickeln. Natürlich kann kein TM jemals das komplexe menschliche Spektrum auf molekularer und zellulärer Ebene wiedergeben. Folglich ist bei MA des Menschen kein einziges TM in der Lage diese Krankheit vollständig zu replizieren. Sie helfen aber bei der Erforschung wichtiger Teilaspekte, die pathologische Entwicklung von klinischen oder histologischen Veränderungen nach Alzheimer-Induktion und den Einfluss unterschiedlichster Therapeutika oder Behandlungsregime näher zu bestimmen. Mit neuem Wissen über den Wirkungsmechanismus von A β bspw. fanden die damit einhergehenden Entzündungen und deren weitreichende Wirkungen auch auf Astrozyten eine Berücksichtigung (BALDUCCI et al., 2017; BRITO-MOREIRA et al., 2017), denn bis dato war dieser nur auf die Synapsen beschränkt (DINIZ et al., 2017).

Es lassen sich also zahlreiche neurophysiologische Vorgänge, pathologische Veränderungen oder die Auswirkungen neuer Therapiemöglichkeiten zumindest zu einem großen Teil am TM erforschen (OHL, 2003). Im Lauf der Jahre ist so eine Vielzahl an Modellen für die Untersuchung kognitiver Zusammenhänge entwickelt worden, ungeachtet der Herausforderung, Verhaltensweisen beim Tier zu identifizieren,

die sich menschlichen Verhaltensweisen gleichsetzen lassen (DECKER, 1995). Sie bieten hierdurch der Forschung eine Chance auf Untersuchung von Krankheiten ohne die menschliche Gesundheit selbst aufs Spiel zu setzen. Denn aus ethischen und moralischen Gründen sind bestimmte Fragestellungen und deren Untersuchungen am Menschen eingeschränkt oder gar nicht möglich. Zudem sind klinische Studien oft zeitaufwendig, schwer standardisierbar und nicht zu Letzt kostenintensiv (GAMES et al., 2006). Einer der wichtigen Vorteile tierexperimenteller (Verhaltens-) Untersuchungen im Vergleich zu klinischen Studien beim Menschen ist die Möglichkeit einer vergleichsweise hohen Standardisierung, aus der sich eine geringere Streuung und damit eine höhere Wertigkeit der erhobenen Daten ergibt (VAN DER STAAAY, 2006). Es können drei Klassifikationen von Modellen im Rahmen der MA-Forschung definiert werden. Diese sind Untersuchungen von:

1. Gehirnfunktionen (Neurowissenschaft in der Form von Bioassays),
2. psychologischen Prozessen (Psychologie, bspw. mit Simulationen),
3. Substanzwirkungen (Pharmakologie mit Hilfe Screening-Tests) (GRÜNDER und BENKERT, 2012).

2.4.2. Die Maus als Tiermodell

Wenngleich zahlreiche Unterschiede zwischen Mensch und Versuchstieren u.a. bzgl. der Anatomie des Gehirns, der Kommunikation, der kognitiven Leistungsfähigkeit oder der physiologischen Vorgänge bestehen, so sind die allermeisten der grundlegenden neurobiologischen Mechanismen ähnlich (KESNER und GOODRICH-HUNSAKER, 2010). Die Wichtigkeit von Nagern in der tierexperimentellen Forschung belegen die statistischen Kennzahlen: bei über 80 % der in Deutschland eingesetzten Versuchstiere handelt es sich um Nagetiere, v.a. Mäuse (60,9 %) und Ratten (13,9 %) (EUROPÄISCHE KOMMISSION, 2013; BMEL, 2016). Speziell die Maus ist ein hervorragendes Modell zur Erforschung von humanen Krankheitsursachen. Denn Mäuse als kleinste multipaare Säugetiere, vereinen die Vorteile einer hohen Reproduktionsrate mit kurzer Aufzuchtphase, früher Geschlechtsreife und aufgrund ihrer Größe einer vergleichsweise kostengünstigen Haltung mit geringem Platzbedarf (GV-SOLAS, 2014). Ihr Nervensystem, die Genexpression und die Organisation der DNA sind dem des Menschen sehr ähnlich. Dennoch wird immer wieder kontrovers diskutiert, inwiefern Leistungen von Nagetieren in komplexen kognitiven Aufgaben auf menschliche kognitive Funktionen übertragen werden können (DECKER, 1995). Bei kognitiven Funktionen, die dem Hippokampus zugeteilt werden, entwickelte sich

allerdings eine evolutionäre Kontinuität, so dass grundlegende Lern- und Gedächtnisprozesse im Laufe der Evolution konserviert wurden (KESNER und GOODRICH-HUNSAKER, 2010). So können einfache menschliche Gedächtnis- und Lernleistungen durchaus mit Hilfe von Tiermodellen beschrieben werden. Deshalb wurde für die vorliegende Studie die Maus als das sinnesphysiologisch am niedrigsten entwickelte Tier gewählt.

Durch genetisch veränderte Mäuse, transgene- und Knock-out-Tiere, könne diese Tiere auch Krankheiten entwickeln, von denen sie auf natürliche Weise nicht betroffen sind. Dies macht die Maus somit zu einem geeigneten Versuchstier auf den meisten Gebieten der medizinischen Forschung. Gerade Inzuchtstämme; definiert als zwanzig oder mehr aufeinander folgende Generationen von Schwester-Bruder-Paarungen (GREEN et al., 1963) mit einem genetischen Homogenitätsgrad von ca. 99 % (SILVER, 1995); bieten dabei mit ihrer vergleichsweise geringen interindividuellen Varianz zahlreiche Möglichkeiten für Untersuchungen im Zusammenhang mit Kognitions- und Verhaltensparametern (LYON und SEARLE, 1989). Mit gentechnisch veränderten Mäusen, sog. transgenen Mäusen, lässt sich heute eine stetig wachsende Anzahl an Humanpathologien im TM darstellen und entsprechend untersuchen. Dazu wird die DNA gezielt verändert: definierte Genkonstrukte, sog. Transgene, werden als zusätzliche Erbinformation bspw. stabil in das Genom integriert ("Knock-in"). Oder die normalen Gene werden durch funktionsunfähige, d.h. nicht mehr lesbare Varianten ersetzt ("Knock-out"). Allein in der Alzheimerforschung existieren unzählige Modelle, v.a. für Mäuse. So hat im Feld der Amyloid Pathologie die Verwendung von transgenen Mausmodellen zu neuen Erkenntnissen über die Prozessierung von A β und die Funktion von A β O in der Pathogenese des MA beigetragen (LESNE et al., 2006; CHENG et al., 2007).

Die meisten der genutzten Modelle bedienen sich natürlicher Verhaltensweisen der Versuchstiere wie Flucht- oder Angstverhalten, um kognitive Veränderungen zu untersuchen. Die bekanntesten Verhaltenstests, die bei solchen TM in der Alzheimerforschung eingesetzt werden, sind der Open-Field-Test (HALL, 1936), diverse Labyrinth-Tests (MORRIS, 1984; JARRARD, 1986) und der modifizierte Hole-Board-Test (mHBT) nach OHL et al. (2001). Sie dienen alle primär der Untersuchung von Orts-Lernen und Gedächtnis und sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

2.4.3. Open-Field-Test

Der sog. Open-Field-Test (OFT) nutzt das angeborene Angst- und Erkundungsverhalten der Tiere und wurde von HALL und BALLACHEY (1932) zur Untersuchung der Emotionalität von Ratten entwickelt. Ursprünglich ist das Open-Field eine im Zentrum hell erleuchtete, nach oben hin offener zirkulärer Arena, in die die Tiere hineingesetzt und anschließend beobachtet werden. Mittlerweile wird eine Vielzahl von modifizierten Varianten benutzt (GOLANI et al., 1999; PRUT und BELZUNG, 2003). Bei der einfachsten Form des OFT werden die Tiere in die Arena gesetzt und auf diese Weise mit einer ihnen unbekanntem Umgebung konfrontiert. Dadurch entsteht ein Konflikt zwischen der Angst vor der fremden Situation, der unbekanntem Umgebung und damit verbundenen, möglichen Gefahren einerseits sowie innerer Neugierde und Erkundungsdrang andererseits. So lassen sich durch den OFT angstbezogenes Verhalten, allgemeines Explorationsverhalten und lokomotorische Aktivität beurteilen (CLEMENT et al., 1997; PRUT und BELZUNG, 2003).

Die Technik eignet sich auch ohne weiteres für die Untersuchung verschiedener pharmakologischer Verbindungen auf anxiolytische oder anxiogene Wirkungen. Dies ist aber auch gleichzeitig der größte Nachteil des OFT, denn durch die negative Motivation der Angst können die Ergebnisse unter Umständen missdeutet werden. Gleichzeitig lassen sich auch mit diesem Test nur wenige, definierte Parameter untersuchen. Dennoch ist der OFT aufgrund des relativ einfachen Aufbaus und der schnellen Durchführbarkeit als Verhaltensexperiment generell weit verbreitet (SEIBENHENER und WOOTEN, 2015) und wird auch bei anderen Tierspezies wie z.B. Huhn, Kaninchen, Kalb, Lamm, Primaten, Schwein oder Hummer angewendet (PRUT und BELZUNG, 2003).

2.4.4. Einfache Labyrinth-Tests

Diese Verhaltenstests mit ihren zahlreichen Varianten stellen einfache, T- oder Y-förmig aufgebaute Labyrinth dar und arbeiten vorwiegend mit dem Erkundungstrieb und der Befriedigung des Fresstriebs als Motivation (HODGES, 1996). Hier funktioniert die korrekte Bewältigung des Test durch die vorher erzwungene Alternation der Armbesuche des Labyrinths hauptsächlich über das räumliche Arbeitsgedächtnis (STEWART et al., 2011).

Zur Beurteilung konditionierten Angstverhaltens ist einer der am häufigsten angewandten, komplexeren Tests der sog. Elevated-Plus-Maze-Test (EPM-Test) welcher von PELLOW et al., (1985) entwickelt worden. Hier besteht der

Versuchsaufbau aus einem erhöht stehenden kreuzförmigen Labyrinth mit je zwei offenen und zwei geschlossenen Armen. Als zu erfassende Parameter werden die Anzahl der Besuche in jedem Arm und die Zeitdauer beurteilt, die das Tier in dem jeweiligen Arm verbringt. So können die lokomotorische Aktivität, aber auch die das Verhalten beeinflussenden Gehirnstrukturen (Amygdala, Hippokampus, limbisches System) getestet werden (WALF und FRYE, 2007).

Ein ähnliches Prinzip weist auch der ursprünglich zur Untersuchung räumlicher Lern- und Gedächtnisprozesse entwickelte Radial-Arm-Maze-Test (RAM-Test) auf, bei dem mehrere Labyrintharme von einer zentralen Plattform abgehen. Am Ende jedes Armes befindet sich eine kleine Vertiefung, die je nach Versuch Futter enthalten kann. Auch hier kann durch Beurteilung der Bewegung des Tieres das Arbeitsgedächtnis beobachtet werden. Durch Modifikationen, wie bspw. nur partiell vorhandene Futterbelohnungen, kann zusätzlich zum Arbeitsgedächtnis auch das LZG untersucht werden (CRUSIO und SCHWEGLER, 2005).

Ein sehr häufig in der Forschung eingesetzter Labyrinth-Test ist der sog. Morris-Water-Maze-Test, entwickelt von MORRIS (1984). Dieser wird v.a. genutzt, um Rückschlüsse auf das räumliche LZG zu ziehen, indem man sich das natürliche Fluchtverhalten von Nagetieren zu Nutze macht. Die Tiere werden in ein mit warmem Wasser gefülltes, kreisrundes Becken eingesetzt. Ziel ist es, dass die Tiere motiviert durch ihre Aversion gegen Wasser, durch Umherschwimmen von wechselnden Startpunkten aus, eine durchsichtige Plattform knapp unterhalb des Wasserspiegels lokalisieren. Zur Orientierung dienen dabei die in jedem Quadranten angebrachten, stets gleichbleibenden Wandmarkierungen. Mit der Erfassung der Zeit, die das Tier bis zum Auffinden der Plattform benötigt und der zurückgelegten Schwimmstrecke können objektiv Aussagen über die Funktion des Arbeitsgedächtnisses und des visuell-räumlichen Gedächtnisses getroffen werden (HODGES, 1996). Thigmotaxis und Schwimmgeschwindigkeit geben zudem Auskunft über Angst und Motivation (MORRIS, 1984).

2.4.5. Der modifizierte Hole-Board-Test

Der ursprünglich zur Untersuchung des Explorationsverhaltens von Nagern in den 1970er Jahren etablierte klassische Hole-Board-Test (HBT) besteht aus einer Box, in deren Boden sich mehrere Löcher mit einer Futterbelohnung befinden (FILE und WARDILL, 1975). Beim Einsetzen des Tieres auf das Board wird u.a. anhand der Bewegungen des Tieres und des Erkundens der Löcher das Explorationsverhalten bzw.

die Ängstlichkeit des Tieres untersucht. Später erfuhr der Test zahlreiche Modifikationen, um den modifizierten Hole-Board-Test (mHBT) auch für die Untersuchung des Verhaltens von Spitzhörnchen (OHL et al., 1998), Ratten und Mäusen nutzen zu können (OHL et al., 2001).

Basis des mHBT bildet das für Mäuse entwickelte klassische Hole-Board (modifiziert nach OHL et al. (2003) (genauere Beschreibung siehe III.2.4.2 Aufbau des modifizierten Hole-Board-Test und III.2.4.3 Versuchsablauf). So kann parallel mit Hilfe des visuell-räumlichen und sehr komplexen Testprinzips des mHBT Folgendes gemessen werden:

- kognitive Parameter in Form von Leistungsfähigkeit des deklarativen Gedächtnisses und des Arbeitsgedächtnisses,
- emotionale Parameter mit einem breiten Spektrum an Verhaltensdimensionen,
- motorische Parameter wie die allgemeine Fortbewegungsaktivität und die Feinmotorik (OHL et al., 2003).

Damit vereint der mHBT heute die Eigenschaften des Open-Field-Tests, die quantitative Darstellung des Erkundungsverhaltens, mit den Eigenschaften des ursprünglichen HBTs und kann parallel die 3 oben genannten Parameter abbilden. Gleichzeitig ist es möglich im mHBT sowohl spontanes, unkonditioniertes als auch erlerntes, konditioniertes Verhalten bei Nagetieren zu untersuchen (GORDAN et al., 2012). Das Konzept basiert auf der Tatsache, dass diese Tiere ihr reiches Verhaltensrepertoire nur ausführlich zeigen können, wenn sie eine passend angereicherte, aber gleichzeitig möglichst stressarme Testumgebung vorfinden (OHL und KECK, 2003). Damit ist es möglich, mit einem einzigen komplexen, räumlichen Testumfeld gleichzeitig mehrere Verhaltensdimensionen zu untersuchen.

Dennoch stellt es generell eine häufige Schwierigkeit bei Verhaltenstests dar, eine erfolgreiche Umsetzung der präklinisch gewonnenen Ergebnisse in klinisch nutzbare Verfahren zu schaffen. Und obwohl sich die Testsysteme in den letzten Jahrzehnten immer weiter verbessert haben, besitzt jeder Test eine verschiedene Wertigkeit und Schwerpunkt. Somit gibt es keinen Verhaltenstest, der alle Parameter optimal abbilden kann (HANELL und MARKLUND, 2014). Durch den mHBT lassen sich einige Forderungen nach D'MELLO und STECKLER (1996) zur Schaffung eines idealen Modells jedoch erfüllen:

- Im Vergleich zu klassischen Testbatterien lassen sich die Zahlen der benötigten Versuchstiere durch die Anzahl der Tests deutlich verringern, da viele Verhaltens- bzw. Lernaspekte innerhalb einer Anordnung überprüft werden können. Dies kommt auch dem Tierschutzgedanken mit dem 3R-Prinzip (Replacement - Vermeidung, Reduction - Verringerung und Refinement - Verfeinerung, seit 2010 durch die Tierversuchsrichtlinie 2010/63/EU Eingang in die Gesetzgebung) nach RUSSELL und BURCH (1959) entgegen.
- Es handelt sich um einen standardisierten, reproduzierbaren Verhaltenstest.
- Durch die Möglichkeit einer transparenten Trennwand zu den restlichen Gruppenmitgliedern bspw. bei Tests mit Ratten, ist während der Durchführung mit Hilfe von visuellem, akustischem und olfaktorischem Kontakt die Stressbelastung der Tiere niedrig (LABOTS et al., 2015).
- Die Motivation der Tiere beruht ausschließlich auf dem positiven Antrieb der Futterbelohnung, im Gegensatz zu den bei anderen Tests häufig gewählten Motivatoren Angst oder Nahrungsentzug. Denn diese negative Motivation kann durch den angstinduzierten Stress Auswirkungen auf die kognitive Leistungsfähigkeit der Tiere haben und unter Umständen das Testergebnis verzerren (HARRISON et al., 2009).

Aus diesen Gründen wird der mHBT zum gegenwärtigen Zeitpunkt als einer der aussagekräftigen Verhaltenstest u.a. in TM der Alzheimerforschung angesehen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen der Erforschung von *Morbus Alzheimer* (MA, dt. Alzheimer-Krankheit) spielt die Etablierung neuer, sowie die stetige Verbesserung bestehender TM eine wichtige Rolle. Ein essenzieller Punkt in bisher existierenden TM ist der nicht ausreichend untersuchte Zeitpunkt, zu dem Verhaltenstests in den jeweiligen Krankheitsmodellen durchgeführt werden sollten. Denn dabei kann es zu Verfälschungen kommen, wenn man zu früh oder zu spät mit den Tests beginnt. In der vorhandenen Literatur sind bisher sehr unterschiedliche Zeitpunkte angegeben und viele Studien beschränkten sich lediglich auf die Untersuchung akuter oder Langzeiteffekte (KIM et al., 2016; SHARMA et al., 2016). In diesem Zusammenhang war es das Hauptziel der vorliegenden Studie ein Mausmodell für den genauen Zeitpunkt der Untersuchung von Lern- und Gedächtnisleistungen nach ICV-Gabe von löslichem Amyloid-Beta₁₋₄₂-Peptid (A β ₄₂) zu optimieren.

Viele frühere Studien untersuchten bereits den Zusammenhang zwischen einer ICV-A β -Injektion und Veränderungen in Kognition und Verhalten (DINELEY et al., 2010; BALDUCCI et al., 2017). Diese Studien und viele andere Arbeiten wurden aber überwiegend entworfen, um die kognitiven Veränderungen unmittelbar nach der A β -Injektion meist in vitro-Experimenten und nur für einen sehr kurzen Zeitraum nach Injektion (2 bis 30 Stunden) zu untersuchen. Im Gegensatz dazu war es das Bestreben der vorliegenden Arbeit, den Verlauf der neurologischen Defizite über den bisher bekannten Zeitraum hinaus weiter zu dokumentieren. Und die Zeit nach der A β ₄₂-Injektion zu bestimmen, zu der die Mäuse beginnen kognitive Beeinträchtigungen zu entwickeln. Denn bisher ist nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt die optimale Untersuchung der Tiere stattfinden sollte, um beste Erkenntnisse bzw. möglichst durch den Eingriff der Injektion selbst unverfälschte Ergebnisse zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden in einem ICV-MA Mausmodell vier ausgewählte Zeitpunkte für den Beginn des mHBT nach der ICV-Injektion gewählt. Alle mit dem mHBT erfassbaren Parameter wurden über einen Zeitraum von acht aufeinander folgenden Tagen vergleichend zwischen den einzelnen Startzeitpunkten und den Versuchstiergruppen betrachtet.

Die ICV-Injektion bei Mäusen ermöglicht die Untersuchung akuter Effekte auf kognitive Funktionen und zellulären Pathologien, da das A β -induzierte MA-TM die Gedächtnisstörung und eine Vielzahl anderer pathologischer Merkmale bei MA-

Patienten wie Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Bündel nachahmen kann (XU et al., 2018). Das hier eingesetzte Modell eines frühen MA wird durch die direkte Verabreichung von A β ₄₂-Peptiden in das Maushirn realisiert. Als Untersuchungsmethode wurde der mHBT angewendet. Mit Hilfe des sehr vielschichtigen und visuell-räumlichen Testprinzips ist der mHBT das meistgenutzte Testverfahren, um kognitive und Verhaltensparameter wie Angst, Erkundungsverhalten und Erregung, kombiniert in einem einzigen Verfahren über mehrere Tage zu analysieren.

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die kognitiven Veränderungen nach ICV-Applikation die Entwicklung von Alzheimer-ähnlichen Phänotypen widerspiegeln. Als ergänzende Ziele dieser Studie sollten deshalb auch *postmortale* Parameter untersucht werden. Diese sollten die möglichen Ursachen für die bei den Verhaltenstests gefundenen, kognitiven Beeinträchtigungen nach ICV-A β ₄₂-Injektion darstellen und sich zum Nachweis bzw. der Charakterisierung der Erkrankung zu den jeweiligen Zeitpunkten eignen. Dazu wurden mittels histologischer Untersuchungen, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und im Westen Blot Marker der zerebralen Inflammation (Tumornekrosefaktor Alpha, TNF α) und der zerebralen Apoptose (Caspase 3) sowie die Level an zerebralem Tau, hyperphosphorylierten Tau-Protein (P-Tau) und A β ₄₂ bestimmt.

Die kombinierte Untersuchung der symptomatischen Veränderungen (abgebildet als Parameter im Verhaltenstest) mit den *postmortal* diagnostizierten Befunden sollte zusammengenommen dazu beitragen, den bestmöglichen Zeitpunkt des mHBT nach ICV-A β ₁₋₄₂-Gabe zu optimieren. Damit zukünftige Untersuchungen besser standardisiert und die Aussagekraft von Ergebnissen in diesem Modell optimiert werden können. Dazu gliedert sich die Zielstellung/Arbeit in vier Abschnitte.

1. Untersuchung von Kognition, Verhalten und Bewegungsverhalten mit Hilfe des mHBT.
2. Nachfolgend *postmortal*er Nachweis von zerebralen A β ₄₂-Plaques mit einer Färbung mittels Methoxy-X04-Lösung.
3. Laboranalytische Untersuchung von zerebraler Apoptose und Inflammation als mögliche Mechanismen, die den Veränderungen der Lern- und Gedächtnisleistung zugrunde liegen.
4. Histologische Untersuchung zur Absicherung der Methode und Nachweis des A β ₄₂ in den Hirnarealen

2. Eigene Untersuchungen

2.1. Versuchstiere

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert am 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934)) durch die Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-111-12) genehmigt.

2.1.1. Herkunft

Die für die vorliegenden Untersuchungen genutzten 54 Mäuse des Stammes C57BL/6N wurden im Alter von 10 Wochen bei Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bestellt und in einem gemäß den gesetzlich geregelten Sicherheitsmaßnahmen für 54 Mäuse des Stammes C57BL/6N wurden im Alter von 10 Wochen bei Charles River Laboratories (Gentechnik-Sicherheitsverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. März 1995 (BGBl. I S. 297), zuletzt geändert am 18. Dezember 2008 (BGBl. I S. 2768)) für eine Tierhaltung konzipierten Raum untergebracht. Die Akklimatisierungszeit bis Testbeginn betrug 7 Tage. Sowohl für die *in vitro* als auch die *in vivo* Untersuchungen waren männliche Mäuse vorgesehen. Für die tägliche Versorgung und Betreuung der Tiere war stets ein und dieselbe Person zuständig, um für die Tiere einen möglichst stressarmen Tagesablauf zu gewährleisten und potenzielle versuchsbeeinflussende Faktoren zu minimieren.

2.1.2. Haltungsbedingungen

Die Mäuse waren in einem speziellen Tierhaltungsraum untergebracht. Dieser war entsprechend den Standardbedingungen nach den Empfehlungen für Versuchstierhaltung (GV-SOLAS, 2014) vollklimatisiert, mit einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, einer relativen Luftfeuchte von 60 ± 15 % und einem 10fach stündlichen Luftwechsel. Um einen natürlichen Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden zu gewährleisten, war eine Zeitschaltautomatik mit beginnender Dunkelphase von 15:00 Uhr bis 03:00 Uhr eingebaut.

In konventioneller, offener Haltung in Laborstandardkäfigen (Makrolon Typ II) wurden die Tiere einzeln gehalten. Ausgestattet waren die Käfige mit staubarmer und autoklavierter Weichholzfaser-Einstreu (Lignocel®, Fa. J. Rettenmaier & Söhne GmbH und Co. KG; Rosenberg, Deutschland), einer Tränkflasche mit Leitungswasser und

einem ebenfalls ad libitum zur Verfügung stehenden Alleinfuttermittel in Pellet-Form (Altromin™ Haltungsdiaät, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG; Lage, Deutschland). Zur weiteren Anreicherung des physischen Lebensraums erhielten die Tiere autoklaviertes Heu, Zellstoff als Nestbau- und Beschäftigungsmaterial und zusätzlich ein Plastikhäuschen in Röhrenform als weiteren Sicht-, Versteck- und Ausweichraum. Ein Käfigwechsel inklusive komplett neuem Interieur und frischem Wasser erfolgte einmal pro Woche.

Die Überwachung des Gesundheitsstatus der Tiere erfolgte mittels indirekter Sentinel-Tiere als vierteljährliche Kontrolle gemäß den Empfehlungen der Federation of Laboratory Animal Sciences Association (FELASA). Typischerweise wurde ein Sentinel-Käfig pro 50 - 80 Versuchstierkäfige verwendet (MÄHLER et al., 2014). Zudem wurde eine engmaschige tierärztlich begleitete Kontrolle des Gesundheitszustandes und des Allgemeinbefindens aller Tiere über die gesamte Versuchsdauer sichergestellt.

2.2. Versuchsaufbau

Die im Folgenden beschriebenen Eingriffe wurden an 54 männlichen C57BL/6N Mäusen (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH; Sulzfeld, Deutschland) mit einem Alter von 11 Wochen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Tiere, bei denen während des chirurgischen Eingriffes oder danach ein Abbruch laut Abbruchkriterien des Tierversuch Antrages (TVA) erforderlich war, genutzt um den korrekten Sitz der Führungskanüle mit einer Färbung mittels Toluidinblau (drei Mäuse) und die ausreichende Eindringtiefe ebendieser mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung (sechs Mäuse) zu überprüfen.

Die Optimierung des Startzeitpunktes des mHBT nach ICV-A β ₁₋₄₂-Gabe und damit die Ermittlung des bestmöglichen Zeitpunktes, der einen möglichst sinnvollen Einsatz des ICV-A β ₄₂-Modells bietet, gliederte sich in 4 Phasen:

- Phase 1: Präparation der Tiere (Implantation der Führungskanüle und Injektion von A β ₄₂ oder Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. Phosphate buffered saline, PBS))
- Phase 2: Untersuchung von Kognition und Verhalten mit Hilfe des mHBT
- Phase 3: *postmortal*er Nachweis von zerebralem A β ₄₂
- Phase 4: laboranalytische Untersuchung von zerebraler Apoptose und Inflammation

Für den mHBT wurden die Tiere randomisiert in 3 Gruppen (und 9 Untergruppen) mit jeweils $n = 6$ Tieren (entsprechend Abbildung 9) eingeteilt:

1. Gruppe ($n = 24$): Die Mäuse bekamen nach 7 Tagen Akklimatisierungsphase eine intrazerebroventrikuläre Kanüle für die Dauer des gesamten Versuchs implantiert (genaue Beschreibung der Führungskanüle siehe III.2.3.1). 14 Tage nach der Implantation wurde bei diesen Tieren lösliches $A\beta_{42}$ injiziert (siehe III.2.3.2). Danach wurden die Tiere in 4 Untergruppen aufgeteilt und es begann der mHBT für 8 aufeinanderfolgende Tage entsprechend des Schemas 1 (= 1/ $A\beta_{42}$, $n = 6$), 2 (= 2/ $A\beta_{42}$, $n = 6$), 4 (= 4/ $A\beta_{42}$, $n = 6$) oder 8 (= 8/ $A\beta_{42}$, $n = 6$) Tage nach $A\beta_{42}$ -Injektion.

2. Gruppe ($n = 24$): Die Mäuse bekamen, nach der gleichen Akklimatisierungsphase wie Gruppe 1, ebenfalls eine Führungskanüle implantiert. 14 Tage nach der Implantation wurde bei diesen Tieren PBS injiziert. Danach wurden die Tiere in 4 Untergruppen aufgeteilt und es begann der mHBT für 8 aufeinanderfolgende Tage entsprechend des Schemas 1 (= 1/PBS, $n = 6$), 2 (= 2/PBS, $n = 6$), 4 (= 4/PBS, $n = 6$) oder 8 (= 8/PBS, $n = 6$) Tage nach PBS-Injektion.

3. Gruppe ($n = 6$): Diese Gruppe bestand aus nativen Mäusen ohne jeglichen chirurgischen Eingriff, die 21 Tage nach Ankunft (7 Tage Akklimatisierung plus 14 Tage, um die Regenerationszeit der Gruppen 1 und 2 mit abzudecken) den mHBT absolvierten (= N).

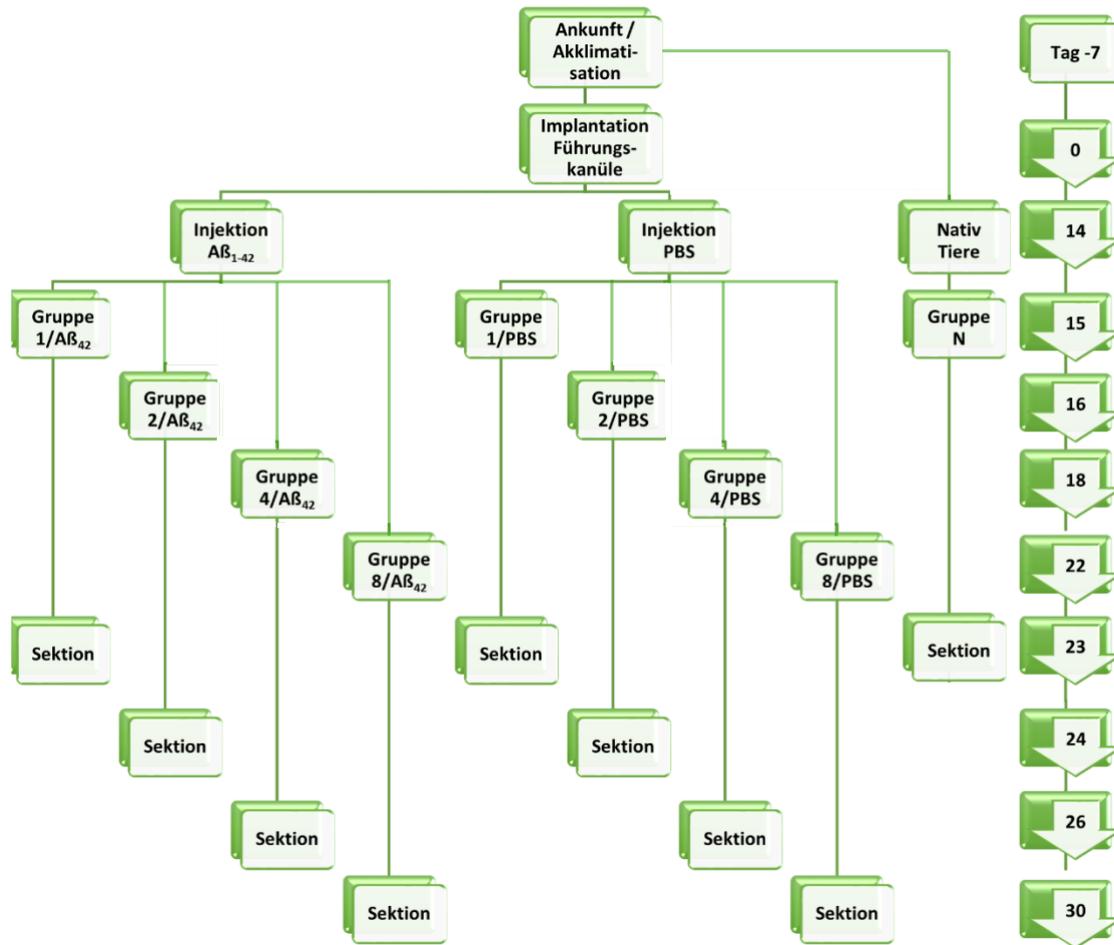


Abbildung 9: Einteilung der Tiere für den mHBT, randomisiert in 9 Untergruppen mit jeweils $n = 6$ Tieren und Darstellung des Zeitverlaufes für jede Gruppe

Schematischer Zeitverlauf des Versuchs der insgesamt 3 Versuchsgruppen und deren Untergruppen; aufgeteilt in die Aβ-Gruppen (1/Aβ₄₂, 2/Aβ₄₂, 4/Aβ₄₂ und 8/Aβ₄₂) die 1, 2, 4 bzw. 8 Tage nach der ICV-Injektion von löslichem Aβ₄₂ beginnen, den 8 Tage dauernden mHBT zu absolvieren, die PBS-Gruppen (1/PBS, 2/PBS, 4/PBS und 8/PBS), die 1, 2, 4 und 8 Tage nach der ICV-Injektion von PBS beginnt, den 8 Tage dauernden mHBT zu absolvieren und die Versuchsgruppe der nativen Mäuse (N), die 21 Tage nach Ankunft im Tierhaltungsraum ohne jeglichen chirurgischen Eingriff beginnt, den 8 Tage dauernden mHBT zu absolvieren.

Somit verliefen die Tage -7 bis 14 bei allen Aβ₄₂- und PBS-Gruppen gleich. Lediglich die nativen Mäuse blieben ohne chirurgische Intervention. An den Tagen 15, 16, 18 oder 22 erfolgte in den unterschiedlichen Versuchsgruppen jeweils der Beginn des mHBT 1, 2, 4 und 8 Tage nach Injektion entsprechend dem Versuchsaufbau.

Vor allen Eingriffen wurde der Allgemeinzustand der Tiere kontrolliert. Um die Mäuse an die Waage zu gewöhnen, wog man die Tiere im Zeitraum zwischen der Implantation

der Führungskanüle und Beginn des mHBT zusätzlich 3x im Abstand von 2 Tagen. Während der achttägigen Testperiode im mHBT wurden die Mäuse täglich gewogen. Um die Tiere mit den als Futterbelohnung eingesetzten Mandelstücken vertraut zu machen, erhielten die Mäuse in ihrem Käfig bereits 4 Tage vor Beginn des mHBT täglich zu Beginn der Dunkelphase zwölf Mandelstücke. Diese Anzahl entsprach der Gesamtmenge aller im Test für die Tiere an einem Tag auffindbaren Mandelstückchen. Der mHBT selbst wurde über einen Zeitraum von 8 Tagen jeweils zur gleichen Uhrzeit mit Beginn der Dunkelphase um 15 Uhr durchgeführt. Pro Tag musste jede Maus 4 Durchläufe mit einer Dauer von jeweils maximal 5 Minuten absolvieren. Dabei alternierte die Reihenfolge der Mäuse nach einem randomisierten Schema in jedem Durchgang und an jedem Versuchstag. Alle Tiere der PBS- und N-Gruppen wurden am letzten Tag nach Beendigung des mHBT in tiefe Sevofluran-Narkose (siehe III.2.5.1.3) gelegt und durch Dekapitation und anschließendes Entbluten euthanasiert. Den Tieren der A β ₄₂- und PBS-Gruppen wurden zuvor unter einer gewichtsabhängigen *intraperitoneal* (i.p.) Injektion, bestehend aus einer Kombination von 5 mg / kg Körpergewicht (KGW) Midazolam, 0.5 mg / kg KGW Medetomidin und 0.05 mg / kg KGW Fentanyl (MMF), *Liquor cerebrospinalis* entnommen und diese danach analog zu den anderen Gruppen euthanasiert. Aus dem Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme Serum gewonnen, das bei - 80 °C gefroren und zur weiteren Verwendung aufbewahrt wurde. Das Gehirn wurde für die weitere Untersuchung hinsichtlich zerebralem A β ₄₂ entnommen, auf Trockeneis tiefgefroren und ebenfalls bei - 80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert (siehe III.2.5.1 Präanalytische Probenbehandlung und Euthanasie).

2.3. Chirurgische Verfahren

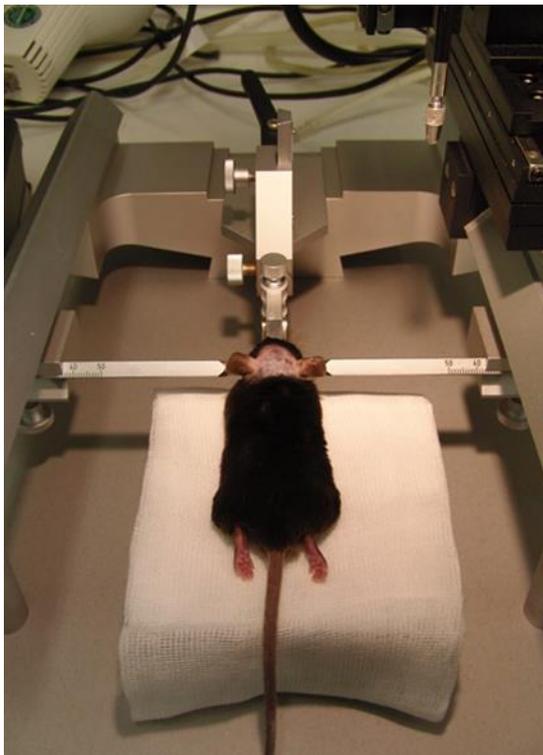
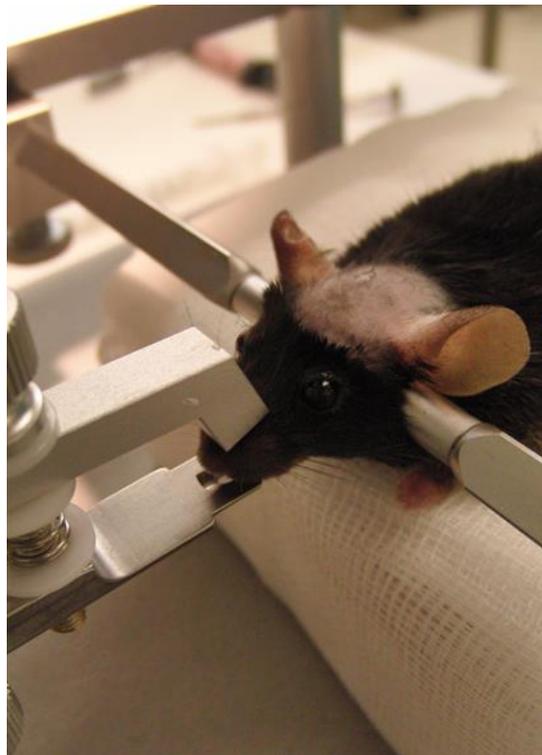
2.3.1. Implantation der intrazerebroventrikulären Führungskanüle

Den Tieren stand bis zu dem Zeitpunkt der Anästhesie Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Um sicher zu stellen, dass es sich um gesunde Tiere handelte, wurden diese vor dem Eingriff einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen und gewogen.

Die Einleitung der Anästhesie erfolgte mittels einer gewichtsabhängigen i.p. MMF-Injektion. Für die *peri-* und *postoperative Analgesie* bekamen alle Tiere zusätzlich bereits *präoperativ* 0.1 mg / kg KGW Buprenorphin (Tramadol ratiopharm® 50 mg / ml Injektionslösung, Ratiopharm GmbH; Ulm, Deutschland) *subkutan* (s.c.) injiziert. 5 min nach der MMF-Injektion erfolgte die Überprüfung des Reflexausfalles durch Kneifen

des Zwischenzehenraums, um den Eintritt der gewünschten Anästhesietiefe mit Bewusstseinsverlust zu bestätigen. Zusätzlich wurde der Lidschlussreflex überprüft und die Augen mit einer Salbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH; Leverkusen, Deutschland) benetzt, um ein Austrocknen der Kornea während des Eingriffs zu verhindern.

Nach Rasieren des Kopfes wurde jedes Tier in einem stereotaktischen Rahmen fixiert, anschließend erfolgte die Reinigung der Kopfhaut mittels einem mit Natriumchloridlösung (NaCl) angefeuchteten Tupfers und die Desinfektion des Operationsbereiches mit Cutasept® F (BODE Chemie GmbH; Hamburg, Deutschland). Der Kopf wurde gerade und symmetrisch ausgerichtet und fest eingespannt (Abbildung 10A und B). Über eine Nasenklemme wurde das Tier zusätzlich fixiert (Abbildung 10B). Es folgte eine *subkutane*, lokale Infiltrationsanästhesie des Inzisionsbereiches mit Lidocainhydrochlorid 2 mg / kg KGW (Xylocain 2 %, Astra Zeneca; Cambridge, Großbritannien). Nachfolgend eröffnete man mittig auf dem Schädel 0.5 cm kaudal der Stirn die Haut mit einem Skalpell auf einer Länge von max. 1 cm, vom Os frontale bis Os parietale reichend. Anschließend wurde die knöcherne Schädeldecke mit Wasserstoffperoxid-getränkten Wattetupfern vorsichtig freigelegt und abgetrocknet, um die für die weitere Orientierung wichtigen Knochennähte sichtbar zu machen (Abbildung 10C).

A**B**

C



D



Abbildung 10: Versuchstier im stereotaktischen Rahmen

A: Fixierung des Tieres im stereotaktischen Rahmen mit geradem und symmetrisch ausgerichtetem Kopf.

B: Zusätzliche Fixation über eine Nasenklemme für mehr Stabilität und Symmetrie.

C: Eröffnung der Schädelhaut mittig, 0,5 cm kaudal der Stirn auf einer Länge von max. 1 cm, vom Os frontale bis Os parietale reichend und Identifizierung der Knochennähte zur weiteren Orientierung (Bregma).

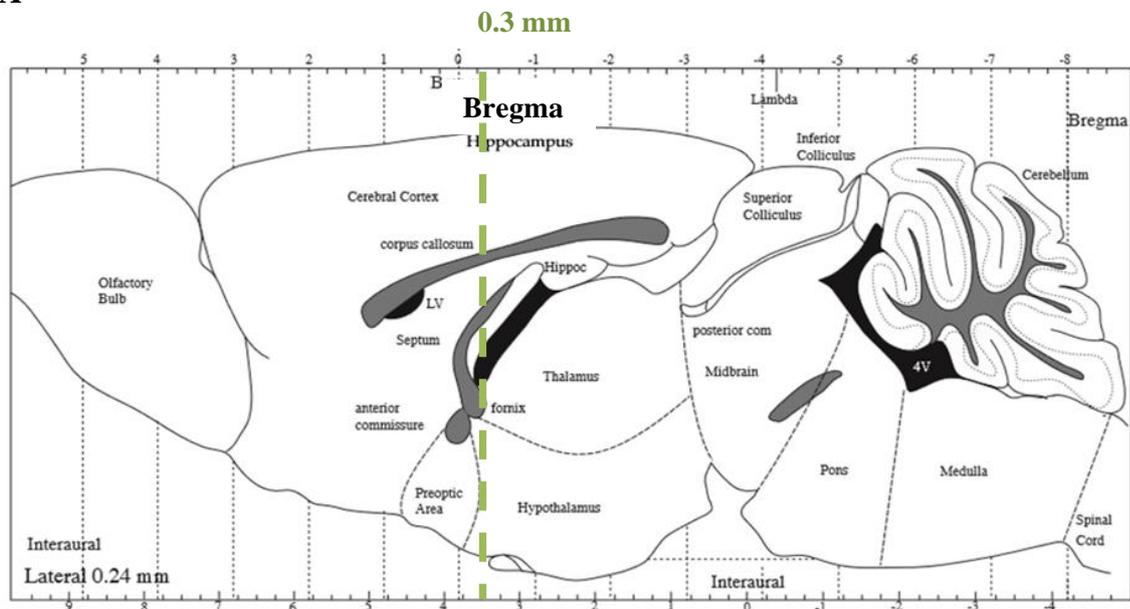
D: Implantierte 23 G-Führungskanüle (10 mm Länge) mit Fixationsschraube, verbunden über den 2-Komponenten-Zahnzement.

Die korrekte Bohrlochposition zur Ausrichtung in Ventrikelhöhe erfolgte durch eine computergesteuerte, motorisierte, stereotaktische Vorrichtung, die zunächst mittig auf dem Bregma als definierte Ausgangsposition platziert wurde. Als Bregma wurde der anatomische Punkt auf dem Schädeldach bezeichnet, an dem die Sutura coronalis (Kranznaht) und die Sutura sagittalis (Pfeilnaht) aufeinandertreffen. Anschließend steuerte man folgende stereotaktische Koordinaten, berechnet und entnommen aus PAXINOS und FRANKLIN (2001) an: 0.3 mm kaudal und 1.0 mm lateral vom Bregma (siehe Abbildung 11). Dort wurde der Bohrer (Labset-N, Rewatronik GmbH; Wald-Michelbach, Deutschland) mit einem 0.8 mm großen Bohrkopf angesetzt und bis unter die letzte Knochenlamelle gebohrt. Ein 2. Bohrloch für die Fixationsschraube (DIN 84

AM 1.0x2 NIRO A1, Paul Korth GmbH; Ludenscheid, Deutschland) wurde 0.5 cm kaudolateral des ersten Loches gesetzt.

Nun wurde mittels Stereotaxie die 23 G-Führungskanüle (10 mm lang, Außendurchmesser 0.6 mm) mit einer Eindringtiefe von 2 mm im Gewebe platziert und die Schraube mit einem Gewindeüberstand von 3 - 4 mm im 2. Bohrloch verschraubt. Beide wurden mit Hilfe des zuvor angerührten gewebeverträglichen 2-Komponenten-Zahnzementes (Dual Cement, Ivoclar Vivadent AG; Schaan/Liechtenstein, Deutschland) miteinander verbunden und damit direkt auf dem Schädelknochen fixiert (Abbildung 10D). Die Haut wurde anschließend mit Einzelstichen (Prolene 4-0, Johnson & Johnson Medical GmbH Ethicon Deutschland; Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

A



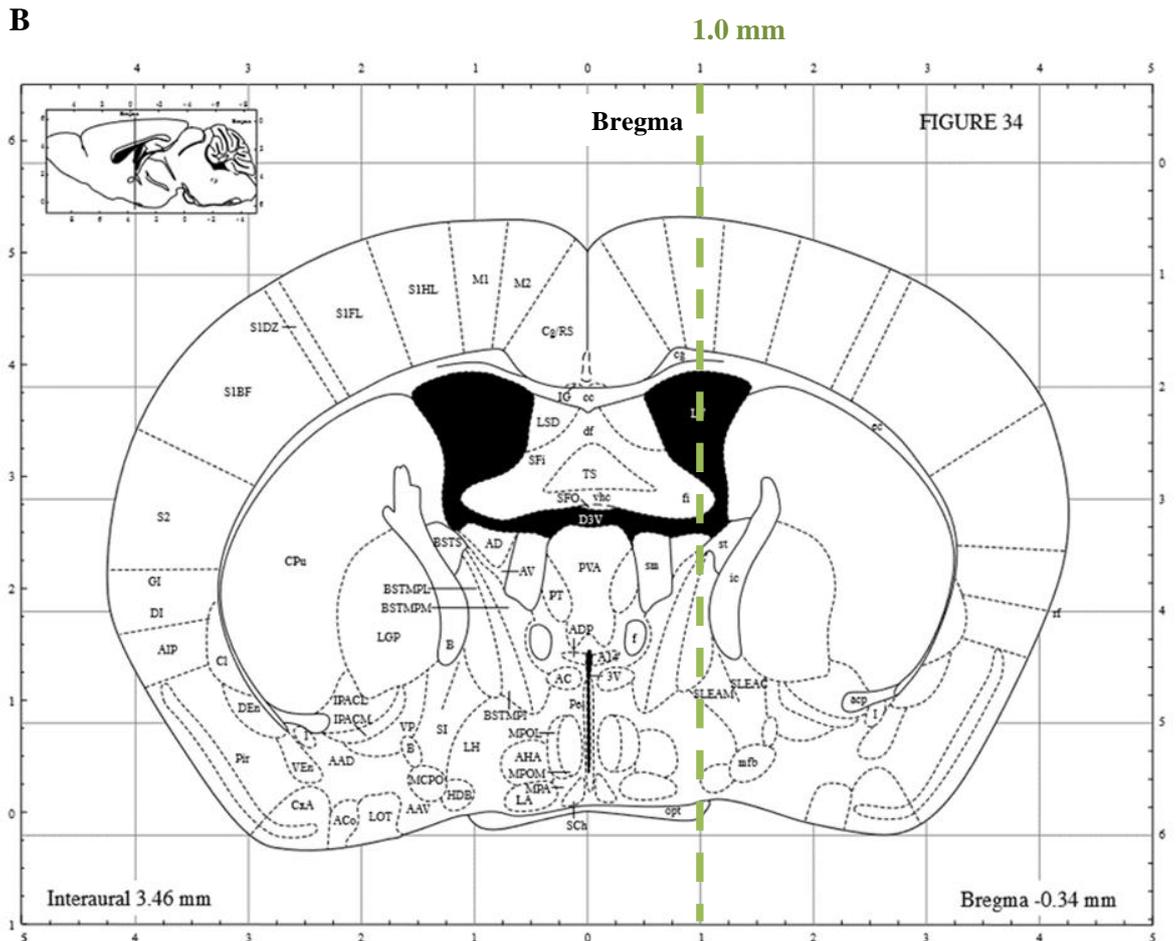


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Bohrlochposition zum Setzen der 23 G-Führungskanüle mit einer Eindringtiefe von 2 mm

A: Sagittale Ansicht des Maushirns mit Angabe der Position des Bohrloches (0.3 mm kaudal vom Bregma = 0), durch die gestrichelte grüne Linie angegeben.

B: Frontalebene des Maushirns mit Angabe der Position des Bohrloches in der 2. Ebene (1.0 mm lateral vom Bregma = 0), durch die gestrichelte grüne Linie angegeben.

Die Abbildungen sind übernommen aus PAXINOS und FRANKLIN (2001) „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates Academic Press“.

Nach Ende des operativen Eingriffs wurde die Narkose gewichtsadaptiert mit einer Kombination aus 2.5 mg / kg Atipamezol, 0.5 mg / kg Flumazenil und 1.2 mg / kg Naloxon (AFN) mittels einer i.p. Injektion antagonisiert. Die Tiere verblieben nachfolgend unter Beobachtung bis zur endgültigen Erholung in einer durchsichtigen Plexiglasbox mit Sauerstoffzufuhr und Wärmematte. Während dieser Phase wurden die Atmung und die Reflexe regelmäßig überprüft. Die *postoperative Analgesie* umfasste bei allen Tieren neben der oben erwähnten präoperativen Buprenorphin-Gabe bis 3 Tage

nach dem Eingriff die 2x tägliche orale Gabe von 200 mg / kg KGW Metamizol oral (Novalgin[®] Tropfen, 500 mg / 442.84 mg pro ml, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH; Frankfurt, Deutschland).

2.3.2. Intrazerebroventrikuläre Injektion des löslichen A β ₁₋₄₂

Nach Implantation der Kanüle und einer 14-tägigen Regenerationszeit erhielten die Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit über die Führungskanüle (siehe Abbildung 10D) lösliches A β ₄₂ oder PBS injiziert.

Zunächst wurde die A β ₄₂-Stammlösung hergestellt. Dazu löste man 50 μ g A β ₄₂ in Pulverform (American Peptide Sunnyvale; CA, USA); dass unter Verwendung von Hexafluorisopropanol (HFIP, Sigma Aldrich; St. Louis, Missouri, USA) *aliquotiert* und bei -20 °C aufbewahrt wurde, in 111 μ l Natronlauge (pH 12.2), erwärmte dies in einem Wasserbad bei 37 °C für 10 Minuten mit anschließender Beschallung für 30 s. Die entstandene 100 μ molare Lösung wurde mit 1 % PBS (pH 7.4) um den Faktor 100 auf eine 1 μ molare Lösung verdünnt, um das Oligomerisierungsverfahren zu starten und für 30 s in das Ultraschallbad gestellt. Es folgte im Wechsel je 30 s Mischen und 30 s im Ultraschallbad, bevor die Lösung ein letztes Mal für 30 s gemischt und auf Eis gelagert wurde. Die A β ₄₂-Lösung wurde jeweils frisch angesetzt und zwischen 15 und 45 min nach der Herstellung verwendet. Vor der Anwendung wurde die Lösung auf Raumtemperatur gebracht, indem 10 min vor Gabe in den Mausventrikel die Verdünnung der vorbereiteten Lösung mit zimmerwarmer PBS-Lösung auf 3.5 μ l Gesamtvolumen erfolgte. Bei einem *Liquorvolumen* von 35 μ l - 40 μ l, welches für eine erwachse Maus in der Literatur angegeben wird (SMITH et al., 2014; SAKIC, 2019), ergab sich so intrazerebroventrikulär eine geschätzte A β ₄₂-Konzentration von 100 nmol (0.1 μ mol).

Für die Injektion der A β ₄₂-Lösung fixierte eine Hilfsperson die Maus mit Daumen und Zeigefinger in der Hand. Anschließend wurde über eine Hamiltonspritze (Hamilton Company; Nevada, USA) mit Verlängerungsschlauch (Silastic[®] Laboratory Tubing, 0.30 mm Innendurchmesser, Dow Corning GmbH; Wiesbaden, Deutschland) ein Volumen von 3.5 μ l 100 nmol A β ₄₂-Lösung über die Führungskanüle in den Ventrikel der Maus appliziert. Die Injektion erfolgte gleichmäßig über einen Zeitraum von 60 - 120 s. Nachfolgend spülte man die Kanüle mit 1.5 μ l 1 % PBS.

Die Injektion der 1 % PBS-Lösung bei den Tieren der PBS-Gruppen erfolgte nach dem gleichen Vorgehen. Hier wurde über dasselbe System die gesamte Menge von 5 μ l

vorbereiteter 1%ige PBS-Lösung über mindestens 60 - 120 s gleichmäßig injiziert. Danach wurde das Tier zurückgesetzt.

2.4. Der modifizierter Hole-Board-Test

2.4.1. Vorbereitung des modifizierten Hole-Board-Test

Wie unter Abschnitt III.2.2 Versuchsaufbau beschrieben, wurden die Tiere zur Überprüfung des Gesundheitszustandes und zur Gewöhnung an die Waage bereits nach der Implantation der Führungskanüle und vor dem mHBT zusätzlich 3x im Abstand von 2 Tagen gewogen. Mit den als Futterbelohnung eingesetzten Mandelstückchen wurden die Tiere über 4 Tage vor Beginn des mHBT vertraut gemacht.

Der Beginn des Verhaltenstests richtete sich nach der Zugehörigkeit zu der jeweiligen Versuchsgruppe der Tiere (siehe III.2.2). Somit wurden die Tiere an Tag 1, 2, 4 und 8 nach Aß₄₂-Injektion und an Tagen 1, 2, 4 und 8 nach der Injektion von PBS nach dem im Folgenden beschriebenen und bereits etablierten Protokoll mit dem mHBT getestet (ECKEL et al., 2013; FENDL, 2013; SCHMID et al., 2017).

2.4.2. Aufbau des modifizierten Hole-Board-Test

Basis des Tests bildete das ursprünglich für das Erkundungsverhalten von Ratten (FILE und WARDILL, 1975) und später für Mäuse weiter entwickelte Hole-Board (modifiziert nach OHL et al. (2003)). Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 12C dargestellt:

Bei der Testarena handelte es sich um ein Brett, das sog. Board, welches das Zentrum eines offenen Feldes in einer nach oben offener, quadratischer Box bildete. Das Board (35 x 18 x 1 cm) und die Box (äußere Kantenlänge 52 cm) waren aus undurchsichtigem, grauem Polyvinylchlorid (PVC) (eigene Herstellung). Der Boden der Box wurde mit weißem Isolierband (Breite 1 cm) (Tesa[®] Iso Tape (56192-00011), Tesa SE; Hamburg, Deutschland) in 9 gleich große Quadrate (ca. 16 x 16 cm) unterteilt. Das Board besaß 2 Reihen parallel ausgefräster Lochvertiefungen, jeweils 5 pro Reihe, mit 0.3 cm Tiefe und einem Durchmesser von 3.2 cm und passgenau aufgesteckten PVC-Zylindern (Höhe 3.4 cm). Jede der Lochvertiefungen wurde mit Hilfe einer Pinzette mit einem Mandelstückchen (durchschnittlich 0.03 g) versehen und für die Tiere unerreichbar mit einem feinmaschigen Gitter (Quadratlochung 2 mm) abgedeckt. Die Zylinder wurden auf die Lochvertiefungen gesteckt und jeweils 3 Zylinder wurden an ihrer oberen Außenwand rundum mit weißem Klebeband (Tesa[®] Iso Tape (56192-00011), Tesa SE;

Hamburg, Deutschland) optisch markiert. In jedem dieser 3 optisch markierten Zylinder wurde ein zusätzliches Mandelstück im Zentrum oberhalb des Drahtgitters und somit erreichbar für die Tiere, platziert. Zusätzlich wurde jeder Zylinder vor jedem neuen Durchlauf an der oberen Innenseite ringsum mit 0.3 % Vanillearomalösung (Vanillearoma, Fa. Th. Geyer; Höxter, Deutschland) bestrichen. Nach einem randomisierten Schema wechselte die Verteilung der markierten Zylinder nach jedem Versuchstag (siehe Tabelle 3).

Die während eines jeden mHBT-Durchlaufes beobachteten Aktivitäten des Tieres wurden in einem speziellen Programm zur Observation (The Observer® 5.0, Noldus Information Technology; Wageningen, Niederlande) manuell von einem Untersucher mittels definierter Befehle über eine geräuscharme Silikontastatur (Foldable Keyboard, Fold- 2000; Taiwan) erfasst und gespeichert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Tastaturbefehle und deren Bedeutung für den mHBT

Aktion	Tastenbelegung	Definition
Beginn des Durchlaufs	Return	Loslassen der Maus in der Box
Betreten des Boards	r	Zielgerichtetes Betreten des Boards mit mindestens einer Vorderpfote
Verlassen des Boards	v	Zielgerichtetes Verlassen des Boards mit beiden Vorderpfoten
Korrektes Loch 1/2/3	f, g, h	Aktives Aufsuchen eines markierten und noch befüllten Zylinders
Motorische Fertigkeit	d	Nase unterhalb der oberen Zylinderebene
Fressen Beginn	x c	Tier beginnt in der Box zu fressen Tier beginnt auf dem Board zu fressen
Wiederholung	l	Aktives Aufsuchen eines Lochs nach vorherigem Besuch mit Futteraufnahme
Falsches Loch	k	Besuch eines nicht markierten Loches
„Männchen machen“	t	Erheben auf die Hinterbeine, auch innerhalb einer Schnupperphase oder Fressphase
Fellpflege Beginn	z u	Putzen, Kratzen in der Box Putzen, Kratzen auf dem Board
Immobilität	i 6	Keine Aktivität ab 3 - 5 s regungsloses Verharren in der Box Keine Aktivität ab 3 - 5 s regungsloses Verharren auf dem Board
Beenden einer Phase	j	Beenden einer Aktivität: Motorische Fertigkeit, Fressen, Fellpflege und Immobilität
Linienüberschreitung	e	Zielgerichtetes Übertreten der Linie mit beiden Vorderpfoten
Urinabsatz	n	Urinabsatz
Bolus	b	Kotabsatz

Dokumentationsschema nach dem Formblatt „Datenerhebung und Definition im mHBT“ der Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesie“ der Klinik für Anästhesiologie des Klinikums rechts der Isar, der Technischen Universität München. Die beobachteten Aktionen des Tieres werden mittels festgelegter Tastenkombinationen anhand der angegebenen Tastaturbefehle in das Observationsprogramm eingegeben.

Ein Durchlauf des mHBT und die Datenerfassung wurde beendet, wenn das Tier die Futterbelohnungen aus allen 3 markierten Zylindern gefunden und gefressen hatte. Fand das Tier in einem Testdurchlauf des mHBT nicht alle Futterbelohnungen innerhalb einer Maximalzeit von 5 min, wurde der Durchgang für dieses Tier beendet.

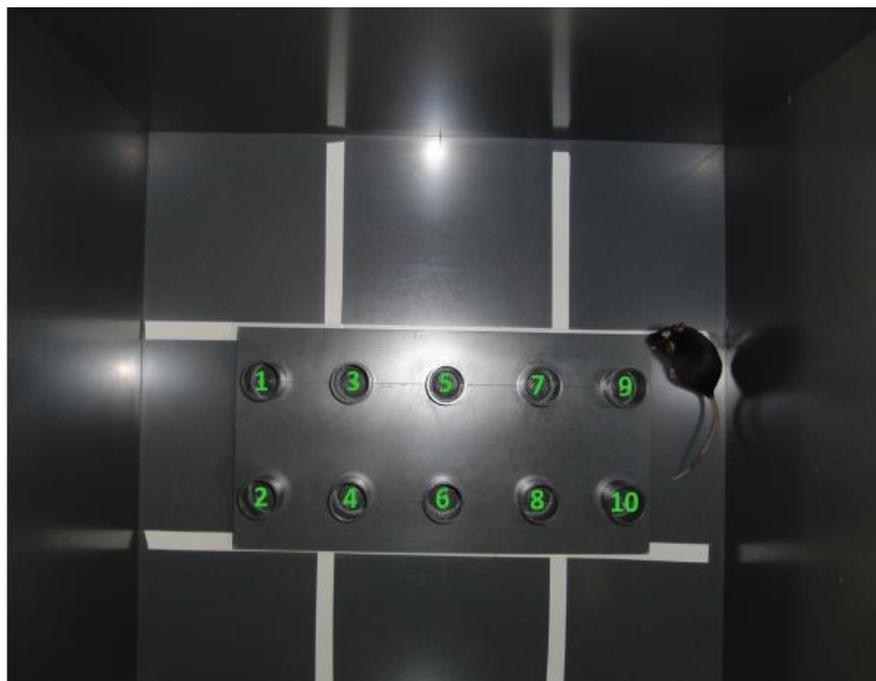
A**B****C**

Abbildung 12: Modifiziertes Hole-Board bestehend aus Versuchsarena und zentral liegendem Hole-Board mit 10 aufgesteckten Zylindern

A: Ausschnitt des Boards mit den zweireihig angeordneten PVC-Zylindern. Die Zylinder oben rechts und unten links sind jeweils optisch markiert und zusätzlich mit einer für die Maus erreichbaren Mandel bestückt.

B: Aktives Aufsuchen eines markierten Zylinders durch das Versuchstier.

C: Aufsicht auf die gesamte Testarena inklusive Board, im Zentrum einer nach oben offener, quadratischer Box mit einem Versuchstier. Nummerierung der festen Zylinderanordnung. Der Boden der Box ist mit weißem Isolierband in 9 gleich große Quadrate unterteilt.

2.4.3. Versuchsablauf

Der mHBT wurde je nach Gruppenzugehörigkeit des jeweiligen Tieres an 8 aufeinander folgenden Tagen bis zu Tag 8, 10, 12 und 16 nach der intrazerebroventrikulären Injektion durchgeführt. Zeitpunkt der Durchführung waren die ersten Stunden der Dunkelphase (Beginn 15:00 Uhr, Ende Dunkelphase 03:00 Uhr). Der Test fand unter Rotlicht statt (60 W Glühbirne, rotes Naturglas, Radium Lampenwerk GmbH; Wipperfurth, Deutschland).

Der Versuchsablauf folgte einem festen Schema:

Der Computer für die Dateneingabe wurde gestartet, die Box mit feuchtem Zellstoff (Wasser) gereinigt und das Hole-Board nach dem oben beschriebenen Schema vorbereitet.

Tabelle 3: Randomisierte Lochkombinationen der markierten Zylinder im mHBT

Versuchstag	Lochnummer
1. Tag	2 / 7 / 8
2. Tag	1 / 4 / 9
3. Tag	3 / 5 / 8
4. Tag	1 / 4 / 10
5. Tag	2 / 5 / 9
6. Tag	3 / 6 / 9
7. Tag	4 / 8 / 10
8. Tag	2 / 5 / 8

Versuchsschema der Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesie“ der Klinik für Anästhesiologie des Klinikums rechts der Isar, der Technischen Universität München.

Das Board wurde mittig in der Box platziert. Nun erfolgte die Eingabe der Identifikationsnummer des Tieres, der Durchlaufnummer und des Versuchstages in das PC- Programm. Nach der adspektorischen Beurteilung des Tieres wurde es mit einem Griff der linken Hand an der Schwanzbasis aus dem Käfig gehoben und im linken vorderen Quadranten der Versuchsarena abgesetzt. Zeitgleich mit Einsetzen des Tieres in die Versuchsarena startete man auf der Tastatur das Observationsprogramm. Der Zeitpunkt und gegebenenfalls die Dauer wurden vom Untersucher blind und zeitlich synchron zur jeweiligen Tieraktion eingegeben. Nach Abschluss eines Durchlaufes beendete der Untersucher das Programm manuell und setzte das Tier wieder in seinen Käfig zurück. Danach wurde die Testarena mit einem feuchten Zellstofftuch gereinigt und für die nächste Maus vorbereitet. Die Reihenfolge der Mäuse alternierte nach einem randomisierten Schema in jedem Durchgang und an jedem Versuchstag. Dabei absolvierte jedes Tier 4 Durchläufe pro Tag über die gesamten 8 Versuchstage. Das Observationsprogramm transformierte und exportierte die erhobenen Daten in eine Excel-Tabelle (Microsoft Excel 2003; Redmond, USA) als Grundlage für die weitere Auswertung.

2.4.4. Mit dem modifizierten Hole-Board-Test erhobene Parameter

Mit Hilfe seines komplexen, visuell-räumlichen Testprinzips kann der mHBT parallel Kognition, motorische, emotionale und Verhaltensparameter in nur einem Testverfahren abbilden (GORDAN et al., 2012) (Zusammenfassung siehe Tabelle 4):

1. Kognitionsparameter

Anhand der Kognitionsparameter ließen sich Lernleistung, Motivation, aber auch Funktionalität des deklarativen Gedächtnisses und die Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses der Mäuse beurteilen.

Die Gesamtgedächtnisleistung wurde in der Gesamtdurchlaufzeit abgebildet der sog. *Time Trial*. Die Zeit, die ein Tier benötigte, um einen gesamten Testdurchlauf zu absolvieren, galt dabei als Indikator für die Lernleistung.

Das bewusste Erinnern an Ereignisse und Fakten ist dem deklarativen Gedächtnis zugeordnet. Indikatoren dieses Gedächtnisses stellten folgende kognitiven Parameter dar: der Besuch nicht markierter Zylinder (*Wrong Choices*) und das Nicht-Besuchen markierter Zylinder, die sog. Auslassungsfehler (*Omission Errors*). Die beiden Parameter wurden zu den Gesamtfehlern eines Durchlaufs (*Wrong Choices total*) aufsummiert.

Als Leistung des dem präf. Kortex zugeordneten Arbeitsgedächtnisses, wurden die wiederholten Besuche markierter, zuvor aber bereits geleerter Löcher (*Repeated Choices*) gewertet.

2. Motorische Parameter

Hier unterschied man allgemein zwischen der lokomotorischen Aktivität der Tiere und ihren feinmotorischen Fähigkeiten. Die Häufigkeit, mit der sie die in die Versuchsarena eingeklebten weißen Linien während eines Testdurchlaufs überquerten, wurde im Parameter *Line Crossing* abgebildet und gab einen Einblick in die lokomotorische Aktivität der Tiere. Die feinmotorischen Fähigkeiten ließen sich mit Hilfe des *Time Food Intake*, also der Zeit, welche die Maus braucht, um ein Mandelstückchen zu fressen, interpretieren.

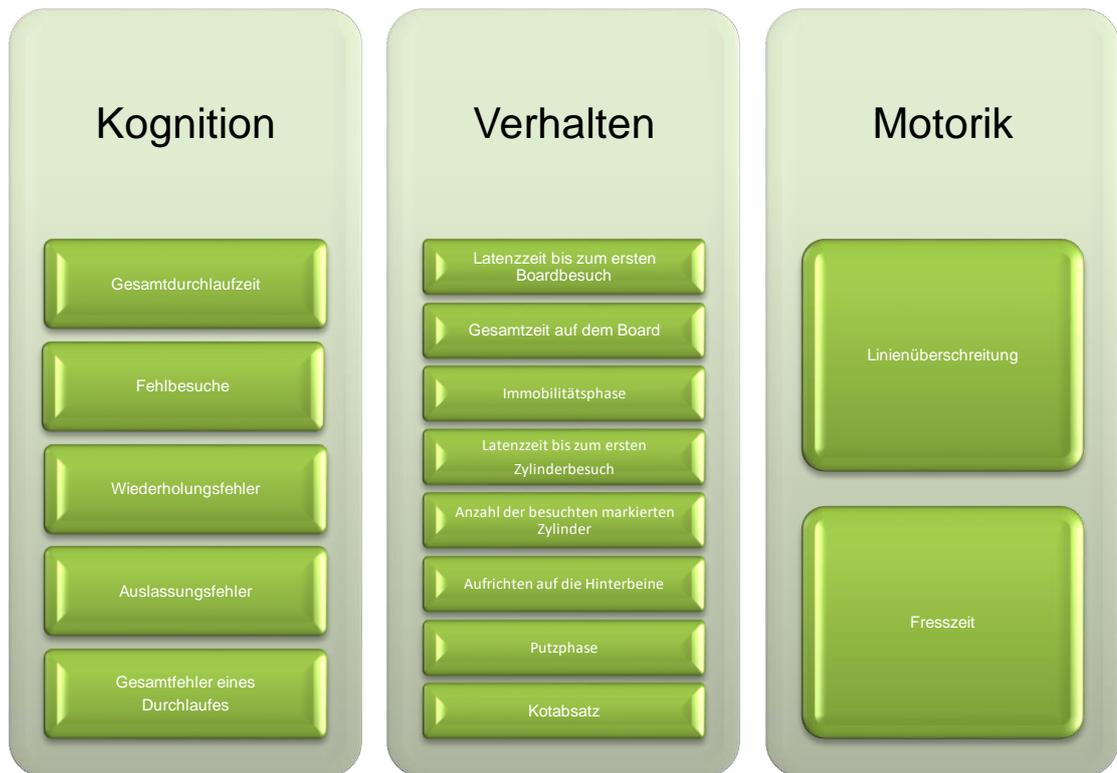
3. Verhaltensparameter

Mit dem mHBT ließen sich im Kern Angst, Erkundung und Erregung als 3 der Hauptverhaltensqualitäten der Mäuse abbilden.

Als klassische Angstparameter wurden dabei aufgezeichnet: Die Latenzzeit, die das Tier benötigte, um das Zylinderbrett das erste Mal zu betreten (*Latency First Board Entry*) und die Zeit, die das Tier insgesamt auf dem Board verbrachte (*Time on Board*). Als weiteres Zeichen von Angst wurde das bewegungslose Verharren der Tiere in der Testarena interpretiert (*Immobility*).

Das Erkundungsverhalten wurde unterschieden in gerichtet und ungerichtet. Als gerichtetes Erkundungsverhalten wertete man die Dauer, bis das erste Loch aufgesucht wurde (*Latency First Hole Visit*) und die Gesamtzahl der besuchten Löcher mit Futterbelohnung (*Correct Hole Visits*). Das Aufrichten auf die Hinterbeine (*Rearing*) zählte man zu ungerichtetem Erkundungsverhalten der Umgebung.

Die Parameter Kotabsatz (*Boli*) und die Putzphasen (*Grooming*) gaben einen Hinweis auf den physiologischen Erregungszustand der Tiere.

Tabelle 4: Mit Hilfe des mHBT erhobene Parameter

Zusammenfassende Darstellung untersuchter Parameter im mHBT (modifiziert nach OHL et al. (2003)).

2.5. Euthanasie und Probennahme

2.5.1. Präanalytische Probenbehandlung und Euthanasie

2.5.1.1. Liquor cerebrospinalis-Entnahme

Bei allen Versuchsgruppen wurde vor der Euthanasie eine Probe des *Liquor cerebrospinalis* (engl. cerebrospinal fluid, CSF) entnommen. Hierzu wurden die Mäuse wie unter III.2.3.1 Implantation der intrazerebroventrikulären Führungskanüle beschrieben, mittels einer gewichtsabhängigen i.p. Injektion mit MMF anästhesiert. Trat die gewünschte Anästhesietiefe mit Bewusstseinsverlust ein, wurde über die Zisterna magna ein Zugang gewählt um eine CSF-Probe nach LIU und DUFF (2008) zu gewinnen (siehe Abbildung 13):

Nach Rasieren des Kopfes und der Reinigung mittels eines mit NaCl angefeuchteten Tupfers sowie Desinfektion mit Cutasept® F, wurde das Tier im stereotaktischen Rahmen fixiert. Es folgte eine lokale, *subkutane* Infiltrationsanästhesie des Inzisionsbereiches mit Lidocainhydrochlorid (Xylocain 2 %, Astra Zeneca; Cambridge,

Großbritannien). Nachfolgend eröffnete man mittig die Haut der Schädelbasis mit einem Skalpell auf einer Länge von ca. 2 cm. Anschließend wurde sämtliches *subkutane* Gewebe und die Muskulatur (*M. biventer cervicis* und *M. rectus capitis dorsalis major*) durch stumpfe Dissektion mit einer Pinzette getrennt. 2 Mikroretractoren wurden verwendet, um die Muskulatur auseinander zu halten und die uneingeschränkte Sicht auf die Dura mater über der Zisterna magna zu gewährleisten. Die Dura erschien als glänzendes, klares und umgekehrtes Dreieck, durch das die Medulla oblongata und die Arteria dorsalis spinalis sichtbar waren. Sie wurde mit sterilen Wattestäbchen trocken getupft. Nach Lagekorrektur des Mauskörpers von der waagerechten Position in einen Winkel von annähernd 135° wurde die Dura mater mit einer selbst gezogenen Glaskapillare in einem Winkel von 45°, unter Zuhilfenahme einer Kopf Lupe (Carl Zeiss Meditec AG; Jena, Deutschland) lateral der Arteria dorsalis spinalis, mit einer Eindringtiefe von einem Millimeter, durchstoßen. Die durch Kapillarwirkung gewonnene CSF wurde in ein 0.5 ml Eppendorfer Reaktionsgefäß (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland) verbracht und bei - 80 °C zur weiteren Untersuchung verwahrt. Danach wurden die Mäuse durch Dekapitation euthanasiert.

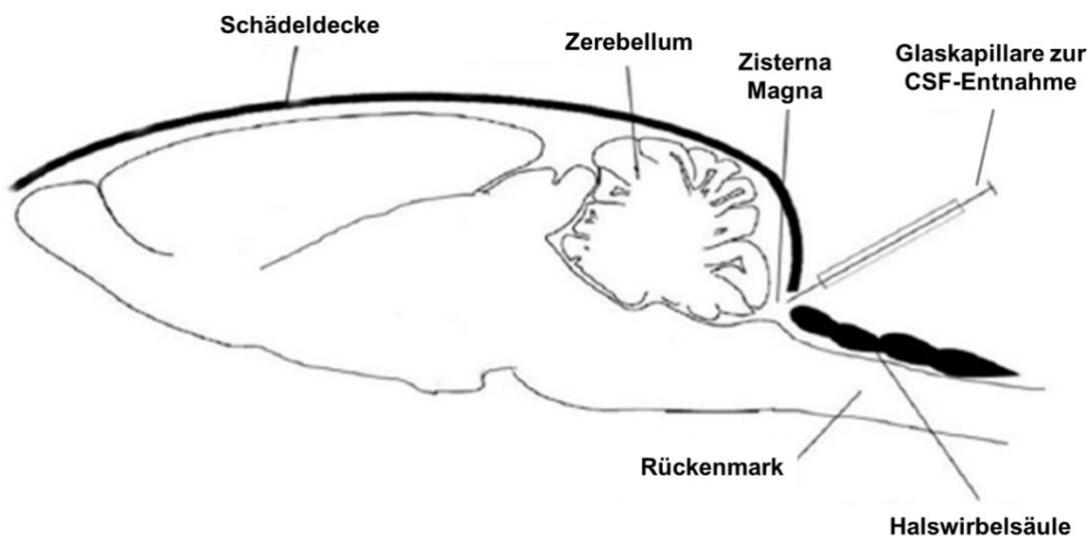


Abbildung 13: Schematische Darstellung der CSF-Entnahmestelle über die Zisterna magna bei Mäusen (VATANDOUSTA et al., 2016)

2.5.1.2. Toluidinblau-Färbung

Für die Färbung wurden zu den 54 verwendeten C57BL/6N Mäusen dieser Studie 3 weitere Mäuse herangezogen. Dies waren Tiere, bei denen während des standardisierten

Protokolls des Versuchsaufbaus ein Abbruch während oder nach dem chirurgischen Eingriff laut Abbruchkriterien des TVA erforderlich war. Damit diese Tiere nicht „ohne Nutzen“ verloren gingen wurden sie zur Überprüfung des korrekten Sitzes der Führungskanüle verwendet. Sie wurden direkt im Anschluss nach dem Eingriff nach gleichem Schema wie unter III.2.5.1.3 euthanasiert. Die Überprüfung des korrekten Sitzes der Führungskanüle erfolgte dann mit einer Färbung mittels Toluidinblau (chem. Summenformel: $C_{15}H_{16}ClN_3S$). Dies ist ein blauer Farbstoff, der sowohl in der Histologie als auch in der medizinischen Diagnostik (intravitale Färbung) eingesetzt wird.

2.5.1.3. Euthanasie

Am 8. und letzten Tag des mHBT wurden die Tiere mittels 8.0 Volumen Prozent Sevofluran in einer Plexiglasbox in tiefe Narkose versetzt und durch Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde in toto entnommen. Dazu wurde die Schädelkalotte durch Resektion von Kopfhaut und Muskulatur freigelegt und die Schädelknochen bis zur Kranznaht durch eine Pinzette abgetragen. Die Entnahme aus der Schädelgrube erfolgte mittels Spatel. Das Gehirn wurde mit der Basis nach unten auf einer Metallplatte auf Trockeneis unmittelbar nach Entnahme tiefgefroren. Sobald das Gehirn komplett gefroren war, wurde es in einem Aluminiumzylinder bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Für die weitere Untersuchung wurde die linke, *contralaterale* Hälfte des Gehirns, ohne Führungskanüle, in sagittale Schnitte von $50\text{ }\mu\text{m}$ für die Histologie geteilt. Die rechte, *ipsilaterale* Gehirnhälfte, in welcher die Führungskanüle lag, wurde in die Regionen Hippokampus und medialer präf. Kortex (MPFK) für Analytik der Apoptose und Inflammation getrennt.

2.5.2. Analytik der $A\beta_{1-42}$ -Konzentration, Apoptose und Inflammation

Es wurden im CSF und im Gehirn (an den Tagen 8, 10, 12 und 16 nach der ICV- $A\beta_{42}$ -Injektion) die Konzentrationen von Caspase 3, Tau, P-Tau sowie $TNF\alpha$ durch Western Blot (WB) (Punkt III.2.5.2.1) bestimmt und zusätzlich erfolgte die Messung des $A\beta_{42}$ -Spiegels mittels ELISA (Punkt III.2.5.2.2).

Bevor die einzelnen Proben im Westen Blot analysiert werden konnten, war eine Proteinaufbereitung durch chemischen und mechanischen Aufschluss aus dem Gewebe (a), eine quantitative Proteinbestimmung (b) sowie die Probenvorbereitung für weitere Untersuchungen (c) notwendig.

a) Proteinaufbereitung der Proben

Die Gewebeproben wurden unter Zuhilfenahme eines sog. Sample Grinding Kit (Sample Grinding Kit, GE HealthCare Europe GmbH; Freiburg, Deutschland) nach dessen Herstellerprotokoll aufbereitet. Dabei diente der verwendete Kit zum mechanischen und chemischen Aufbrechen von Zellen im Gewebe und zur Freisetzung und Bestimmung des gesamten Proteingehalts.

Die ersten Arbeitsschritte erfolgten alle auf Wasser mit Eis bei 4 °C, um eine Zerstörung der Proteine zu vermeiden. Zuerst wurden die sog. Grinding Tubes (dt. Mikrozentrifugenröhrchen mit Mahlmedium) mit 1.5 ml Volumen vorbereitet und mit 200 - 300 µl neu hergestellter Extraktionslösung (engl. radioimmunoprecipitation assay [RIPA]- Buffer, dt. Radioimmun-präzipitations-Assay Puffer, Lysepufferlösung, Sigma-Aldrich; Saint-Louis, USA) gemischt, um die Beads (dt. Mahlmedium = geringe Menge abrasiver Schleifharz in Wasser suspendiert) in den Zentrifugenröhrchen zu benetzen (chemischer Aufschluss). Anschließend wurde mit einem Spatel eine kleine Menge der jeweiligen Hirnregion (Hippokampus, MPFK) hinzugegeben. Dies musste nun mit je einem Einweg-Pistill pro Probe, 1 - 2 min auf Eis manuell homogenisiert und anschließend mit 13000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C für 30 min zentrifugiert werden (mechanischer Aufschluss). Dadurch wurden die gelösten Proteine von den Zellresten und dem Mahlmedium isoliert. Der Überstand mit den darin gelösten Proteinen wurde abpipettiert und in ein frisches 0.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Rest der Gewebeproben wurde bei - 20 °C eingefroren und bis zur weiteren Analyse gelagert.

b) Die quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgte mit der Methode nach Bradford. Dazu wurden die Proben in Triplets mit destilliertem Wasser verdünnt und auf eine 96-Well Platte zusammen mit einer Standardreihe aufgetragen.

Die Standardreihe („Pre-Dilution-Protein Assay Standard“) wurde zunächst bei Raumtemperatur hergestellt (Quick Start™ Bradford Protein Assay; Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland). Danach erfolgte das Herstellen der 2 unterschiedlichen Verdünnungen der zu untersuchenden Probe (1:5 und 1:10) aus Schritt a) Proteinaufbereitung. Dafür wurden zu 16 µl bzw. 18 µl *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) entsprechend 4 µl bzw. 2 µl Probe pipettiert. Anschließend wurde die Probenverdünnung mittels Tischzentrifuge (Sprout® Mini-Zentrifuge, Heathrow Scientific; Vernon Hills, USA) einige Sekunden vermischt. Nun wurde mit Hilfe eines Bradford Assay (DC™ Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH; München,

Deutschland) eine Farbreaktion nach Blau erzwungen. Dazu wurde der Farbstoff Triphenylmethan Coomassie-Brillant-Blau G - 250 (CBBG) angewendet, welcher in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen einen blauen Komplex bildet. Er färbt sich umso intensiver blau, je mehr Proteinmenge in der Probe vorhanden ist. Somit existierte ein Maß für die quantitative Proteinkonzentration in der hergestellten Lösung. Diese konnte mittels photometrischer Messung (Sunrise™ Mikroplatten-Reader, Tecan Trading AG; Männedorf, Schweiz) bestimmt werden:

Hierzu wurden jeweils 3 x 5 µl des 0-Wertes (*Aqua dest.*) und alle Konzentrationen der Standardreihe in die Mikrotiterplatte pipettiert. Ebenso wurde mit sämtlichen Proben (je 3 x 5µl jeder Verdünnung) verfahren. Um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wurde im Doppelansatz gearbeitet. Nach Protokoll wurden in jede Vertiefung 25 µl Reagenz A (DC™ Protein Assay Reagenz A) pipettiert und für einige Minuten auf einen Labor-Schüttler (Rocky 3D, Fröbel Labortechnik; Lindau, Deutschland) inkubiert. Danach wurden 200 µl der Reagenz B (DC™ Protein Assay Reagenz B) hinzu pipettiert und die Platte für mindestens 30 weitere Minuten auf einem Labor-Schüttler im Kühlschrank inkubiert. Dann erfolgte die photometrische Messung bei 620 nm Wellenlänge (Sunrise™ Reader, Tecan Deutschland GmbH; Crailsheim, Deutschland) und die computergestützte Auswertung der gemessenen optischen Dichte mittels des Programms Magellan™ (Magellan™-Datenanalyse-Software Version 7.2, 2013, Tecan Trading AG; Männedorf, Schweiz). Die Proteinkonzentrationen ließen sich anhand einer entsprechenden Tabelle mit den Standardwerten durch die vorangegangene Erstellung einer Standardkurve mittels einer definierten Konzentrationsreihe bovines Serumalbumins (Bio-Rad Protein Assay Standard H, Bio-Rad Laboratories; Hercules, USA) ermitteln.

c) Proteinvorbereitung der Proben

Im Anschluss an die quantitative Proteinbestimmung wurden die Proben mit Hilfe des Ladepuffers auf eine Konzentration von 2µg / µl eingestellt. So war beim Auftragen der Proben mittels Sodiumdodecylsulfat (SDS)-PAGE die gleiche Menge an Gesamtprotein in jeder Tasche des Gels/Probe vorhanden und die Ergebnisse konnten verglichen werden. Dazu wurde die errechnete Probenmenge mit einem zweifachen Ladepuffer (NuPage LDS Sample Buffer, Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA) und einem Reduktionsmittel (NuPage Reducing Agent, Invitrogen AG) gemischt. Der Ladepuffer enthielt 3 Komponenten: 1. Glycerol, welches die Dichte der Proteinlösung erhöhte und somit die Proben in die Geltaschen sinken ließ. Als 2. Komponente den

Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G - 250 (CBBG), ein Farbmaler, der die Fließmittelfront des Proteingemischs im Gel anzeigte. Und zum 3. SDS, welches dazu diente, die Proben gleichmäßig negativ zu laden und somit die Auftrennung im angelegten Spannungsfeld zu verbessern. Zusätzlich wurde, um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen, das Reduktionsmittel Dithiothreitol (bricht die Disulfidbrücken im Molekül) eingesetzt. Zum anderen wurden die Lysate bei 95°C für 5 Minuten in einem Wärmeblock erhitzt (Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland), um die Proteine zu denaturieren und dadurch die Wasserstoffbrückenbindungen zu lösen.

2.5.2.1. Messung von Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α im Western-Blot-Verfahren

Durch das Verfahren des WB wurden die Konzentrationen und das Vorhandensein spezifischer Proteine (Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α) geprüft und ermittelt. Die gesuchten Proteine wurden hierbei zunächst von den Zellen extrahiert, auf eine Trägermembran gebロットet, gelelektrophoretisch aufgetrennt (a) und danach auf eine Membran übertragen/ transferiert (b). Im Anschluss wurde bei der Immundetektion eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert. Die einzeln nachzuweisenden Proteine wurden mittels Reaktion mit den Antikörpern einzeln detektiert (c). Die Schwärzungsintensität der Proteinbanden infolge einer Dichtemessung, als Maß der Chemilumineszenz, stand im Zusammenhang mit der Rezeptorexpression. Diese Einzelschritte werden im Folgenden beschrieben.

a) Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der in der Gewebeprobe enthaltenen Proteine nach ihrer Größe, wurde das Verfahren der SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Als Erstes mussten die notwendigen Puffer (Elektrophorese Lauf- und Transferpuffer, siehe VI.2 Rezepte Verzeichnis) hergestellt und die Proteine der Proben bei 95 °C für 5 min denaturiert werden. Für die Gelelektrophorese selbst kamen die Elektrophorese-Kammern und das weitere Zubehör des Mini-PROTEAN® Tetra Cell-Systems (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories; California, USA) zum Einsatz. Nach dem Zusammenbau der Elektrophorese-Kammer wurde die innere Kammer mit Laufpuffer gefüllt und die denaturierten Protein-Proben in gleichen Mengen zur Vergleichbarkeit (20 μ l) und Proteinkonzentration (1 μ g / μ l) in die Taschen des Gels (Tris-Glycine eXtended (TGX) Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit 10 %; Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland) pipettiert. Anschließend wurde der

Außenbereich der Kammer mit dem Elektrophorese Puffer (SDS-Laufpuffer) gefüllt. In der Tasche 1 des Gels befanden sich dabei Standard und Kontrolle, die Tasche 2 bis 9 enthielten die zu analysierenden Proben und Tasche 10 war mit einer Mischung definierter, verschieden großer und unterschiedlich gefärbter Proteine (Molekulargewichtsmarker) zu Markierungszwecken befüllt (MagicMark™ XP, Invitrogen AG; Carlsbad, USA und Novex®, Invitrogen AG; Carlsbad, USA im Verhältnis 1:9). Waren die Geltaschen vollständig befüllt, wurde die Elektrophorese zunächst bei 100 V über 20 min und anschließend bei 200 V über 30 - 45 min aktiviert.

b) Transfer der Proteine mittels Western-Blot

Mit Hilfe des WB wurden die Proteinkonzentrationen von Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α bestimmt. Nach der oben beschriebenen elektrophoretischen Auftrennung der Proteine erfolgte mit Hilfe des Mini Trans-Blot® Cell Systems (Mini Trans-Blot® Cell, Bio-Rad Laboratories; California, USA) bei 80 V für die Dauer von 1 h der Transfer (= Blothen) der Proteine (1 μ g / μ l) vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Amersham Hybond Low Fluorescence 0.2 μ m PVDF-Membrane, TH Geyer GmbH; München, Deutschland).

Bei dem Verfahren wurden die Proteinbanden aus der Gelelektrophorese vom vorhergehenden Schritt vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran im dazu senkrecht angelegten elektrischen Feld transferiert. Durch die elektrische Spannung wurden die negativ geladenen Proteine in den Proben der Größe nach durch die SDS-PAGE in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Sie wanderten aus dem Gel in die Membran und hafteten dort durch hydrophobe Wechselwirkung entsprechend ihrer Größe und Ladung an. Hierbei blieb das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Dazu wurden jeweils von oben und unten im sog. „Sandwichverfahren“ die mit Transferpuffer (siehe VI.2 Rezepte Verzeichnis, Elektrophorese Transferpuffer) gesättigte und in der Größe des Gels angepassten Kunststoffschwämme, 2 Filterpapiere (Mini Trans-Blot® Accessoires, Bio-Rad Laboratories; California, USA) und die Membran zusammen mit dem aus der Laufkammer entnommenen Gel übereinandergeschichtet (siehe Abbildung 14).

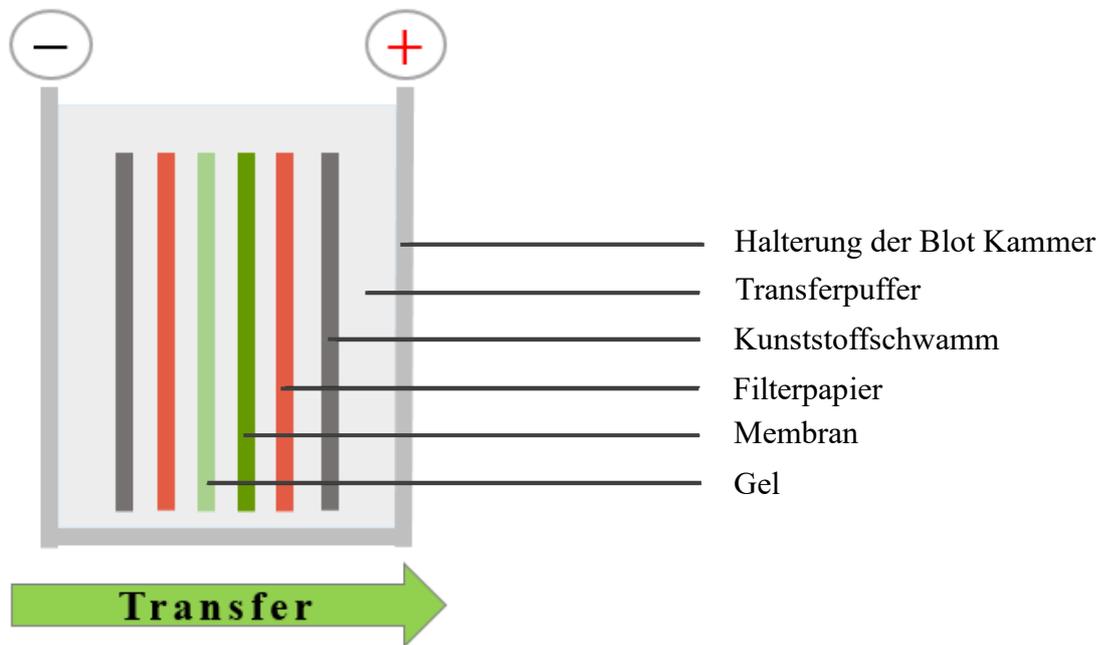


Abbildung 14: Schematische Darstellung des "Gel-Sandwiches" beim WB-Verfahren

In dieser Anordnung wurde das System in die Blot Kammer gespannt, mit einem Kühlelement ausgestattet, mit dem hergestellten Transferpuffer gefüllt und der Transfer durch Anlegen einer Spannung von 35 V für 60 min gestartet.

Zur Identifikation der gesuchten Proteinsequenz verwendete man 2 verschiedene Antikörper. Der erste band spezifisch an die passende Bande des zu detektierenden Proteins und der 2., mit einem Enzym konjugiert, wiederum band spezifisch an den 1. Antikörper. Durch Zugabe des Substrates für das Enzym und dessen Umsetzung, konnte der gebildete Antigen-Antikörper-Komplex nachgewiesen werden. Generell wurde die exakte Durchführung immer von derselben geschulten Person vorgenommen, um potenzielle Fehlerquellen zu vermeiden.

c) Darstellung der Proteine

Die Darstellung der gesuchten Proteine erfolgte schlussendlich durch nacheinander stattfindende Inkubationen der Membran mit Primär- und Sekundärantikörpern. Zunächst inkubierte man die Membran für 1 h mit 10 ml Roti[®]-Block einfach konzentriert (Roti[®]-Block ready-to-use, 10 x Konzentrat, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur auf einem Labor-Schüttler. Danach folgten 3 Waschschrte mit jeweils 10 ml 0.1 % Tween20 - haltiger (Tween[®]20, Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Deutschland) Tris-gepufferter Kochsalzlösung

(Tris-Buffered-Saline Tween-20, TBS/T). Dieser und sämtliche folgenden Waschschrte wurden auf einem Labor-Schüttler bei Raumtemperatur für jeweils 5 min pro Waschschrte durchgeführt. Im Folgenden wurde die Membran mit dem spezifischen, gegen das jeweils gesuchte Protein gerichteten Primärantikörper in entsprechender Verdünnung in TBS-T ("Caspase 3" Cell Signaling # 9662, „Tau“ Cell Signaling # 4019, „P-Tau“ Cell Signaling #11834 oder "TNF-alpha " ProSci XP-5284) beschickt (siehe IX. Tabelle 23). Dazu verblieb die Membran in der Antikörper-Lösung über Nacht (mindestens für 8 h) bei 4 °C auf dem Labor-Schüttler mit niedrigster Stufe. Am folgenden Tag wurde die Membran entnommen und für 5 min in TBS/T gewaschen, bevor sie mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper ("Anti-Maus IgG", Cell Signaling # 7076) auf dem Labor-Schüttler für 1 Stunde inkubiert wurde (siehe IX. Tabelle 23). Danach schlossen sich 3 weitere Waschgänge á 5 min in TBS/T an. Im nächsten Schritt wurde die Membran in 1 ml Clarity™ - Enhanced Chemiluminescence (ECL)Western-Substrat (Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland) für 1 min inkubiert. Die Membran wurde anschließend luftblasenfrei auf die Image Station aufgelegt, durch die UV-Kamera belichtet, fotografiert (Bio-Rad Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS +, Bio-Rad Laboratories GmbH; München, Deutschland) und die Daten elektronisch gesichert. Für die Analyse der WB-Daten mit dem Programm ImageLab® (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde die Menge des gesuchten Proteins durch die Intensität der Bande (Grauwert) bestimmt und anschließend mit dem Gesamtprotein der einzelnen Proben normalisiert. Das Programm errechnete aus dem Lumineszenz-Signal den Gehalt an in der Probe enthaltenem Protein. Die verschiedenen Blots konnten anhand des Standards auf jeder Membran, verglichen und in einer Exceldatei analysiert werden.

2.5.2.2. Messung der A β ₁₋₄₂-Konzentraion mittels ELISA

Der ELISA bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (Assay), basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion. Bei diesem Verfahren wird das A β ₁₋₄₂-Protein (Antigen) sicht- und messbar, durch die Bindung von Enzym-markierter Antikörper (= Konjugat) an dessen N-terminalen- (Position 1) und C-terminalen- (Position 42) Ende. Die durch das Enzym hervorgerufene katalytische Reaktion dient dann als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

Zur Bestimmung von A β ₁₋₄₂-Monomeren wurden die Hirnsegmente von Hippokampus und MPFK in 10 Volumina kaltem Guanidin Puffer homogenisiert und für 3.5 h bei Raumtemperatur auf dem Labor-Schüttler inkubiert. Die Homogenate wurden in 10

Volumina kaltem Kaseinpuffer verdünnt, bei 4 °C zentrifugiert (16.000 × 20 min) und der Überstand bei - 80 °C gelagert. Die Menge des A β ₄₂-Proteins in den jeweiligen Hirnregionen wurde mittels eines handelsüblichen Human-A β ₄₂-ELISA-Kits (Human β Amyloid (1-42) ELISA Kit, Wako Chemicals GmbH; Neuss, Deutschland; Primärantikörper = monoklonaler Antikörper BNT77, Antikörper vom Typ IgA, dessen Epitop A β ₁₁₋₂₈ ist + Sekundärantikörper = monoklonaler Maus-Antikörper BC05, Antikörper vom Typ IgG₁, der spezifisch mit A β ₄₂ reagiert, dessen C-terminales Ende erfasst) mit einer Empfindlichkeit von 1.0 pmol / l bestimmt.

Zunächst wurde für den ELISA nach dem Kit-spezifischen Protokoll ein Standard-Verdünnungspuffer hergestellt. Dieser wurde dann genutzt, um aus den zuvor aufbereiteten Proben eine Probenverdünnung (Konzentration: 0.075 μ g / μ l) anzufertigen. Dazu wurden 100 μ l gleichzeitig nach einem vorher erstellten Pipettierschema in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Geschützt vor Licht und abgedeckt wurde das Probenmaterial über Nacht auf einem Labor-Schüttler bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten 5 Waschgänge der Platte mit jeweils 400 μ l verdünnter Waschlösung (50 ml Wash-Solution + 950 ml *Aqua dest.*) pro Durchgang und Vertiefung. Danach erfolgte die Zugabe von 100 μ l Horseradish Peroxidase-konjugierter Antikörper (BC05) -Lösung (HRP, dt. Meerrettich Peroxidase) pro Vertiefung der Mikrotiterplatte und Inkubation von einer Stunde auf dem Labor-Schüttler bei 4 °C. Anschließend wurden die Vertiefungen wiederum 5-mal gewaschen, danach 100 μ l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzu pipettiert und für weitere 30 min auf dem Labor-Schüttler bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert, um die HRP-Reaktion zu starten.

Nach Ablauf der 30 min wurden in jede Plattenvertiefung 100 μ l der Stopp-Lösung pipettiert. Während der nächsten maximal 30 min wurde die optische Dichte jeder Probe bei einer Wellenlänge von 450 nm im Mikroplatten-Leser (Sunrise™ Mikroplatten-Reader, Tecan Trading AG; Männedorf, Schweiz) doppelt bestimmt. Anhand eines Umrechnungsfaktors berechnete ein Computerprogramm aus der optischen Dichte die Konzentration an ursprünglich in der Probe enthaltenem A β ₄₂-Protein.

2.5.3. Postanalytische Probenbehandlung

2.5.3.1. Kontrolle der Implantat Tiefe mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hierzu wurden im Vorfeld zu den 54 verwendeten C57BL/6N Mäusen dieser Studie, aus der Gruppe der 9 Kontrolltiere 6 Tiere verwendet. Die Tiere der Kontrollgruppe

stammen aus dem Pool der Tiere für die Verhaltensuntersuchung. Bei einigen Tieren musste während oder nach dem chirurgischen Eingriff ein Abbruch vorgenommen werden um weitere Schmerzen, Schäden oder Leiden zu verhindern. Damit diese Tiere aber nicht ohne wissenschaftlichen Nutzen verloren gingen wurden sie zur Überprüfung des korrekten Sitzes der Führungskanüle mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) verwendet. Die Mäuse wurden nach gleichem Schema wie die Versuchsgruppen euthanasiert. Die entnommenen Gehirne wurden unter Verwendung eines Kryostat-Mikrotoms (HM 355, Microm International GmbH; Walldorf, Deutschland) in 7 μm dicke Schnitte geschnitten. Anschließend erfolgte eine Färbung mittels HE. Dazu wurden die vorbereiteten Schnitte entsprechend des Standard-Protokolls nach ROMEIS (2010) gefärbt, eingedeckt und bei Zimmertemperatur in einem Objektträgerkasten bis zur weiteren Begutachtung aufbewahrt. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axiolab, Fa. Zeiss; Jena, Deutschland) wurden die gefärbten Schnitte anschließend bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Hierbei unterschied man verschiedene Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild anhand von 2 verschiedenen Einzelfärbungen: Hämatoxylin ist natürlicher Farbstoff des mexikanischen Blauholzbaums (*Haematoxylon campechianum*), der in Form des oxidierten, basischen Hämalan intensive färbende Eigenschaften entwickelt. Dieser Stoff färbte alle Strukturen selektiv blau, welche saurer bzw. basophil sind, v.a. Zellkerne mit ihren enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue Endoplasmatische Retikulum. Eosin dagegen ist ein saurer, synthetischer, gelbroter Xanthinfarbstoff, der alle basischen bzw. acidophilen Zellstrukturen rot färbte. Das sind v.a. Proteine des Zytoplasmas, Mitochondrien, das glatte Endoplasmatische Retikulum und Kollagen.

2.5.3.2. Färbung mittels Methoxy-X04-Lösung

Methoxy-X04 ist ein Derivat von Kongorot und Chrysamin-G, das jedoch keine Säuregruppen enthält und daher kleiner und viel lipophiler ist, aber die *in vitro*-Bindungsaffinität für A β -Fibrillen behält. Methoxy-X04 ist fluoreszierend und färbt Plaques, Bündel und zerebrovaskuläres Amyloid in *postmortalen* Schnitten von MA-Gehirnen mit guter SPE.

Von den *in toto* entnommenen und bei - 80 °C gelagerten Hirnen der mit A β ₄₂ behandelten Versuchstiere, wurden von den linken Gehirnhälften unter Verwendung eines Kryostat-Mikrotoms (HM 355, Microm International GmbH; Walldorf, Deutschland) 50 μm dicke Schnitte angefertigt und anschließend mit einer 4,4'-(2-

Methoxy-1,4-Phenylene)di-(1E)-2,1-Ethenediyl]bis-Phenol-Lösung (Methoxy-X04-Lösung, Tocris Bioscience Avonmouth; Bristol, Großbritannien) gefärbt.

In einem ersten Schritt wurden die Gehirnschnitte direkt aus dem - 80 °C Tiefkühlschrank in 100 % Ethanol (- 20 °C) für 15 min dehydriert. Es folgte über Nacht eine Fixierung der Schnitte in 4 % Paraformaldehyd (PFA). Am folgenden Tag fixierte man sie weitere 20 min bei - 20 °C in Azeton und trocknete die Hirnschnitte für einige Minuten anschließend bei Raumtemperatur. Nach 2 weiteren Waschschrritten zu jeweils 10 min in einem 1:1-Gemisch aus PBS/Ethanol (zuvor denaturiert mit Methylethylketon (MEK) im Verhältnis 1:1), wurden die Schnitte mit einer Methoxy-X04-Lösung für 30 min auf einem Labor-Schüttler im Dunkeln inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschrritten in dem 1:1-Gemisch aus PBS/Ethanol, schlossen sich 2 weitere Waschschrritte zu je 10 min in *Aqua dest.* an. Zuletzt trockneten die fertig gefärbten Hirnschnitte bei Raumtemperatur für einige Minuten, bevor sie mit Eindeckmedium (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako Denamk A/S; Glostrup, Dänemark) und einem Deckgläschen (Deckgläser, 18 x 18 mm, 100 Stück in Griffschale, Urhammer Lehrmittel; Kiel, Deutschland) versehen und unter Verwendung eines Fluoreszenz-Mikroskops im Kachel-Scan-Modus (ZEISS Axio Imager, ApoTome.2 und Zen 2012 Blue Software; Oberkochen, Deutschland) abgebildet.

2.6. Statistische Bewertung der Befunde

Die mit dem mHBT erhobenen Daten zu Kognition, Motorik und Verhalten der untersuchten Tiere wurden unter Verwendung eines allgemeinen linearen Modells (engl. General Linear Model, GLM) mit den Zwischengruppenfaktoren Injektionstyp (PBS oder A β ₄₂), dem Zeitpunkt des Beginns der kognitiven Tests (Tag 1, 2, 4 oder 8), der Zeit innerhalb der Gruppe und ihrer Interaktionsbedingungen analysiert. Auswirkungen der Zeit wurden aufgrund des streng monoton abnehmenden Charakters der Lernkurven in diesen Tests in linearer Weise analysiert. Die Werte wurden post-hoc unter Verwendung einer Varianz-Analyse (Analysis of Variance, ANOVA) ausgewertet.

Bezüglich der Proteinkonzentrationen in der WB-Analyse wurde das Verhältnis zu PBS in jedem WB separat berechnet (PBS = 1.0) und für den ELISA der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Die Ergebnisse wurden nicht-parametrisch zunächst mit dem Kruskal-Wallis Test und anschließend post hoc Mann-Whitney-U-Test (auch Wilcoxon Rangsummen-Test, engl. Wilcoxon rank-sum Test, WRS) für ungepaarte Proben ausgewertet. Das

Signifikanzniveau war für $p < 0.05$ festgelegt und für $p < 0.01$ als hoch signifikant definiert. Die Berechnungen wurden mit SPSS Statistics® (Version 23.0, IBM, New York, USA) durchgeführt. Beim Gruppenvergleich wurden die Ergebnisse der Versuchsgruppen immer den Konfidenzintervallen (KI) der unbehandelten Kontrolltiere gegenübergestellt.

Die histologischen Befunde der HE-gefärbte Gehirnschnitte wurden mikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung ermittelt.

IV. ERGEBNISSE

Für die Studie sind insgesamt 54 Tiere, randomisiert in 3 Gruppen und 9 Untergruppen mit jeweils $n = 6$ Tieren, mit dem mHBT untersucht worden. Ziel war die Optimierung des intrazerebroventrikulären (engl. intracerebroventricular, ICV) - $A\beta_{1-42}$ -Modells des frühen *Morbus Alzheimer* (MA, dt. Alzheimer-Krankheit) hinsichtlich Orientierung des optimalen Zeitpunktes für den Beginn des mHBT nach ICV- $A\beta_{1-42}$ -Gabe als wichtigen Faktor für die Standardisierung und Optimierung des Modells. Zusätzlich sollten die funktionellen Befunde des Verhaltenstests mit den histologischen und den Biomarker-Befunden korreliert werden, um zu prüfen, ob sich die im mHBT gefundenen kognitiven Beeinträchtigungen auch als Nachweis der Erkrankung zu den jeweiligen Zeitpunkten eignen.

Zudem wurden neun weitere Kontrolltiere für den korrekten Sitz der Führungskanüle verwendet. Bei drei Tieren wurde eine Färbung mittels Toluidinblau durchgeführt und bei den anderen sechs Mäusen die ausreichende Eindringtiefe mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung überprüft.

Die folgenden Abbildungen sind unterteilt. Die Abbildungen A zeigen jeweils die graphische Darstellung (Mittelwert und Standardfehler ($MW \pm SEM$)) aller mit $A\beta_{42}$ und PBS injizierten Tiere im mHBT im Zeitverlauf, wobei der Bereich zwischen den gepunkteten Linien das 95 %-Konfidenzintervall (KI) der nativen Mäuse markiert. Zur besseren Darstellung und v.a. zur Übersichtlichkeit werden nur die Untergruppen 2/ $A\beta_{42}$, 4/ $A\beta_{42}$ und 8/ $A\beta_{42}$ abgebildet. Bei den PBS-Gruppen gab es (außer beim Parameter *Grooming* siehe Abbildung 30 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, daher ist hier der Mittelwert aller vier Gruppen zur besseren Übersicht dargestellt (siehe Abbildung 30A0 1x als Vergleich alle Gruppen abgebildet). Abgebildete * kennzeichnen Signifikanzen. In den Abbildungen B sind jeweils die graphische Darstellung (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) des Gesamtmittelwertes aller Untersuchungsgruppen während des mHBT ersichtlich. Abgebildete \circ und * mit Zahlenwert kennzeichnen Ausreißer und extreme Ausreißer. Die ausführlichen Tabellen mit den errechneten Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (engl. Standarddeviation, SD) für die analysierten Parameter der jeweiligen Gruppen zu den verschiedenen Untersuchungstagen, sind im Anhang angegeben. Dort sind ebenfalls auch die ausführlichen graphischen Darstellungen ($MW \pm SEM$) aller 3 Gruppen mit Untergruppen im mHBT im Zeitverlauf zu finden.

1/A β ₄₂, 2/A β ₄₂, 4/A β ₄₂ und 8/A β ₄₂ sind die Untergruppen, die 1, 2, 4 bzw. 8 Tage nach der ICV-Injektion von löslichem A β ₄₂ beginnen, den mHBT zu absolvieren. 1/PBS, 2/PBS, 4/PBS und 8/PBS ist die Untergruppen, die 1, 2, 4 und 8 Tage nach der ICV-Injektion von PBS beginnt, den 8 Tage dauernden mHBT zu absolvieren. MW PBS gibt den Mittelwert aller 4 mit PBS behandelten Gruppen in einem Graph wieder. N bezeichnet die Versuchsgruppe der nativen Mäuse, die 21 Tage nach Ankunft im Tierhaltungsraum ohne jeglichen chirurgischen Eingriff beginnt, den mHBT zu absolvieren.

1. Physiologische Parameter

1.1. Körpergewichtsentwicklung

Im Folgenden stellt Tabelle 5 den Körpergewichtsverlauf bis zur ICV-Injektion (Tag 14) dar, während Tabelle 6 den Verlauf über den Zeitraum des mHBT abbildet. Anschließend werden in graphischer Form die MW und SEM im Zeitverlauf dargestellt.

Zwischen allen getesteten Versuchsgruppen lagen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Körpergewichtsentwicklung vor.

Tabelle 5: Körpergewicht in Gramm (g) aller 9 Untergruppen (n = 6) von der Ankunft der Tiere bis zur ICV-Injektion (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag -7 Ankunft der Tiere	Tag 0 Implantation Führungskanüle	Tag 14 ICV-Substanz- applikation
1/A β ₄₂	22.2 \pm 0.9	25.2 \pm 0.4	25.7 \pm 0.6
2/A β ₄₂	22.1 \pm 1.1	24.4 \pm 0.7	25.4 \pm 1.0
4/A β ₄₂	21.5 \pm 1.0	24.4 \pm 1.3	25.7 \pm 1.0
8/A β ₄₂	21.7 \pm 1.6	24.6 \pm 0.9	26.3 \pm 0.4
1/PBS	22.9 \pm 0.6	23.7 \pm 1.2	25.8 \pm 0.8
2/PBS	23.9 \pm 0.8	26.3 \pm 1.5	25.9 \pm 1.3
4/PBS	22.9 \pm 0.6	23.7 \pm 1.2	25.8 \pm 0.8
8/PBS	24.4 \pm 1.7	25.7 \pm 1.0	26.6 \pm 0.8
N	23.7 \pm 1.1	25.3 \pm 1.5	27.2 \pm 1.1

Alle Gruppen nahmen über die Dauer von der Ankunft im Tierhaltungsraum bis zur Implantation konstant an Gewicht zu. Auch im zweiten Intervall von Tag 0 bis zum Zeitpunkt der ICV-Injektion stieg das Gewicht an, aber bei den Gruppen mit Kanülenimplantat in einem geringeren Maße. Während der gesamten Dauer bis zum mHBT unterlag das KGW physiologischen Schwankungen: A β ₄₂-Gruppen (MW₋₇ = 21.9, MW₀ = 24.7, MW₁₄ = 25.8), PBS-Gruppen (MW₋₇ = 23.5, MW₀ = 24.9, MW₁₄ = 26.0), und den nativen Mäusen (MW₋₇ = 23.7, MW₀ = 25.3, MW₁₄ = 27.2). Zu keinem der einzelnen Wiegezeitpunkte unterschieden sich die Gewichte der Versuchsgruppen signifikant voneinander ($p > 0.05$).

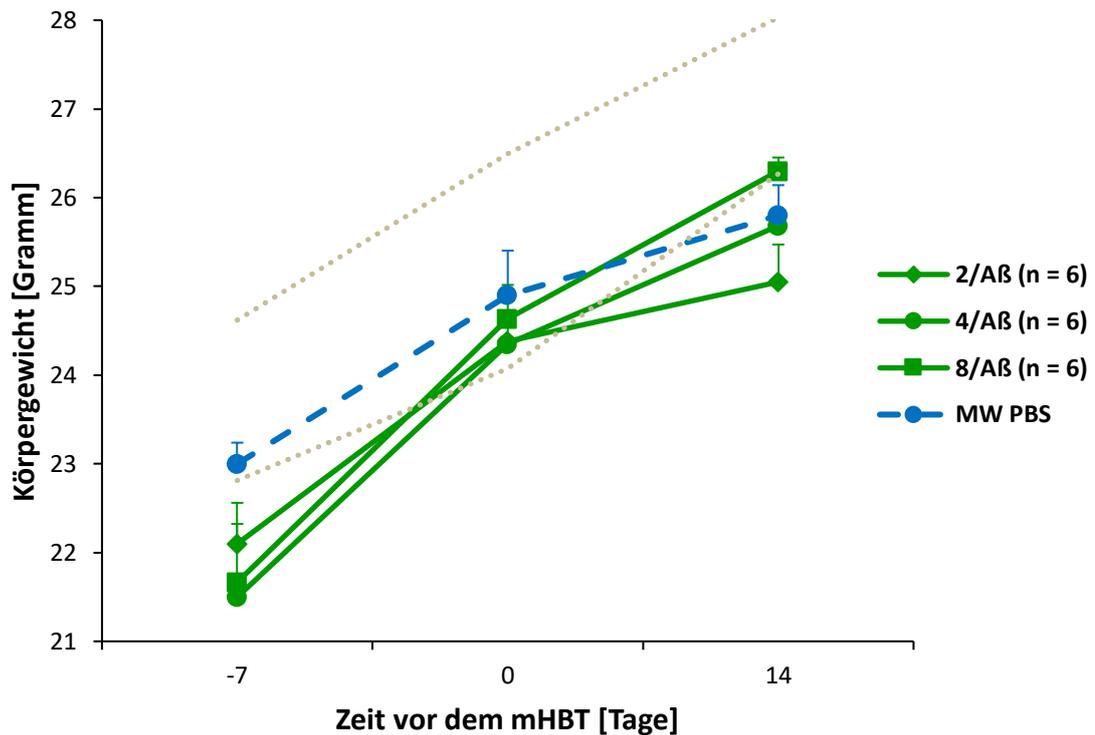


Abbildung 15: Graphische Darstellung des Körpergewichts in Gramm (g) von der Ankunft der Tiere bis zur ICV-Injektion zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW \pm SEM)

Am Tag -7 wurden die Tiere in den Tierhaltungsraum eingesetzt, am Tag 0 erfolgte die Implantation der Führungskanüle und am Tag 14 die ICV-Injektion. Die Körpergewichtsentwicklung verlief ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p > 0.05$).

Tabelle 6: Körpergewicht in Gramm (g) aller 9 Untergruppen (n = 6) während des mHBT (dargestellt als MW±SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/A β ₄₂	26.0 ± 0.7	25.9 ± 0.6	26.0 ± 0.7	26.0 ± 0.7	26.0 ± 0.7
2/A β ₄₂	25.2 ± 1.1	25.3 ± 1.1	25.4 ± 0.9	25.5 ± 1.0	25.3 ± 1.0
4/A β ₄₂	26.0 ± 0.9	26.0 ± 0.8	26.2 ± 0.8	26.2 ± 0.8	26.1 ± 0.8
8/A β ₄₂	26.5 ± 0.5	26.5 ± 0.6	26.5 ± 0.6	26.4 ± 0.6	26.4 ± 0.5
1/PBS	25.2 ± 0.7	25.4 ± 0.7	25.5 ± 0.7	25.6 ± 0.6	25.4 ± 0.6
2/PBS	26.6 ± 1.4	26.6 ± 1.3	26.6 ± 1.2	26.5 ± 1.2	26.5 ± 1.3
4/PBS	25.8 ± 0.9	25.4 ± 0.8	25.8 ± 0.7	25.6 ± 0.9	25.7 ± 0.8
8/PBS	27.0 ± 0.9	26.9 ± 0.9	26.7 ± 1.0	26.7 ± 1.1	26.8 ± 1.0
N	27.4 ± 1.4	27.1 ± 1.3	27.2 ± 1.2	27.0 ± 1.3	27.2 ± 1.3

Es sind jeweils 2 aufeinander folgende Tage und nochmals alle Tage des mHBT (1 - 8) als MW zusammengefasst dargestellt. Die Tiere aller Gruppen hielten ihr Gewicht konstant im Verlauf des 8 Tage dauernden mHBT. Im Durchschnitt wogen die nativen Mäuse tendenziell etwas mehr als die Tiere der ICV-Injektion von löslichem A β ₄₂ oder PBS. Es zeichneten sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tagen bei den Gruppen ab ($p > 0.05$).

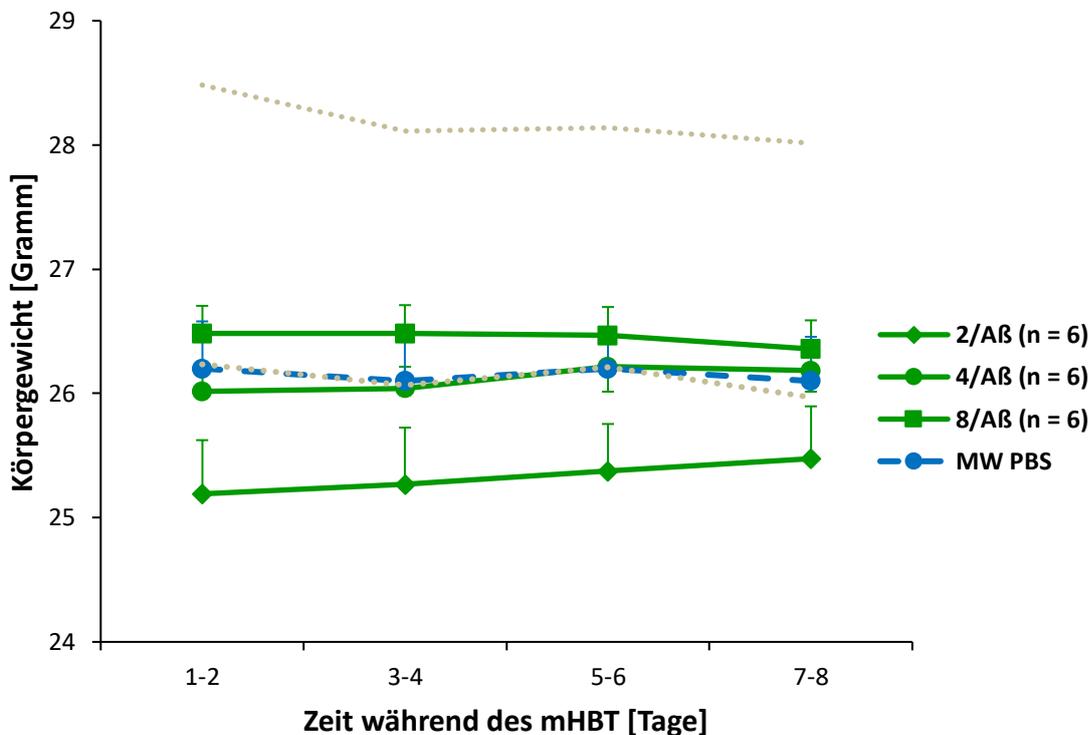


Abbildung 16: Graphische Darstellung des Körpergewichts in Gramm (g)

während des mHBT zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW \pm SEM)

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ($p > 0.05$).

2. Modifizierter Hole-Board-Test

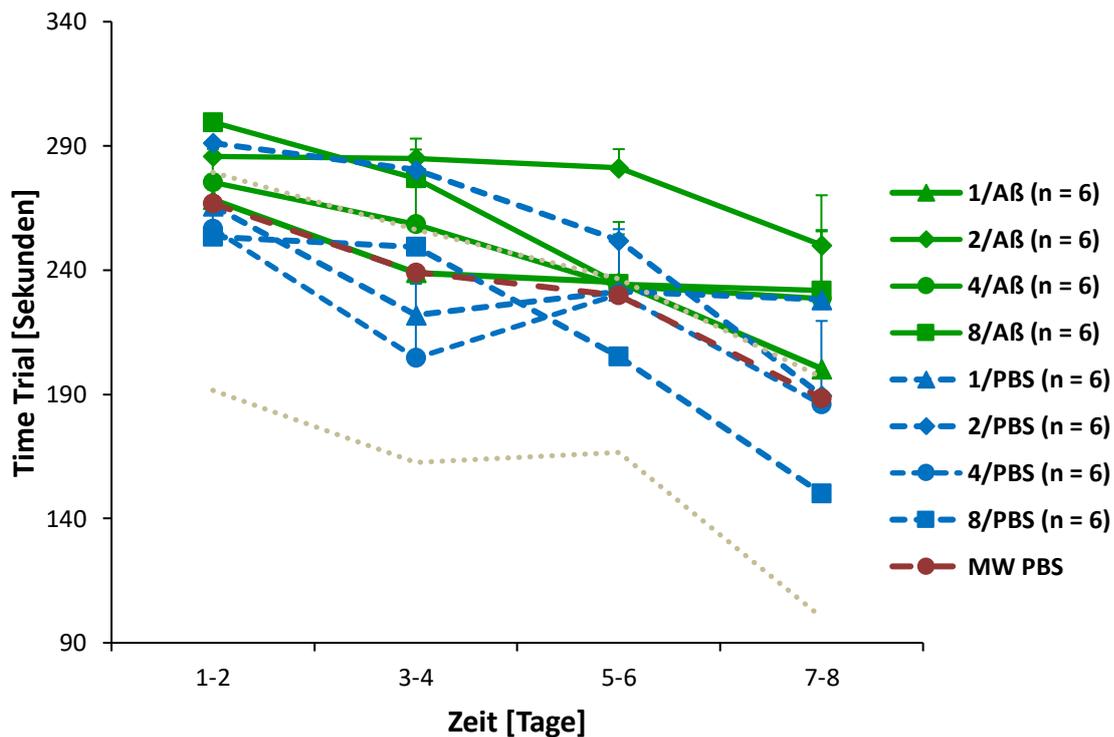
Die Mäuse wurden mit dem mHBT nach etablierten Protokoll (OHL et al., 2001) beginnend am Tag 1, 2, 4 oder 8 nach der Injektion des löslichen A β ₄₂ und am Tag 1, 2, 4 oder 8 nach der Injektion von PBS getestet. Gesamtdauer des Tests waren 8 aufeinanderfolgende Tage bis zum Tag 8, 10, 12 bzw. 16 nach der intrazerebroventrikulären Injektion. Zeitgleich wurde eine Gruppe mit 6 nativen Mäusen (ohne jeglichen chirurgischen Eingriff) getestet. Mit dieser Vorgehensweise konnten parallel kognitive, motorische und Verhaltensparameter beurteilt und gleichzeitig der eventuell versuchsbeeinflussende Effekt des chirurgischen Eingriffes und des Injektionsverfahrens ausgeschlossen werden.

2.1. Kognitive Parameter

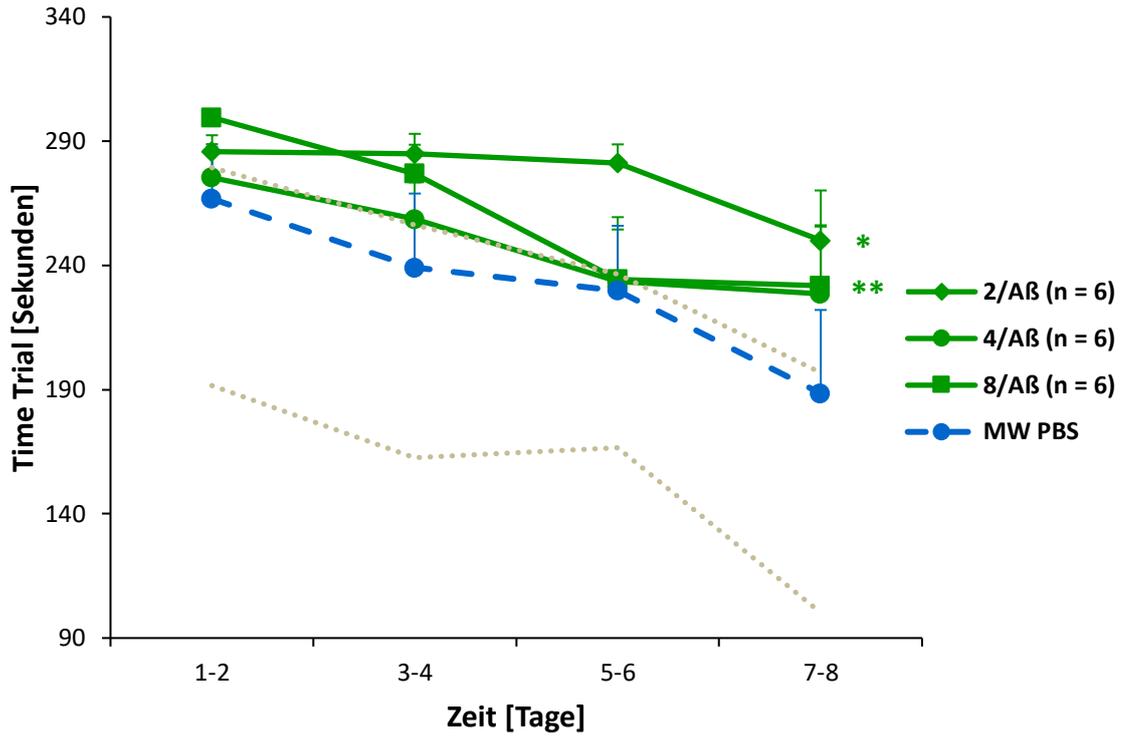
Für die Kognitionsparameter wurden die berechneten MW und SEM graphisch für die Anzahl der pro Durchlauf benötigten Gesamtzeit (*Time Trial*), des Besuches nicht markierter Zylinder (*Wrong Choices*), wiederholt besuchter Löcher (*Repeated Choices*), ausgelassener Zylinder (*Omission Errors*) und der Gesamtfehler eines Durchlaufs (*Wrong Choices total* = Aufsummierung *Wrong Choices* + *Omission Errors*) dargestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse aller 4 Kognitionsparameter einzeln betrachtet.

2.1.1. Gesamtdurchlaufzeit (*Time Trial*)

A0



A



B

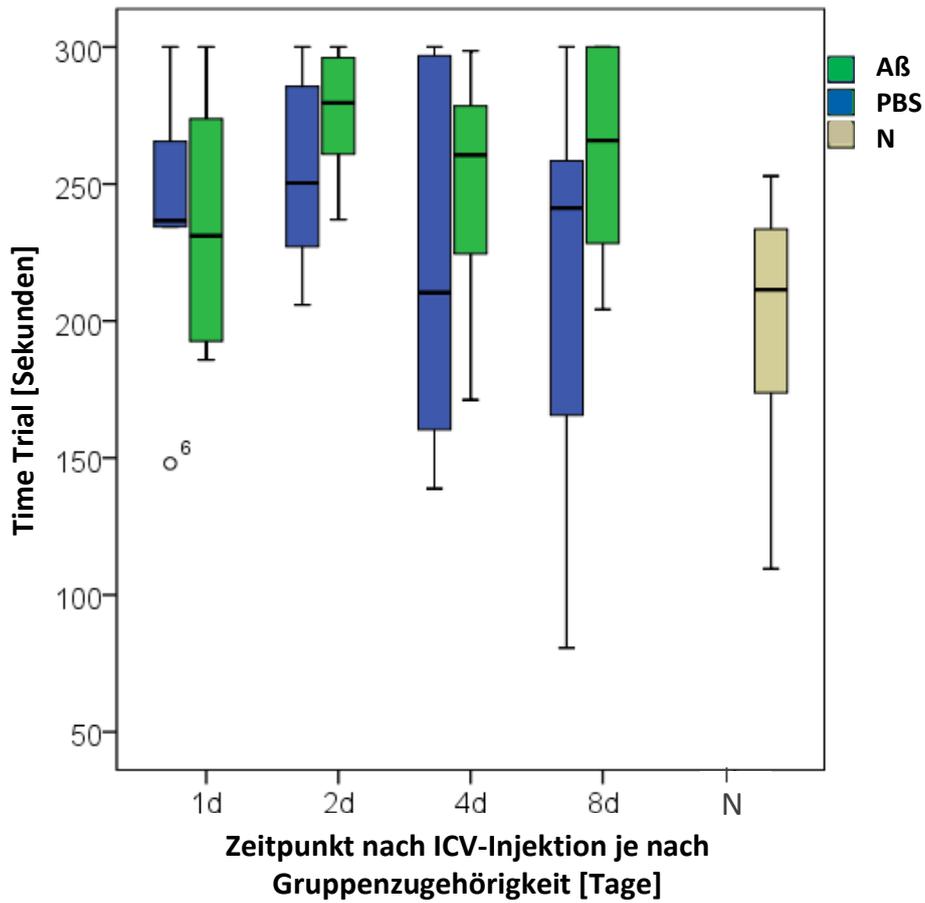


Abbildung 17: Graphische Darstellung zum Vergleich der benötigten Gesamtdurchlaufzeit (*Time Trial*) in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW \pm SEM) aller Versuchsgruppen (A0), reduziert zur besseren Darstellung und als Vergleichsbeispiel MW \pm SEM der Untergruppen 2/A β ₄₂, 4/A β ₄₂ und 8/A β ₄₂ sowie der Mittelwert aller vier PBS-Gruppen (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Es zeigte sich, dass das Gesamtmodell signifikant ist ($F = 963.18$, $p < 0.001$, $\eta^2 = 54$). Eine einfaktorielle MANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied in der Gesamtdurchlaufzeit über die Dauer des mHBT hinweg ($F(7, 39) = 10.23$, $p < 0.001$, Wilk's $\Lambda = 0.353$).

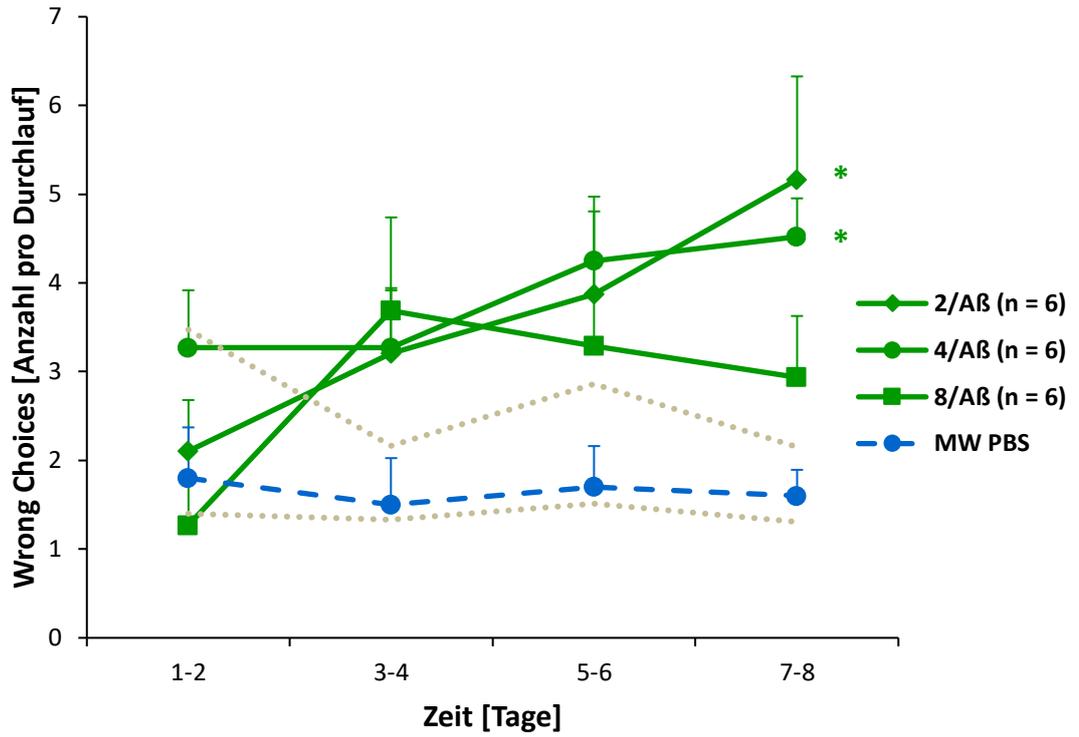
Die Varianzanalyse mit Messwiederholung (Sphärizität nicht angenommen: Mauchly $W = 0.081$, $p < 0.001$) ergab, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss auf den *Time Trial* hatte ($F(3, 158) = 28.58$, $p < 0.001$), Korrektur nach Greenhouse-Geisser, partielles $\eta^2 = 0.392$ und einen signifikanten linearen Trend aufwies. Damit wurden 39.2 % der Varianz erklärt. Es gab keine Interaktion der unabhängigen Variablen. Im Test der Zwischensubjekteffekte wurde für jede abhängige Variable eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Bedingungen dargestellt werden ($p > 0.05$).

Bonferroni-korrigierte paarweise Vergleiche zeigten, dass sich die Gruppen A β ₄₂ und N in den Mittelwerten des *Time Trial* signifikant unterscheiden (* $p = 0.021$, $M_{\text{Diff}} = 56.49$, 95%-KI [8.82, 104.15]), nicht aber zwischen den A β ₄₂- und PBS-Gruppen ($p = 0.113$, $M_{\text{Diff}} = 24.22$, 95%-KI [-5.92, 54.37]), sowie den PBS- und N-Tiere ($p = 0.180$, $M_{\text{Diff}} = 32.26$, 95%-KI [-15.40, 79.93]). Innerhalb der Gruppen hatten die A β ₄₂-Tiere ($p = 0.391$) und die PBS-Tiere ($p = 0.688$), in Abhängigkeit des Startzeitpunktes keine signifikanten Differenzen.

B: Es gab keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte Tag 1 - 8 der Gesamtdurchlaufzeit zwischen den Gruppen ($p > 0.05$).

2.1.2. Fehlbesuche (Wrong Choices)

A



B

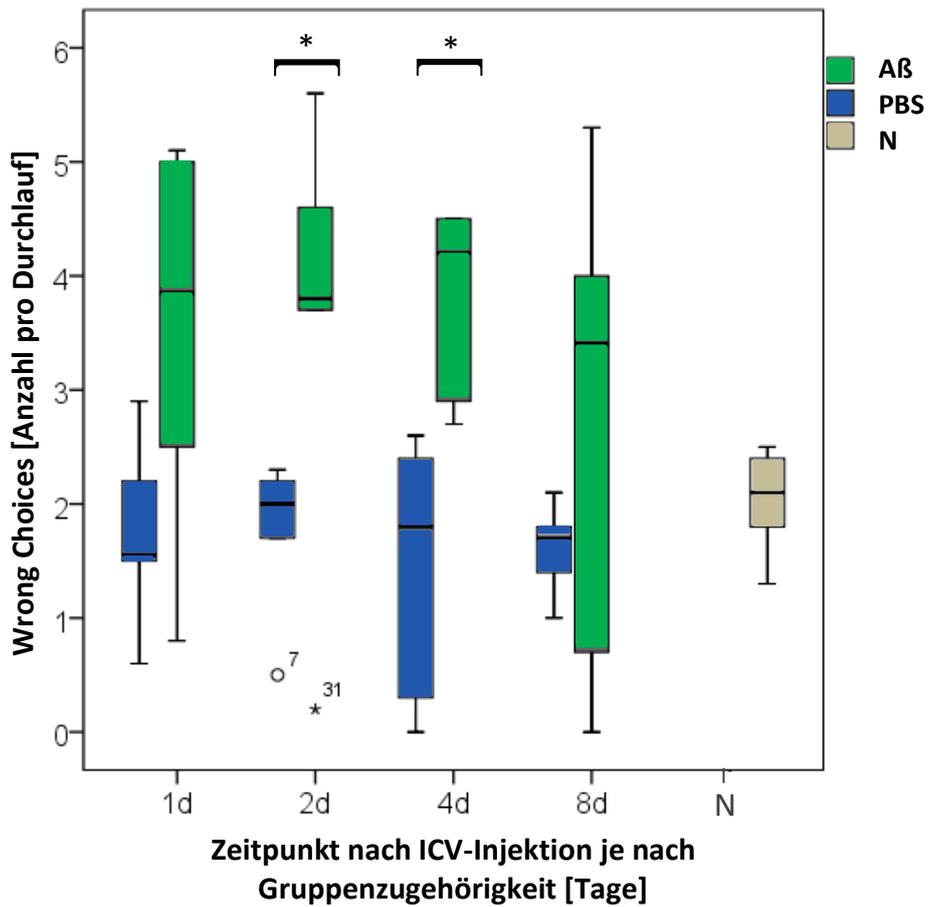


Abbildung 18: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Fehlbesuche (*Wrong Choices*) pro Durchlauf zu den festgelegten Unter-suchungszeitpunkten (MW \pm SEM) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Der Multivariate Test dokumentierte einen statistisch signifikanten Unterschied der Fehlbesuche zwischen den Gruppen über die Dauer des mHBT hinweg bei der Kombination Zeit \cdot A β_{42} ($F(7, 39) = 2.66, p = 0.024$, Wilk's $\Lambda = 0.677$), Zeit \cdot Startzeitpunkt ($F(21, 13) = 2.46, p = 0.001$, Wilk's $\Lambda = 0.338$) und Zeit \cdot A β_{42} \cdot Startzeitpunkt ($F(21, 113) = 2.04, p = 0.009$, Wilk's $\Lambda = 0.396$). Die Varianzanalyse (Sphärizität nicht angenommen: Mauchly $W = 0.119, p < 0.001$) zeigte, dass die Interaktion der Faktoren Zeit \cdot A β_{42} ($F(4, 188) = 4.06, p = 0.003$) und Zeit \cdot Startzeitpunkt ($F(13, 188) = 2.37, p = 0.007$) einen signifikanten Haupteffekt der Messwiederholungen auf die abhängige Variable *Wrong Choices* hatten. Damit erklärte die erste 8.3 % ($\eta^2 = 0.083$), die zweite Interaktion 13.6 % ($\eta^2 = 0.136$) der Varianz. Beide Paarungen wiesen einen signifikanten linearen Trend auf.

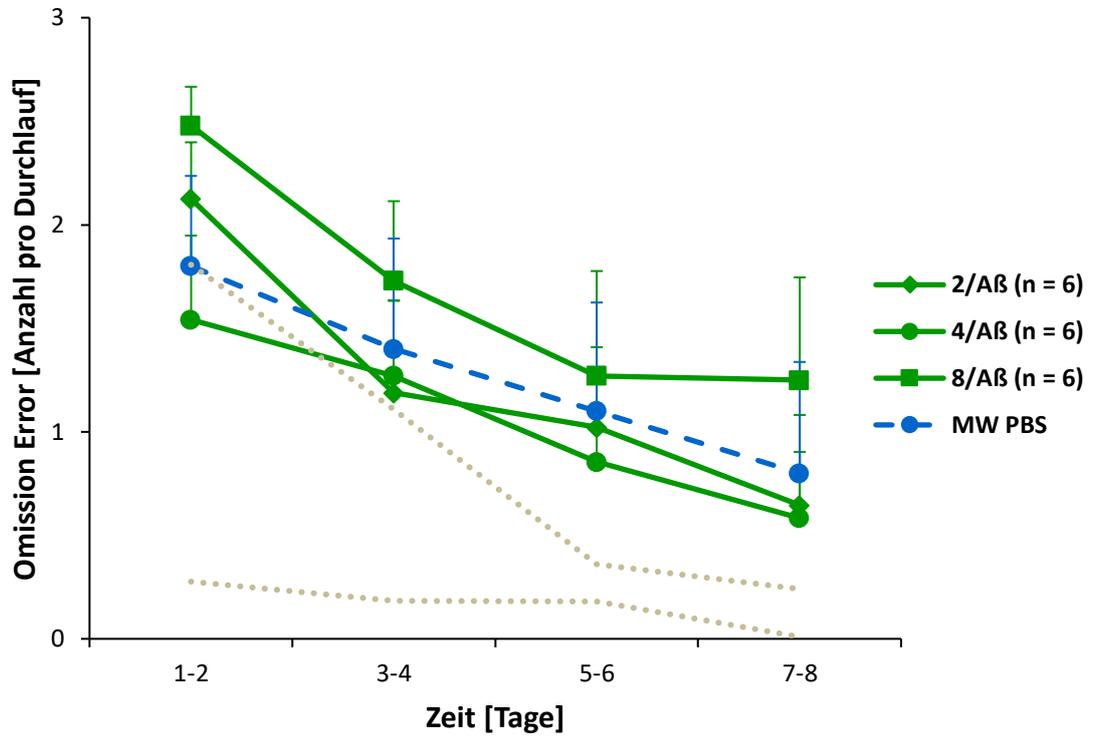
Die Anzahl der Fehlbesuche wurde hoch signifikant bestimmt durch die Gabe von A β_{42} ($F(306, 546) = 25.21, p < 0.001$). A β_{42} erklärte 35.9 % der bis anhin nicht erklärten Varianz. Der Post-hoc-Test zeigte für die Ergebnisse der *Wrong Choices*, dass die A β_{42} -Gruppen gegen die PBS-Gruppen ($p < 0.001, M_{\text{Diff}} = 1.79, 95\%$ -KI [1.07, 2.50]) und den nativen Mäusen (* $p = 0.016, M_{\text{Diff}} = 1.40, 95\%$ -KI [0.27, 2.53]) signifikant schlechter abschnitt. Im Verhältnis zu den nativen Mäusen wiesen die PBS-Tiere keinen Unterschied auf ($p = 0.489$). In weiteren Berechnungen wurde ersichtlich, dass sich konkret die 1/A β_{42} - ($F(1, 10) = 5.63, * p = 0.039$, partielles $\eta^2 = 0.360$), 2/A β_{42} - ($F(1, 10) = 5.31, * p = 0.044$, partielles $\eta^2 = 0.347$) und die 4/A β_{42} -Gruppe ($F(1, 10) = 17.48, * p = 0.002$, partielles $\eta^2 = 0.636$) zu der jeweiligen PBS-Gruppe signifikant unterschieden. Die 8/A β_{42} -Gruppe verhielt sich nicht signifikant zur 8/PBS-Gruppe ($p = 0.200$).

In der Auswertung der Daten aufgeteilt nach A β_{42} -Gabe hatten die A β_{42} -Tiere ($p = 0.729$) und die PBS-Tiere ($p = 0.922$) in Abhängigkeit des Startzeitpunktes innerhalb der Gruppen keine signifikanten Differenzen.

B: Kennzeichnend zwischen der jeweiligen PBS-Gruppe und der 2- und 4/A β_{42} -Gruppe (MW Tag 1 - 8) war ein signifikanter Unterschied der Anzahl an Fehlbesuchen mit einer erhöhten Anzahl von falschen Entscheidungen während der Testperiode, dargestellt (* 2/A β_{42} $p = 0.047$, 4/A β_{42} $p = 0.002$). Bei den weiteren A β_{42} -Gruppen existierte keine Signifikanz (1/A β_{42} $p = 0.065$, 8/A β_{42} $p = 0.394$).

2.1.3. Auslassungsfehler (*Omission Error*)

A



B

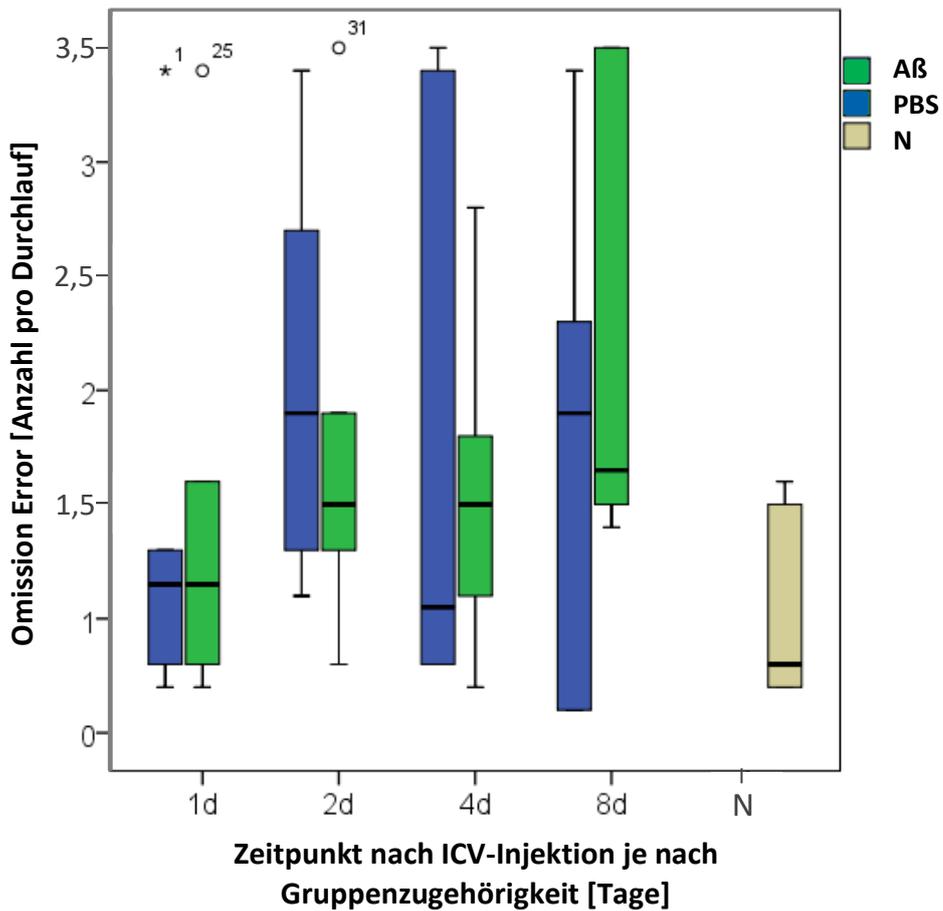


Abbildung 19: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Auslassungsfehler (*Omission Errors*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW \pm SEM) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

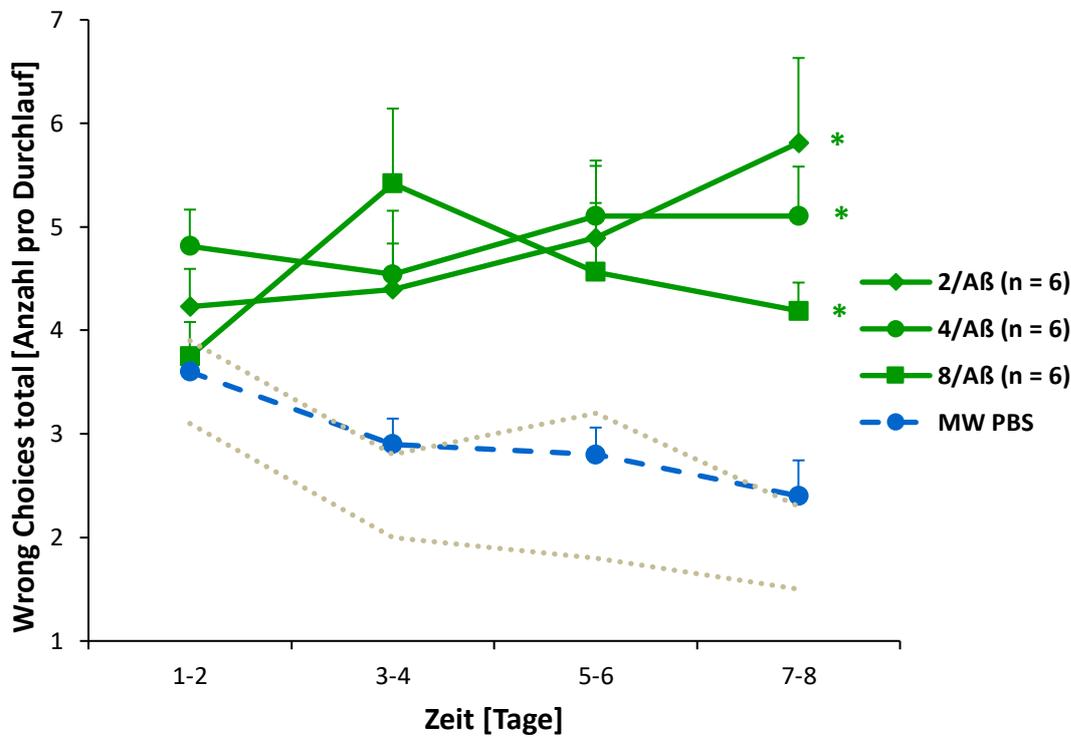
A: Die Varianzanalyse (Sphärizität nicht angenommen: Mauchly $W = 0.006$, $p < 0.001$) zeigte, dass die Zeit ($F(2, 155) = 25.4$, $p < 0.001$) einen signifikanten Haupteffekt der Messwiederholungen auf die abhängige Variable *Omission Errors* hatte. Alle anderen durchgeführten statistischen Berechnungen (einfaktorielle MANOVA, Zwischensubjekteffekte, Post-hoc-Test, WRS) zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen als auch innerhalb der Gruppen an ($p > 0.05$).

B: Es gab keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte Tag 1 - 8 zwischen den mit $A\beta_{42}$ und PBS behandelten Tieren, sie verhielten sich hierin gleich (1/ $A\beta_{42}$ $p = 0.589$, 2/ $A\beta_{42}$ $p = 0.818$, 4/ $A\beta_{42}$ $p = 0.394$, 8/ $A\beta_{42}$ $p = 0.699$).

2.1.4. Gesamtfehler eines Durchlaufes (*Wrong Choices total*)

Die beiden Parameter Besuch nicht markierter Zylinder (*Wrong Choices*) und das Nicht-Besuchen markierter Zylinder (*Omission Errors*) wurden zu den Gesamtfehlern eines Durchlaufs, den *Wrong Choices total* aufsummiert.

A



B

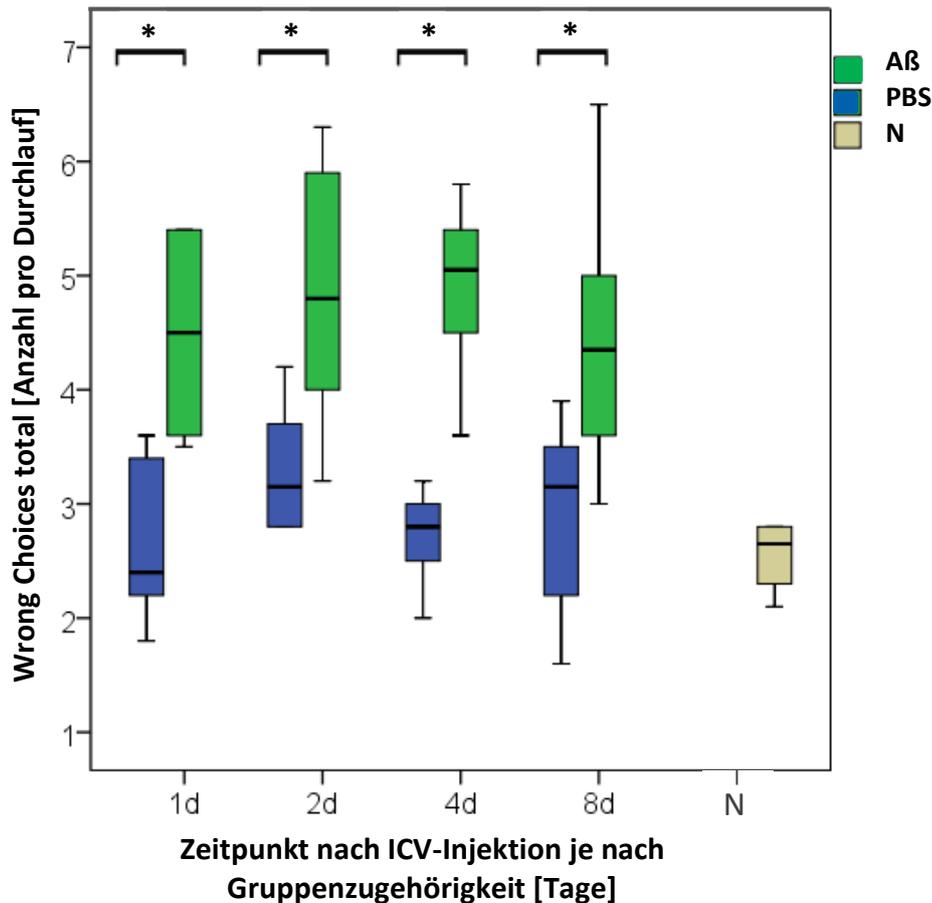


Abbildung 20: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Gesamtfehler (*Wrong Choices total*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Eine einfaktorische MANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl der Gesamtfehler für die kombinierten abhängigen Variablen ($F(7, 39) = 5.78, p < 0.001, \text{Wilk's } \Lambda = 0.491$). Die Varianzanalyse mit

Messwiederholung (Sphärizität nicht angenommen: Mauchly $W = 0.266, p < 0.001$) ergab, dass die Zeit ($F(5, 226) = 5.70, p < 0.001$), die Interaktion Zeit·A β_{42} ($F(5, 226) = 4.53, p = 0.001$) und Zeit·Startzeitpunkt ($F(15, 226) = 2.08, p = 0.012$) einen signifikanten Einfluss auf den *Wrong Choices total* hatten, Korrektur nach Greenhouse-Geisser. Somit wurden die Zeit 11.2 % (partielles $\eta^2 = 0.112$), durch Zeit·A β_{42} 9.1 % (partielles $\eta^2 = 0.091$) und durch Zeit·Startzeitpunkt 12.2 % (partielles $\eta^2 = 0.122$) der Varianz erklärt. Post-hoc zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in Abhängigkeit der A β_{42} -Gabe für das Ergebnis der Gesamtfehler ($F(1, 45) = 53.18, p < 0.001, \text{partielles } \eta^2 = 0.541$). Damit konnte 54.1 % der bis anhin nicht erklärten Varianz durch die Variable A β_{42} erklärt werden.

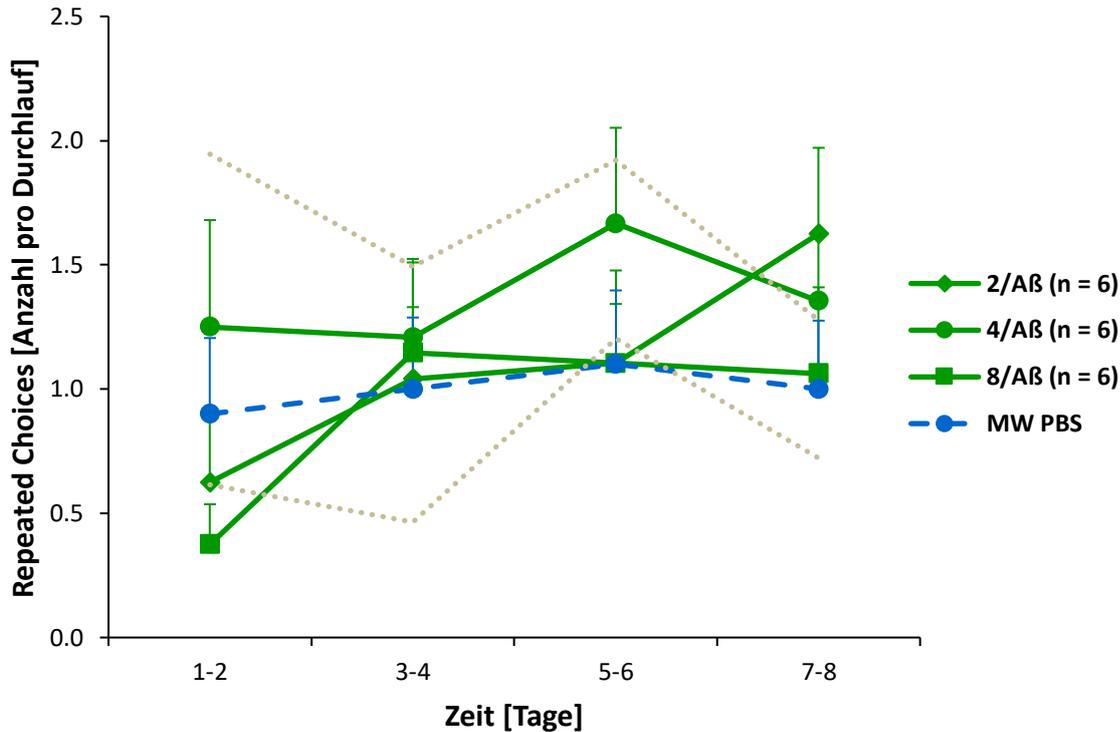
Im paarweisen Vergleich wurden die hoch signifikanten Unterschiede zwischen den A β_{42} - und PBS-Gruppen (* $p < 0.001, M_{\text{Diff}} = 1.78, 95\text{-KI} [1.29, 2.27]$) und zwischen den A β_{42} -Gruppen und der Gruppe der nativen Tiere (* $p < 0.001, M_{\text{Diff}} = 2.12, 95\text{-KI} [1.34, 2.89]$) dargestellt. Zwischen den PBS-Gruppen und

den nativen Tieren gab es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0.381$). In Abhängigkeit des Testbeginns kam es zu signifikanten Unterschieden bei allen 4 A β_{42} -Gruppen gegenüber der PBS-Gruppe an den jeweiligen Startzeitpunkten (1/A β_{42} : $F(1, 10) = 13.88$, * $p = 0.004$, partielles $\eta^2 = 0.581$, 2/A β_{42} : $F(1, 10) = 8.13$, * $p = 0.017$, partielles $\eta^2 = 0.448$, 4/A β_{42} : $F(1, 10) = 35.91$, * $p < 0.001$, partielles $\eta^2 = 0.782$ und 8/A β_{42} : $F(1, 10) = 6.27$, * $p = 0.031$, partielles $\eta^2 = 0.386$). Innerhalb ihrer jeweiligen Gruppen hatten die A β_{42} -Tiere ($p = 0.854$) und die PBS-Tiere ($p = 0.357$) an allen Tagen des Testbeginns keine signifikanten Differenzen.

B: Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die *Wrong Choices total* nach Gruppenzugehörigkeit unterschieden. Alle 4 A β_{42} -Gruppen waren im Vergleich (MW Tag 1 - 8) der Gesamtzahl der falschen Entscheidungen insgesamt signifikant schlechter als die mit PBS behandelten Gruppen (* 1/A β_{42} $p = 0.004$, 2/A β_{42} $p = 0.026$, 4/A β_{42} $p = 0.002$, 8/A β_{42} $p = 0.041$).

2.1.5. Wiederholungsfehler (*Repeated Choices*)

A



B

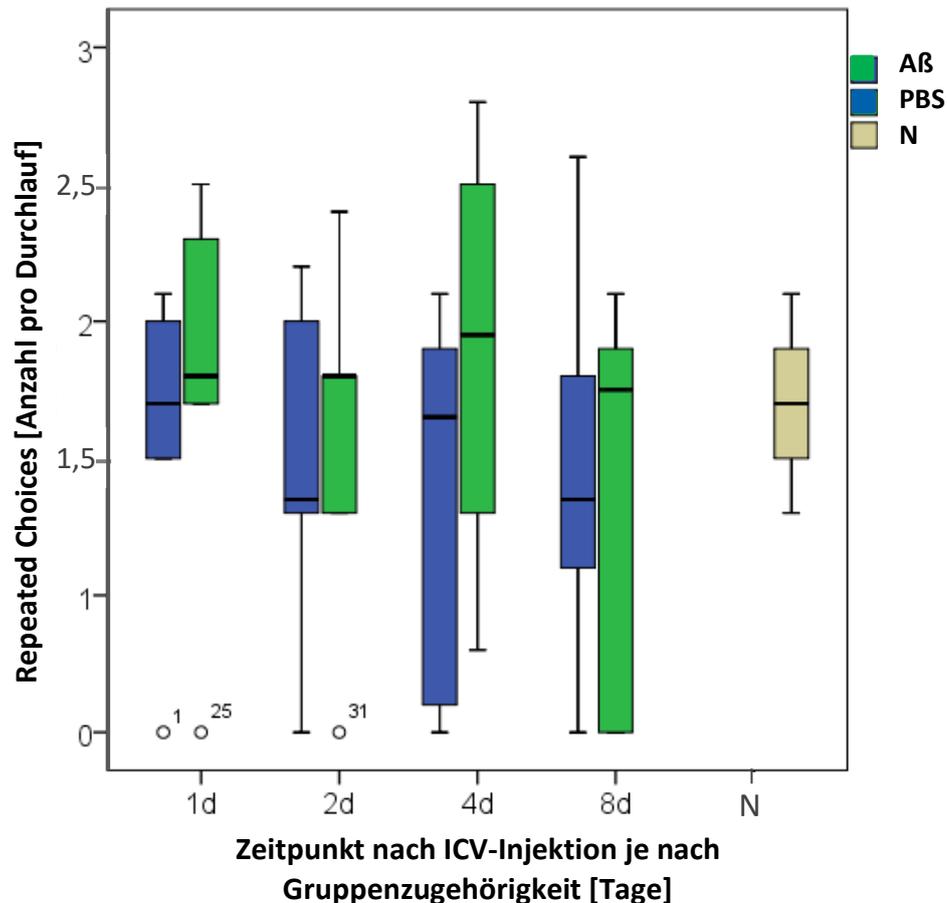


Abbildung 21: Graphische Darstellung zum Vergleich der Wiederholungsfehler (*Repeated Choices*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Eine einfaktorische MANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Haupteffekt in der Zeit ($F(7, 39) = 3.00, p = 0.013, \text{Wilk's } \Lambda = 0.650$) und der Kombination Zeit-Startzeitpunkt-A β_{42} -Gabe ($F(21, 112) = 2.16, p = 0.005, \text{Wilk's } \Lambda = 0.378$) für die kombinierten abhängigen Variablen. Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorlag (Mauchly $W = 0.157, p < 0.001$), wurde eine Greenhouse-Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Die Dauer des mHBT hatte einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Wiederholungsfehler ($F(4, 200) = 2.41, p = 0.044, \text{partielles } \eta^2 = 0.051$). Die Dauer des Tests erklärte 5.1 % der Varianz. Es gab eine Interaktion der Testdauer und dem Startzeitpunkt des mHBT ($F(13, 200) = 1.92, p = 0.029, \text{partielles } \eta^2 = 0.113$). Der Verlauf der Veränderungen war bei den Gruppen unterschiedlich. Diese Interaktion erklärte 11.3 % der bis anhin erklärten Varianz. Post-hoc wurde für jede abhängige Variable eine einfaktorische ANOVA durchgeführt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen für die *Repeated Choices* und ebenfalls keine signifikanten Differenzen bei den Mehrfachvergleichen ($p < 0.05$).

B: Es gab keine signifikanten Unterschiede im WRS der Mittelwerte Tag 1 - 8 zwischen den einzelnen Gruppen bei den wiederholten Besuchen markierter,

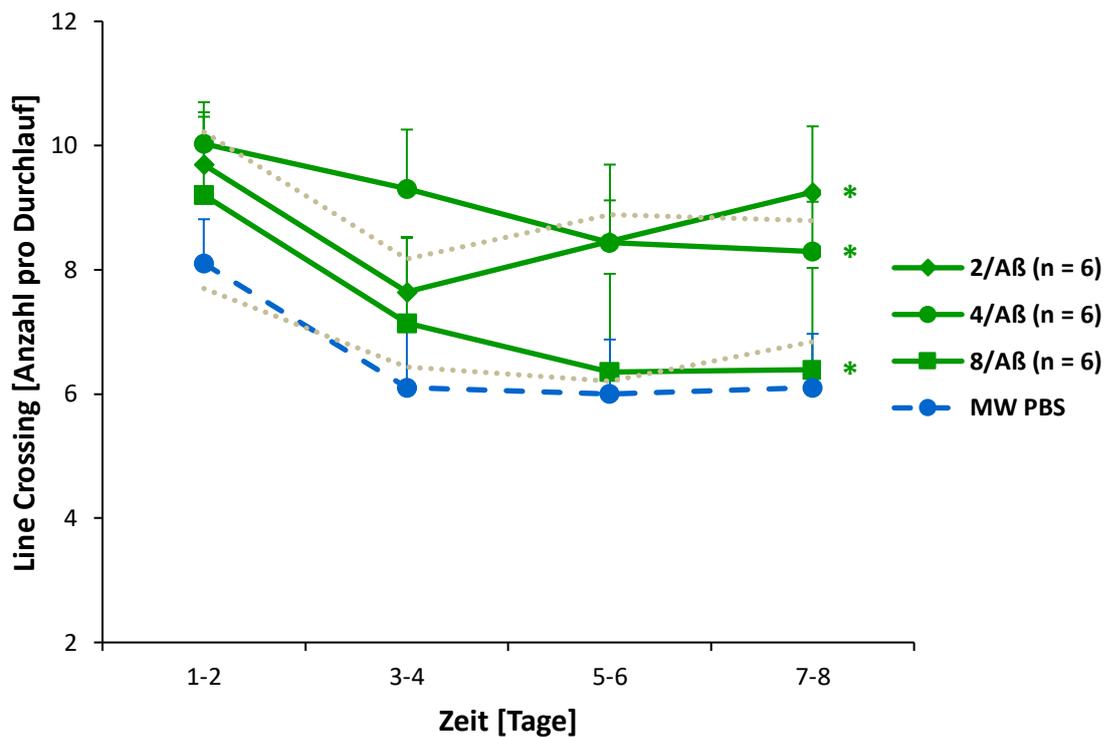
zuvor aber bereits geleerter Zylinder (*Repeated Choices*) (1/AB₄₂: p = 0.394, 2/AB₄₂: p = 0.699, 4/AB₄₂: p = 0.310, 8/AB₄₂: p = 0.818).

2.2. Motorische Parameter

Die Häufigkeit, mit der die weißen Linien in der Versuchsarena während eines Testdurchlaufs überquert wurden, wird im Parameter *Line Crossing* abgebildet und spiegelt die allgemeine Bewegungsaktivität wider. Dagegen gibt die Zeit, die die Maus brauchte, um ein Mandelstückchen zu fressen (*Time Food Intake*), Auskunft über die feinmotorischen Fähigkeiten.

2.2.1. Linienüberschreitung (*Line Crossing*)

A



B

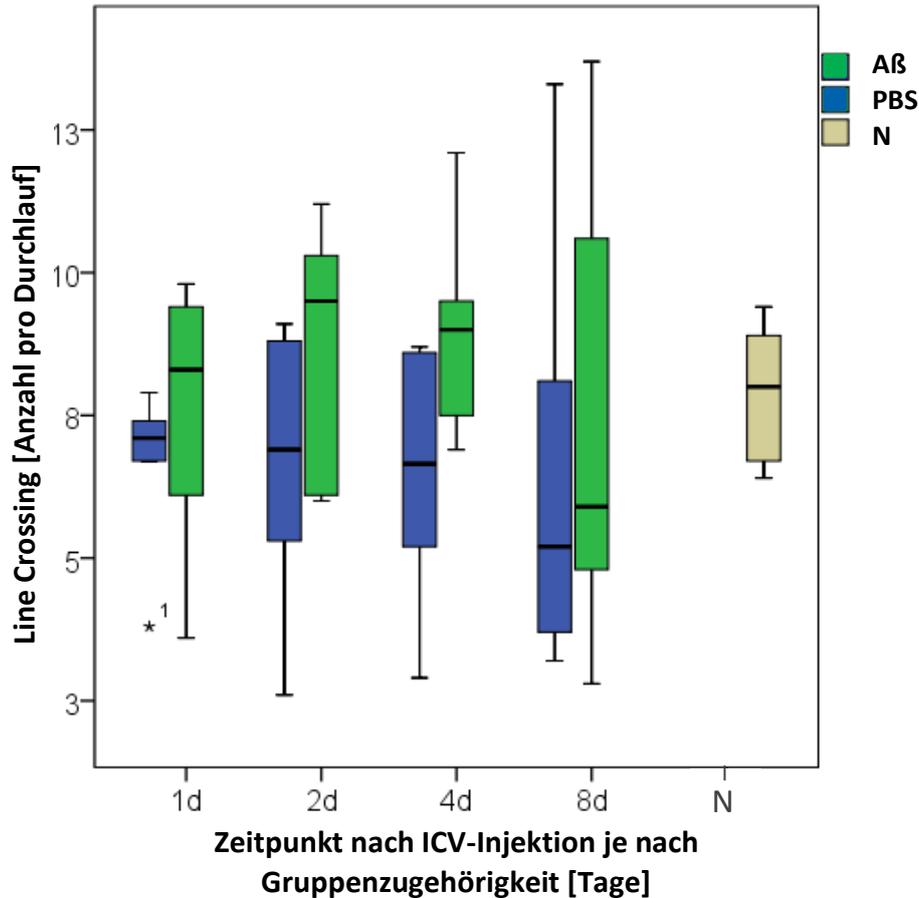


Abbildung 22: Graphische Darstellung zum Vergleich der Linienüberschreitungen (*Line Crossing*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Der Multivariate Test zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied im *Line Crossing* in Abhängigkeit der Zeit ($F(7, 39) = 16.68, p < 0.001$, Wilk's $\Lambda = 0.250$) und der Zeit-Startzeitpunkt ($F(21, 112) = 2.35, p = 0.002$, Wilk's $\Lambda = 0.352$) zwischen den Gruppen. Auch die Berechnung der Haupteffekt der Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur zeigte eine Signifikanz bei der Zeit ($F(4, 202) = 29.48, p < 0.001$, partielles $\eta^2 = 0.396$) und der Interaktion von Zeit-Startzeitpunkt ($F(13, 202) = 3.18, p < 0.001$, partielles $\eta^2 = 0.184$) des mHBT (Sphärizität nicht angenommen: Mauchly $W = 0.133, p < 0.001$). Die Dauer des mHBT erklärte 39.6 % und die Interaktion 18.4 % der bis anhin nicht erklärten Varianz.

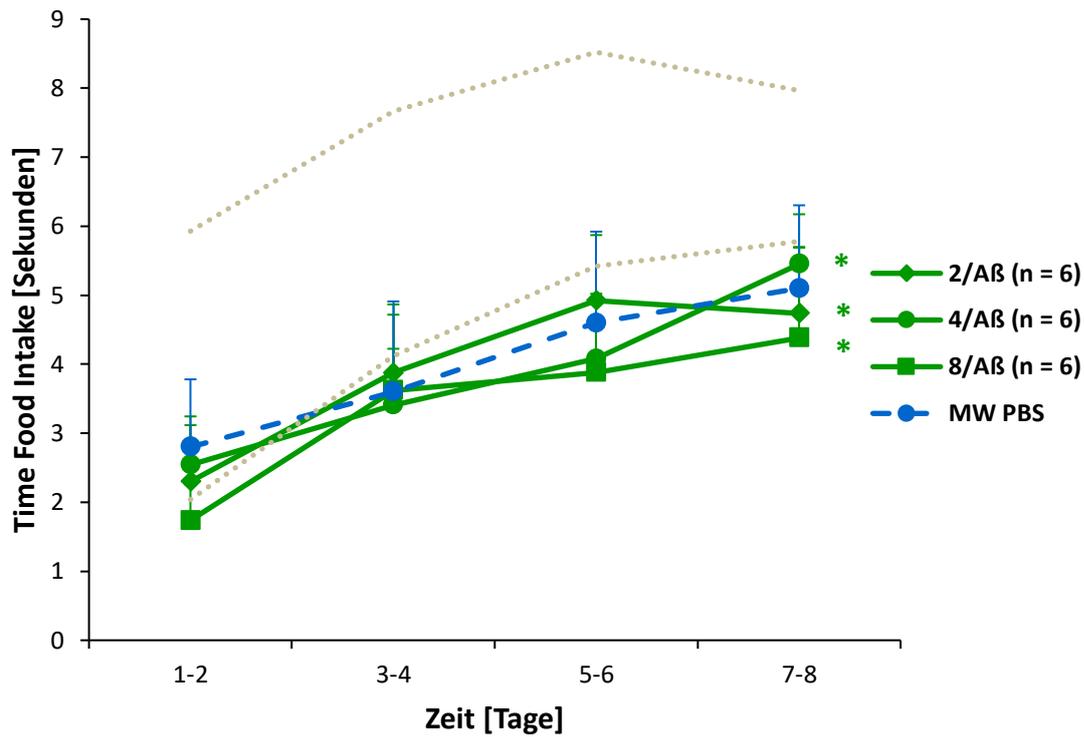
In den weiteren Post-hoc-Tests gab es einen Haupteffekt von $A\beta_{42}$ auf die Anzahl der Linienüberschreitung ($F(1, 45) = 4.71, p = 0.035$, partielles $\eta^2 = 0.095$), aber nicht für den Startzeitpunkt ($p = 0.804$) und die Interaktion beider ($p = 0.785$). Um zu überprüfen zwischen welchen Messzeitpunkten signifikante Unterschiede bestanden wurde ein paarweiser Vergleich, Bonferroni-korrigiert, durchgeführt. Die $A\beta_{42}$ -Gruppen zeigten im *Line Crossing* signifikante Differenzen zu den PBS-Gruppen (* $p = 0.035, M_{Diff} = 1.61, 95\%-KI [0.12, 3.09]$), blieben aber unauffällig gegenüber der Gruppe der nativen Tiere ($p = 0.827$) und auch die nativen Tiere

zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den PBS-Gruppen ($p = 0.255$). Weitere Berechnungen ergaben keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen und innerhalb der einzelnen Gruppen an allen Testtagen.

B: Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Linienüberschreitungen nach Gruppenzugehörigkeit unterscheidet. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den $A\beta_{42}$ - und PBS-Gruppen zum jeweiligen Startzeitpunkt ($p > 0.05$).

2.2.2. Fresszeit (*Time Food Intake*)

A



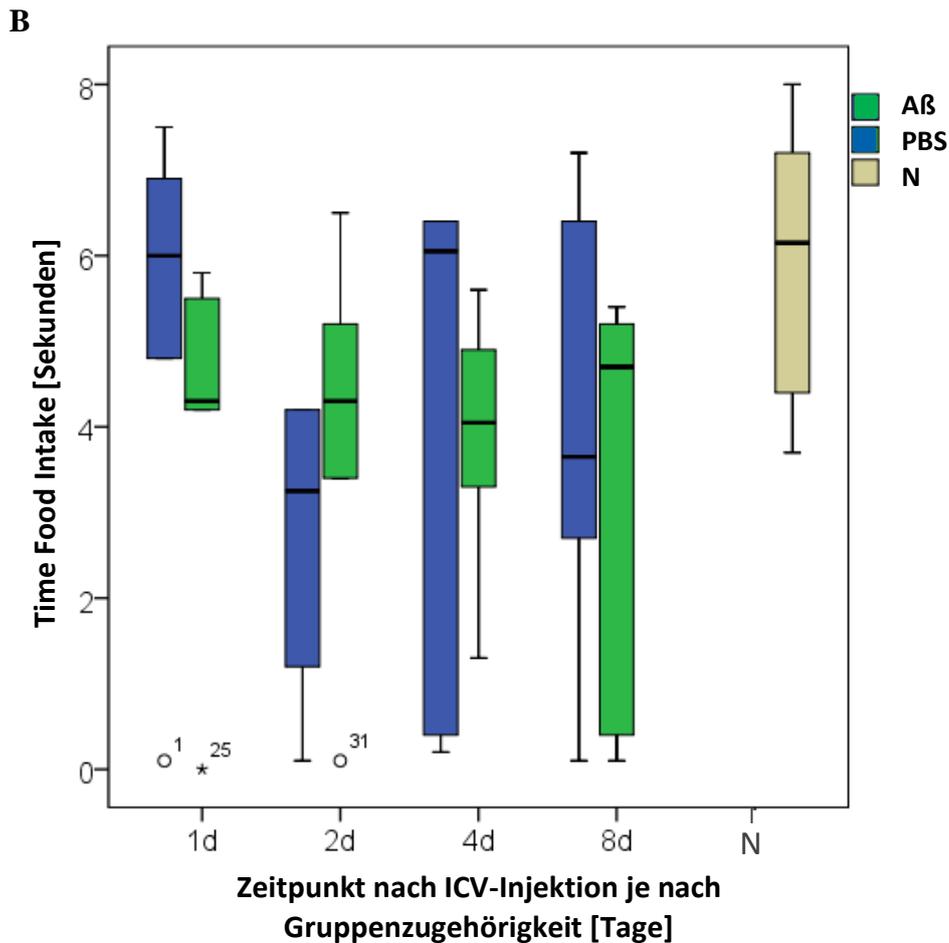


Abbildung 23: Graphische Darstellung zum Vergleich der benötigten Fresszeit einer Futterbelohnung (*Time Food Intake*) in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW±SEM) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Eine einfaktorische MANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem zeitlichen Verlauf der benötigten Fresszeiten eine Futterbelohnung ($F(7, 39) = 5.06, p < 0.001, \text{Wilk}'s \Lambda = 0.524$). Die Dauer des mHBT hatte einen signifikanten Einfluss auf die *Time Food Intake* ($F(3, 147) = 18.57, p < 0.001, \text{partielles } \eta^2 = 0.292$, Korrektur nach Greenhouse-Geisser mit einem signifikanten linearen Trend des Innersubjektfaktors (Zeit)). Die Dauer des mHBT erklärte 29.2 % der Varianz. Post-hoc wurde für jede abhängige Variable eine einfaktorische ANOVA durchgeführt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0.05$). Ein Bonferroni-korrigierter post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied in der Performanz zwischen der PBS- und der A β_{42} -Gruppe (* $p = 0.048, M_{\text{Diff}} = 2.12, 95\text{-KI} [0.02, 4.22]$). Weitere Berechnungen ergaben keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen und innerhalb der einzelnen Gruppen an allen Testtagen.

B: WRS wurde zur Überprüfung berechnet, ob sich die Fresszeiten nach Zugehörigkeit einer Gruppe unterscheiden. Es gab keinen sig. Unterschied

zwischen den Aß₄₂- und PBS-Gruppen zum jeweiligen Startzeitpunkt ($p > 0.05$).

2.3. Verhaltensparameter

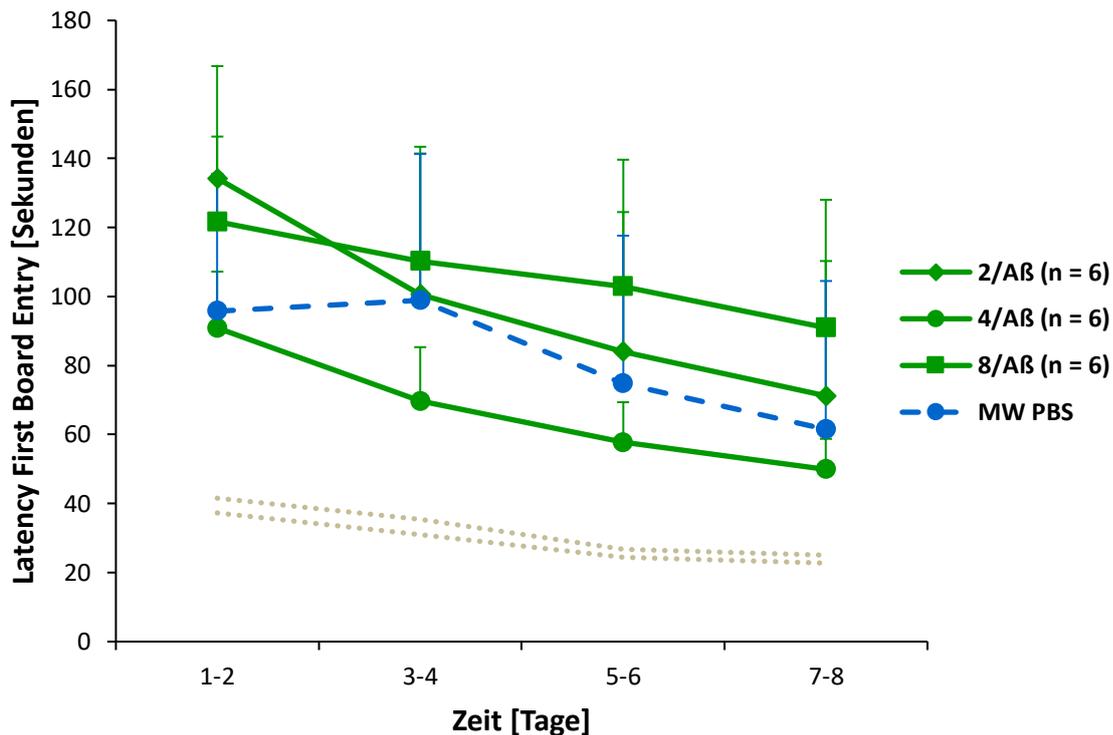
Mit dem mHBT ließen sich neben den oben beschriebenen Parametern Kognition und Motorik, auch Angst, Erkundung und Erregung, als 3 Hauptverhaltensparameter von Mäusen abbilden. Diese 3 Komplexe werden im Folgenden einzeln beleuchtet.

2.3.1. Angstverhalten (*Latency First Board Entry, Time on Board, Immobility*)

Als klassische Angstparameter werden aufgezeichnet: Die Latenzzeit, die das Tier benötigt, um das Zylinderbrett das erste Mal zu betreten (*Latency First Board Entry*) und die Zeit, die das Tier insgesamt auf dem Board verbringt (*Time on Board*). Als weiteres Zeichen von Angst wird das bewegungslose Verharren der Tiere in der Testarena interpretiert (*Immobility*).

2.3.1.1. Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (*Latency First Board Entry*)

A



B

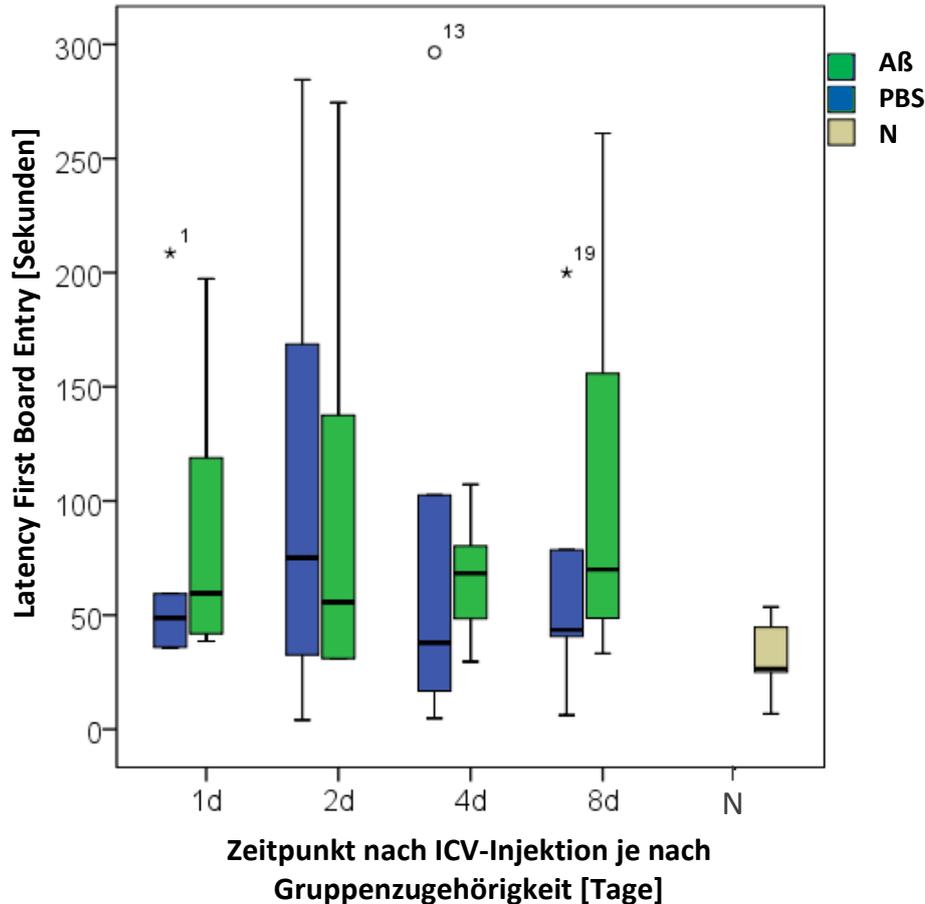


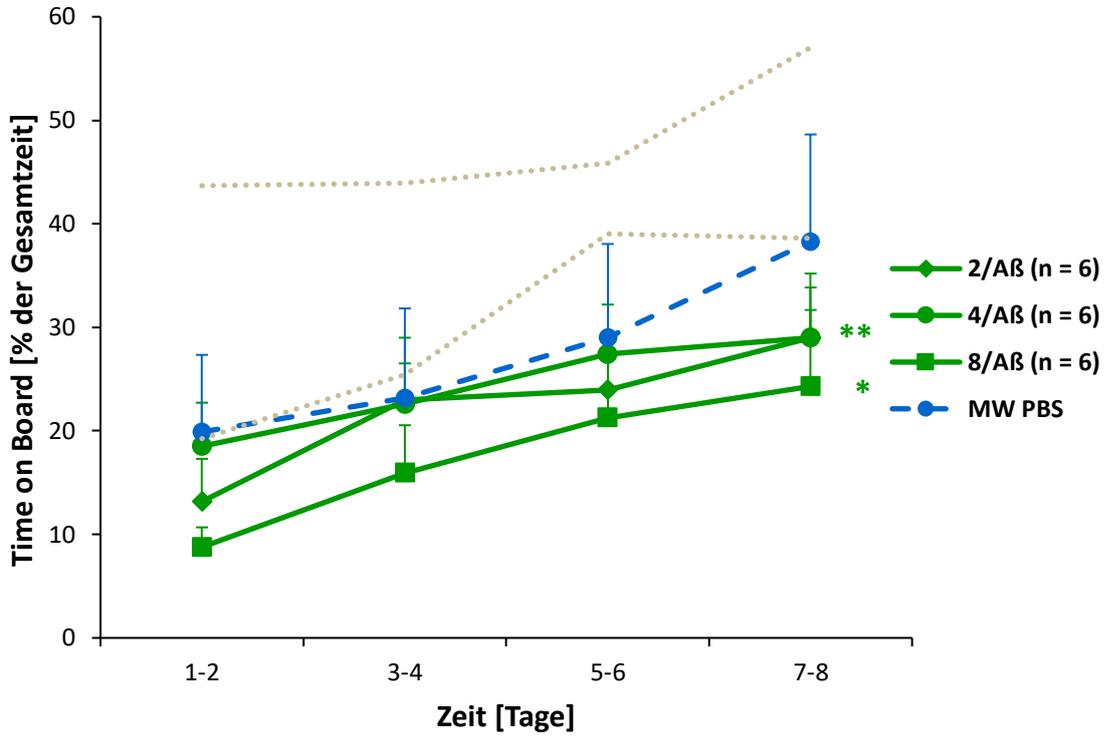
Abbildung 24: Graphische Darstellung zum Vergleich der Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (*Latency First Board Entry*) in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Im Multivariate Test gab es einen signifikanten Unterschied für die *Latency First Board Entry* in Abhängigkeit der Zeit ($F(7, 39) = 4.18, p = 0.002, \text{Wilk's } \Lambda = 0.571$). Ebenso zeigt die Varianzanalyse (Sphärität nicht angenommen: Mauchly $W = 0.037, p < 0.001$), dass die Zeit einen signifikanten Haupteffekt der Messwiederholungen auf die abhängige Variable Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch hatte ($F(3, 162) = 11.11, p < .001, \text{partielles } \eta^2 = 0.198$). Damit erklärte sie 19.8 % der Varianz und wies einen signifikanten linearen Trend auf. Alle weiteren angewendeten statistischen Berechnungen sind ohne Signifikanz innerhalb oder zwischen den Gruppen ($p > 0.05$).

B: Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen der mit $A\beta_{42}$ und PBS behandelten Tieren in Abhängigkeit des Startzeitpunktes, sie verhielten sich hierin ähnlich ($p > 0.05, 1/A\beta_{42}: 0.485, 2/A\beta_{42}: p = 0.699, 4/A\beta_{42}: p = 0.485, 8/A\beta_{42}: p = 0.310$).

2.3.1.2. Gesamtzeit auf dem Board (*Time on Board*)

A



B

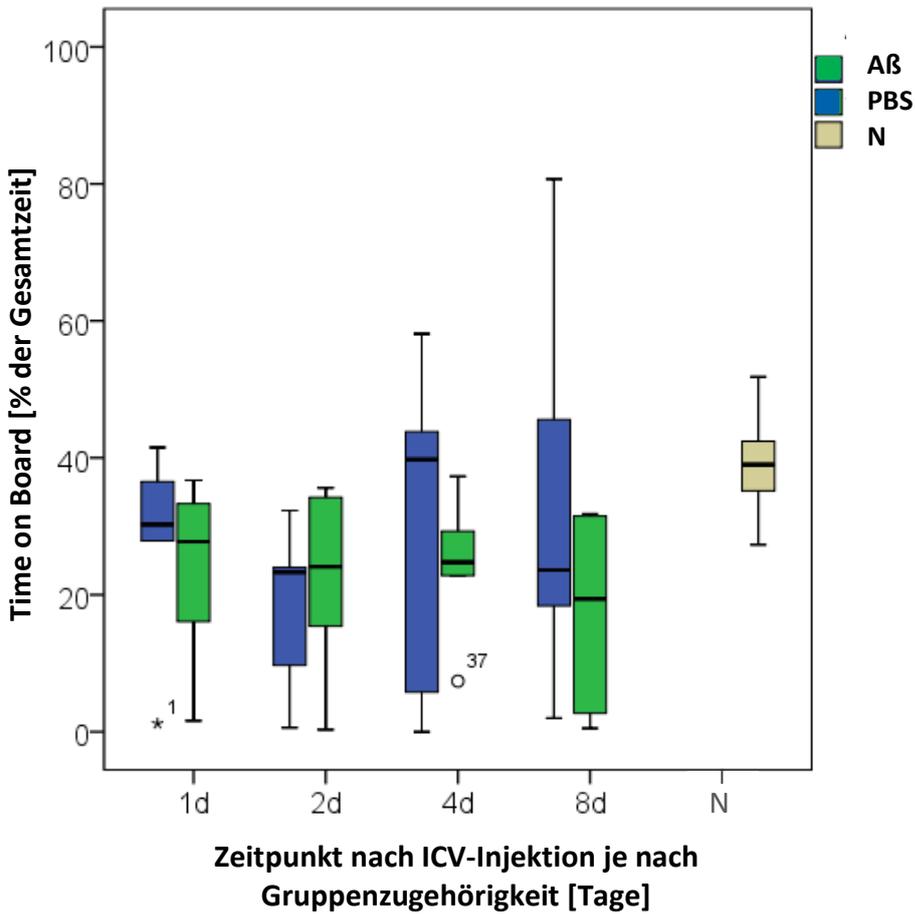


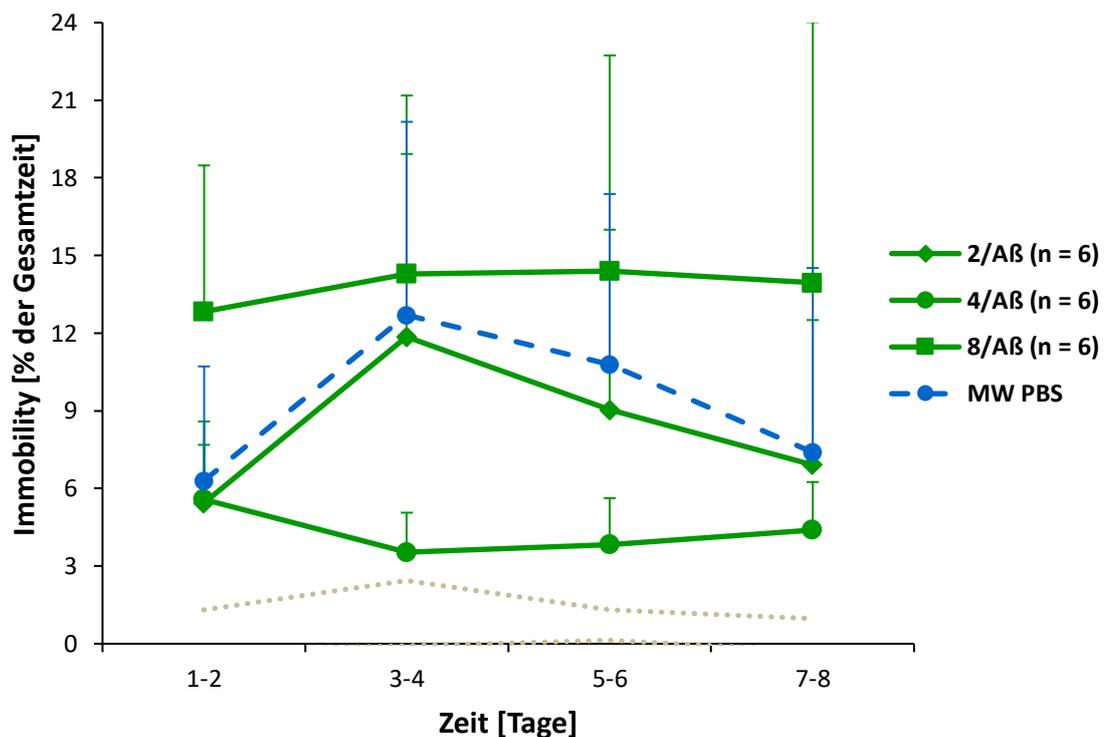
Abbildung 25: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit auf dem Board (*Time on Board*) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW \pm SEM) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Der Multivariate Test, einfaktorielles MANOVA, zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gesamtzeiten auf dem Board über die Zeitdauer des mHBT hinweg ($F(7, 39) = 7.55, p < 0.001, \text{Wilk's } \Lambda = 0.428$). Es trat ein signifikanter Haupteffekte der Zeit auf, Greenhouse-Geisser korrigiert ($F(3, 178) = 25.27, p < 0.001, \text{partielles } \eta^2 = 0.359$). Post-hoc wurde für jede abhängige Variable eine einfaktorielles ANOVA durchgeführt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem *Time on Board* für A β_{42} ($F(1, 45) = 1.42, p = 0.240, \text{partielles } \eta^2 = 0.031$) oder dem Startzeitpunkt des Tests ($F(3, 45) = 0.43, p = 0.735, \text{partielles } \eta^2 = 0.028$). Der paarweise Vergleich, Bonferroni-korrigiert, zeigte das ein signifikante Unterschied zwischen den A β_{42} -Gruppen und der Gruppe der nativen Tiere bestand (* $p = 0.025, M_{\text{Diff}} = -17.08, 95\% \text{-KI} [-31.89, -2.28]$). Zwischen A β_{42} und PBS ($p = 0.240$) und zwischen PBS und den nativen Tieren ($p = 0.123$) bestand keine Signifikanz. Auch innerhalb der Gruppen hatten die A β_{42} -Tiere und die PBS-Tiere in Abhängigkeit des Startzeitpunktes keine signifikanten Differenzen ($p > 0.05$).

B: Es ließen sich zwischen den PBS- und den A β_{42} -injizierten Mäusen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gesamtzeit auf dem Board im WRS darstellen (1A β_{42} : $p = 0.818$ 2/A β_{42} : $p = 0.699$, 4/A β_{42} : $p = 0.394$, 8/A β_{42} : $p = 0.485$).

2.3.1.3. Immobilitätsphase (*Immobility*)

A



B

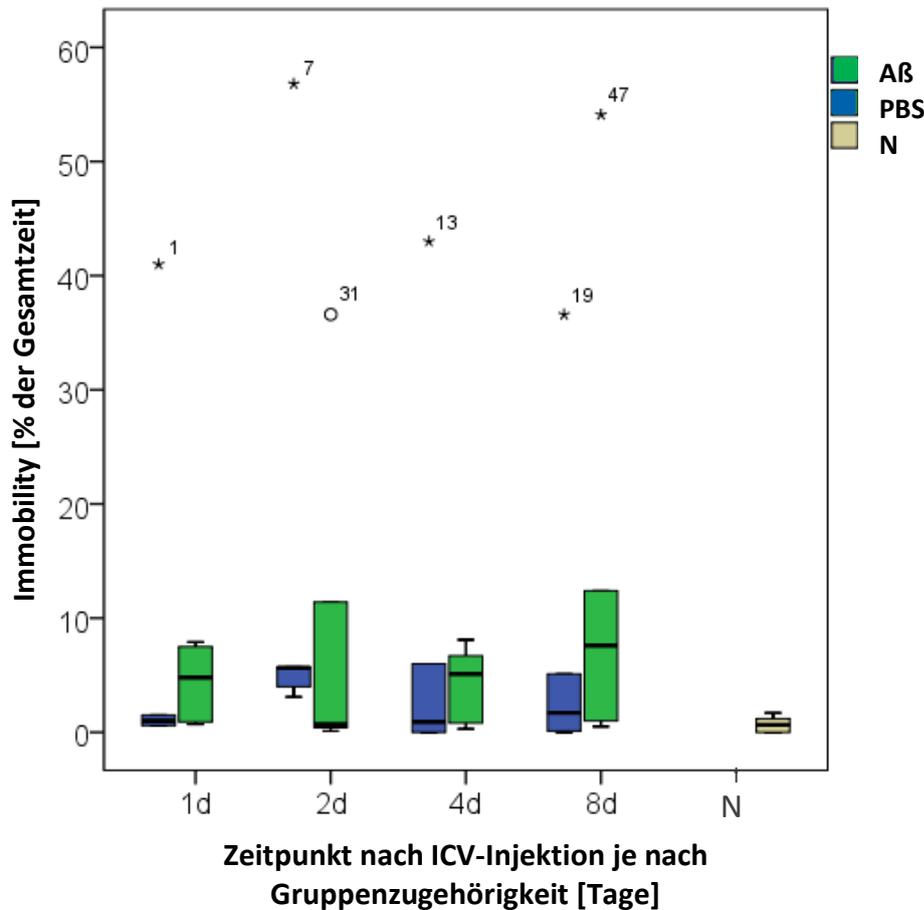


Abbildung 26: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit der Immobilitätsphase (*Immobility*) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Eine einfaktorielle MANOVA zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der *Immobility* für die kombinierten abhängigen Variablen ($p < 0.05$). Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorlag (Mauchly $W = 0.003$, $p < 0.001$), wurde eine Greenhouse-Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Es zeigte sich, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtzeit der Immobilitätsphase ($F(2, 121) = 3.76$, $p = 0.016$), Korrektur nach Greenhouse-Geisser, partielles $\eta^2 = 0.077$ hatte. Damit wurden 7.7 % der Varianz erklärt. Es gab keine Interaktion der unabhängigen Variablen. Post-hoc zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der *Immobility* für A β_{42} und den Startzeitpunkten ($p > 0.05$). Auch der Bonferroni-korrigierte Post-hoc Test zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p > 0.05$) in der Performanz zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit A β_{42} oder mit PBS injiziert wurden.

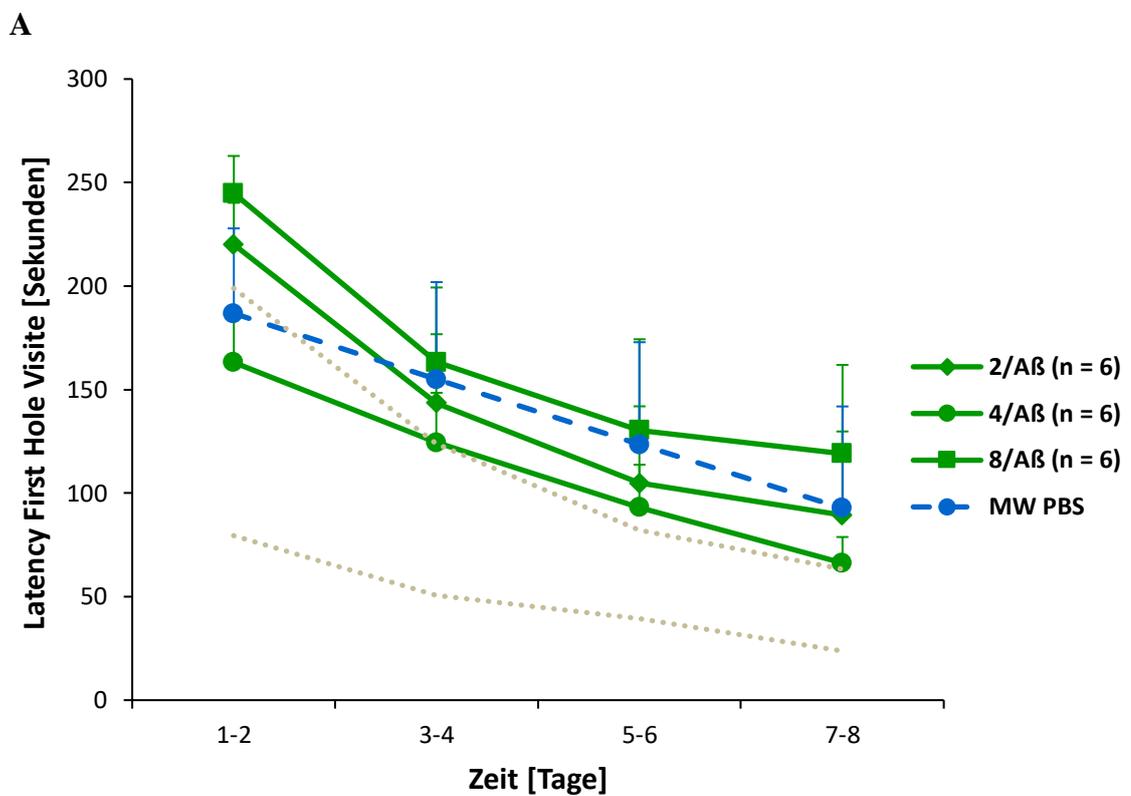
B: Zwischen den A β_{42} -Gruppen und den PBS-Gruppe ließ sich kein signifikanter Unterschied des Gesamtmittelwertes über den Zeitraum von 8 Tagen erkennen (1/A β_{42} : $p = 0.394$, 2/A β_{42} : $p = 0.240$, 4/A β_{42} : $p = 0.394$, 8/A β_{42} : $p = 0.394$).

2.3.2. Erkundungsverhalten (*Latency First Hole Visit, Correct Hole Visits, Rearing*)

Das Erkundungsverhalten wurde unterschieden in zielgerichtetes und ungerichtetes Verhalten. Als gerichtetes Erkundungsverhalten wertete man die Dauer, bis das erste Loch aufgesucht wird (*Latency First Hole Visit*) und die Gesamtzahl der besuchten Löcher mit Futterbelohnung (*Correct Hole Visits*) pro Durchlauf.

Das Aufrichten auf die Hinterbeine (*Rearing*) zählte man zu ungerichtetem Erkundungsverhalten der Umgebung.

2.3.2.1. Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch (*Latency First Hole Visit*)



B

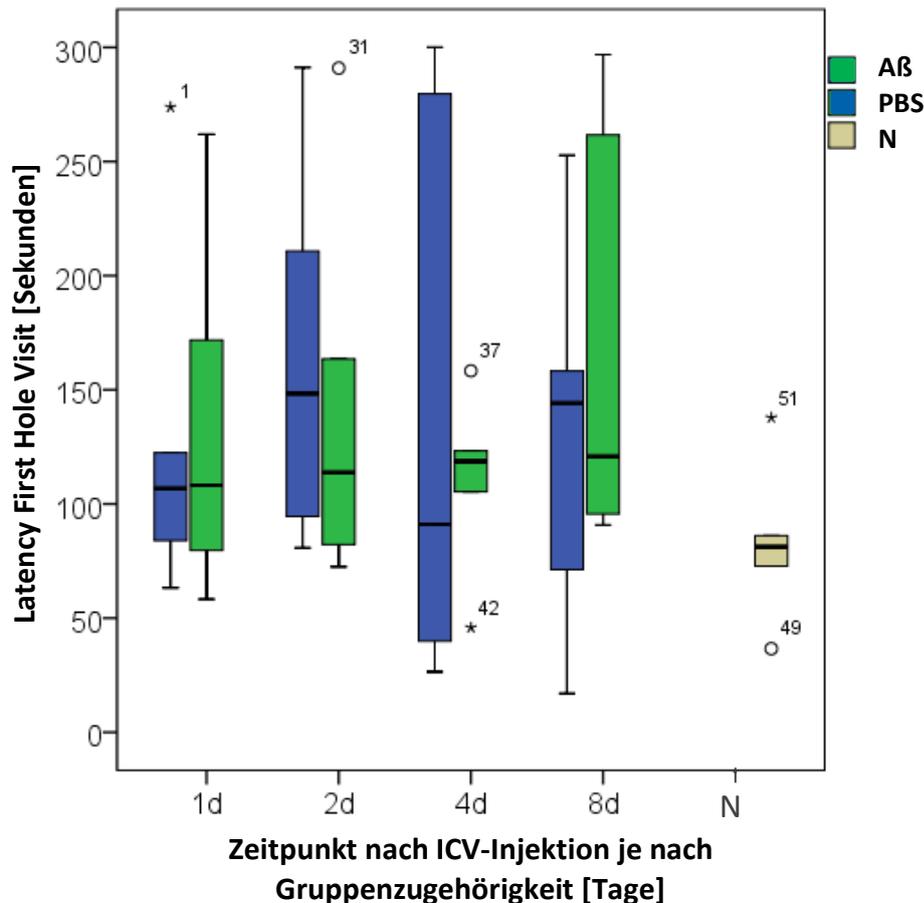


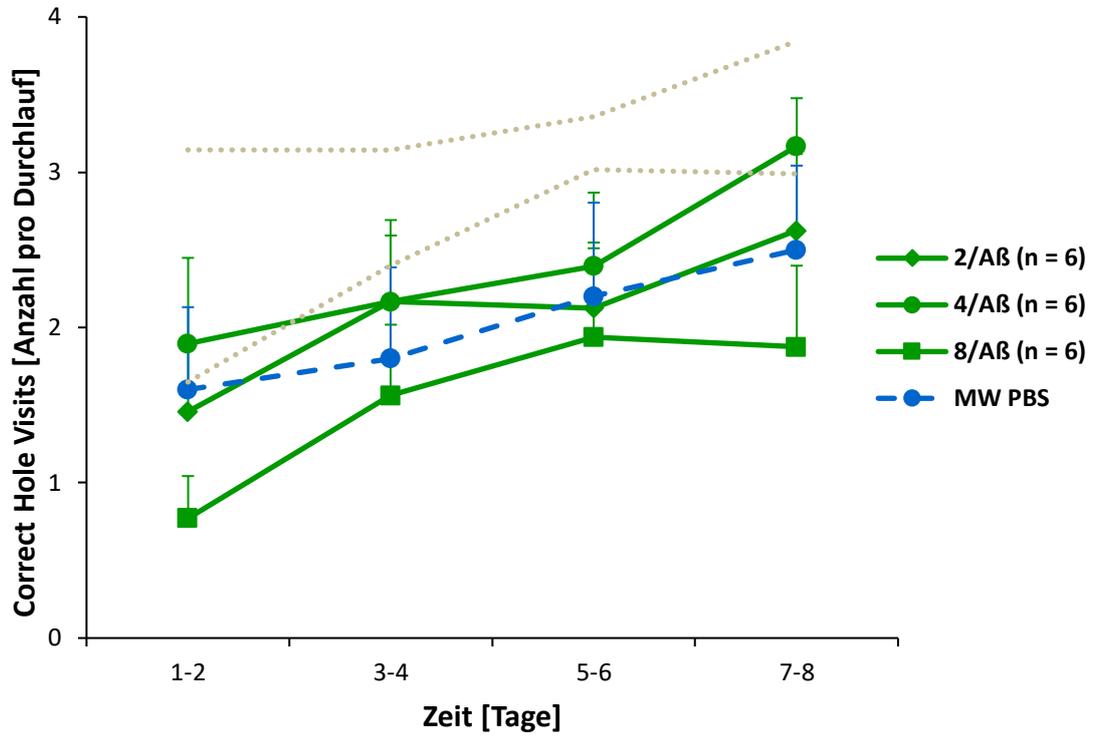
Abbildung 27: Graphische Darstellung zum Vergleich der Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch mit Markierung (*Latency First Hole Visit*) in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW±SEM) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Der Multivariate Test zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der Latenzzeit in Abhängigkeit der Zeit ($F(7, 39) = 16.61, p < 0.001, \text{Wilk's } \Lambda = 0.251$) zwischen den Gruppen. Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorlag (Mauchly $W = 0.011, p < 0.001$), wurde eine Greenhouse-Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Es zeigte sich, dass die Zeit einen signifikanten Einfluss auf den *Latency First Hole Visit* hat ($F(2, 127) = 39.29, p < 0.001$), Korrektur nach Greenhouse-Geisser, partielles $\eta^2 = 0.466$. Damit wurden 46.6 % der Varianz erklärt. Es gab keine Interaktion der unabhängigen Variablen. Post-hoc zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Latenzzeit für Aß₄₂ und den Startzeitpunkten ($p > 0.05$). Auch der Bonferroni-korrigierter Post-hoc Test zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p > 0.05$) in der Performanz zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit Aß₄₂ oder mit PBS injiziert wurden.

B: Bei der vergleichenden graphischen Box-Plot-Darstellung des Parameters Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch gab es keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte Tag 1 - 8 zwischen den mit Aß₄₂ und PBS behandelten Tieren (1/Aß₄₂ $p = 0.937, 2/Aß_{42} p = 0.589, 4/Aß_{42} p = 0.699, 8/Aß_{42} p = 0.818$).

2.3.2.2. Anzahl der besuchten markierten Zylinder (*Correct Hole Visits*)

A



B

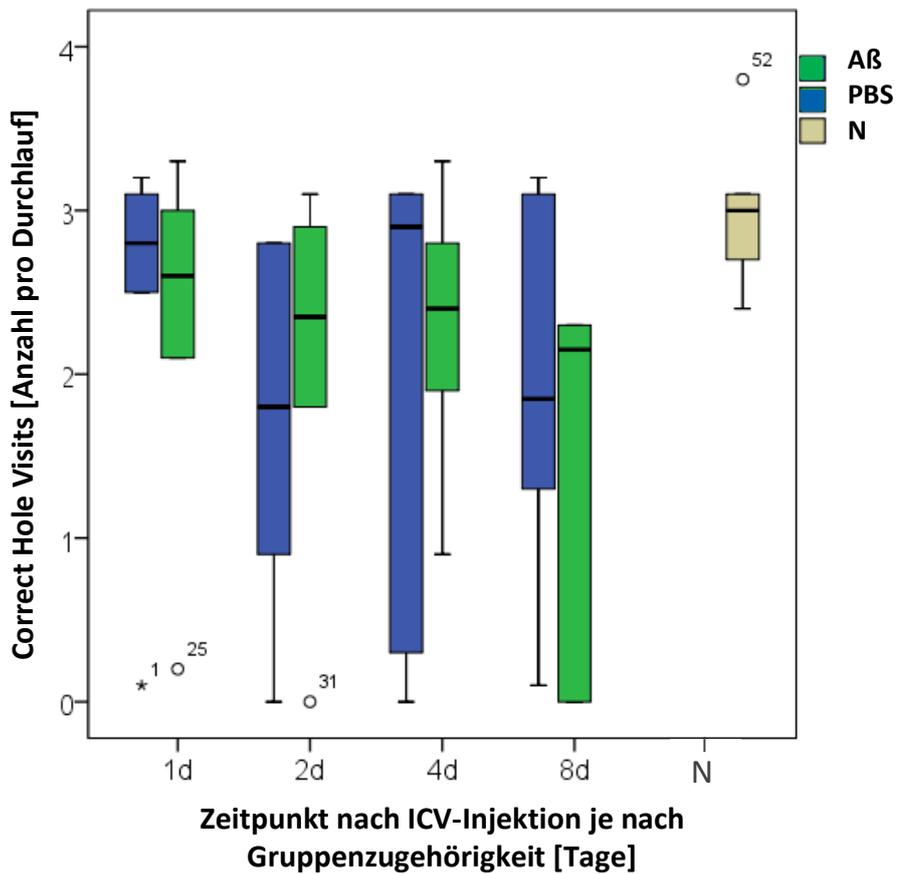
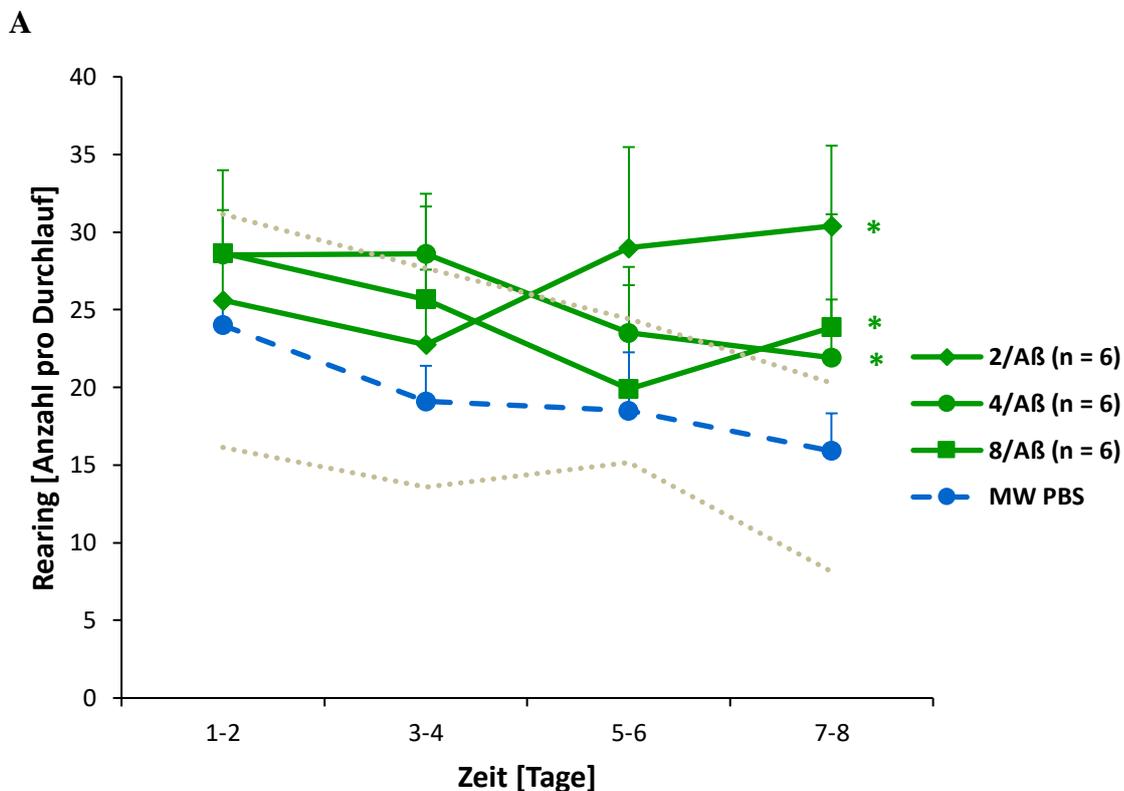


Abbildung 28: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der besuchten markierten Zylinder (*Correct Hole Visits*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW \pm SEM) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Eine einfaktorielle MANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der Anzahl der besuchten markierten Zylinder in Abhängigkeit der Zeit ($F(7, 39) = 8.09, p < 0.001, \text{Wilk's } \Lambda = 0.408$). Ebenso zeigte die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur (Sphärizität nicht angenommen: $\text{Mauchly } W = 0.058, p < 0.001$), dass sich die durchschnittliche Performanz durch einen Haupteffekt der Zeit, über die Dauer des mHBT statistisch signifikant unterschieden ($F(4, 166) = 14.70, p < 0.001, \text{partielles } \eta^2 = 0.246$). Damit erklärte sie 24.6 % der Varianz und wies einen signifikanten linearen Trend auf. Alle weiteren statistischen Tests zur Messung der Signifikanz zwischen und innerhalb aller Gruppen waren unauffällig ($p < 0.05$).

B: Ein WRS wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die *Correct Hole Visits* nach Gruppenzugehörigkeit unterschieden. Alle 4 A β_{42} -Gruppen waren im Vergleich der MW Tag 1 - 8 der Gesamtzahl der falschen Entscheidungen nicht signifikant schlechter als die mit PBS behandelten Gruppen (1/A β_{42} : $p = 0.699$, 2/A β_{42} : $p = 0.394$, 4/A β_{42} : $p = 0.818$, 8/A β_{42} : $p = 0.818$).

2.3.2.3. Aufrichten auf die Hinterbeine (*Rearing*)



B

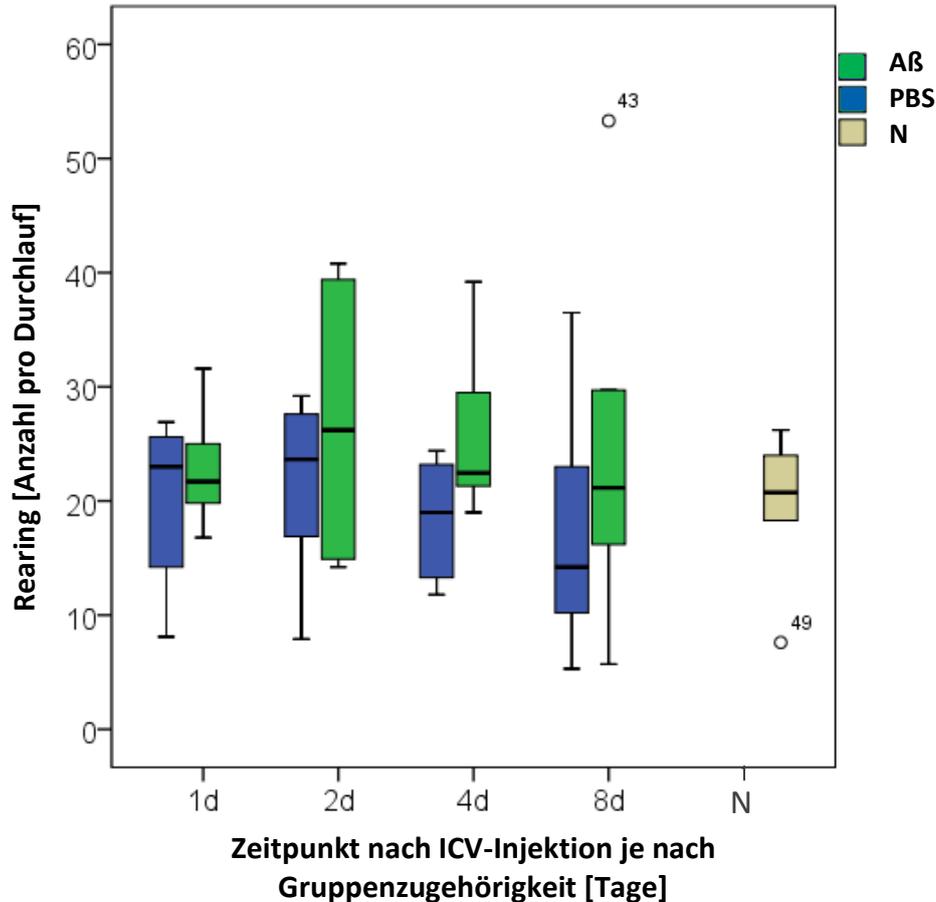


Abbildung 29: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (*Rearing*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Der Multivariate Test zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied im *Rearing* in Abhängigkeit der Zeit ($F(7, 39) = 6.85, p < 0.001, \text{Wilk's } \Lambda = 0.449$) und den Interaktionen Zeit·Startzeitpunkt ($F(21, 112) = 2.04, p = 0.009, \text{Wilk's } \Lambda = 0.396$), sowie Zeit·Startzeitpunkt·Aβ ($F(21, 112) = 2.62, p = 0.001, \text{Wilk's } \Lambda = 0.319$), zwischen den Gruppen. Auch die Berechnung der Haupteffekt der Messwiederholung mit Greenhouse-Geisser-Korrektur zeigte eine Signifikanz bei der Zeit ($F(4, 180) = 8.41, p < 0.001, \text{partielles } \eta^2 = 0.157$) und der Interaktion von Zeit·Startzeitpunkt ($F(12, 180) = 2.52, p = 0.004, \text{partielles } \eta^2 = 0.144$), sowie von Zeit·Startzeitpunkt·Aβ ($F(12, 180) = 3.11, p < 0.001, \text{partielles } \eta^2 = 0.172$) des mHBT (Sphärizität nicht angenommen: Mauchly $W = 0.088, p < 0.001$). Die Dauer des mHBT erklärte 15.7 % und die Interaktionen 14.4 % bzw. 17.2 % der bis anhin nicht erklärten Varianz. In den weiteren Post-hoc-Tests gab es einen Haupteffekt von Aβ₄₂ auf die Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine ($F(1, 45) = 4.35, p = 0.043, \text{partielles } \eta^2 = 0.088$), aber nicht für den Startzeitpunkt ($p = 0.836$) und die Interaktion beider ($p = 0.925$). Um zu überprüfen zwischen welchen Messzeitpunkten signifikante Unterschiede bestanden wurde ein paarweiser Vergleich, Bonferroni-korrigiert, durchgeführt. Die Aβ₄₂-Gruppen zeigten im *Rearing* Unterschiede zu den PBS-Gruppen (* $p = 0.043, M_{\text{Diff}} = 5.66, 95\% \text{-KI}$

[0.19, 11.14]), blieben aber unauffällig gegenüber der Gruppe der nativen Tiere ($p = 0.214$) und auch die nativen Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den PBS-Gruppen ($p = 0.954$). Weitere Berechnungen ergaben keine zusätzlich signifikanten Unterschiede zwischen und innerhalb der einzelnen Gruppen an allen Testtagen ($p < 0.05$).

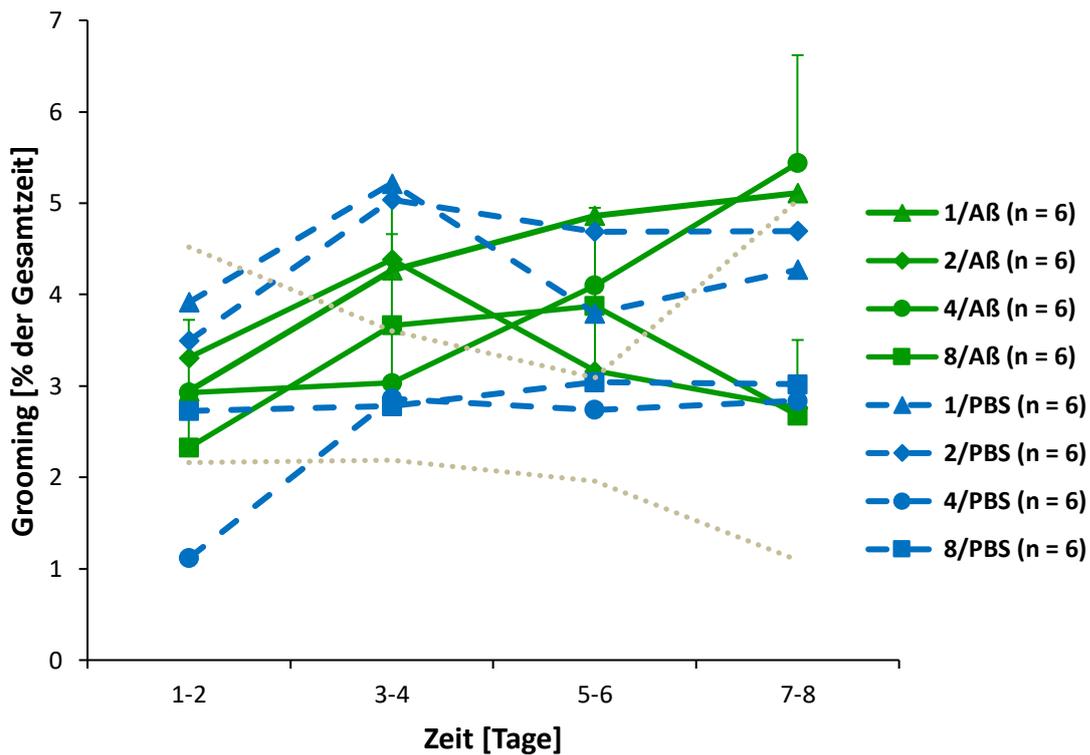
B: Es gab keine signifikanten Unterschiede im WRS der Mittelwerte Tag 1 - 8 zwischen den einzelnen Gruppen bei der Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (1/AB₄₂: $p = 0.937$, 2/AB₄₂: $p = 0.485$, 4/AB₄₂: $p = 0.132$, 8/AB₄₂: $p = 0.394$).

2.3.3. Erregung (*Grooming*, *Boli*)

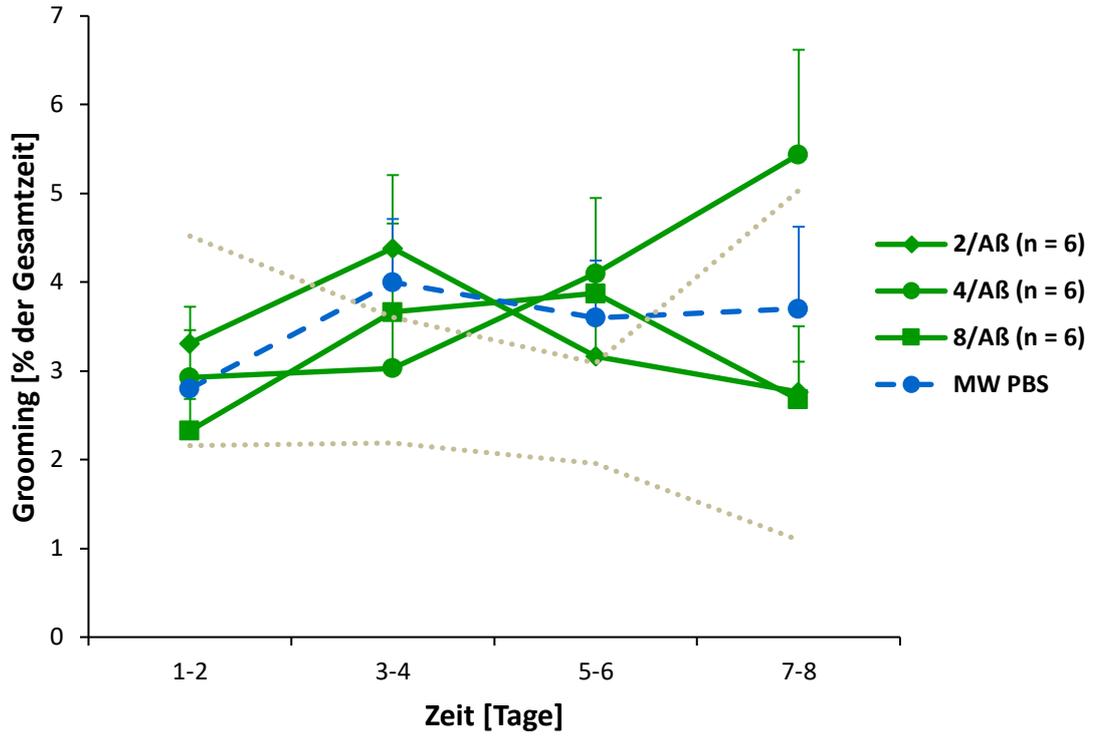
Die Parameter der Putzphasen (*Grooming*) und des Kotabsatzes (*Boli*) gaben einen Hinweis auf den Erregungszustand der Tiere.

2.3.3.1. Putzphasen (*Grooming*)

A0



A



B

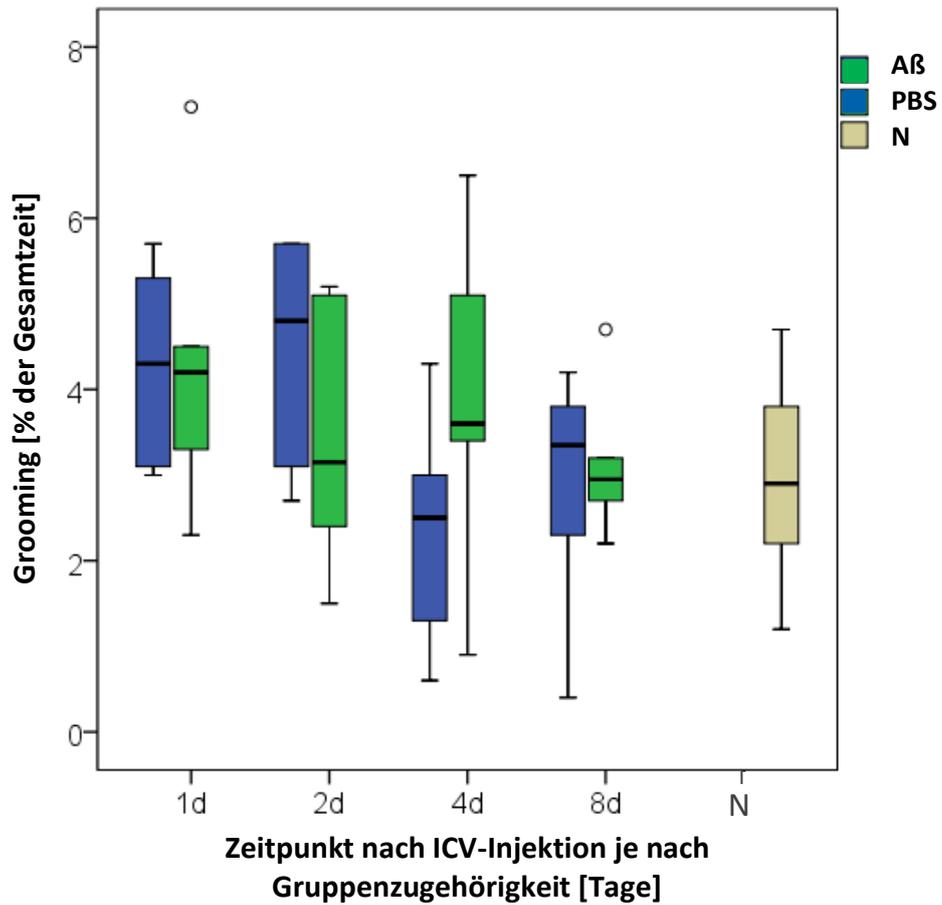


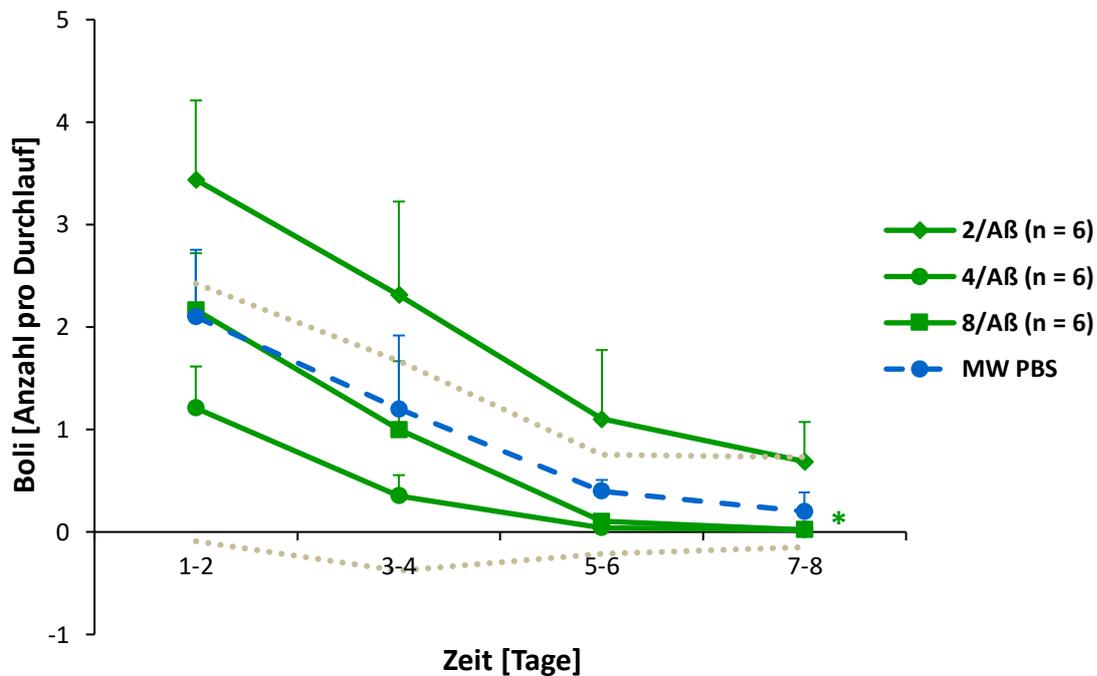
Abbildung 30: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit der Putzphase (*Grooming*) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Der Multivariate Test zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Putzphase ($p < 0.05$). Die Interaktion der Dauer des mHBT mit dem Startzeitpunkt hatte einen signifikanten Einfluss das *Grooming* ($F(16, 244) = 1.66, p = 0.047$, partielles $\eta^2 = 0.012$, Korrektur nach Greenhouse-Geisser (Sphärizität nicht angenommen: Mauchly $W = 0.353, p = 0.020$). Post-hoc wurde für jede abhängige Variable eine einfaktorische ANOVA durchgeführt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0.05$). Der Bonferroni-korrigierter post-hoc Test zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$) in der Performanz zwischen den Kontrolltieren, der PBS- und der $A\beta_{42}$ -Gruppe. In Abhängigkeit des Startzeitpunktes kam es zu keinen signifikanten Unterschieden bei allen 4 $A\beta_{42}$ -Gruppen gegenüber den PBS-Gruppen ($p > 0.05$). In der Auswertung der Daten aufgeteilt nach $A\beta_{42}$ -Gabe hatten die $A\beta_{42}$ -Tiere ($p > 0.05$) keine und die PBS-Tiere eine signifikante Differenz ($F(3, 20) = 3.59, p = 0.032$, partielles $\eta^2 = 0.350$) in Abhängigkeit des Startzeitpunktes zwischen den Gruppen.

B: Die Putzphase unterschied sich nicht signifikant zwischen den $A\beta_{42}$ - und PBS-Tieren nach Zugehörigkeit einer Gruppe zum jeweiligen Startzeitpunkt (1/ $A\beta_{42}$: $p = 0.937$, 2/ $A\beta_{42}$: $p = 0.180$, 4/ $A\beta_{42}$: $p = 0.132$, 8/ $A\beta_{42}$: $p = 0.937$).

2.3.3.2. Kotabsatz (*Boli*)

A



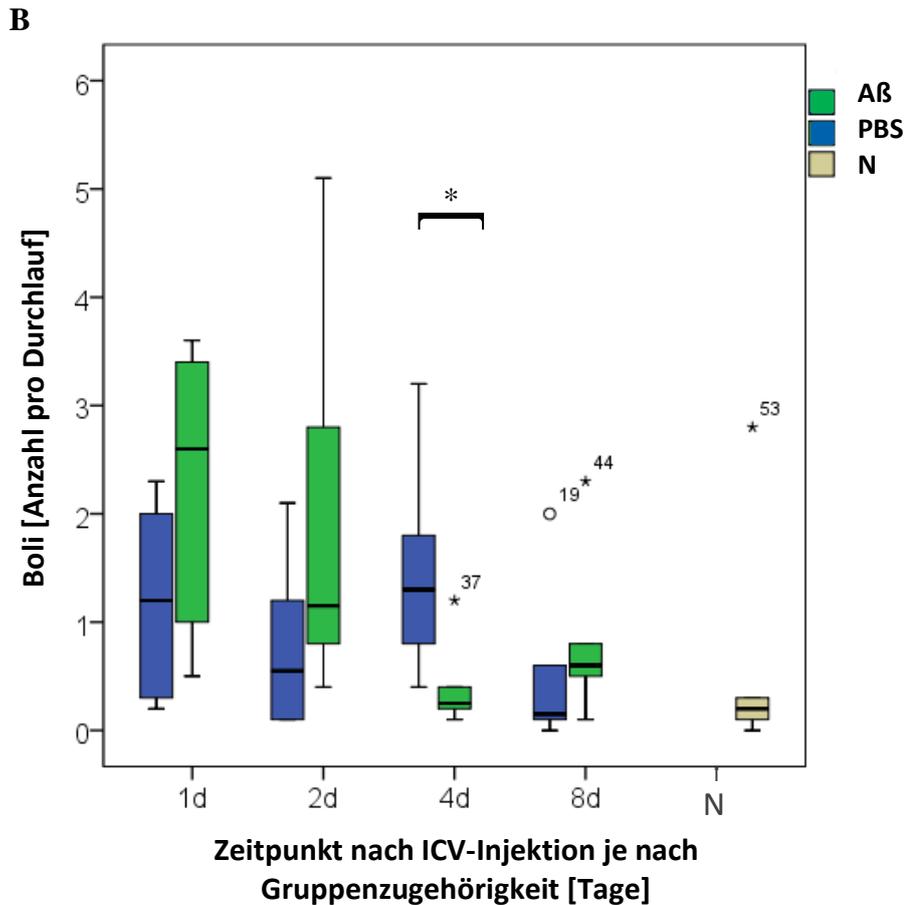


Abbildung 31: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl des Kotabsatzes (*Boli*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) und als Mittelwert aller Untersuchungsgruppen über den Gesamtzeitraum der Studie (Mediane und Perzentile) (B)

A: Eine einfaktorische MANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl des Kotabsatzes in Abhängigkeit der Zeit ($F(7, 39) = 12.76, p < 0.001, \text{Wilk's } \Lambda = 0.304$). Da eine Verletzung der Voraussetzung der Sphärizität vorlag (Mauchly $W = 0.014, p < 0.001$), wurde eine Greenhouse-Geisser Korrektur der Freiheitsgrade vorgenommen. Diese Berechnung der Haupteffekt der Messwiederholung zeigte eine Signifikanz der Zeit ($F(3, 154) = 32.79, p < 0.001, \text{partielles } \eta^2 = 0.422$) und der Interaktion von Zeit·Startzeitpunkt·Aß ($F(10, 154) = 2.35, p = 0.012, \text{partielles } \eta^2 = 0.136$) des mHBT, mit einem signifikant linearen Trend. Die Dauer des mHBT erklärte 42.2 % und die Interaktion 13.6 % der bis anhin nicht erklärten Varianz. Post-hoc wurde für jede abhängige Variable eine einfaktorische ANOVA durchgeführt. Es zeigte sich einen statistisch signifikanten Unterschied der *Boli* für die Interaktion von Startzeitpunkt·Aß ($F(3, 45) = 2.85, p = 0.048, \text{partielles } \eta^2 = 0.160$), nicht aber für die einzelnen Variablen ($p > 0.05$). Der paarweise Vergleich, Bonferroni-korrigiert, zeigte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0.05$). In weiteren Berechnungen wurde ersichtlich, dass sich 4/Aß₄₂-Gruppe ($F(1, 10) =$

5.77, * $p = 0.037$, partielles $\eta^2 = 0.366$) zu der 4/PBS-Gruppe über alle 8 Tage signifikant unterschied. Die 1/A β_{42} -, 2/A β_{42} - und 8/A β_{42} -Gruppe verhielten sich nicht signifikant zur jeweiligen PBS-Gruppe ($p > 0.05$). In der Auswertung der Daten differenziert nach A β_{42} -Gabe in Abhängigkeit des Startzeitpunktes, wiesen die A β_{42} -Tiere innerhalb der Gruppen über alle Untersuchungstage hinweg einen signifikanten Unterschied auf ($F(2, 20) = 3.34$, $p = 0.040$, partielles $\eta^2 = 0.334$). Die PBS-Gruppen waren nicht signifikant ($p > 0.05$).

B: In der vergleichenden graphischen Box Plot Darstellung (MW Tag 1 - 8) ließen sich signifikante Unterschiede zwischen der 4/A β_{42} - und 4/PBS-Gruppe im WRS bestätigen (* $p = 0.015$). Bei den weiteren A β_{42} -Gruppen existierte keine Signifikanz im Vergleich zu PBS (1/A β_{42} : $p = 0.132$, 2/A β_{42} : $p = 0.180$, 8/A β_{42} : $p = 0.240$).

2.4. Zusammenfassung der erhobenen Parameter im mHBT

2.4.1. Physiologische Parameter

Zwischen allen getesteten Versuchsgruppen lagen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Körpergewichtsentwicklung vor. Alle Tiere nahmen bis zum mHBT stetig an Gewicht zu und hielten es während des gesamten Versuchs konstant aufrecht.

2.4.2. Modifizierter Hole-Board-Test

1. Kognitive Parameter

Die Injektion von A β_{1-42} führte zu einer Beeinträchtigung der kognitiven Leistung, mit Defiziten im deklarativen und räumlichen Gedächtnis. Sichtbar wurde dies bei der Entwicklung der Gruppen über die 8 Tage des mHBT (siehe VI.1 Zusätzliche Tabellen und Abbildungen der untersuchten Parameter im mHBT). Die nativen und mit PBS behandelten Tiere lagen meist auf einem ähnlichem Erfolgslevel. Die mit A β_{42} injizierten Tiere zeigten ein klares Defizit durch die Interaktion von A β mit den Neuronen. Diese spiegelte sich als erhöhte Anzahl an Fehlbesuchen (*Wrong Choices*) der Gruppen 1/A β_{42} ($p = 0.039$), 2/A β_{42} ($p = 0.044$) und 4/A β_{42} ($p = 0.002$) im Vergleich zur PBS-Gruppe wider (für die 8/A β_{42} Gruppe lag keine Signifikanz vor, $p = 0.200$) und war unabhängig vom Beginn der kognitiven Tests über den gesamten Testzeitraum vorhanden (GLM-Interaktionsterm): $p = 0.001$. Auch bei dem Gesamtfehler eines Durchlaufs (*Wrong Choices total*) wiesen die Mäuse, denen A β_{42} injiziert wurde, eine schlechtere Leistung als die PBS-Gruppe auf (1/A β_{42} : $p = 0.004$ über die Zeit und $p = 0.045$ an den Tagen 7 und 8 im Vergleich zu PBS, 2/A β_{42} : $p = 0.017$ und $p = 0.031$, 4/A β_{42} : $p < 0.001$ und $p = 0.001$, 8/A β_{42} : $p = 0.031$ und $p = 0.007$) und erreichen keine physiologischen Werte, die von den nativen Mäusen ($p < 0.001$) aufgestellt wurden.

Ebenfalls signifikante Unterschiede zeigten die Tiere bei dem ersten Kontakt mit dem Testsystem: bei der Gesamtdurchlaufzeit (*Time Trial*) hoben sich die Aß₄₂-Gruppen von den nativen Tieren ab ($p = 0.021$). Jedoch wurde die Gesamtzeit des mHBT kontinuierlich von allen Tieren reduziert und war ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen über die Zeit.

Andere neurokognitive Parameter, die Angst und Motivation darstellten, wie der Arbeitsspeicher (*Repeated Choices*) und die Leistung des deklarativen Gedächtnisses (*Omission Errors*) waren zwischen Aß₄₂ und PBS vergleichbar (siehe VI.1.1 Abbildung 40 und Abbildung 42).

2. Motorische Parameter

Die Häufigkeit, mit der die in die Versuchsarena eingeklebten weißen Linien während eines Testdurchlaufs überquert wurde, ist im Parameter *Line Crossing* abgebildet und gab einen Einblick in die lokomotorische Aktivität der Tiere. Sie war zu Beginn des mHBT bei allen Tieren hoch, sank dann im weiteren Verlauf ab und stabilisierte sich. Es gab einen signifikanten Unterschied bei diesem Parameter bei allen Aß₄₂-Gruppen gegenüber den jeweiligen PBS-Gruppen ($p = 0.035$) aber unabhängig vom Startzeitpunkt des Versuches

Die feinmotorischen Fähigkeiten ließen sich mit Hilfe des *Time Food Intake*, also der Zeit, welche die Maus braucht, um ein Mandelstückchen zu fressen, interpretieren. Die Werte aller Versuchsgruppen stiegen kontinuierlich, über den gesamten Versuchszeitraum hinweg, an. Auch hier existierte eine Signifikanz zwischen den Aß₄₂- und den PBS-Gruppen ($p = 0.048$), aber ohne Unterschied zwischen und innerhalb der einzelnen Gruppen an allen Testtagen und unabhängig vom Startzeitpunkt.

3. Verhaltensparameter

Zwischen allen drei Tiergruppen unterschieden sich die Angst der Mäuse anhand der erfassten Parameter nicht stark: Die Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (*Latency First Board Entry*) sank bei allen Tieren ohne Unterschied innerhalb der Gruppen. Die nativen Tiere verbrachten mehr Zeit auf dem Board (*Time on Board*) und es existierte ein signifikanter Unterschied zwischen den Aß₄₂-Gruppen und der Gruppe der nativen Tiere ($p = 0.025$). Tendenziell stieg diese Zeit aber bei allen Versuchsgruppen, ohne weitere Signifikanz, an. Ebenso war die Immobilitätsphase (*Immobility*) von einer großen Diversität geprägt.

Im Erkundungsverhalten (gerichtetes Verhalten) zeigte sich über die acht Tage des Versuches eine Abnahme der Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch (*Latency First*

Hole Visit) und eine Zunahme der Anzahl der besuchten markierten Zylinder (*Correct Hole Visits*) bei allen Versuchsgruppen. Im ungerichteten Verhalten (*Rearing*) verringerte sich die Exploration der Umgebung bei allen Gruppen, mit einem signifikanten Unterschied zwischen den A β ₄₂- und den PBS-Gruppen ($p = 0.043$)

Das Erregungslevel (*Grooming*) war durch schwankende Werte geprägt, insgesamt jedoch eher unauffällig. Unter Berücksichtigung des Startzeitpunktes kam es zu keinen signifikanten Unterschieden bei allen 4 A β ₄₂-Gruppen gegenüber den PBS-Gruppen ($p > 0.05$). Die PBS-Tiere zeigten allerdings eine signifikante Differenz ($p = 0.032$) zwischen den Gruppen. Auch der zweiten Parameter Kotabsatz (*Boli*) zeigte eine deutliche Reduzierung der Anzahl über die Zeit hinweg. Die signifikante Interaktion von Startzeitpunkt*A β ($p = 0.048$), bedeutete das eine Abhängigkeit zwischen diesen beiden Variablen bestand und diese einen komplexen Einfluss auf den Kotabsatz hatte. So wiesen die A β ₄₂-Tiere innerhalb der Gruppen über alle Untersuchungstage hinweg einen signifikanten Unterschied auf ($p = 0.040$), differenziert nach A β ₄₂-Gabe in Abhängigkeit des Startzeitpunktes. Über alle 8 Tage war die 4/A β ₄₂-Gruppe ($p = 0.03$) signifikant zu der 4/PBS-Gruppe.

3. Entnahme und Präparation des Gehirns

Neben der Analyse der physiologischen und Verhaltensparameter wurde zum Zeitpunkt der Sektion ebenfalls das Gehirn der Tiere gewonnen, aufgearbeitet und analysiert.

3.1. Präanalytische Probenbehandlung

3.1.1. Liquor cerebrospinalis-Entnahme

Es war möglich bei 40 Tieren eine Spinalpunktion vorzunehmen (Erfolgsrate: 74,1%), davon wurden 11 Proben u.a. mit Blut verunreinigt, so dass am Ende von den insgesamt 54 Tieren lediglich von 29 (53,7%) eine einwandfreie, verwertbare Probe der Zerebrospinal Flüssigkeit gewonnen werden konnte. Eine Übersicht über die Probengewinnung und Gruppenzugehörigkeit gibt die folgende Tabelle.

Tabelle 7: Anzahl und Menge in μl der gewonnene Liquor cerebrospinalis-Proben aller 9 Untergruppen (n = 6) nach dem mHBT

Gruppe	Gewonnene Proben	Ø-Menge in μl	Verwertbare Proben	Ø-Menge in μl	Gesamtmenge für Diagnostik in μl
1/AB ₄₂	4	8.8	3	9.0	27
2/AB ₄₂	3	6.3	2	6.5	13
4/AB ₄₂	5	6.6	2	9.0	18
8/AB ₄₂	5	9.6	5	9.6	48
1/PBS	5	8.0	5	8.0	40
2/PBS	5	7.2	3	8.7	24
4/PBS	4	7.0	4	7.0	28
8/PBS	5	7.2	3	8.7	26
N	4	8.5	2	10.0	20

3.1.2. Toluidinblau-Färbung

Bei 3 Tieren der insgesamt 9 Kontrolltiere erfolgte eine weitere Überprüfung des korrekten Sitzes der Führungskanüle mit einer Färbung mittels Toluidinblau. Die 3 Gehirne wurden in toto entnommen und die Färbung nach vertikaler Teilung in 2 Gehirnhälften makroskopisch beurteilt.

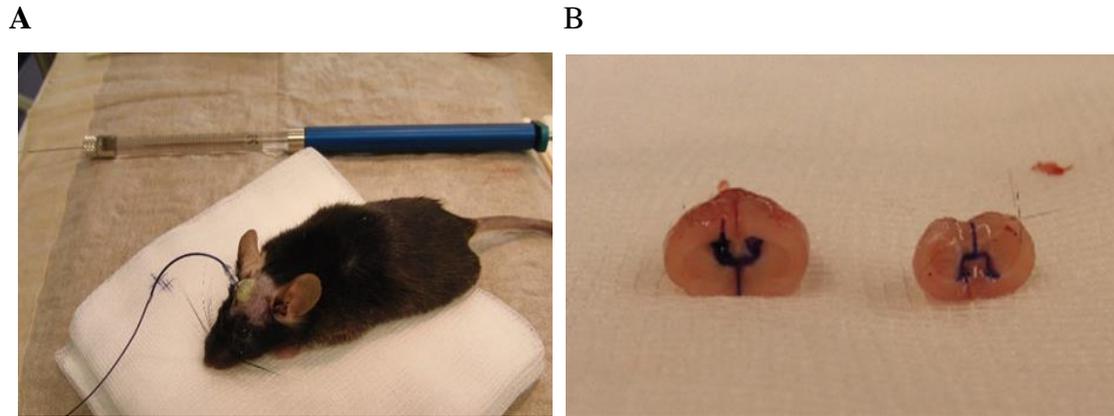


Abbildung 32: Nachweisführung des korrekten Sitzes der Führungskanüle am Beispiel eines Kontrolltieres mit einer Färbung mittels Toluidinblau

A: Toluidinblau-Färbung über die zuvor gelegte Führungskanüle mit Hilfe einer Hamiltonspritze und Verlängerung nach Euthanasie.

B: Makroskopischer Nachweis des korrekten Sitzes der Führungskanüle, bis in den Ventrikel reichende Blaufärbung, nach Färbung mit Toluidinblau und anschließender in toto Entnahme des Gehirns und vertikaler Teilung in 2 Hirnhälften.

3.2. Analytik der A β ₁₋₄₂-Konzentration, Apoptose und Inflammation

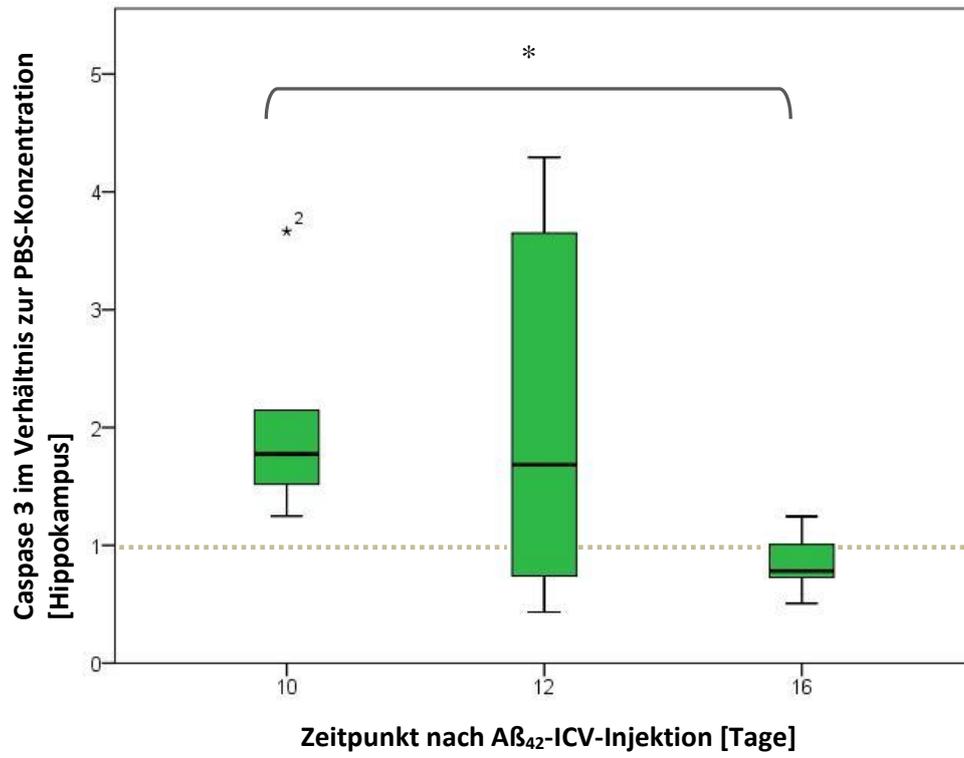
3.2.1. Messung von Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α im Western-Blot-Verfahren

Bei allen WBs war die Intensität (quantitative Proteinkonzentration) der PBS-Gruppen, mit einem festgelegten Wert von 1 die Bezugsgröße. D.h. die Werte, der mit A β ₄₂ behandelten Tiere wurden in Relation zu diesem Standard ermittelt und gingen nach doppelter Auswertung, in Form des Mittelwertes in die Analyse aller Gruppen (n = 6) ein.

In den folgenden Graphiken (Mediane, sowie 25 % und 75 % Perzentile) ist die Proteinkonzentration der einzelnen Demenzmarker im Hippokampus (A) und im medialen präfrontalen Kortex (MPFK) (B) der mit A β ₄₂ injizierten Tiere in Bezug zu den mit PBS injizierten Tiere (PBS = 1.0) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten dargestellt. Dabei bezeichnet 10, 12 und 16 jeweils den letzten Tag des 8 Tage dauernden mHBT der 2/A β ₄₂-, 4/A β ₄₂- und 8/A β ₄₂-Untergruppe (Tag 8 = 1/A β ₄₂-Gruppe wurde der Übersicht halber weggelassen). An diesen Tagen erfolgte für die jeweilige Gruppe der letzte Durchlauf des Verhaltenstests und im Anschluss die Probennahme und Euthanasie. Der Bereich der gepunkteten Linien markiert die

quantitative Proteinkonzentration der PBS-Gruppen mit den festgelegten Wert von 1 als Bezugsgröße.

A



B

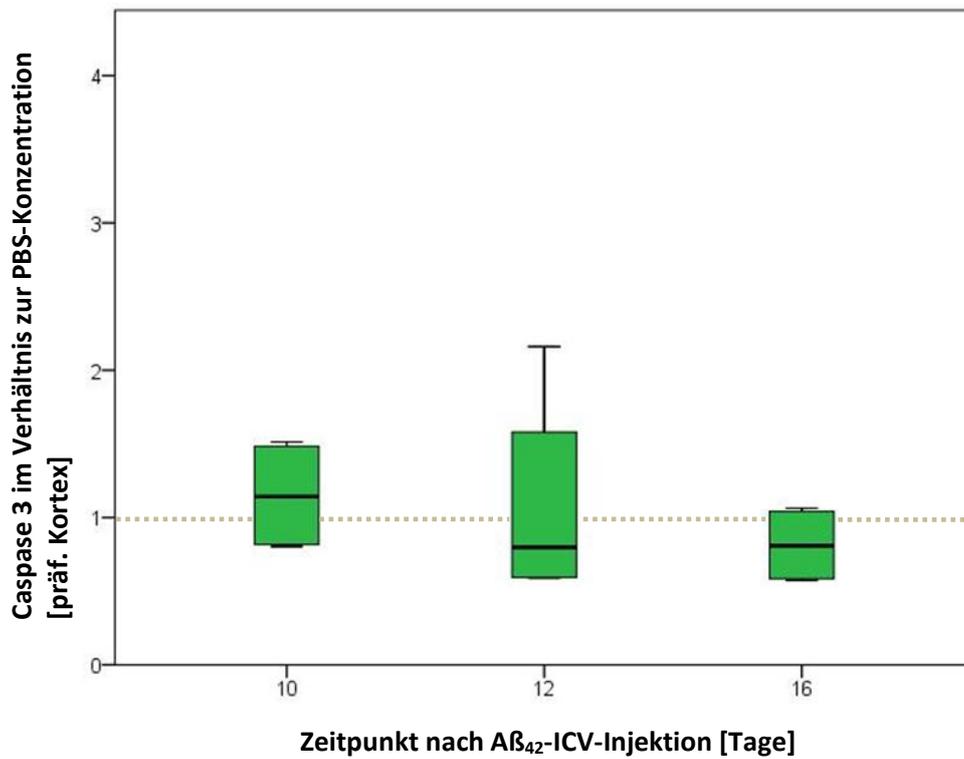


Abbildung 33: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von Caspase 3 im Hippokampus (A) und MPFK (B) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten im Verhältnis zur quantitativen PBS-Konzentration mit festgelegtem Standard = 1.0

A: Der Kruskal-Wallis Tests zeigte, dass es Unterschiede bezüglich der zentralen Tendenzen der Untersuchungszeitpunkte gab (Chi-Quadrat(2) = 6.352, $p = 0.042$). Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen bei welchen Paarungen sich die Caspase 3 - Proteinkonzentration je nach Zugehörigkeit der Untersuchungsgruppen unterschieden. Die Konzentration im Hippokampus und der einhergehende Abfall am Tag 16 nach $A\beta_{42}$ -Injektion verglichen mit dem Tag 10 war hoch signifikant (d10 : d16 * $p = 0.004$). Die anderen Untersuchungszeitpunkte waren im Vergleich nicht signifikant zueinander (d10 : d12 $p = 0.0792$, d12 : d16 $p = 0.180$). *2 stellt einen extremen Ausreißer dar.

B: Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Tendenz der Untersuchungszeitpunkte (Chi-Quadrat(2) = 1.077, $p = 0.584$). Und ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Proteinkonzentration von Caspase 3 nach $A\beta_{42}$ -Injektion im MPFK zwischen Tag 10, 12 und 16 (d10 : d12 $p = 0.686$, d10 : d16 $p = 0.343$, d12 : d16 $p = 1.0$).

A

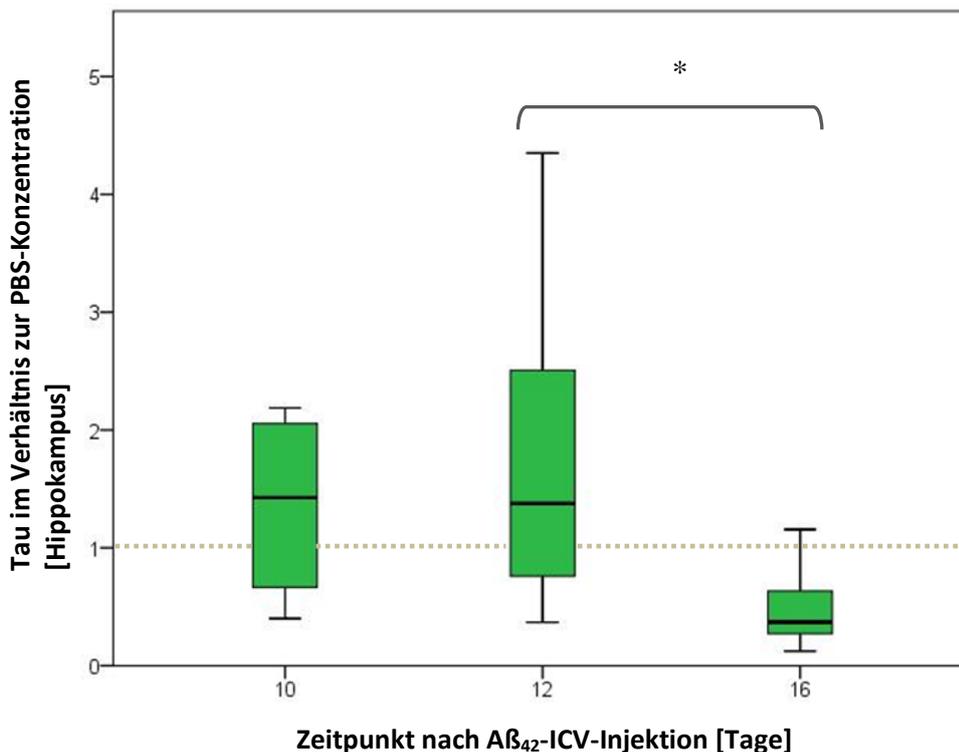


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von Tau im Hippokampus (A) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten im Verhältnis zur quantitativen PBS-Konzentration mit festgelegtem Standard = 1.0

A: Der Kruskal-Wallis Tests zeigte, dass es Unterschiede bezüglich der zentralen Tendenzen der Untersuchungszeitpunkte geben haben könnte, diese waren aber nicht signifikant (Chi-Quadrat(2) = 5.706, $p = 0.058$). Die statistische Auswertung des WRS zeigte eine Signifikanz der Proteinkonzentrationsänderung von Tau im Hippokampus von Tag 12 verglichen mit Tag 16 nach $A\beta_{42}$ -Injektion (d12 : d16

* $p = 0.041$). Alle anderen Vergleiche der Untersuchungszeitpunkte untereinander waren nicht signifikant (d10 : d12 $p = 0.914$, d10 : d16 $p = 0.067$).

Abbildung der Proteinkonzentration von Tau nach $A\beta_{42}$ -Injektion im MPFK war Aufgrund der geringen Probenanzahlen (Tag 10 $n = 2$, Tag 12 $n = 1$ und Tag 16 $n = 1$) statistisch nicht auswertbar.

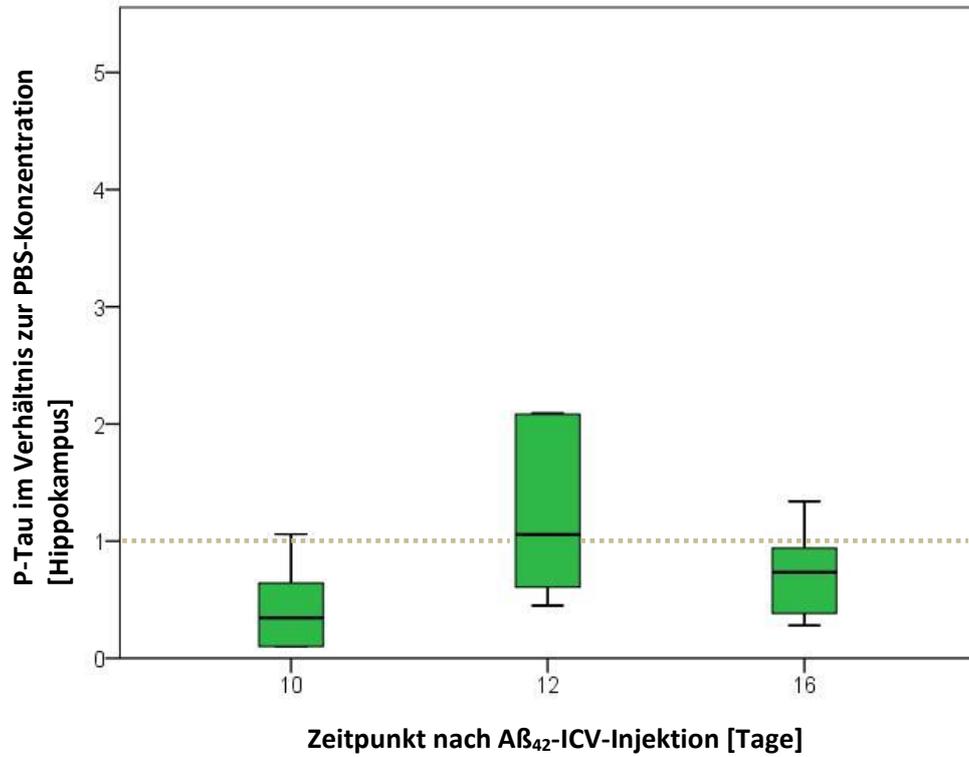
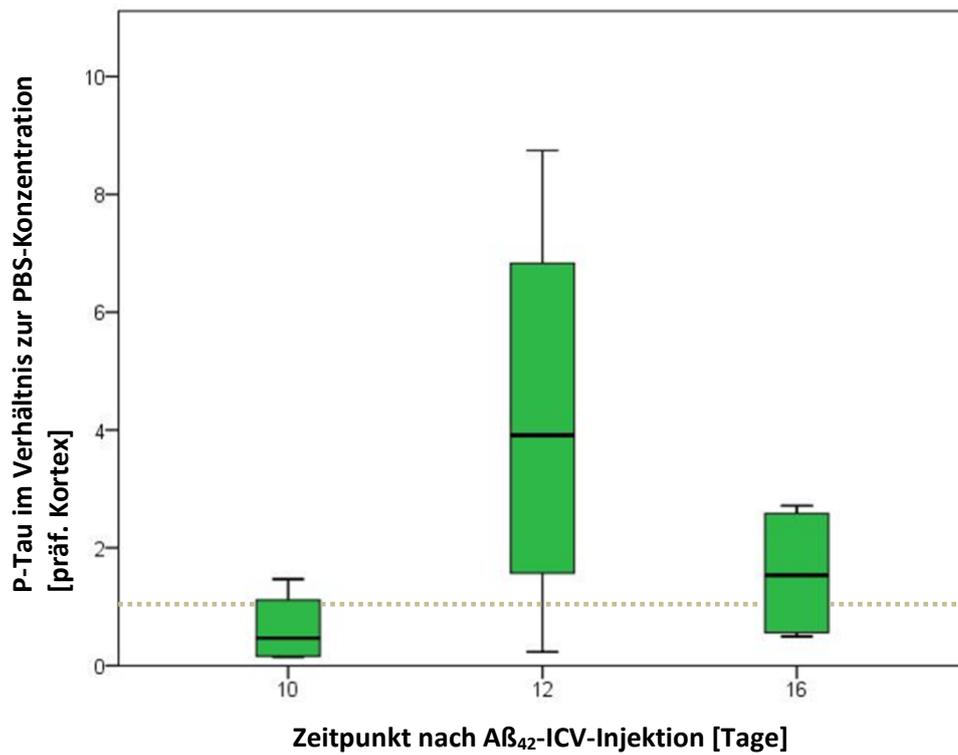
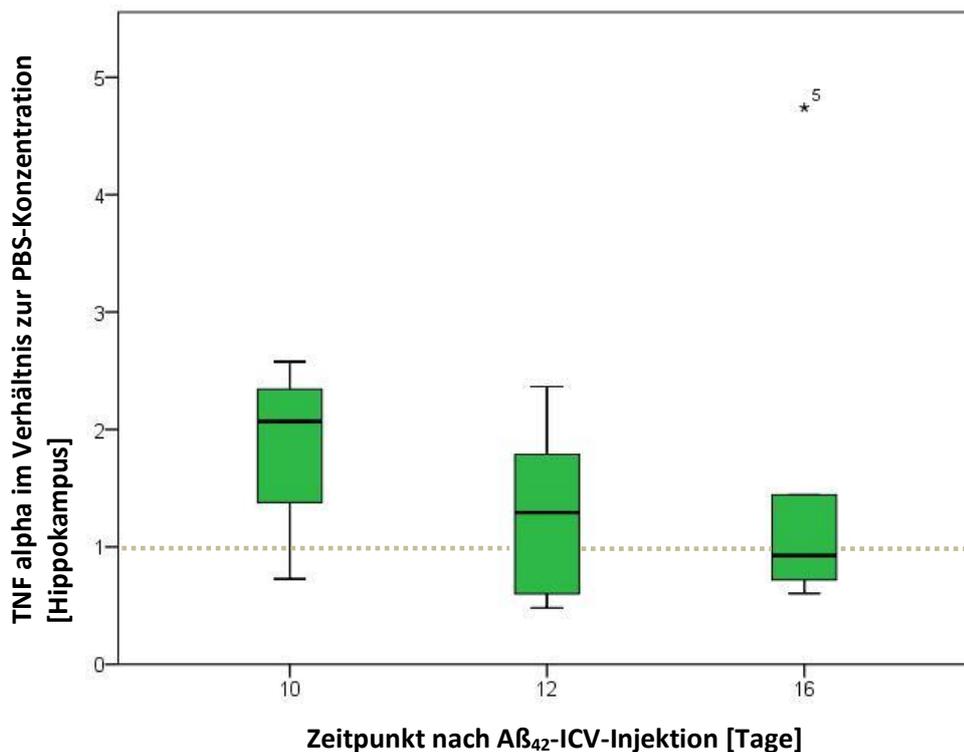
A**B**

Abbildung 35: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von P-Tau im Hippokampus (A) und im MPFK (B) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten im Verhältnis zur quantitativen PBS-Konzentration mit festgelegtem Standard = 1.0

A: Ein Vergleich der mittleren Ränge zeigte, dass die Gruppen eine unterschiedliche zentrale Tendenz aufweisen könnten. Die weitere Berechnung zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Untersuchungszeitpunkten (Chi-Quadrat(2) = 3.941, $p = 0.139$). Im WRS wurden ebenfalls die Proteinkonzentrationen von P-Tau im Hippokampus berechnet. Hier zeigten sich keine Signifikanz der Konzentrationen zwischen den Untersuchungszeitpunkten (d10 : d12 $p = 0.126$, d10 : d16 $p = 0.180$, d12 : d16 $p = 0.329$).

B: Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Tendenz (Kruskal-Wallis Test) der Untersuchungszeitpunkte (Chi-Quadrat(2) = 3.846, $p = 0.146$). Auch Post hoc im WRS lagen kein signifikanter Unterschied in der Proteinkonzentration von P-Tau nach A β ₄₂-Injektion im MPFK zwischen Tag 10, 12 und 16 (d10 : d12 $p = 0.114$, d10 : d16 $p = 0.342$, d12 : d16 $p = 0.343$) vor.

A



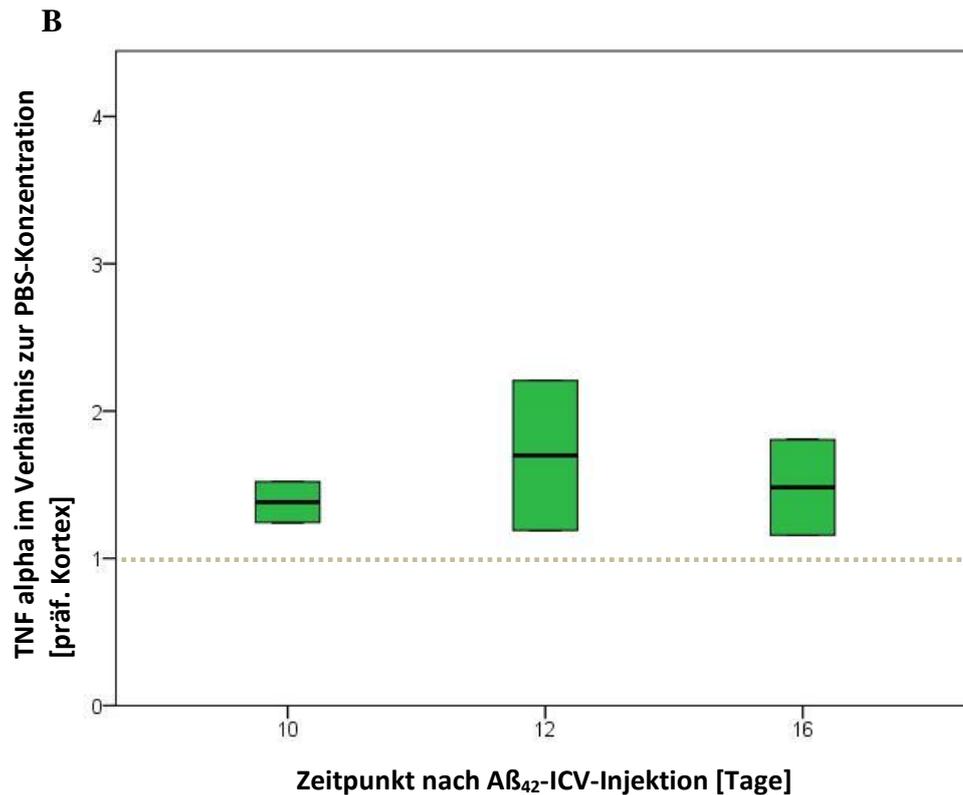


Abbildung 36: Graphische Darstellung der Proteinkonzentration von TNF α im Hippokampus (A) und im MPFK (B) zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten im Verhältnis zur quantitativen PBS-Konzentration mit festgelegtem Standard = 1.0

A: Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der zentralen Tendenzen der TNF α Proteinkonzentration (Chi-Quadrat(2) = 1.783, $p = 0.410$). Der WRS zeigte keine Signifikanz der Konzentrationen zwischen den Untersuchungszeitpunkten Tag 10, 12 und 16 nach A β_{42} -Injektion im Hippokampus (d10 : d12 $p = 0.257$, d10 : d16 $p = 0.352$, d12 : d16 $p = 0.937$). * 5 stellt einen extremen Ausreißer dar.

B: Die Proteinkonzentration von TNF α nach A β_{42} -Injektion an den Tagen 10, 12 und im MPFK war aufgrund der geringen Probenanzahlen (Tag 10 $n = 2$, Tag 12 $n = 2$ und Tag 16 $n = 2$) statistisch nicht auswertbar.

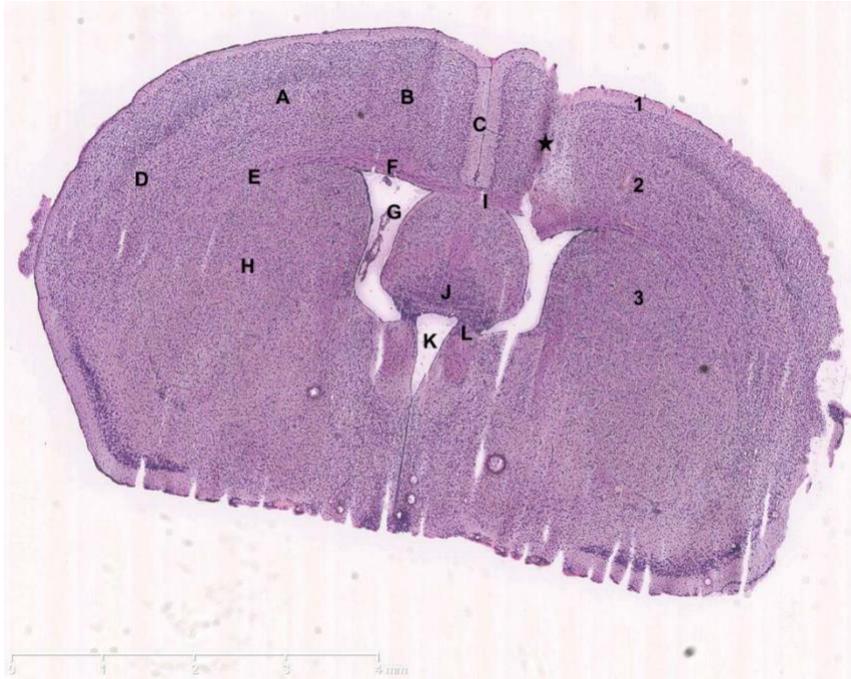
3.2.2. Messung der A β_{1-42} -Konzentration mittels ELISA

In den Hirnarealen der Mäuse an den Tagen 8 (letzter Tag von Gruppe 1/A β_{42}), 10 (letzter Tag von Gruppe 2/A β_{42}), 12 (letzter Tag von Gruppe 4/A β_{42}), und 16 (letzter Tag von Gruppe 8/A β_{42}) nach A β_{42} -Injektion konnten trotz des sensitiven Human-A β_{42} -ELISA-Kits mit einer Empfindlichkeit von 1.0 pmol / l keine menschlichen A β_{1-42} -Monomere nachgewiesen werden.

3.3. Postanalytische Probenbehandlung

3.3.1. Kontrolle der Implantat Tiefe mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung

A



B

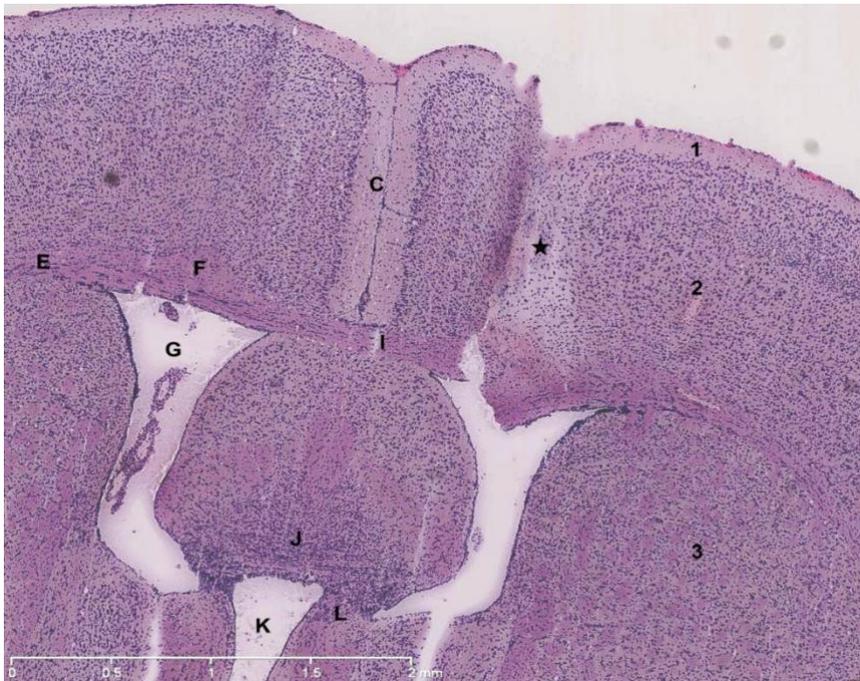


Abbildung 37: Beispiele für Hämatoxylin-Eosin (HE)- gefärbte 7 μm starke histologische Schnitte der Kontrolltiere (Mäuse, die nach 7 Tagen Akklimatisierungsphase nach dem Standardprotokoll

eine Führungskanüle implantiert bekommen) aus dem relevanten Hirn-bereich

★ : Kanal der Führungskanüle

1: Kortex cerebri (Hirnrinde, graue Substanz)

E: Kapsula externa

2: Substantia alba (weiße Substanz bestehend aus Axonen und Neuronen)

F: Cingulum

G: lateraler Ventrikel

3: Basalganglien (Striatum + Globus pallidus)

H: Striatum

A: primär somatosensorischer Kortex

I: Korpus callosum (Balken)

B: motorischer Kortex

J: triangulare Septumkerne

C: Fissura longitudinalis cerebri

K: dorsaler 3. Ventrikel

D: sekundär somatosensorischer Kortex

L: Fornix cerebri

37A: Komplett perforierter Bereich im Großhirn, vom Kortex cerebri über die Substantia alba bis in den lateralen Ventrikel reichend.

37B: Vergrößerter Ausschnitt von Abbildung 37a. Breite komplette Perforation über den Kortex cerebri, die Substantia alba bis in den lateralen Ventrikel des Großhirns reichend, die Führungskanüle lag bis in den Ventrikel.

Bei allen 6 verwendeten Kontrolltieren zur histologischen Untersuchung des genauen Sitzes der implantierten Führungskanüle im Ventrikel konnte dies mit einer ausreichenden Eindringtiefe bis in den lateralen Ventrikel histologisch dokumentiert werden.

3.3.2. Färbung mittels Methoxy-X04-Lösung

In den Hirnarealen der Mäuse an den Tagen 8, 10, 12 und 16 konnten mit dem ELISA-Test keine menschlichen A β ₁₋₄₂-Monomere nachgewiesen werden. Die Methoxy-04-Färbung für A β ₄₂ ließ keine Schlussfolgerung auf eine Plaque-Bildung im Hippokampus oder in einem anderen Hirnbereich zu.

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Präanalytische Probenbehandlung

Durch eine Toluidinblau-Färbung konnte der korrekte Sitz der Führungskanüle im Ventrikel bei 3 Kontrolltieren bestätigt werden. Die entnommene Menge *Liquor cerebrospinalis* konnte aufgrund unzureichender Ausbeute und Qualität nicht analysiert werden.

2. Analytik der A β ₁₋₄₂-Konzentration, Apoptose und Inflammation

Bei der A β ₄₂-Monomere-Konzentrationsmessung mittels ELISA konnte keine Monomere detektieren. Das WB-Verfahren zum Nachweis von Apoptose und Inflammation zwei signifikante Unterschiede in den Hirnarealen der A β ₄₂-Mäuse im Vergleich zu den PBS-Tieren. Einen Unterschied in der Hippokampus-

Proteinkonzentration von Tau am Tag 12 zu Tag 16 ($p = 0.041$). Und der Caspase 3-Spiegel war im Vergleich zur PBS-Gruppe am Tag 10 (Ende mHBT 2A β_{42} -Gruppe) nach A β_{42} -Injektion bei den behandelten Tieren verglichen mit dem Tag 16 (Ende mHBT 8A β_{42} -Gruppe) erhöht ($p = 0.004$, siehe Abbildung 33A). Alle anderen Konzentrationen von Tau, P-Tau sowie der Tumornekrosefaktor Alpha(TNF α) zwischen den Versuchsgruppen waren ohne Signifikanz. Histologische Untersuchung Mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung konnte der exakte Sitz der implantierten Führungskanüle bis in den lateralen Ventrikel bei allen 6 Kontrolltieren dokumentiert werden. Die Methoxy04-Färbung für A β_{42} ließ keine Schlussfolgerung auf eine Plaque-Bildung im Hippokampus oder in einem anderen Hirnbereich zu.

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt unterschiedlicher Verhaltenstestzeitpunkte nach intrazerebroventrikulärer Injektion von Amyloid-Beta auf Kognitions- sowie Verhaltensparameter und motorische Fähigkeiten im Maus-Modell des frühen *Morbus Alzheimer* untersucht. Mäuse zeigten je nach Gruppenzugehörigkeit 1, 2, 4 oder 8 Tage nach A β ₄₂-Injektion schlechtere Gedächtnisleistungen als Tiere mit ICV-PBS-Injektion oder native Mäuse. Im Folgenden werden zunächst ein Überblick über die aktuellen Modelle von Morbus Alzheimer gegeben. Dann die angewandten Methoden im Kontext bisheriger Forschungsarbeiten diskutiert, bevor im 3. Kapitel auf die gefundenen Verhaltens- und Kognitionsmuster eingegangen wird. Dem folgt abschließend eine Gesamtdiskussion im weiteren wissenschaftlichen Kontext unter Einbezug aller erhaltenen Ergebnisse.

1. Überblick über aktuelle Modelle von Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer ist nach wie vor weltweit die am weitesten verbreitetste neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Ursache für Demenz. Fakt ist, dass fortgeschrittene Alter in Kombination mit der sich ändernden Bevölkerungsstruktur, stellt das häufigste Erkrankungsrisiko dar. Dies ist ein enormes Problem für die öffentliche Gesundheit. Es werden Medikamente benötigt, die den Ausbruch der Krankheit verhindern, ihr Fortschreiten verlangsamen oder die kognitiven und Verhaltenssymptome verbessern. Jedoch haben jahrzehntelange Forschungen keine kausale Therapie oder eine wirksame Heilung aufzeigen können. Denn die häufigsten Fälle von MA treten sporadisch auf und verlaufen kaskadenartig. Sie stellt eine multifaktorielle, genetisch und ökologisch äußerst komplexe Art von Erkrankung mit umfangreichen Neurodegenerationsprozessen dar. Die zwei am besten erforschten Hauptläsionen bei MA sind die extrazellulären senilen Plaques und intrazellulär liegende neurofibrilläre Bündel (engl. neurofibrillary tangles, NFTs). Trotz starker Bemühungen auf allen Forschungsfeldern fehlt immer noch ein grundlegendes Verständnis der Ursachen von MA und wie die Neurotoxizität von A β und Tau zur Entwicklung der Pathophysiologie von MA führt. Neben diesen beiden Pathologien, tragen cerebrale Amyloid-Angiopathien, frühe neuritische Dystrophie und Degeneration der Synapsen, Neurotransmitterstörungen (siehe II Literaturübersicht 2.3. A β und Kognition), Stoffwechselstörungen und Gliose, bis hin zu einer Neuroinflammation mit offensichtlichen Verlust von Neuronen zur MA-Pathogenese bei

(CUMMINGS et al., 2023; FISAR et al., 2024). Als Folge dieses späten Stadiums atrophieren die betroffenen Hirnregionen zunehmend. Da der chronische, fortschreitende Verlauf über mehrere Jahre dauern kann, konzentrieren sich die aktuellen Studienschwerpunkte auf notwendige Fortschritte vor allem bei der Entwicklung von Biomarkern die für die Diagnostik der Erkrankung in frühen Stadien entscheidend sind. Denn hier ist die erfolgreiche Intervention wahrscheinlich am effektivsten. Zusätzlich wächst das Wissen über die MA-Pathophysiologie und neue Wege werden beschritten. Weg von den ersten Forschungsgebieten ausgerichtet auf die beiden wichtigsten pathologischen Merkmalen A β -Peptid und Tau-Protein. Nach CUMMINGS et al. untersuchten 2023 70% der ausgewerteten Studien Nicht-A β - und Nicht-Tau-Ziele mit neuartigen Wirkstoffen. Am häufigsten davon Wirkstoffe gegen Entzündung und synaptischer Dysfunktion in der Entwicklung. Dazu hier ein kurzer Überblick über den aktuellen Stand der Forschung/Modelle:

a) Amyloid-Beta (A β)-Peptid, Proteine und Neuroprotektion

A β_{42} stört die neuronale Ca²⁺-Signalübertragung, das glutamaterge System und hebt die Induktion von Langzeitpotenzierung auf. Viele Enzyme und Gene und ihre jeweiligen Rezeptoren, die an der Produktion und Clearance von A β und Tau beteiligt sind, wurden eingehend als potenzielle therapeutische MA-Ziele untersucht (YIANNOPOULOU et al., 2019). Es gibt einen direkteren kausalen Zusammenhang zwischen der A β -Produktion und der Krankheitsentwicklung für die familiäre Form von MA (durch ursächliche Mutationen in APP, Presenilin 1 und - 2) (BOEDDRICH et al., 2023). Und dennoch, dass ursprüngliche Paradigma: die Bildung großer A β -Aggregate als Kennzeichen und Hauptursache bei MA für synaptische Dysfunktion und Neurodegeneration wird nach und nach verworfen. Denn die Linearität der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ bleibt umstritten. Zusätzlich wird die Skepsis an der These durch diverse Ergebnisse verstärkt: bestehende Amyloid-Plaques bei nicht dementen Personen, kaum noch neue und v.a. wirksame Medikamentenzulassungen zur Behandlung von MA durch die FDA (US Food and Drug Administration) seit 2003, dass Versagen von Anti-Plaques-Immuntherapien und nicht zuletzt durch die Entdeckung von A β -Oligomeren und deren Korrelation mit Symptomen (YIANNOPOULOU et al., 2019; DI SCALA, et al., 2022).

Es wird vermutet, dass neben der langen, bekannten synaptotoxischen Wirkungen von A β -Oligomeren, vor allem die membranassoziierte Oligomere Exzitotoxizität und damit neuronalen Verlust induzieren wird. Membraneingefügte Oligomere bilden Ca²⁺-

durchlässige Amyloid Poren. Ca^{2+} -Ionen lösen tatsächlich ein nachgeschaltetes Ereignissen mit Kaskadeneffekt aus: u.a. oxidativer Stress, Tau-Hyperphosphorylierung, synaptische Dysfunktion, Störung der Plastizität und schließlich Zelltod (DI SCALA, et al., 2022). Hier erhofft man sich eine zusätzliche Strategie beim Kampf gegen MA, aufbauend auf die vielversprechend Daten zum therapeutischen Potenzial neuer Proteine wie AmyP53 und MRZ-99030. Diese kleinen Moleküle können die A β -Aggregation unterdrücken, die Oligomer Stabilität verringern oder die nichttoxische Oligomerisierung außerhalb des Signalwegs fördern. Das kurze Peptid AmyP53 bspw. zielt auf Ganglioside ab, die als Plasmamembranrezeptoren von Amyloid Proteinen dienen und verhindert so die Bildung von Amyloid Poren. Und MRZ-99030 wurde kürzlich als Dipeptid identifiziert, welches die nicht amyloidogene, amorphe A β -Aggregat-Bildung fördert und dadurch weniger an intermediär toxischen, löslichen, oligomeren A β -Spezies entstehen lässt (PARSONS et al., 2015). Der Hauptvorteilen solcher therapeutischer Peptide ist die fehlende Anreicherung im Gewebe, die hohe Spezifität und die geringe Toxizität (Umwandlung in natürliche Aminosäure-komponenten) (DI SCALA, et al., 2022).

Ein weiterer Schutz des Gehirns, jedoch nicht an einzelnen Stoffen, Enzymen oder Faktoren messbar, ist die kognitive Reserve. Sie postuliert, wie u.a. von PETTIGREW et al. 2019 beschrieben, dass Personen mit Lebenserfahrung (höherem Bildungs- und Berufsniveau, allgemeine kognitive Fähigkeiten oder Intelligenz sowie die Teilnahme an mental, sozial und körperlich anregend Aktivitäten) in Kombination/Interaktion mit genetischen Faktoren (die die Effizienz, Kapazität oder Flexibilität von Gehirnnetzwerken beeinflussen) weniger anfällig für eine Ausbildung von Demenz sind. Denn durch diese Art von „Reserve“, die solche Menschen besitzen, müssen mehr Neuronen und deren Verbindungen beschädigt plus Wissen gelöscht werden, bevor sie Symptome entwickeln. Sie können im gewissen Grad, mehr als andere, altersbedingte und/oder pathologische Veränderungen des Gehirns tolerieren und indes ihre kognitiven Funktion erhalten.

b) Aberrant aktivierte Mikroglia

Im Gehirn gibt es verschieden Typen von Gliazellen. Diese sogenannten Mikrogliazellen bilden das Verteidigungs- und Immunsystem des Gehirns (BACHILLER et al., 2018). Daher identifiziert man sie als wichtige potenzielle therapeutische Ziele. In einem gesunden Gehirn beseitigen sie die lösliche A β -Peptide und kleine Mengen an A β . Mikroglia empfangen Signale von Blutgefäße, Astrozyten,

Neuronen und sezernieren neuroprotektive Faktoren. Sie exprimieren mehrere Rezeptoren für Neurotransmitter und Neuropeptide, wodurch es ihnen möglich ist, die neuronale Aktivität zu überwachen (VIDAL-ITRIAGO et al., 2022). Nimmt die relative Häufigkeit der Zellen mit steigendem Alter zu, weisen alternde Mikroglia allerdings Anzeichen einer Dystrophie auf. Ebenfalls nimmt die Fähigkeit ab, das Gehirn zu überwachen und auf Schäden zu reagieren (VIDAL-ITRIAGO et al., 2022). Wird das Gehirn verletzt oder es kommt zu einer Entzündung, gehen die Mikroglia in eine amöboide Morphologie über, ein hochaktiver Zustand (GRAEBER MB, 2010). Studien ergaben, dass Mikrogliazellen dann eine Reihe von MA-Risikogenen bevorzugt präsentieren, die an verschiedenen biologischen Funktionen beteiligt sind (SALA et al., 2019; MCQUADE et al., 2019). Darunter Phagozytose, Zytokin Freisetzung, synaptisches Beschneiden und Einflussnahme auf die Stärke und Plastizität der Synapse (ZANG et al, 2023).

Galten Reaktive Gliose und neurale Entzündung in der Vergangenheit als sekundäre Ereignisse, ist nun klar, dass sie eine wichtige zellautonome Rolle bei der Erkrankung spielen. Immunhistochemische Analysen haben gezeigt, dass sich Mikroglia (sogenannte krankheitsassoziierte Mikroglia (DAM, engl.: disease-associated microglia)) um Amyloid-Plaques in Modellen von MA begeben (KEREN-SHAUL et al., 2017). Und sich entweder positiv oder negativ auf das Fortschreiten der Krankheit auswirken können (VIDAL-ITRIAGO et al., 2022). So konnte eine Reihe von genetischen Studien zeigen, dass viele Genen, die mit dem Risiko einer frühen MA-Erkrankung in Verbindung gebracht werden, hauptsächlich von DAMs exprimiert werden (Apolipoprotein E (ApoE), Transmembranrezeptor (TREM2, engl. triggering receptor expressed on myeloid cells 2) und CD33) (KOMURO et al., 2023). Das Expressieren von ApoE ist ein wichtiger Effekt bei der Verstärkung der Phagozytose von A β -Aggregaten durch Mikroglia bei gleichzeitiger Abschwächung ihrer Entzündungsreaktionen und die Neurotoxizität von A β und Tau. TREM2 führt über mehrerer Reaktionswege zu einer deutlich geringeren Ansammlung von Mikroglia um A β -Plaques, womit die mikroglialen Barrieren geschwächt wird. Und bei CD33 ebenfalls bekannt als Siglec-3, korreliert seine Expression mit der Plaque Belastung, den unlöslichen A β ₄₂-Spiegeln und hemmte die Aufnahme und Clearance von A β ₄₂ in Mikroglia-Zellkulturen (GRICIUC et al., 2013; KRASEMANN ET AL., 2017).

c) Biomarker

Die meisten genannten und validierten biochemischen Biomarker von MA (siehe II. Literaturübersicht 1.2. Diagnostik), können bei der Krankheitsabklärung im CSF nachgewiesen werden. Die Blut-Hirn-Schranke erschwert jedoch die Etablierung körperflüssigkeitsbasierter Methoden erheblich. Zudem ist die mit P-Tau-Oligomeren und der NFTs verbundene Neurotoxizität ein Zeichen des fortschreitenden/späten MA. Die chronische Krankheit beginnt jedoch mit einer langen präklinischen Phase (ca. 20 Jahre). Gefolgt von einer durchschnittlichen klinischen Dauer von 8 - 10 Jahren (BATEMAN et al., 2012). Erst hier können die klinischen Symptomen meistens, mit altersbedingten mitochondrialen Dysfunktion und der Neurotoxizität von A β -Oligomeren, erkannt werden. Daher nimmt man einen hypothetischen Zeitverlauf von Biomarker- und pathologischen Veränderungen bei MA an. Auf dieser Grundlage werden weltweit große Forschungsanstrengungen unternommen, um proteomische und metabolische Marker, neuroimaging Biomarker, sowie Biomarker mitochondriale Dysfunktion, oxidativen Stress und Neuroinflammation zu finden und zu untersuchen (FISAR et al., 2024). Das Ziel: der Ausbruch der Krankheit muss besser vorherzusagen und der Krankheitsverlauf soll genauer zu überwachen sein.

Bspw. diskutiert SONG et al. (2022) die hochregulierte Asparaginyl-Endopeptidase (AEP) in Live-Gehirnbildgebung als ein aufstrebendes Medikamentenziel für Krankheitsmodifikationen. Die neuesten Fortschritte in AEP-bezogenen Neurodegenerationsstudien zeigen, dass diese durch Alter und andere Belastungen des Gehirnes überaktivieren und hochregulieren werden können. Diese Reaktion fördert MA infolge ihrer Verstärkung von Amyloidose und Tau-Hyperphosphorylierung, welche in Synaptotoxizität, Neurodegeneration und kognitiven Beeinträchtigungen gipfelt. Somit stellen sie wahrscheinlich einen potenzielle Biomarker für die Vorhersage präklinischem MA dar.

Ähnlich bei BOEDDRICH et al. (2023). Hier konnten mit modernsten Methoden der Massenspektrometrie proteomische Veränderungen umfassend erkannt und relevante Erkenntnisse im Bereich der intrinsisch ungeordneten Proteine (engl. intrinsically disordered proteins, IDPs) geliefert werden. Sie stellten eine positive Korrelation fest: zwischen der Anreicherung von extrazellulärer A β -Plaques im Hippocampus und der Akkumulation und Anreicherung der kleinen GTPase Arl8b (engl. ADP-ribosylation factor-like protein 8B) als auch lysosomaler Proteine in der Plaque Umgebung. Arl8b ist mit den Lysosomen verbunden und vermittelt den axonalen Transport, als auch von synaptischen Vesikeln in Neuronen (DE PACE et al., 2020). Jüngste Untersuchungen

lassen vermuten, dass die Überexpression von Arl8b die A β -Aggregation und Neurotoxizität erheblich verringert (RONEY et al., 2021). Diese Schutzfunktion könnte den Lysosomen Transport retten und dadurch den axonalen autophagischen Stress und den Neuronentod reduzieren (BOEDDRICH et al., 2023). Arl8b könnte somit die Messung der fortschreitenden Lysosomen Akkumulation bei MA-Patienten ermöglichen und als Biomarker Kandidat von klinischem Nutzen sein und neuen Angriffspunkt für Therapien aufzeigen.

2. Diskussion der Methoden

Ein Studiendesign für experimentelle Forschungen gilt als Goldstandard, wenn aufgrund seiner Eigenschaften der Effekt der Selbstsuggestion unterbunden und der Versuchsleiter-Artefakt kontrolliert wird. Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurden die Studientiere randomisiert auf die drei Versuchsgruppen verteilt, um die Repräsentativität und Vergleichbarkeit der Stichproben zu erhöhen. Es war aus praktischen-logistischen Gründen der Studiendurchführung leider nicht möglich, die Versuche doppelt verblindet durchzuführen. Somit liegt eine „einfach verblindete“, randomisierte kontrollierte Studie vor.

2.1. Tiermodell Maus und ICV-A β ₁₋₄₂-Modell

2.1.1. C57BL/6N als Tiermodell

Nagetiere und die entsprechenden TM zählen zu den bevorzugten Spezies, um Ursachen und Mechanismen menschlicher Gedächtnisstörungen zu evaluieren (SQUIRE, 1992). Vor allem transgene Modelle leisten einen starken Beitrag zu vielen Forschungsgebieten, indem sie standardisierte TM darstellen, mit denen Forscher unabhängige weltweit reproduzierbare, experimentelle Ergebnisse nach derselben Methode erhalten können (SILVER, 1995). Die Maus selbst ist ein hervorragendes Modell zur Findung von humanen Krankheitsursachen und lässt sich ideal für diverse Forschungszwecke einsetzen. Denn Mäuse als kleinstes multipaares Säugetier vereinen u.a. die Vorteile einer hohen Reproduktionsrate mit kurzer Aufzuchtphase und früher Geschlechtsreife. Zudem aufgrund ihrer Größe eine relativ kostengünstige Haltung mit geringem Platzbedarf und der Möglichkeit der vergleichsweise einfachen genetischen Veränderung (GV-SOLAS, 2014). Bei kognitiven Funktionen, die dem Hippokampus zugeteilt werden, entwickelte sich eine evolutionäre Kontinuität, so dass grundlegende Lern- und Gedächtnisprozesse im Laufe der Evolution konserviert wurden. So können einfache menschliche Gedächtnis- und Lernleistungen durchaus mit Hilfe von TM beschrieben werden (KESNER und GOODRICH-HUNSAKER, 2010).

Nach der vollständigen Sequenzierung und Analyse von Mausstämmen (WATERSTON et al., 2002) wurde die Maus das mit Abstand am häufigsten auserwählte TM für wissenschaftliche Zwecke. So sind erst durch die Nutzung von (transgenen) Mausmodellen die Entwicklung und die präklinische Überprüfung von Therapiekonzepten, wie der aktiven oder passiven A β -Immunsierung, möglich geworden (ELDER et al., 2010). Speziell C57BL/6-Mäuse sind ein bekannter Inzucht-Mausstamm, der

ursprünglich für die Untersuchung von Antitumoraktivität und Immunologie 1948 vom Jackson Laboratory (JAX, Bar Harbor; Maine, USA) entwickelt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde sich für diesen Stamm entschieden, da verschiedenste Einrichtungen mit ihm die meiste Erfahrung hinsichtlich der Langzeitpotenzierung bzw. bei Verhaltensuntersuchungen haben und damit die beste Charakterisierung dieses Stammes besteht. Es stellt ein etabliertes Modell für dieses Studiendesign dar (GORDAN et al., 2012; ECKEL et al., 2013). Zudem wurden nur männliche Tiere verwendet, da zunächst der Einfluss von zyklusbedingten Hormonschwankungen ausgeschlossen werden sollte. Diese würden bei weiblichen Tieren in dem von uns verwendeten Alter (elf Wochen nach Geburt) auftreten. Die Tiere wurden mit 10 Wochen bestellt und nach 1 Woche Eingewöhnung verwendet. Somit waren sie im geschlechtsreifen, adulten Alter.

2.1.2. ICV-A β ₁₋₄₂-Modell

Die intrazerebroventrikuläre (engl. intracerebroventricular, ICV) Injektion von A β -Peptid in Mäuse ermöglicht die Untersuchung akuter Auswirkungen auf die Zellpathologie und kognitive Veränderungen. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den zeitlichen Verlauf von A β ₄₂-induzierten kognitiven Defiziten weiter zu charakterisieren und mögliche neurodegenerative Effekte zu erkennen. Die dazu sonst üblichen verwendeten transgenen Mausmodelle basieren auf der Überexpression humaner APP Transgene und zeigen verschiedene spezifische Aspekte der Neuropathologie sowie der Gedächtnis- und Verhaltensbeeinträchtigungen von MA. Das am häufigsten genutzte transgene Mausmodell bei MA ist das Modell Tg(HuAPP695. K670N-M671L) 2576. Nach ca. acht Monaten sind im Tg2576-Modell die ersten vereinzelt Plaques im Gehirn zu sehen, deren Anzahl aber erst mit zwölf Monaten rapide ansteigt (CALLAHAN et al., 2001; KAWARABAYASHI et al., 2001). Somit ergibt sich eine sehr lange Wartezeit, bis die benötigten Tiere die entsprechende Symptomatik zeigen und einsatzbereit sind. Bisherige Mausmodelle eignen sich jedoch nur bedingt, da es oft nur einen sehr schwachen qualitativen Trend zwischen quantifizierten A β -Spiegeln und experimentellen Messungen der kognitiven Funktion gibt. Hinzu kommt ein nicht unerheblicher Aufwand in der Zucht zur Generierung der benötigten Tieranzahl. Da die Quote der Träger des Transgen (sog. Carrier) unter 50 % liegt (46.8 % bei Männchen, 48.7 % bei Weibchen). Ebenfalls negativ wirkt sich die hohe Mortalitätsrate aus: 25.4 % der weiblichen und 48.4 % der männlichen Carrier versterben, bevor die Tiere das geplante Versuchsalter erreichen (FENDL, 2013). Daher

wendeten wir synthetisch hergestelltes A β O und das Verfahren der ICV-Injektion an. Denn die Oligomere aus Hirnen von MA-Patienten und synthetischer Herstellung sind strukturell gleich (GONG et al., 2003). Sie stören nach Injektion die synaptische Funktion durch Hemmung der Langzeitpotenzierung (CLEARY et al., 2005) und verursachen nachgewiesenermaßen Lern- und Gedächtnisstörungen bei Nagetieren (BILLINGS et al., 2005; HOLSCHEER et al., 2007). Die Injektionslösung war pH neutral, isoton und isotherm, sodass wir davon ausgehen konnten, dass durch die Injektion selbst keine weitere Belastung für die Tiere entstanden ist.

Es wurde bewusst A β ₄₂ ausgewählt, da auch aktuelle Studien wie LI et al. (2018) den längeren A β -Formen wie A β ₄₂ - A β ₄₆ eine viel höhere Synaptotoxizität als den kürzeren Formen von A β (A β ₃₇ - A β ₃₉), einschließlich Prä-A β -APP-Fragmenten und N-terminal verlängerten A β s zuschreiben. In experimentellen und klinischen Studien wurde bewiesen, dass der akute Anstieg des A β -Spiegels im Gehirn zu Zelldegeneration und -verlust führt, die Immunreaktivität von P-Tau erhöht und Entzündungshemmung verursacht, während die endogene Produktion von weiterem A β ₁₋₄₂ gefördert wird (HOLSCHEER et al., 2007; VODERHOLZER und HOHAGEN, 2017). Somit spielt A β eine entscheidende Rolle, da es verschiedene pathologische und Verhaltensmerkmale von MA-Patienten imitiert (CORACI et al., 2002). Daneben gibt es diverse Peptidspezies, die sich in Länge, biologischer Aktivität, Löslichkeit, Toxizität und Aggregationsneigung unterscheiden, aber A β ₁₋₄₂ ist die häufigste Form von Amyloid Peptiden, die in Gehirn-Plaques von MA-Patienten und Gefäßablagerungen gefunden wurde (FABBRO et al., 2011). Eine mögliche Optimierungsquelle für Folgestudien ist die hier genutzte zeitnahe Verwendung (zwischen 15 und 45 min) nach der Herstellung der frisch angesetzten A β ₄₂-Lösung. Diese wurde vorher mit PBS versetzt, um das Oligomerisierungsverfahren zu starten. Einige Untersuchungen konnten nachweisen, dass eine vier- bis siebentägige Inkubation bei 37°C die mit Toxizität verbundene Peptid Assemblierung erhöht und dadurch eine Störung des Erinnerungsvermögens deutlich erleichtert (DELOBETTE et al., 1997; RUSSO et al., 2012; ZUSSY et al., 2013). Denn durch diese Vorbehandlung, enthält die Lösung dann sowohl Fibrillen artige Strukturen als auch Oligomere unterschiedlicher Größe. Zusammenfassend bieten sich folgenden Vorteilen bei Nutzung des hier gewählten Modells an:

- das verwendete Tiermodell mit Injektion ist gut etabliert (ZARE et al., 2015; SCHMID et al., 2017),
- es zeigt verlässliche Symptome (KIM et al., 2016),

- mit einer schnelleren Plaquebildung als andere Modelle (MORRONI et al., 2016),
- es entfallen im Gegensatz zum Tg 2576-Modell Zeit- und Kostenaufwand für die Zucht der transgenen Tiere.

Daher stellte das gewählte Tiermodell den passenden Ansatz für die untersuchte Fragestellung dar.

Der zweite große Punkt, der beachtet werden muss, ist der Zeitpunkt der Injektion, bzw. der Zeitraum bis zum Beginn des Verhaltenstests, um einen Zusammenhang zwischen einer ICV-A β ₄₂-Injektion und Veränderungen in Kognition und Verhalten optimal darstellen zu können. Auch hier nutzen frühere Studien uneinheitlich eine Bandbreite von gewählten Zeitpunkten, wobei die meisten sich dem Zeitraum unmittelbar nach der Injektion widmeten (2 bis 30 Stunden) (BALDUCCI et al., 2010; DINELEY et al., 2010; BALDUCCI et al., 2017). Einigkeit besteht allerdings darin, dass die Versuchstiere unmittelbar nach A β -Injektion eine Beeinträchtigung des Erkennungsgedächtnisses zeigen und die A β O-vermittelte Gedächtnisstörung reversibel ist (GUTIÉRREZ-LERMA et al., 2013). Bei BALDUCCI et al. (2010) hatte sich diese zehn Tage nach der Verabreichung von A β wieder erholt. HOLSCHER et al. (2007) wiederum stellte an den Tagen zwölf bis zwanzig nach Injektion eine signifikante Beeinträchtigung des Arbeits- und Langzeitgedächtnisses fest, jedoch nicht an den Tagen 3 bis 11 oder 20 bis 28 nach Injektion. Diese divergierenden Befunde früherer Studien stellten die Grundlage der vorliegenden Arbeit dar: Wir widmeten uns der Frage, ob und ab wann es bei dem ICV-A β ₄₂-Modell einen optimalen Untersuchungszeitpunkt gibt. Folgende Kriterien sind an diesen Zeitpunkt zu stellen: Einerseits sollte er möglichst zeitnah sein, aber andererseits dem Tier die nötige Regeneration und A β die Zeit zur Entfaltung des Wirkungsmechanismus bieten. Daher starteten wir direkt ein Tagen nach Injektion und untersuchten bis 16 Tage danach (8 Tage Wartezeit + 8 Tage mHBT).

2.2. Haltung und chirurgisches Verfahren

Im Allgemeinen wird eine Gruppenhaltung für soziale Säugetierarten wie Mäuse und Ratten empfohlen, um ihr Wohlbefinden zu steigern und nachteilige Auswirkungen durch die soziale Isolation zu vermeiden (RICHTLINIE 2010/63/EU, 2010). Dennoch ist in bestimmten Studiendesigns, wie bei unserem, eine Einzelhaltung notwendig, um individuelle Ergebnisse zu erzielen und potenziell verfälschende Effekte durch Partnertiere auszuschließen. So zeigen männliche Mäuse bspw. verstärkt ein Dominanzverhalten zur Herstellung einer Hierarchie (MONDRAGON et al., 1987). Dabei kommt es, im Gegensatz zu einzeln gehaltenen Kontrolltieren, in Gruppenhaltung zu einer

Erhöhung des angst- und depressionsähnlichen Verhaltens sowie Reduzierung der Risiko- und Explorationsbereitschaft (SINGEWALD et al., 2009). In unserer Studie war diese Haltungsform erforderlich, da die Tiere nach der erfolgreichen Implantation der Kopfkanüle aufgrund des höheren Verletzungsrisikos bei Gruppen ohnehin einzeln gehalten werden müssen. Um den zur OP zusätzlich entstehenden Stress einer dann für die Tiere *postoperativen* ungewohnten Einzelhaltung zu reduzieren, wurden alle Tiere mit Ankunft einzeln gesetzt. Da es sich aber um eine konventionelle, also eine Haltung in offenen Käfigen handelte, hatten die Tiere zu ihren Artgenossen stets akustisch, olfaktorisch und visuellen Kontakt. So konnten sie einen großen Teil der sozialen Kommunikation ausüben. Desweiterem zeigten mehrere Studien, dass eine Einzelhaltung die Stressmarker bei Mäusen im Vergleich zur Gruppenhaltung nicht erhöht (ARNDT et al., 2009; KAMAKURA et al., 2016).

Zur Steigerung des Wohlbefindens der Tiere und aus tierschutzrechtlichen Gründen sind die Käfige mit Enrichment angereichert gewesen, welches bei allen Tieren gleich und standardisiert war. Die dadurch eventuell entstandenen Varianzerhöhungen müssen in Relation zur Art der wissenschaftlichen Fragestellung gesehen werden und setzten vermutlich, wenn dann nur die physiologische *Homogenität* der Versuchstiere in den Gruppen herab (LEWEJOHANN et al., 2006). Auch der Zeitpunkt der Versuche wurde zur Erreichung idealer Ergebnisse dem natürlichen Verhalten und den Bedürfnissen der Mäuse angepasst. Folglich ergab sich ein Zeitfenster für die Durchführung des mHBT in den ersten Stunden der Dunkelphase.

Das standardisierte Vorgehen bei allen Tieren ermöglichte es, die Belastung der Tiere vor, während und nach den Eingriffen so gering wie möglich zu halten:

- Transport im eigenen Käfig,
- Gewöhnung an die menschliche Hand,
- Versorgung der Tiere durch das immer gleichbleibende Personal,
- adäquate Anästhesie mittels gewichtsabhängiger Injektion von Narkosemittel und zusätzlicher Infiltrationsanästhesie,
- engmaschige Kontrolle in Narkose,
- *postoperative*, kontrollierte Beobachtung,
- standardisierte präoperative und individuell angepasste *postoperative Analgesie*.

Dennoch kann ein möglicher Einfluss der Kanülen-Implantation und eine folgende Varianz auf das kognitive Verhalten generell nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um einen eventuellen Effekt aber zu minimieren, wurden alle oben beschriebenen

Maßnahmen ergriffen und zusätzlich verblieben die Mäuse nach dem chirurgischen Eingriff bis zur Injektion von A β ₄₂ für eine 14-tägige Regenerationszeit in ihrem fest zugewiesenen Käfigplatz. In dieser Zeit erfolgte eine tägliche, engmaschige Kontrolle des Allgemeinbefindens (Aktivität, Futter- und Wasseraufnahme, Kotabsatz, Pflegezustand, Gewichtszunahme), des Gesundheitszustandes und der Wundheilung der Tiere. Zudem wurde eine Kontrollgruppe und eine native Gruppe ins Studiendesign eingeschlossen, um diesen potenziellen Effekt abzumildern bzw. in Relation betrachten zu können.

2.3. Der Modifizierter Hole-Board-Test

Die ersten typischen klinischen Symptome des MA beim Menschen wie auch im TM sind die Beeinträchtigung des Lernens und des Gedächtnisses, hervorgerufen durch frühzeitige strukturelle *hippokampaler Anomalien* (im Mausmodell ca. ab 8 bis 12 Monaten) (MORAN et al., 1995; MUCKE et al., 2000). Somit muss zur Erfassung dieser frühzeitigen Symptome ein Verhaltenstest gewählt werden, der u.a. eine Hippokampus Schädigung wiedergeben kann. Das Prinzip des mHBT setzt genau dort an:

Das verwendete Studiendesign zielt darauf ab, dass die Maus lernt die Futterbelohnung mit den markierten Zylindern zu assoziieren und sich deren räumliche Anordnung zu merken. Die Bewältigung dieser Aufgabe erfolgt über das deklarative Gedächtnis mit besonderem Augenmerk auf den Hippokampus als verarbeitendes Element dieser kontextabhängigen, räumlichen Informationen (SQUIRE und ZOLA, 1996; BIRBAUMER und SCHMIDT, 2011). Die einfache prozedurale Lernstrategie des nicht-deklarativen Gedächtnisses durch automatisierte Bewegungsabläufe sollte mittels der variierten Zylinderverteilung jeden Tag verhindert werden (SQUIRE und ZOLA, 1996). Nur durch die Erinnerung, welche Futterbelohnung bereits in einem Durchlauf gefressen wurde, können die Tiere eine möglichst effiziente Strategie der Nahrungssuche erlangen. So kann mit dieser kurzfristigen Informationsspeicherung das Arbeitsgedächtnis mit dem präf. Kortex als dessen neuronales Korrelat untersucht werden (OHL et al., 2003).

Der mHBT basiert also auf der natürlichen Neugier von Nagetieren und deren natürlicher Scheu vor offenen, ungeschützten Flächen. Obendrein ist er bei verschiedenen Spezies erfolgreich etabliert und eingesetzt worden (OHL et al., 2003; GORDAN et al., 2012). Entscheidend für die aussagekräftige Durchführung des mHBT, sind die konstanten Untersuchungsbedingungen, wie bspw. den immer selben Ablauf,

durchgeführt von stets demselben Untersucher zur gleichen Uhrzeit. Damit wird der Einflussfaktor Mensch minimiert, da die Tier-Experimentator-Interaktion immer durch die gleiche Person stattfindet. Dies schließt die meisten Aktionen während der Versuche ein: vom ersten Einsetzen der Mäuse in den Tierhaltungsraum bis zum Handling sämtlicher Tests der Studie. Durch dieses Vorgehen wurde gewährleistet, dass es auch in diesem Bereich zu möglichst keiner bzw. maximal niedrigsten möglicher Varianz der Studienergebnisse kommen konnte.

Der mHBT ist ein standardisierter, replizierbarer Verhaltenstest. Im Vergleich zu klassischen Testbatterien (mit Interferenzen der nötigen verschiedenen Tests) lassen sich die Zahlen der benötigten Versuchstiere, aber auch der Zeit- und Kostenaufwand deutlich verringern. Die Motivation der Tiere beruht ausschließlich auf positivem Antrieb, nämlich der Futterbelohnung. Dies steht im Gegensatz zu der sonst häufig gewählten Quelle der Motivation: die Angst oder Nahrungskarenz. Dieser Ansatz kann unerwünschte Wirkungen verursachen wie Erstarren oder panikähnliches Verhalten. Dieser angstinduzierte Stress kann sich negativ auf die kognitive Leistungsfähigkeit auswirken (HARRISON et al., 2009). Daher ist die Verwendung positiver Motivatoren nicht nur ethisch sinnvoller, sondern mündet auch in ein weniger stressinduziertes aberrantes Verhalten (NITHIANANTHARAJAH und HANNAN, 2006). Diese starke Motivation soll das eventuell mangelnde Interesse an der Lösung des Tests überwinden. Mit der aktuellen und angewandten Methodik ist jedoch keine absolute, objektive Beurteilung der Aktivität im mHBT möglich. Das Verhalten muss vom Untersucher sofort, zeitgleich und fehlerfrei analysiert und von Hand eingegeben werden. Folglich ist das Verfahren je nach Benutzer und dessen Übungsstand anfällig für Fehler. Durch entsprechende Schulung und Trainings der testdurchführenden Person wurde dieser untersucherbedingte Fehler im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglichst geringgehalten. Zudem muss angenommen werden, dass die menschliche Anwesenheit immer das Verhalten der Tiere verändert und die Motivation, einen Test durchzuführen, reduzieren kann. Um eine 100%ige Reproduzierbarkeit dieser Durchläufe und die Optimierung der Ergebnisse zu erhöhen, wäre deshalb für zukünftige Studien z.B. eine Aufrüstung mit einem Kamerasystem wertvoll. Denn alle Parameter wurden lediglich visuell vom Untersucher erfasst und dokumentiert. Dies könnte, wenn auch nur in geringem Ausmaß eine Verfälschung der Daten, einerseits durch fehlerhafte Dateneingabe, aber auch durch die Anwesenheit des Untersuchers selbst, erzeugt haben. Bei einer Videoaufzeichnung gäbe es die Möglichkeit der Überprüfung der Resultate,

der genaueren Beurteilung nach dem Test, bei Bedarf den späteren Vergleich mit anderen Studiendesigns und gegebenenfalls auch die Auswertung durch weitere Personen oder zukünftig sogar computerbasierte Analysen. Somit hätte man auch die Möglichkeit geschaffen, die Werte beider Auswertungen zu mitteln, um den eventuellen Untersuchereinfluss zu reduzieren. Dennoch fiel die Wahl im Rahmen dieser Studie auf dem mHBT, da er sensitiv bei der Feststellung typischer krankheitsspezifischer Defizite ist. Den Mäusen einen positiven Anreiz bietet und die physiologischen und ethologischen Eigenschaften der Tiere berücksichtigt. Insofern ist es mit nur einem einzigen Testsystem möglich, verschiedene Parameter wie Angstverhalten, Risikobewertung, kognitive Fähigkeiten, allgemeine Erregung, Explorationsverhalten und lokomotorische Aktivität zu erfassen. Die Mäuse können ihrem natürlichen Futterverhalten nachgehen, werden keinen weiteren Zwangsmaßnahmen ausgesetzt und der Test ist schmerzfrei.

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1. Physiologische Parameter

3.1.1. Allgemeinuntersuchung

Da der mHBT ein sehr komplexes Testprinzip zur Untersuchung kognitiver und Verhaltensparameter ist, wäre eine Einschränkung der Gesundheit mit großen Störungen der Ergebnisse verbunden. Darüber hinaus war es das Ziel der vorliegenden Studie, Vergleichswerte von Kognition, Verhalten und Bewegungsverhalten im Testsystem zwischen den drei eingesetzten Gruppen (ICV-A β ₄₂-Injektion, ICV-Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) -Injektion und nativen Mäusen) zu erhalten.

Zur Überprüfung des Gesundheitszustandes und des Allgemeinbefindens erfolgte über die gesamte Versuchsdauer eine engmaschige tierärztlich begleitete Kontrolle der Versuchstiere u.a. von Futter- und Wasseraufnahme, Kotabsatz, Aktivität und Interaktion mit der Umgebung, des Pflegezustandes (Putzverhalten, Fellbeschaffenheit) und Gewichtsentwicklung. Bei allen Tieren konnte vor und nach dem chirurgischen Verfahren und über den gesamten Testzeitraum von acht Tagen keine Anzeichen von Verletzung und Krankheit (reduziertes Verhalten, Desinteresse, Aggressivität, mangelnde Körperpflege, Gewichtsabnahme) festgestellt werden. Zusätzlich gaben die *postmortal* durchgeführten histologischen Analysen keine Hinweise darauf, dass es durch die Eingriffe selbst zu Beeinträchtigungen der Tiere gekommen sein könnte. Darum kann angenommen werden, dass die Verhaltens- und Kognitionsparameter in dieser Studie nicht durch ein gestörtes Allgemeinbefinden beeinflusst und gegeben falls verfälscht wurden.

3.1.2. Körpergewichtsentwicklung

Der physiologische Parameter der Körpergewichtsveränderung gibt zusätzlich Auskunft über den Gesundheitszustand der Tiere. Das KGW wurde von allen Gruppen zum Zeitpunkt der Ankunft im Tierhaltungsraum, zur Implantation der Führungskanüle, am Tag der ICV-Substanzapplikation sowie im Folgenden täglich während des gesamten Zeitraumes des mHBT ermittelt.

Alle Tiere nahmen über die Dauer von der Ankunft im Tierhaltungsraum bis zur Implantation konstant an KGW zu (Ø-Gewichtszunahme A β ₄₂-Gruppen: 2.78g, PBS-Gruppen: 1.33g, N-Tiere: 1.60g). Auch im zweiten Intervall von der Implantation bis zum Zeitpunkt der ICV-Injektion stieg das Gewicht. Bei den Gruppen mit

Kanülenimplantat jedoch in einem geringeren Maße (\emptyset -Gewichtszunahme A β ₄₂-Gruppen: 1.13g, PBS-Gruppen: 1.18g, N-Tiere: 1.90g). Der operative Eingriff schien anfangs eine ggr. Belastung für die Tiere darzustellen. Dies unterstreicht eine ausreichende Erholungszeit der Tiere nach dem Eingriff, da ansonsten möglicherweise negative Effekte ebenfalls bei den Testverfahren zu erwarten sein könnten. Im Verlauf des mHBT hielten sämtliche Tiere aller Gruppen ihr KGW konstant (\emptyset -KGW Tag 1 versus Tag 8: A β ₄₂ = 25.9 : 26.0, PBS = 26.2 : 26.1, N = 27.4 : 27.0). Es gab keine statistisch signifikante Veränderung im Verlauf des mHBT. Die Gewichtsentwicklung zeigte sich unabhängig von der vorher erfolgten Behandlung. Die Tiere der Gruppe N, die nativen Mäuse ohne jeglichen chirurgischen Eingriff, wogen trotz Randomisierung auch zu Beginn des acht Tage dauernden mHBT mehr als die Tiere der Gruppen A β ₄₂ und PBS und behielten diesen Gewichtsvorsprung über den gesamten Zeitraum des Verhaltenstestes hinweg aufrecht.

Die KGW-Veränderungen lagen im Rahmen der bei den regelmäßigen Gewichtskontrollen akzeptablen und im Tierversuchsantrag als Abbruchkriterium festgelegten maximal 10 %. So ist anzunehmen, dass lediglich die erhöhte körperliche Aktivität beim Ausüben des Verhaltenstests über acht Tage verantwortlich für die Stagnation des KGW ist. Schlussfolgernd gehen wir anhand des Markers KGW davon aus, dass es für beide Zeiträume, bis zum mHBT und während des Tests, zu keiner signifikanten Belastung der Tiere kam. Dies wird ebenfalls darin bestätigt, dass auch die Gesundheitschecks aller Mäuse unauffällig verliefen und vorangegangene Studien bereits zeigten, dass der HBT sich als Testsystem eignet, ohne die Tiere dauerhaft negativ zu beeinflussen (OHL, 2003; LABOTS et al., 2015).

3.2. Modifizierter Hole-Board-Test

Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag in der zeitlichen Bestimmung kognitiver Defizite nach A β ₄₂-Injektion und deren Effekte. Einige Studien zeigten bereits den Zusammenhang einer A β -Injektion in den lateralen Ventrikel und einer damit einhergehenden Amyloid bedingten Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten sowie einen erhöhtem Angstverhalten (BALDUCCI et al., 2010; DINELEY et al., 2010; MORRONI et al., 2016).

Daher sollte der Zeitraum, zu dem die Mäuse beginnen kognitive Beeinträchtigungen zu entwickeln, möglichst weiter dokumentiert und präzisiert werden. Zu diesem Zweck wurden für die hier durchgeführte Studie vier ausgewählte Stichtage (ein, zwei, vier und acht Tage nach ICV-Injektion) für den Beginn des mHBT gewählt. Alle mit dem

Verhaltenstest erfassbaren Parameter wurden über die Dauer von acht aufeinander folgenden Tagen vergleichend analysiert. Die einzelnen Parameter werden im Folgenden näher betrachtet.

3.2.1. Kognitive Parameter

Wichtige Parameter wie die Lernleistung, Motivation, aber auch die Funktionalität des deklarativen Gedächtnisses und die Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses, lassen sich anhand der Analyse der Kognitionsparameter im mHBT beurteilen. Dadurch können wir differenzieren, ob die Tiere tatsächlich lernen, dass für eine Futterbelohnung nur ein markierter Zylinder aufgesucht werden muss (deklaratives Gedächtnis, Hippokampus) und ob sie sich merken können, welche sie bereits besucht und geleert haben (Arbeitsgedächtnis, präf. Kortex). Anhand der Art und Weise, wie sich die Mäuse im Untersuchungsfeld bewegen, können zudem Angst, Motivation, Motorik und Stress beurteilt werden. Ängstliche Mäuse bspw. verbleiben vermehrt am Rand des Feldes, setzen mehr Kot und Urin ab, verlassen zum Fressen das Board und putzen sich öfter. Im mHBT wird die kognitive Funktion der Tiere anhand folgender etablierter Parameter bewertet: Gesamtdurchlaufzeit (*Time Trial*), Fehlbesuche (*Wrong Choice*), Wiederholungsfehler (*Repeated Choice*), Auflassungsfehler (*Omission Error*) und Gesamtfehler eines Durchlaufes (*Wrong Choices total*) (OHL und KECK, 2003; GORDAN et al., 2012).

3.2.1.1. Gesamtdurchlaufzeit (*Time Trial*)

Der Gesamtlernleistung im mHBT wird der kognitive Parameter für die Gesamtzeit des Durchlaufs (*Time Trial*) zugeordnet. Dieser ist stark von der Motivation der Tiere abhängig. Je schneller die Maus einen Testdurchlauf absolviert, desto besser kann sie die Erinnerungen an Gelerntes abrufen. Störungen der gesamten kognitiven Leistung werden folglich angenommen, wenn die Dauer für die Vollendung eines Durchlaufes überschritten wird.

Die Zeit hatte einen signifikanten Einfluss auf den *Time Trial* und erklärt 39.2 % Varianz. Alle Gruppen reduzierten über die Dauer des mHBT die Versuchszeit (MW: Aß₄₂ = 255.7, PBS = 237.7, N = 198.8). Bei den N-Mäusen war die Spanne von Beginn an kürzer und die deutlichere Reduktion der Zeitdauer für den Test zeigte, dass diese Tiere in zunehmender Weise zielgerichtet handeln und den Test erlernten. Dies schien den Aß₄₂-Tieren schwerer zu fallen. Paarweise Vergleiche belegten über die Gesamtdauer des Tests einen signifikanten Unterschied mit $p = 0.021$ zwischen den

Gruppen A β ₄₂ und N. Das kann ein Hinweis auf die Pathologie des frühzeitigen MA oder der Einfluss der chirurgischen Intervention sein. Da die PBS-Gruppen ähnliche Werte wie die N-Mäuse hatten, aber keine Signifikanz im paarweisen Vergleich zu den A β ₄₂-Gruppen ($p = 0.113$) als auch zu den N-Tieren ($p = 0.180$) zeigten, konnten wir den OP-Effekt ausschließen. Lediglich durch die neurologische Schädigung beginnender MA-ähnlichen Pathologie (ZUSSY et al., 2013; SHARMA et al., 2016), könnte es im Vergleich zu den N-Tieren zu Unterschieden beim ersten Kontakt mit dem Markierungsprinzip kommen. Die Gabe von A β ₄₂ hatte einen Einfluss auf die Gesamtdurchlaufzeit, nicht aber auf den Startzeitpunkt.

Zusätzlich kann der Indikator für die Lernleistung von Verhaltensparametern beeinflusst werden. Dazu zählen neben der möglichen Ängstlichkeit das Erkundungsverhalten und der Erregungszustand eines Tieres, die zwischen den einzelnen Zylinderbesuchen Einfluss nehmen können. Jedoch waren alle analysierten Werte der Verhaltensparameter hinsichtlich Angst zwischen den Gruppen vergleichbar (siehe V.3.2.3.1 Angstverhalten), sodass Angst als mögliche versuchsbeeinflussende Komponente vermutlich ausgeschlossen werden konnte.

3.2.1.2. Fehlbesuche (*Wrong Choices*)

Die Fehlbesuche sind ein verlässlicher Parameter, der schon frühzeitig Veränderungen widerspiegelt. Unsere Daten zeigten, dass die Interaktion der Zeit mit der A β ₄₂-Gabe ($p = 0.003$) und dem Startzeitpunkt der Gruppen ($p = 0.007$) einen signifikanten Haupteffekt der Messwiederholungen auf die Anzahl der Fehlbesuche hatte. So waren die *Wrong Choices* signifikant durch die Gabe von A β ₄₂ ($p < 0.001$) bestimmt und erklärten 35.9 % der Varianz. Insgesamt schnitten die A β ₄₂-Gruppen gegen die PBS-Gruppen ($p < 0.001$) und den nativen Mäusen ($p = 0.016$) signifikant schlechter ab. Der Unterschied lag zwischen den Gruppen 1-, 2- und 4/A β ₄₂ gegen die jeweilige PBS-Gruppe, was mittels der erhöhten Anzahl von falschen Entscheidungen während der Testperiode deutlich dargestellt ist. Bei den nativen Mäusen und den mit PBS injizierten Tieren pegelt sich die Anzahl an Fehlbesuchen über den Verlauf des Untersuchungszeitraumes jedoch in einem Abwärtstrend ein. Die restlichen Versuchsgruppen deuteten einen Aufwärtstrend an. Lediglich die 8/A β ₄₂-Tiere zeigten zunächst ebenfalls einen Anstieg, ab Tag fünf bis sechs dann eine Reduzierung der Fehler. Die Tiere dieser Gruppe wiesen aber generell eine hohe Schwankung auf, was erklären könnte, warum sie als einzige A β ₄₂-Gruppe keine signifikanten Werte zu den N- und PBS-Tieren

erreichten. Die 8/A β ₄₂-Tiere schienen aufgrund dieser Variationsbreiten hinsichtlich dieses Parameters damit nur eingeschränkt beurteilbar zu sein.

Die Daten der Mittelwerte und Standardabweichungen zeigten, dass die Werte jedoch bei allen Gruppen schwankten. Aber die konstante Reduktion der Fehlbesuche verdeutlichten, dass die N-Gruppe und PBS-behandelten Tiere den Test erlernen und sich nicht signifikant zueinander verhielten. Die A β ₄₂-Tiere besuchten öfter nicht markierte Zylinder. Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass für diese Mäuse der mHBT schwerer zu erlernen war. Hier konnte lediglich die pathologische Wirkung des injizierten A β ₄₂ im Gehirn der Tiere als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse gewertet werden. Da die PBS-Gruppe als Kontrolle eine Reduktion vergleichbar mit den N-Tieren zeigte. Diese A β -induzierten Lern- und Gedächtnisstörungen stimmen mit der verschlechterten Leistung im Frühstadium von MA-Patienten überein (MATSUZAKI et al., 2006; XU et al., 2018).

Anzumerken ist, dass es scheinbar einen Unterschied im Verlauf der Entwicklung zwischen den A β ₄₂-Tieren gab. Kennzeichnend war ein signifikanter Unterschied der Anzahl an Fehlbesuchen mit einer erhöhten Anzahl von falschen Entscheidungen während der Testperiode der MW Tag 1 - 8 zwischen der 2- und 4/PBS-Gruppe gegen die 2- und 4/A β ₄₂-Gruppe ($p = 0.002$). Bei den weiteren A β ₄₂-Gruppen existierte jedoch keine Signifikanz. So kann davon ausgegangen werden, dass hinsichtlich dieses Parameters der Start des mHBT nicht untergeordnet zu sein scheint. Eine mögliche Erklärung könnte hier wie folgt sein: 2 Tage nach Injektion könnte die A β ₄₂-*Liquorkonzentraion* noch angestiegen sein, wobei sie 4 Tage danach schon ein hohes Level erreicht hatte und 8 Tage nach Injektion bereits begann wieder zu sinken (siehe IV.3.2.1 Messung von Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α im Western-Blot-Verfahren). Dieser theoretisch angenommene zeitliche Verlauf, welcher sich in dem Verlauf des Verhaltensparameters widerspiegelt, würde dem A β -Verlauf entsprechen, der bereits in anderen Untersuchungen und beim Menschen charakterisiert werden konnte (KOSS et al., 2016; FILIPPI et al., 2020).

3.2.1.3. Auslassungsfehler (*Omission Error*)

Beim Auslassungsfehler (*Omission Error*) verringert sich deren Anzahl über den Untersuchungszeitraum bei allen Tieren. Die A β ₄₂- (MW = 1.25) und PBS-Gruppen (MW = 1.26) starteten zwar mit einer höheren Fehlerzahl als die nativen Tiere (MW = 0.54), aber ohne sichtbaren Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p > 0.05$). *Omission Errors* werden zusätzlich von der Motivation beeinflusst, welche bei allen

unseren Versuchsgruppen nicht negativ beeinflusst wurde. Das heißt, es stellte sich bei allen Gruppen ein Lern- und Habituationseffekt ein. Die Tiere lernten, dass auf dem Board Futter zu finden ist. Somit kam es zur Abnahme der Anzahl der nicht besuchten markierten Zylinder. Hier ist anzumerken, dass die N-Gruppe zwar ohne Signifikanz zu den anderen beiden Gruppen, dennoch oft unter den Werten der Versuchs-Gruppen lag. Ergo konnten alle Tiere noch Lernpotenzial ausschöpfen. Die nativen Tiere lagen aber tendenziell auf einem höheren Level. Es zeigte sich also, dass die Motivation der Tiere in Form des Parameters *Omission Error* unabhängig vom Startzeitpunkt des mHBT nicht beeinflusst war.

3.2.1.4. Gesamtfehler eines Durchlaufes (*Wrong Choices total*)

Beide Parameter *Wrong Choices* und *Omission Error* werden zum Gesamtfehler eines Durchlaufes (*Wrong Choices total*) aufsummiert. Dieser Parameter zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Vergleich der Mittelwerte Tag 1 - 8 lag zwischen den A β ₄₂- und den PBS-Tieren ein hochsignifikantes Ergebnis vor ($p < 0.001$). Alle vier A β ₄₂-Gruppen waren in der Gesamtzahl der falschen Entscheidungen, einen nicht markierten Zylinder zu besuchen, an allen Untersuchungstagen signifikant schlechter als die jeweilige PBS-Gruppe (1/A β ₄₂ $p = 0.004$, 2/A β ₄₂ $p = 0.026$, 4/A β ₄₂ $p = 0.002$, 8/A β ₄₂ $p = 0.041$) und erreichten keine physiologischen Werte, die von den N-Mäusen aufgestellt wurden ($p < 0.001$). Zwischen den PBS-Gruppen und den nativen Tieren gab es keine signifikanten Unterschiede.

Jede A β ₄₂-Gruppe zeigte über die Dauer und gegen Ende des mHBT einen Fehleranstieg, da die Zeit ($p < 0.001$), die Interaktion Zeit*A β ₄₂ ($p = 0.001$) und Zeit*Startzeitpunkt ($p = 0.012$) einen signifikanten Einfluss auf den *Wrong Choices total* hatten. Unsere Ergebnisse bestätigen die vorangegangenen Untersuchungen der Interaktion von A β mit den Neuronen im Rahmen verschiedener TM. Die Injektion von A β im lateralen Ventrikel führt zu einer beeinträchtigten kognitiven Funktion (DINELEY et al., 2010; REESE et al., 2011; MORRONI et al., 2016). Natürlich ist zu beachten, dass es in der mHBT-Phase auch zu Veränderungen infolge von gestressten A β ₄₂-Tieren während der Versuchsdauer (Aufenthalt außerhalb des eigenen Käfigs, kein Sichtkontakt zu Artgenossen, keine Flucht- und/oder Versteckmöglichkeit, usw.) gekommen sein könnte. Dies ist hier zu entkräften, da die Nativen und mit PBS injizierten Tiere ähnliche Werte erreichten und auch die weiteren Angst- / Erregungsparameter kaum Auffälligkeiten zeigten (siehe V.3.2.3.1 Angstverhalten, 3.2.3.3 Erregung).

Der mHBT zeigte zusammenfassend ein klares Defizit der A β ₄₂-Tiere bei den *Wrong Choices* und den *Wrong Choices total*, was auf eine Störung des deklarativen Gedächtnisses unserer Mäuse nach ICV-A β ₄₂-Injektion hindeuten könnte. Dieser Befund ist typisch für die frühen Phasen von MA. Da sich jedoch der *Omission Error* zwischen den Gruppen nicht unterschied, ist die Differenz bei den *Wrong Choices total* mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Gruppenunterschiede bei den *Wrong Choices* zurückzuführen. Die Tiere zeigten also mehr Fehlbesuche als Auslassungsfehler. Betrachtet man den Parameter Gesamtfehler eines Durchlaufes in Hinblick auf den Startzeitpunkt sind alle 4 A β ₄₂-Gruppen signifikant und nutzbar.

3.2.1.5. Wiederholungsfehler (*Repeated Choices*)

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Parametern, die zum deklarativen Gedächtnis gerechnet werden, wird die funktionelle Leistung des Arbeitsgedächtnisses, welches dem präf. Kortex zugeordnet ist, über die Anzahl der Wiederholungsfehler (*Repeated Choice*) ermittelt. Bei einem Wiederholungsfehler wird ein zuvor entleerter, markierter Zylinder erneut aufgesucht. Erst wenn die Mäuse gelernt haben, markierte Löcher aufzusuchen und die Mandelstückchen zu entnehmen, kann die Arbeitsgedächtnisleistung beurteilt werden. Dies dauert in der Regel zwei Tage, sodass die Funktion des Arbeitsgedächtnisses erst ab dem dritten Testtag verlässlich gemessen werden kann.

Es zeigten sich Unterschiede über die Zeit des Versuches hinweg. D.h. die Dauer des mHBT hatte einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Wiederholungsfehler ($p = 0.044$). Der Verlauf der Veränderungen war bei den Gruppen unterschiedlich, also unabhängig von der Gruppenzuteilung. Die A β ₄₂ Tiere lagen während der Versuchszeit fast durchgehend auf dem Niveau der nativen- und PBS-Tiere. Es gab daher keine signifikanten Unterschiede zwischen der Leistung des Arbeitsgedächtnisses der einzelnen Gruppen. Über die Versuchstage hinweg zeichnete sich bei allen 3 Gruppen der wiederholte Zylinderbesuch als unregelmäßig und stark schwankend ab. Daher ließ sich dieser Parameter im beschriebenen Versuchsaufbau nur bedingt zur Diagnostik geeignet erscheinen, was es zukünftig zu berücksichtigen gilt. In der Literatur gibt es Studien, die eine über die Hippokampus abhängige KZG-Schädigung auch eine Beeinträchtigung des räumlichen Arbeits- und Langzeitgedächtnisses beschreiben (OLARIU et al., 2001; KONG et al., 2005; HOLSCHER et al., 2007). Allerdings erfolgten in diesen Arbeiten u.a. eine dreimalige- und eine zweiwöchige Applikation oder eine chronische Infusion von A β . Somit kann angenommen werden, dass unsere

einmalige Applikation mit einer ermittelten intrazerebroventrikulären A β ₄₂-Konzentration von 100 nmol, zwar ausreichten, um Beeinträchtigungen des deklarativen Gedächtnisses zu verursachen. Jedoch nicht ausreichend war, um Schäden in den Regionen des Arbeits- und Langzeitgedächtnisses zu verursachen. Ein Grund dafür könnte die Reversibilität von löslichem A β sein (GUTIÉRREZ-LERMA et al., 2013), die geringgradig und maximal beginnende, nachweisbare Plaquebildung in den Proben und in anderen anatomisch beteiligten Regionen dieser Gedächtnisse verursachen, welche aber insgesamt weniger störanfällig als das LZG sind (Hanser, 2005).

3.2.2. Motorische Parameter

Die motorischen Parameter lassen sich mit Hilfe des mHBT anhand der lokomotorischen Aktivität (*Line Crossing*) und der feinmotorischen Geschicklichkeit (*Time Food Intake*) beurteilen und unterscheiden. Diese müssen zur Auswertung des mHBT mit berücksichtigt werden. Denn eine eingeschränkte Motorik könnte Einfluss auf die kognitiven Ergebnisse nehmen und diese möglicherweise verfälschen. Andersrum könnten aber auch kognitive Beeinträchtigungen Einfluss auf die motorischen Leistungen haben und müssen somit im Zusammenhang gesehen werden.

3.2.2.1. Linienüberschreitung (*Line Crossing*)

Die lokomotorische Aktivität lässt sich anhand der Häufigkeit, mit der die in die Versuchsarena eingeklebten weißen Linien während eines Testdurchlaufs in vorwärts gerichteter Bewegung überquert werden (*Line Crossing*), abbilden. Zu Beginn zeigten alle Gruppen, vermutlich durch den angeborenen Erkundungstrieb und damit einhergehender genauerer Erforschung der für sie ungewohnten Umgebung, eine hohe allgemeine körperliche Aktivität. In allen Versuchsgruppen nahm darauffolgend über die acht Tage hinweg die Anzahl der Linienüberschreitungen ab. Stabilisierte sich dann tendenziell über die restliche Versuchszeit hinweg wieder (GLM-Interaktionsterm: $p < 0.001$). Dies lag vermutlich darin begründet, dass die Tiere vertrauter mit der Testarena werden. Im Post-hoc-Test konnte ein Haupteffekt von A β ₄₂ auf die Anzahl der Linienüberschreitung ($p = 0.035$) nachgewiesen werden. Der paarweise Vergleich, Bonferroni-korrigiert, bestätigte die Unterschiede der A β ₄₂-Gruppen im *Line Crossing* gegenüber den PBS-Gruppen ($p = 0.035$), war aber unauffällig gegenüber der Gruppe der nativen Tiere. Fresszeit (*Time Food Intake*)

Die feinmotorischen Fähigkeiten lassen sich mit Hilfe des Parameters *Time Food Intake* interpretieren: Besucht bspw. die Maus ein markiertes, gefülltes Loch, belässt die Futterbelohnung jedoch im Zylinder oder benötigt lange, um das Mandelstück zu greifen und zu fressen, kann dies für feinmotorische Defizite sprechen.

Bei unseren Verhaltenstests war ersichtlich, dass alle Gruppen das Intervall über die Testphase kontinuierlich steigern. Die Dauer des mHBT hat einen signifikanten Einfluss auf die *Time Food Intake* ($p < 0.001$), mit einem signifikanten linearen Trend des Innersubjektfaktors Zeit. Die nativen Tiere begannen von Anfang an mit einer etwas längeren Fresszeit (MW = 5.93). Die PBS- (MW = 4.02) und A β ₄₂-Gruppen (MW = 3.81) wiesen bei den MW eine ähnliche Performanz auf. Im Bonferroni-korrigierten post-hoc Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0.048$). Dies könnte prinzipiell bei den A β ₄₂-Tieren auf eine Verschlechterung der Feinmotorik hindeuten. Da gleiche Entwicklungen jedoch auch in den beiden Kontrollgruppen auftraten, scheint dies nicht der Fall zu sein. Die vorschreitende Krankheit und damit eine Erhöhung des Angst- und Erregungslevels als Ursache konnte aufgrund der PBS- und N-Tiere widerlegt werden. Es existierten keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen und innerhalb der Gruppen. Eine Störung der Feinmotorik schien daher bei den A β ₄₂-Tieren zu keinem Zeitpunkt bzw. unabhängig vom Startzeitpunkt der mHBT-Messungen nicht vorgelegen zu haben. Dies deutet darauf hin, dass sich alle Versuchsgruppen, aufgrund des steigenden Sicherheitsgefühls mit zunehmender Dauer des mHBT, lediglich mehr Zeit nahmen, um die Futterbelohnung zu fressen. Und die Feinmotorik in diesem Zeitraum noch keine signifikanten/erfassbaren Unterschiede zwischen erkrankten Tieren und Kontrolltieren aufwies. Dies entspricht den bekannten Erkenntnissen, dass zunächst milde kognitive Veränderungen bei an MA erkrankten Menschen und Tieren beobachtet werden können und erst später die motorischen Fähigkeiten beeinflusst werden (BRAAK et al., 1994; KOSS et al., 2016; FILIPPI et al., 2020).

3.2.3. Verhaltensparameter

Durch die Analyse der Verhaltensparameter war es möglich auszuschließen, dass eventuelle kognitive Störungen nicht durch Änderungen im Reaktionsmuster der Mäuse wie bspw. Angst (3.2.3.1), Motivation (3.2.3.2) oder Erregung (3.2.3.3) überlagert wurden. Anhand der Art und Weise wie sich die Mäuse im Untersuchungsfeld bewegten, konnten Angst, Motivation, Motorik und Stress beurteilt werden. Nagetiere geraten immer dann, wenn sie mit einer neuen Umgebung konfrontiert werden, auf

natürliche Weise in einen Konflikt zwischen Vermeidung potenzieller Gefahren und ihrem angeborenen Erkundungsdrang (OHL, 2003). Dadurch tritt eine gewisse Erregungs- und Angstsymptomatik auf, welche sich in häufigem Putzen, erhöhtem Kot- und Urinabsatz sowie vermehrtem Aufenthalt am Rand des Feldes äußern. Somit schränkt Angst das Verweilen auf dem zentral gelegenen Board und damit das intensive Erkundungsverhalten im mHBT ein.

3.2.3.1. Angstverhalten

OHL (2003) und HARRISON et al. (2009) belegten, dass es unter Standardbedingungen in bestimmten Verhaltensbereichen wie bspw. der allgemeinen Aktivität und dem Erkundungsverhalten zu Veränderungen kommen kann, wenn ein höherer Grad an Angst bei den Tieren vorliegt. Folglich sollten auch im vorliegenden Testumfeld die Angstparameter eine deutliche Differenz zwischen den Gruppen zeigen, falls die abweichenden kognitiven Leistungen der Aß₄₂-Tiere durch den Einfluss von Angst entstanden wären. Der mHBT bedient sich dabei der natürlichen Aversion von Nagern gegenüber offenen Flächen. So halten sich die Tiere anfänglich lieber in der dunkleren Peripherie auf als im Zentrum und bewegen sich bevorzugt entlang der Wände fort (OHL, 2003). Genauso wird die Inaktivität als Hemmung des Normalverhaltens erklärt und somit als passives Meide Verhalten angesehen. Dies ist jedoch auch charakteristisch für Tiere, die zwischen kurzen intensiven Erkundungsphasen zeitweilig innehalten.

Für die Auswertung wurde die Latenzzeit bis zum ersten Betreten des Boards (*Latency First Board Entry*) und die verbrachte Gesamtzeit auf dem Board (*Time on Board*) ausgewertet. Zusätzlich kann die Dauer unbeweglichen Verharrens (*Immobility*) das Angstniveau der Maus widerspiegeln. Die erreichten Werte der drei Hauptparameter von den mit Aß₄₂ behandelten Tieren waren vergleichbar mit den erreichten Werten der Tiere der PBS-Gruppen und der nativen Tiere. Beim direkten Vergleich der Versuchsgruppen hinsichtlich des Parameters *Latency First Board Entry*, lagen die Gruppen der ICV-Aß₄₂-Injektion (MW = 89.27) sowie die PBS-Gruppe (MW = 82.74) beim ersten Betreten sichtbar über den von den N-Mäusen aufgestellten Reverenz Wert (MW = 30.53). Jedoch nahm bei allen Gruppen die Latenzzeit über die Versuchstage hinweg ab. Sie lernten also scheinbar dazu bzw. wurden vertrauter mit der Umgebung. Die Zeit hatte einen signifikanten Haupteffekt der Messwiederholungen auf die abhängige Variable ($p < 0.001$). Alle weiteren angewendeten statistischen Berechnungen waren aber ohne Signifikanz innerhalb oder zwischen den Gruppen. Über den Zeitraum der 8 Untersuchungstage stieg tendenziell die auf dem Board verbrachte

Zeit bei allen Tier-Gruppen insgesamt, bis zu den Tagen 7 - 8 nach Testbeginn, an (signifikanter Haupteffekte der Zeit, $p < 0.001$). Dennoch starteten die nativen Tiere von Beginn an mit einer höheren Durchschnittszeit der *Time on Board*, gefolgt von den Tieren den PBS-Gruppen und den A β_{42} -Gruppen. Innerhalb der Gruppen lagen keine Signifikanzen vor. Im paarweisen Vergleich, Bonferroni-korrigiert, bestand jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den A β_{42} -Gruppen und der Gruppe der nativen Tiere ($p = 0.025$; A β_{42} : PBS $p = 0.240$, PBS : N $p = 0.123$). A β_{42} führte zu leicht erhöhter Angst. Dies könnte durch die Pathogenität von A β erklärt werden, da es leichter toxische Oligomere bildet. Ebenso war das Meide Verhalten gegenüber dem zentralen, ungeschützten Bereich über die gesamte Testphase kontinuierlich reduziert. Im zeitlichen Verlauf und auch zwischen den Gruppen gab es keine weiteren signifikanten Unterschiede. Die angstassoziierten Parameter unterschieden sich zusammenfassend also nicht stark zwischen den Gruppen und scheinen somit im vorliegenden Studiendesign keine Veränderungen zu zeigen.

Dieses Ergebnis scheint anfangs widersprüchlich zur Prävalenz nichtkognitiver Verhaltens- und psychologischer Symptome von Demenz (BPSD) bei Patienten mit MA. Hier werden im Schnitt mit bis zu 90 % Formen von Persönlichkeitsveränderungen wie unruhiges, enthemmtes Verhalten, Aggressivität und Angst beobachtet (HUGHES et al., 1982; KIM et al., 2021). Allerdings kommt es bei einem nicht durch Injektion von A β induziertem MA, zu einer langsamen Anhäufung von A β -Konzentrationen bis zu Plaquebildung und -ablagerung über mehrere Jahre. Bei unserem Injektionsmodell kann es zu einer akuten Akkumulation des Peptids kommen (FABBRO et al., 2011), es wird aber bestätigt, dass induzierte Hemmungen v.a. in den Hippokampus Regionen reversibel sind (GUTIÉRREZ-LERMA et al., 2013). So ruft das lösliche A β_{42} zu diesem Zeitpunkt *in vitro* vielmehr eine synaptische Beeinträchtigung als einen irreversiblen synaptischen Verlust hervor (GUTIÉRREZ-LERMA et al., 2013). Ein weiterer wichtiger Faktor, der berücksichtigt werden muss, besteht darin, dass die induzierte A β_{42} -Wirkung erst mit dem Alter und Dauer der Krankheit zunimmt (BALLEZA-TAPIA et al., 2010). Auch andere Autoren liefern Befunde, dass ältere Mäuse anfällig für funktionelle Defizite sind, frühere und länger anhaltende zerebrale Entzündungsreaktion aufweisen und schlechtere neurologische Ergebnisse liefern. Insgesamt zeigten „alte“ Gehirn eine erhöhte Anfälligkeit und eine schlechtere Genesung aufgrund ihrer verminderte antioxidative Abwehr (SANDHIR et al., 2004; MATSUZAKI et al., 2006). Dementsprechend lässt sich sagen, dass mit dem gewählten Modell zur Untersuchung

kurzzeitiger Effekte von A β -Injektionen keine Veränderungen im Angstverhalten zu erwarten waren, da diese bei den typischen MA-Modellen in der Regel erst nach längerer Zeit auftreten. Somit entsprechen die beobachteten Befunde den Erwartungen an das Modell dahingehend, dass lediglich frühzeitige subtile Symptome abgebildet werden und keine späten Beeinträchtigungen wie das Angstverhaltens. Sie müssen aber dennoch erhoben werden, da sie essenziell sind, um Veränderungen anderer Parameter im Kontext beurteilen zu können bzw. Beeinflussungen durch Angst ausschließen zu können.

Hinsichtlich des zu untersuchten Startzeitpunktes lässt sich ergänzen, dass es hier Post-hoc keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gab und dieser Parameter daher unabhängig vom Startzeitpunkt des mHBT erscheint.

3.2.3.2. Erkundungsverhalten

Das Explorationsverhalten lässt sich in ein gerichtetes und ein ungerichtetes Verhalten gliedern und spiegelt die Motivation Neues zu erforschen und damit die Erkundungsfreudigkeit der Tiere wider (OHL und KECK, 2003). Das gerichtete Explorationsverhalten wird im mHBT mit der Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch (*Latency First Hole Visit*) und mit der Anzahl der besuchten markierten Zylinder (*Correct Hole Visits*) analysiert. Ungerichtetes Explorationsverhalten wird an dem Parameter Aufrichten auf die Hinterbeine (*Rearing*) bemessen.

Bei den Parametern zeigte sich in allen Gruppen eine gleiche Abnahme der *Latency First Hole Visit* ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, aber mit einem signifikanten Einfluss der Zeit ($p < 0.001$). Ebenso eine Zunahme ohne gruppenspezifische Differenzen der *Correct Hole Visits* über den gesamten Untersuchungszeitraum von 8 Tagen. Das gerichtete Erkundungsverhalten schien daher bei den A β_{42} -Tieren nicht beeinflusst zu sein. Im Gegenteil, die Entwicklung dieser beiden Parameter deutet an, dass die Aktivität der Tiere aller Gruppen zunahm. Gleichzeitig verringerte sich damit die ungerichtete Exploration der Umgebung während der Testphase. Das *Rearing* nahm bei allen Tieren ab, mit einem Haupteffekt der Zeit ($p < 0.001$) und der Interaktion von Zeit*Startzeitpunkt ($p = 0.004$) sowie von Zeit*Startzeitpunkt*A β ($p < 0.001$) auf die Messwiederholungen. Die A β_{42} -Gruppen zeigten Unterschiede zu den PBS-Gruppen ($p = 0.043$), blieben aber unauffällig gegenüber der Gruppe der nativen Tiere und auch die nativen Tiere zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den PBS-Gruppen.

Alle 3 Parameter und deren beurteiltes Verhalten gehören zum natürlichen Verhaltensrepertoire von Nagetieren. Es ist für Mäuse überlebenswichtig, um sich an neue, veränderte Situationen anzupassen. Somit dient die Exploration dem Aufsuchen neuer Futterquellen und ermöglicht andererseits die Erkenntnis von Fluchtwegen im Falle eines Beuteangriffs (PERSCH, 1994). In unserer Studie explorierten alle Tiere gleichermaßen zielgerichtet und ungerichtet die Testumgebung. Deshalb gehen wir davon aus, dass alle Tiere gleich stark motiviert waren. Der signifikante Unterschied der A β ₄₂-Gruppen im *Rearing*, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Tiere zu einer vermehrten Ängstlichkeit neigen. Indem sie ihre Umgebung öfters mit dem Aufrichten auf die Hinterbeine kontrollierten, was sich ebenfalls in der Latenzzeit bis zum Besuch des ersten Zylinders widerspiegelte. Auch hier ließen sich die A β ₄₂-Tiere die längste Zeit aber ohne Signifikanz.

Da aber auch die Angstparameter kaum Rückschlüsse auf eine vermehrte Ängstlichkeit zulassen, sprechen unserer Ergebnisse gegen eine Beeinträchtigung der kognitiven Leistung der Tiere durch eine gesunkene Motivation und/oder durch eine Verhaltensinhibition. Dies entspricht ebenfalls den Erwartungen an den Test zur Untersuchung der frühen Symptome nach einer A β -Injektion (BOYD-KIMBALL et al., 2005). Vielmehr ist die Verringerung der ungerichteten explorativen Tätigkeit, das *Rearing*, als eine zielgerichtete Nahrungssuche auf dem Board der anderen beiden Gruppen zu werten und nach HSIAO et al. (1996) als die Fähigkeit zum Lernen definiert.

3.2.3.3. Erregung

Die Putzphasen (*Grooming*) als Zeichen für Erregung kam bei allen Versuchsgruppen während der gesamten Durchläufe vor. Es fand meistens in der Randzone bzw. in den Ecken der Versuchsarena statt, da die Tiere dort vermutlich durch ein erhöhtes Sicherheitsgefühl ihre Aufmerksamkeit eher auf die Körperpflege richten können. Der Trend im Verlauf des mHBT war bei den mit A β ₄₂- (MW = 3.68) und PBS behandelten Tieren (MW = 3.52) eher steigend und bei den nativen Tieren (MW = 2.96) abfallend. Insgesamt war dieser Parameter durch einen stark schwankenden Verlauf geprägt. Dieser spiegelte sich in einem signifikanten Unterschied in Abhängigkeit vom Startzeitpunkt innerhalb der PBS-Gruppen wider ($p = 0.032$). Alle weiteren Berechnungen ergaben keine Differenzen innerhalb und zwischen den Gruppen. Damit ist anzunehmen, dass es zu keiner signifikanten Veränderung der Erregung im Laufe

des mHBT kam. Dieser Parameter ist damit ebenfalls unabhängig vom Startzeitpunkt des mHBT ist.

Gestresste Tiere neigen zudem zu einer deutlich höheren Kotabsatzfrequenz (*Boli*). Der Trend ging während der acht Tage bei allen Mäusen gegen Null. Es lag ein Haupteffekt der Zeit ($p < 0.001$) und der Interaktion von Zeit*Startzeitpunkt*Aß ($p = 0.012$) mit einem signifikant linearen Trend auf den Messwiederholungen vor. Es war ersichtlich, dass sich die 4/Aß₄₂-Gruppe zu der 4/PBS-Gruppe über alle 8 Tage signifikant unterschied ($p = 0.037$). Im WRS (MW Tag 1 - 8) ließen sich signifikante Unterschiede bestätigen ($p = 0.015$). Die restlichen Aß₄₂-Gruppen verhielten sich nicht signifikant zur jeweiligen PBS-Gruppe. Warum lediglich die 4/Aß₄₂-Gruppe eine Signifikanz zeigte ist schwer zu beurteilen. Bei den kognitiven-, motorischen- und das Erkundungsverhalten betreffenden Parametern waren diese den anderen Gruppen ähnlich. Aber bei genauer Betrachtung zeigte die Gruppe eine Heterogenität im Angst- und Erregungslevel. Die *Latency First Board Entry* lag deutlich unter den der anderen Aß-Gruppen, ebenso war die *Immobility* reduzierter. Die Phasen des Grooming stieg kontinuierlich und etwas stärker an. Konkret heißt das, diese Gruppe betrat wesentlich früher das Board, verharrte weniger oft und lang in einer vollständigen Bewegungslosigkeit und putzte sich ausgiebiger in der ungewohnten Umgebung. Es deutete darauf hin, dass sich die Tiere schneller auf die neue Situation einlassen können, die Vermeidung potenzieller Gefahren schneller dem angeborenen Erkundungsdrang wich und somit folglich auch der Kot- und Urinabsatz (ein Zeichen einer erhöhten Erregungs- und Angstsymptomatik) signifikant schneller reduziert wurde.

In der Auswertung der Daten differenziert nach Aß₄₂-Gabe in Abhängigkeit des Startzeitpunktes zeigten die Aß₄₂-Tiere innerhalb der Gruppen über alle Untersuchungstage hinweg einen signifikanten Unterschied ($p = 0.040$). Die PBS-Gruppen waren nicht signifikant. Da aber eine große Streuung in jeder Gruppe und auch bei den Werten der nativen Tiere vorlag, stuften wir diese Signifikanz als nicht klinisch relevant ein. So scheint lediglich die Konfrontation mit der neuen Umgebung und der zu bewältigenden Aufgabe der Grund für den anfänglich häufigeren Kotabsatz in den Versuchsgruppen zu sein.

Nach Auswertung aller Parameter der erfassbaren Bereiche (Kognition, Motorik, Verhaltensparameter) kann gesagt werden, dass die vorliegenden Daten eine nachteilige Auswirkung auf die kognitive Funktion zeigen, wenn der mHBT direkt oder bis zum achten Tag nach der ICV-Aß₄₂-Injektion beginnt (sichtbar am Anstieg der *Wrong*

Choices über den Versuchsverlauf). Das gewählte TM funktioniert und die Injektionen führt zu den erwarteten milden Beeinträchtigungen, was durch das Vergleichen der Parameter mit den PBS- und Nativen Tieren ersichtlich wird. Zusätzlich konnten durch den mHBT als Testsystem die milden Differenzen in den erwarteten Punkten erfasst werden. Eine Stärke des mHBT besteht darin, Veränderungen des kognitiven und emotionalen Verhaltens gleichzeitig überwachen zu können (OHL et al., 2001). Daher kann die Störung der kognitiven Leistung mit emotionalem Verhalten wie eine Zunahme der Angst oder eine Abnahme der Motivation leicht erkannt und interpretiert werden. Unsere befundeten kognitiven Defizite, die mit einer Beeinträchtigung des deklarativen und räumlichen Gedächtnisses einhergehen, werden nicht durch Änderungen im Verhalten der Mäuse überlagert. Dies war aufgrund der gewählten Methode (Untersuchung früher Veränderungen nach A β ₄₂-Injektion) zu erwarten.

Gegebenenfalls wäre es gut über eine Optimierung der Gruppengrößen (im Sinne einer Erhöhung), der Haltung (Gruppenhaltung für soziale Säugetierarten wie Mäuse) oder des Testsystems (transparenten Trennwand für einen visuellem, akustischem und olfaktorischem Kontakt während der Durchführung) nachzudenken. Somit kann unter Umständen die Stressbelastung erniedrigt und das Wohlbefinden der Tiere gesteigert werden. Damit zukünftig die Streuungen/Varianzen weiter begrenzt und noch subtiler die Veränderungen erfassbar gemacht werden.

3.3. Entnahme und Präparation des Gehirns

3.3.1. Präanalytische Probenbehandlung

3.3.1.1. Liquor cerebrospinalis-Entnahme

Vor der Euthanasie der Versuchstiere wurde bei allen Gruppen eine Probe des *Liquor cerebrospinalis* (engl. cerebrospinal fluid, CSF) entnommen.

Biomarker für CSF gelten als besonders zuverlässig unter den diagnostischen Markern für Demenzerkrankungen, allem voran A β ₄₂ und Tau. Ein bedeutendes Argument ist, dass die CSF direkt mit dem extrazellulären Raum im Gehirn interagiert und so die damit verbundenen Veränderungen reflektieren kann. Die Flüssigkeit wird kontinuierlich produziert, recycelt und frei mit der interstitiellen Flüssigkeit im Gehirn ausgetauscht. Dabei wird lösliches A β in den *Liquor* sekretiert und macht es zu einem idealen Biomarker Kandidaten für MA (DE et al., 2019). Hierbei wird eine Senkung des A β ₁₋₄₂-Monomerspiegels im *Liquor* weitgehend als stabiler Marker für die Diagnose

von MA validiert, während der Gesamtgehalt an A β -Peptiden unverändert bleibt (FAGAN et al., 2007; YANG et al., 2013). Die Gesamtmenge an A β - Monomeren und -Oligomeren in der CSF kann unter Verwendung des ELISA-Verfahren basierten Methoden gemessen werden (DE et al., 2019). Der spezifische Nachweis und die Quantifizierung der Heterogenität in der Morphologie von löslichen A β -Aggregaten kann aufgrund des Mangels an geeigneten sensitiven Methoden jedoch bisher noch nicht bestimmt werden. Auch weisen die Methoden immer noch einige Einschränkungen auf, wie bspw. die Unterschiede zwischen und innerhalb von Laboratorien und erhebliche Interferenzen mit anderen Formen von Demenz, weshalb Ergebnisse immer kritisch beurteilt werden müssen.

So konnten auch wir in unserer Studie kein A β_{42} nachweisen. Bei 40 von insgesamt 54 Tieren konnte eine Spinalpunktion vorgenommen werden (Erfolgsrate: 74,1%). Davon wurden 11 Proben u.a. mit Blut verunreinigt, so dass schlussendlich 29 (53,7%) einwandfreie, verwertbare Proben der Zerebrospinal Flüssigkeit gewonnen wurden. Diese Schwierigkeit v.a. bei kleinen Nagern wie der Maus beschreibt auch LIU und DUFF (2008) sowie LIM et al. (2018): die Problematik liegt erstens in der Größe der Versuchstiere und der anatomische Nähe der Zisterne Magna zu den Blutgefäßen begründet. Dadurch werden die Proben häufig kontaminiert. Ergo ist dieser Bereich von Natur aus schwierig zu präparieren und oft sind nur kleine Probenmengen gewinnbar (maximal 5 - 7 μ l oder weniger). Für routinemäßige mikrobiologische und biochemische Beurteilung in der Humanmedizin hingegen gewinnt man ca. 6 - 8 ml CSF, um daraus die benötigte Menge von 150 μ l für einen doppelten Nachweis (Biomarker Assay) nutzen zu können (REMBACH et al., 2015). Aufgrund unserer geringen Gesamtliquormenge (244 μ l), die maximal eine Untersuchung als eine gepoolte Probe aller Gruppen zugelassen hätte. Der aktuellen technischen Gegebenheiten und der nötigen maximalen Konzentration zum Nachweis von CSF-A β_{42} -Konzentration wurden die Proben nicht untersucht und verblieben bei -80 °C tiefgekühlt. Um Aussagen zu diesem Parameter erheben zu können, müssten daher zukünftig einerseits bedeutend mehr Tierzahlen pro Studiengruppe eingeschlossen werden (wobei die Aspekte wissenschaftlicher Nutzwert gegen die 3Rs abzuwägen wäre). Andererseits muss eine hochexakte Probengewinnung möglich sein, bspw. durch zeitlich, technisch und finanziell umfangreiches Training der durchführenden Personen.

3.3.1.2. Toluidinblau-Färbung

Zur Überprüfung des korrekten Sitzes der Führungskanüle wurden bei drei Kontrolltieren eine Färbung mittels Toluidinblau durchgeführt. Dies waren Tiere, bei denen nach Standardprotokoll eine Führungskanüle implantiert, aber ein Abbruch während oder nach dem chirurgischen Eingriff laut Abbruchkriterien des TVA erforderlich war. Nach der Euthanasie wurden die Gehirne in toto entnommen und die Färbung makroskopisch beurteilt. Alle Gehirne wurden vertikal geteilt und wiesen einen korrekten Sitz der Führungskanüle auf. Die Blaufärbung der Ventrikel belegte eine korrekte und verlässliche Vorgehensweise in der vorliegenden Arbeit. Damit ist die Eignung der angewandten Operationstechnik zur Erreichung verlässlicher Ergebnisse gegeben.

3.3.2. Analytik der A β ₁₋₄₂-Konzentration, Apoptose und Inflammation

3.3.2.1. Messung von Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α im Western-Blot-Verfahren

Das WB-Verfahren ist ein einfaches Verfahren zur Proteinanalyse, das sich als ein vielseitiges, ubiquitäres und spezifisches Werkzeug in der medizinischen und biochemischen Forschung etabliert hat (TOWBIN et al., 1992; SILVA und MCMAHON, 2014).

Durch das Verfahren des WB wurden in unserer Studie die Konzentrationen und das Vorhandensein spezifischer Proteine (Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α) geprüft und ermittelt. Alle vier gesuchten Proteine konnten detektiert und ausgewertet werden.

a) Caspase 3

Ein relevanter Faktor in der Entwicklung des MA ist der Zelltod durch Apoptose, welcher als eine wichtige Ursache der pathophysiologischen Prozesse diskutiert wird (OBULESU und LAKSHMI, 2014). MORRONI et al. (2016) beschreibt die Beteiligung des apoptotischen Weges an der Toxizität von A β Os. Neuronale Apoptose kann auf mehrere Faktoren wie oxidativen Stress, Entzündung, Störung von Enzymen und Hypoxie zurückzuführen sein (QIU et al., 2016). Aber auch die A β -Wechselwirkungen selbst induzieren u.a. oxidativen Stress (MORRONI et al., 2016). So haben viele Studien bewiesen, dass MA durch eine erhöhte oxidative Last im Gehirn und einer Neurodegeneration charakterisiert ist.

Eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit war, dass der Zelltod bspw. durch histologische Färbungen nicht direkt bestimmt wurde. Dies sollte für zukünftige

Arbeiten mitberücksichtigt werden, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu stärken. Dennoch ergab die Analyse der Proben einen hochregulierten Caspase 3-Spiegel im Hippokampus am Tag zehn nach Injektion von A β ₄₂ vergleichend mit den PBS-Tieren ($p = 0.004$). Im MPFK konnte hingegen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Proteinkonzentration von Caspase 3 nach A β ₄₂-Injektion detektiert werden ($p > 0.05$). Der Peak im Hippokampus scheint jedoch nur transient zu sein und wieder zu fallen. Da die Tiere der A β ₄₂-Gruppe am Tag 16 wieder vergleichbar mit den PBS-Gruppen hinsichtlich der Caspase 3-Proteinkonzentration in den Hirnproben waren.

Der programmierte Zelltod oder Apoptose verläuft nach den extrinsischen Wegen (assoziiert mit Tumornekrosefaktor-Rezeptorfamilie) oder nach den intrinsischen Wegen (assoziiert mit der Cytochrom-C-Freisetzung aus Mitochondrien) (ELMORE, 2007). Beide Pfade vereinigen sich am Ende im terminalen Teil der sogenannten Caspase-Kaskade. Der letzte Schritt dieser Kaskade ist die Caspase-3-Aktivierung. Sie aktiviert die Proteolyse des Zellinhaltes, den Kollaps des Zytoskeletts und löst die DNA-Fragmentierung aus (SEBBAGH et al., 2001). Caspase-3 gilt daher als universeller Indikator einer apoptotischen Zelle und kann bis zu 14 Tage nach Zellschädigung mit erhöhten Werten nachgewiesen werden (KELLERMANN et al., 2013). Somit können wir ausschließen, dass die Caspase 3-Erhöhungen durch die Injektion und nicht durch die OP verursacht worden sind, da alle Gruppen nach dem chirurgischen Eingriff eine 14-tägige Regenerationszeit hatten. Setzt man den erhöhten Caspase 3-Spiegel einem Indikator für gestiegene Apoptose gleich, könnte dies die Erklärung der kognitiven Leistungsminderung unserer Mäuse sein. Gleichzeitig bestätigen dies die Ergebnisse vorangegangener Studien. Sie hatten einen massiven und schnellen oxidativen Stress in der ersten und zweiten Woche nach der ICV-Injektion beobachtet (ZUSSY et al., 2013). Und konnten zudem eine Caspase 9-Aktivierung, ebenfalls ein bekannter Biomarker von durch oxidativen Stress induziertem Zelltod, im Hippokampus und der Hirnrinde bei Mäusen zehn Tage nach ICV-A β O-Injektion bestimmen (MORRONI et al., 2016).

Die unterschiedlichen Konzentrationen zwischen Hippokampus und MPFK zeigen, dass A β ₄₂ alle untersuchten Hirnregionen erreicht. Es allerdings je nach unterschiedlicher Empfindlichkeit jeder Region gegenüber der direkt oder indirekt A β ₄₂ induzierten Toxizität, auch eine unterschiedliche Reaktion auf die Toxizität selbst gibt. Nach Injektion existieren insbesondere im zeitlichen Verlauf und zwischen den Strukturen

Unterschiede, die u.a. auch von ZUSSY et al. (2011) sehr gut beschrieben wurden: die intrazerebroventrikuläre Injektion von A β induziert ferner nach 1 Woche einen signifikanten Anstieg des Lipidperoxidationsniveaus (oxidativer Stress), der im Hippokampus stärker war als im Kortex. Die Ausmaße des mitochondrialen Stresses, gemessen am Anstieg aktivierter Caspase-9 im Hippokampus und Kortex, einsetzende Neuroinflammation durch veränderte astrogliale Aktivität und auch die neuroprotektiven Reaktionen zum Schutz der Strukturen laufen zeitlich unterschiedlich an (ZUSSY et al., 2011).

b) Tau und P-Tau

Tau akkumuliert im Laufe eines MA frühzeitig im medialen Temporallappen, führt so zur Leistungsreduzierung des vom Hippokampus vermittelten Gedächtnisses und ist assoziiert mit einer Atrophie innerhalb dieser Region (kortikobasaler Degeneration). Diese Dysfunktionen des episodischen Gedächtnisses, insbesondere gekennzeichnet durch Tau-Pathologien im *entorhinalen* Kortex, äußern sich in Störungen des autobiographischen Wissens, also von persönlichen Erinnerungen, die in zeitlichem und räumlichem Kontext stehen (FU et al., 2017).

Wir konnten beide Marker, Tau und P-Tau, prinzipiell in den Proben detektieren. Im Hippokampus lag eine signifikante Proteinkonzentrationsänderung von Tau nach A β ₄₂-Injektion am Tag 12 zu Tag 16 im Vergleich zu PBS vor ($p = 0.041$). Alle anderen Vergleiche der Untersuchungszeitpunkte untereinander waren nicht signifikant (d10 : d12 $p = 0.914$, d10 : d16 $p = 0.067$). Die Auswertungen der P-Tau Konzentrationen zeigten im Vergleich der mittleren Ränge, dass die Gruppen eine unterschiedliche zentrale Tendenz aufweisen könnten. Die weitere Berechnung ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0.139$) und Untersuchungszeitpunkten ($p > 0.05$). Im MPFK schien mit der vorliegenden Probenmenge die Entwicklungen in die Richtung, dass es keinen Unterschied in der Proteinkonzentration von Tau und P-Tau zwischen Tag acht, zehn, zwölf und sechzehnt im Vergleich zu PBS gibt, wahrscheinlich zu sein. Eine statistische Auswertung von Tau war aber aufgrund der Stichprobengröße nicht möglich und ist als eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit zu sehen. Die P-Tau-Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0.146$) und in der Tendenz (Kruskal-Wallis Test) der Untersuchungszeitpunkte zwischen Tag 10, 12 und 16 ($p > 0.05$).

Dennoch müssen beiden Formen von Tau durch das injizierte A β ₄₂ gebildet bzw. durch die Wechselwirkungen mit ihm erhöht worden sein. Dies belegen frühere Studien von TM: A β -Spezies gehen in synaptischen Domänen zellulärem P-Tau voraus, induzieren und erhöhen dieses. Sie legen nahe, dass die typischen toxischen Eigenschaften von A β O_s und Tau zusammenwirken und sich möglicherweise gegenseitig verstärken (WANG et al., 2012; CHEN und MOBLEY, 2019). Somit scheint A β in der MA-Pathogenese Tau vorgeschaltet zu sein, da sein Vorhandensein die Entwicklung der NFT-Bildung beschleunigt und die Tau-Amyloidose verstärkt (u.a. Auslöser für die Umwandlung von normalem Tau in einen toxischen Zustand). Gleichzeitig ist P-Tau mit einer Verzögerung des A β -Anstiegs verbunden, wodurch eine negative Rückkopplungsschleife existiert, in der ein Anstieg von P-Tau die Rate der A β -Akkumulation verlangsamt. Dies führt dazu, dass P-Tau weiterhin intrazellulär liegende NFTs mit Fortschreiten der Krankheit in späten Stadien bildet, während A β -Plaques-Akkumulations-Plateaus auftreten (HUBER et al., 2018). Ein weiterer Sachverhalt, in dem auch die Erklärung zu vermuten ist, warum es bei uns nicht möglich war eine Signifikanz zwischen den A β ₄₂- und den PBS-Gruppen nachzuweisen, ist das Vorhandensein einer intrinsischen spezifischen Regulation der Tau-Phosphorylierung wie aus der Studie von ZUSSY et al. (2013). Es scheint, dass die Tau-Phosphorylierung in einer sequentiellen Reihenfolge von Ereignissen auftritt und weitere Rückkopplungsmechanismen in den Neuronen existieren, durch welche die Phosphorylierung bestimmter Positionen die Dephosphorylierung anderer Positionen induzieren würde, um ein konstantes Phosphorylierungsniveau aufrechtzuerhalten (BERTRAND et al., 2010).

c) TNF α

Mehrere Quellen deuten darauf hin, dass oxidativer Stress früh im Verlauf von MA auftritt, was seine Schlüsselrolle bei deren Pathogenese unterstützt. Durch die A β -Ablagerung wird eine Entzündungsreaktion induziert, so dass erhöhte Konzentrationen von A β ₄₀ und A β ₄₂ mit erhöhten Konzentrationen von Oxidationsprodukten aus Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren im Hippokampus und Kortex assoziiert sind (CHEIGNON et al., 2018). Sie führen bspw. zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten. Mikroglia wiederum werden in einem chronisch aktivierten Zustand bei MA im Umkreis seniler Plaques gefunden und treiben u.a. durch die kontinuierliche Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine (bspw. Interleukin-1 β), TNF α und Cyclooxygenasen 2 die Neuropathologie in den frühen Krankheitsstadien voran (LI et

al., 2016). Als Vertreter dieser proinflammatorischen Zytokine wurden in der vorliegenden Arbeit die Spiegel an TNF α bestimmt.

So kann ebenfalls die Injektion von A β ₄₂ eine Zunahme der TNF α -Expression und oxidativen Veränderungen in dem MPFK und Hippokampus hervorrufen. Induziert werden negative Auswirkungen auf das Lernen, das Gedächtnis und die Regulierung des neuronalen Todes im ZNS. Es ist einer der frühesten Mediatoren im neurodegenerativen Prozess (MEDEIROS et al., 2007). So konnten auch wir in unserer Studie einen TNF α -Nachweis in beiden Hirnregionen führen, aber keine Unterschiede in den Proteinkonzentrationen der einzelnen Gruppen nachweisen. Im Hippokampus war keine Signifikanz nachweisbar ($p > 0.05$) und im MPFK war die Proteinkonzentration von TNF α nach A β ₄₂-Injektion an den Tagen 10, 12 und 16 aufgrund der geringen Probenanzahlen statistisch nicht auswertbar. Dies ist als eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit zu sehen und sollte als Konsequenz beachtet und verbessert werden.

SONG et al. (2001) zeigte, dass die ICV-A β ₁₋₄₂-Injektion bei Mäusen zu einer zeitnahen TNF α -Protein-Expression führt, welche aber bereits nach 72 h wieder auf den Basalwerte zurückkehrt. Da TNF α in unserer Studie an den Analysetagen 8, 10, 12 und 16 nach Injektion von A β ₄₂ gemessen wurde, ist es wahrscheinlich, dass es bis zu diesen Zeitpunkten schon wieder abgesunken war. Dies deutet darauf hin, dass das durch A β ₄₂ induzierte und gebildete TNF α genauso wie das lösliche A β wieder relativ schnell abgebaut wird und könnte die fehlenden Unterschiede erklären. Insgesamt wäre es optimal gewesen von allen Markern vorher einen Basalwert zu bestimmen, um einen besseren Vergleich hinsichtlich der Veränderungen über den gesamten Zeitraum zu haben. Dies war im Rahmen dieser Studie jedoch nicht möglich. Die Erkenntnisse könnte aber zur Optimierung zukünftiger Untersuchungen genutzt werden. Auch sollten andere, langlebigere Entzündungsparameter als TNF α bzw. gleich spezifische Marker für zukünftige Analysen in dem untersuchten Versuchszeitraum genutzt werden. Dafür bieten sich bspw. das ionisierte Calcium-bindendes Adaptermolekül 1 (Iba-1), das saure Gliafaserprotein (GFAP von engl. glial fibrillary acidic protein) oder das polysialylierte neuronale Zelladhäsionsmolekül (PSA-NCAM) an (QUARTU et al., 2008; ZUSSY et al., 2013).

Anhand der Bestimmung dieser Parameter (Caspase 3, Tau und TNF) scheint es sinnvoll einen Startzeitpunkt um den Tag 4 zu wählen. TNF entfällt als Marker, da es zu diesem

Zeitpunkt länger nicht mehr nachweisbar ist. Tau und Caspase 3 sind in diesem Zeitfenster jedoch signifikant verändert.

3.3.2.2. Messung der A β ₁₋₄₂-Konzentration mittels ELISA

Wir verwendeten einen sensitiven Human-A β ₄₂-ELISA-Kit mit einem primären und sekundären monoklonalen Antikörper. A β ₄₂ selbst verteilt sich nach einer ICV-Injektion im Gehirn und kann so in verschiedenen Hirnarealen nachgewiesen werden (BARGHORN et al., 2005; ZUSSY et al., 2013).

Zusammenfassend dokumentierten unsere Daten im mHBT, eine klare Schwäche der A β ₄₂-Tiere u.a. bei der Erkennung markierter Zylinder (*Wrong Choices* und *Wrong Choices total*), was auf eine Störung des deklarativen Gedächtnisses unserer Mäuse nach ICV-A β ₄₂-Injektion hindeutet. Ebenso publizierten weitere Autoren wie u.a. XU et al. (2018), dass die Injektion von A β ₄₂ in den Hirnventrikel verschiedene Hirnregionen einschließlich Hippokampus und Kortex beeinträchtigen und dadurch sowohl Kurzzeit- als auch LZG-Prozesse beeinträchtigt werden können. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine experimentell induzierte Amyloid Pathologie selektive kognitive Defizite induziert. A β hat somit eine wesentliche Rolle in der MA-Ätiologie, da induziert durch synaptische Dysfunktion in Folge der ICV-A β ₄₂-Injektion (akute Anstieg des A β -Spiegels im Gehirn) die Entwicklung von Alzheimer-ähnlichen Phänotypen ermöglicht wird (FORNY-GERMANO et al., 2014; KIM et al., 2016). LI et al. (2018) belegte ebenfalls, dass die kürzeren Formen von A β -Proteinen (einschließlich A β ₁₋₃₇ - A β ₁₋₃₉) jeweils eine viel geringere Synaptotoxizität als längere A β -Proteine (A β ₁₋₄₂ - A β ₁₋₄₆) zeigten. Dennoch konnten wir keine menschlichen A β ₁₋₄₂-Monomere in den Hirnarealen der Mäuse an den Tagen acht, zehn, zwölf und sechzehn durch den ELISA bestätigen. Dies könnte der Sensitivität des Testes, der kurzen Präsenz von löslichem A β ₄₂ im Gegensatz zu über Jahre angereicherten Konzentrationen bei MA und der somit geringeren Proteinmenge unserer Proben geschuldet sein. Ein weiterer zentraler Punkt von löslichem A β ergibt sich u.a. aus der Arbeit von MUCKE et al. (2000) welche darstellt, dass sich weit vor der Ablagerung von unlöslichem A β in Maushirnen eine kognitive Beeinträchtigung entwickelt. Daraus ergibt sich das eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität und somit eine selektive Blockierung der Hippokampus-Langzeitpotenzierung nachgewiesen werden kann, bevor sich A β -Plaques in Mausmodellen von MA ablagert (LI et al., 2018). Dies könnte erklären, warum die Tiere bereits kognitive Defizite aufwiesen, obwohl noch keine A β ₄₂ nachweisbar war. Ebenfalls nachteilig kann sich die Tatsache auswirken, wie schon

YANG et al. (2014) belegte, dass sich in den Proben von MA- und Kontrollgehirnen 1000-fach höhere Konzentrationen an A β O als -Monomere befanden. Die vorherige Proteinaufbereitung unserer Proben mittels dem sog. Sample Grinding Kit enthält eine Extraktionslösung mit Bestandteilen (Lysepufferlösung, Complete, PMSF und Pepstatin) die exakt dem Ausfällen, der Instabilität oder der Spaltung der enthaltenen Proteine entgegenwirkt. D.h. würden in unseren Proben ebenfalls mehr Oligomere vorliegen, wären diese gegebenenfalls nicht nachweisbar, da die meisten bisher verfügbaren A β -ELISAs zum Nachweis von Monomeren entwickelt wurden. Zudem macht es die intrinsische Natur von A β -Peptiden, insbesondere von A β ₄₂, sich in wässrigen Lösungen schnell zu einer Vielzahl von polymerisierten Strukturen zu aggregieren (einschließlich Oligomere, Protofibrillen und Fibrillen), fast unmöglich, die beobachteten neuropathologischen Veränderungen auf die Wirkungen eines spezifischen A β -Monomer oder Multimer zurückzuführen (STINE et al., 2003). Berücksichtigt man alle diese strukturellen A β -Variationen und die Komplexität derselbigen, wird zunehmend klar, dass lediglich ein Antikörper nicht ausreicht, um alle möglichen pathologischen Aggregate von A β , die zu MA beitragen, zu untersuchen. Somit werden konformationsspezifische A β -Antikörper unverzichtbar für die Zukunft der Alzheimer-Forschung. Diese Erkenntnis sollte für zukünftige Studiendesigns berücksichtigt werden.

Für eine vollständige Bewertung der pathophysiologischen Beziehung zwischen der A β ₄₂-Injektion in den lateralen Ventrikel und den kognitiven Defiziten wäre es womöglich aussagekräftiger gewesen, den Proteingehalt auch während des neurologischen Tests zu bestimmen. Das primäre Ziel unserer Studie war es aber, kognitive Defizite nach der A β ₄₂-Injektion zu bestimmen. So konnten wir keine Analyse vor dem Ende des mHBT durchführen. Dies wäre allerdings interessant für zukünftige Studien, wobei in diesem Fall auch der Stress zum Handeln der Tiere und die Effekte der Entnahme von Hirnflüssigkeit und damit potenziellen Verfälschungen von Testwerten u.a. durch damit einhergehende Übelkeit, berücksichtigt werden müssten. Trotz dieser Nachteile beweisen die ersten Anzeichen von kognitiven Defiziten unserer Mäuse das Vorhandensein und die toxische Wirkung des ICV-injizierten A β ₄₂.

3.4. Postanalytische Probenbehandlung

Die histologische Untersuchung der Gehirne von 10 Kontrolltieren wurde zur Absicherung der Methode herangezogen um:

- den genauen Sitz der implantierten Führungskanüle im Ventrikel zu prüfen

- einen zusätzlichen Nachweis des A β ₄₂ in Form von Plaques in den Hirnarealen zu erbringen.

3.4.1. Kontrolle der Implantat Tiefe mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE- Färbung zählt zu den Hauptfärbungen in der Histopathologie und stellt die am häufigsten verbreitete Routinefärbemethode in der medizinischen Diagnostik für einen Überblick über Zellkerne und zytoplasmatische Bestandteile sowie in unserem Fall über das Ausmaß einer neuronalen Schädigung dar (CARDIFF et al., 2014).

Um eine Übersicht über die Struktur und Morphologie auch von neuronalem Gewebe zu bekommen, nutzten wir die HE-Färbung als Standardmethode. Sie diente hauptsächlich dazu, unsere angewandte Methode der Implantation auf mikroskopischer Ebene zu kontrollieren und die gewünschte und nötige Eindringtiefe bis in den lateralen Ventrikel abzusichern. Die HE-gefärbten Gehirnschnitte wurden hinsichtlich einer Gewebeschädigung und die Tiefe, bis in der diese reicht, unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung ermittelt. Bei allen sechs verwendeten Kontrolltieren konnte eine ausreichende Eindringtiefe dokumentiert werden, was neben der Toluidinblau Färbung nochmals die Eignung der verwendeten Methode bestätigt.

Nach der Implantation der Führungskanüle zeigen die Präparate natürlicherweise eine massive Schädigung des Gewebes und dessen Verbandes im Bereich des Kanülen Kanals. Somit kann trotz der Bemühung, den möglichen Effekt der implantierten Kanüle durch eine 14-tägige Regenerationszeit zu minimieren, dessen Einfluss auf das kognitive Verhalten nicht vollständig ausgeschlossen werden. Leider war es wegen dem geringen Probenmaterial, begrenzt durch die Größe eines Maushirnes und den zahlreichen vorangegangenen wichtigen Untersuchungen (Schnitte für Plaque Färbungen, Aufbereitung für ELISA, WB) nicht möglich weitere Färbungen für die genauere Differenzierung oder zusätzliche Bestätigung der apoptotisch geschädigten Zellen durchzuführen. Da aber eine eventuelle Schädigung auch die Kontrollgruppe der PBS-behandelten Tiere betreffen würde, kann dieser Faktor durch Vergleich mit ebenjener Gruppe weitestgehend ausgeschlossen werden.

3.4.2. Färbung mittels Methoxy-X04-Lösung

A β ₄₂ verteilt sich im Gehirn nach einer Injektion in den Ventrikel und kann so in verschiedenen Hirnarealen nachgewiesen werden (BARGHORN et al., 2005). Zur Visualisierung und Quantifizierung dieser Amyloid-Plaques wird die Methoxy-X04-Färbung als Standardtechnik verwendet (KLUNK et al., 2002).

Es besteht kein Zweifel, dass eine fortschreitende A β -Akkumulation zu MA beiträgt (Zussy et al., 2013). Viele Studien lieferten aber auch eindeutige Beweise dafür, dass in sehr frühen Stadien von MA strukturelle hippokampale Anomalien / kognitive Defizite in Mausmodellen auftreten und dies weit vor dem Nachweis unlöslicher Amyloid Aggregate / dem Vorhandensein von Plaques, infolge einer Plaque unabhängigen A β -Toxizität (MOECHARS et al., 1999; MUCKE et al., 2000). Das würde konkret bedeuten, dass die Aggregatbildung vom absoluten A β ₄₂-Spiegel aber auch vom Verhältnis zwischen A β ₁₋₄₂ zu A β ₁₋₄₀ abhängt. Andererseits ist aber auch eine kritische A β ₄₂-Konzentration in den entsprechenden Gehirnregionen für diese Entwicklung erforderlich. Insofern zeigt die wechselseitige Beziehung zwischen der A β -Gesamtmenge im menschlichen Gehirn und dem kognitiven Rückgang, dass die MA-Progression besser mit biochemisch nachgewiesenem A β als mit der histologisch bestimmten Plaque Anzahl korreliert (HAASS und SELKOE, 2007; ZUSSY et al., 2013). Unter anderem weisen auch transgene APP-Mäuse einen kognitiven Rückgang vor der Plaquebildung auf. Tatsächlich ist es möglich, dass extrazelluläre Amyloid Ablagerungen nur ein Aspekt der größeren pathologischen MA-Kaskade sind (WATSON et al., 2005). Denn bei einem nicht durch Injektion von A β induziertem MA kommt es zu einer langsamen Anhäufung von Aggregaten im Laufe des Lebens der Betroffenen. Das Injektionsmodell jedoch ist eine akute Akkumulation des Peptids, die bei den Versuchstieren oft in den durchgeführten Zeitspannen keine Aggregate bilden (FABBRO et al., 2011). Diese Erklärung legt nahe, warum wir bei den A β ₄₂-Gruppen keine Plaques nachweisen konnten. Somit entspricht es den Erwartungen und war ein mögliches und wahrscheinliches Ergebnis des frühen MA-Modells.

Zur Verbesserung der Ergebnisse wäre es besser gewesen, A β ₄₂ und den Proteingehalt auch schon während und nicht nur nach dem mHBT zu bestimmen, um die pathophysiologische Beziehung zwischen den kognitiven Defiziten und der Injektion im lateralen Ventrikel uneingeschränkt vollständig zu bewerten. Aufgrund des Studiendesigns (das primäre Ziel war es kognitive Defizite nach A β ₄₂-Injektion zu bestimmen) konnten wir jedoch keine Analysen vor dem Ende des mHBT durchführen. Eine Serie von Blutprobenentnahmen oder andere Analyseverfahren, hätten die neurokognitiven Tests beeinflussen können. Dies kann als eine Einschränkung der vorliegenden Arbeit angesehen werden und könnte in weiteren Studien detaillierter untersucht werden. Nichtsdestotrotz liefert die durchgeführte Arbeit wertvolle

Erkenntnisse zum Verlauf von Verhaltens-, Motorik- und Kognitionstests in der Frühphase des weitverbreiteten ICV-A β ₄₂-Injektion Mausmodells des frühen MA.

4. Abschließende Betrachtung und Ausblicke

Das Hauptaugenmerk der Studie lag auf der Untersuchung der Kognition, des Verhaltens und der motorischen Funktion über acht, zehn, zwölf und sechzehn Tage nach A β ₁₋₄₂-Injektion in den lateralen Ventrikel bei Mäusen des ICV-A β ₄₂-Injektion Mausmodells des frühen MA. Dabei ermöglicht diese ICV-Injektion neben der Untersuchung akuter Auswirkungen auf die kognitive Funktion auch die Auswertung der zellulären Pathologie. Zusätzlich sollten durch abschließende molekularbiologische und histologische Untersuchungen die erhaltenen Befunde mit den histologischen Daten und identifizierten charakteristischen Markern korreliert werden.

Da der Hirnventrikel durch den CSF ein kommunizierendes Netzwerk von Hohlräumen ist, haben schon andere Studien gezeigt, dass die Injektion von A β ₁₋₄₂ in diese Stelle ein zuverlässiges Modell für MA darstellt (XU et al., 2018). Speziell bei Mäusen führt die A β -Injektion schnell zu einer reduzierten kognitiven Funktion (MORRONI et al., 2016). Wobei die Daten mit löslichem A β bei einmaligen Injektionen von sofortigen Wirkungen (BALDUCCI et al., 2010; DINELEY et al., 2010) bis über mehrere Wochen (ZUSSY et al., 2013) oder teilweise Monate (XU et al., 2018) andauern. Dies sind aber meist Versuche mit Mehrfachinjektion von A β . Bei einer einmaligen ICV-A β ₄₂-Injektion in den lateralen Ventrikel sind wir von Beginn an davon ausgegangen, dass eher ein subtiles Ergebnis zu erwarten ist. Mit zurückhaltend ausgeprägten Symptomen der Versuchstiere nach einer Wartezeit von eins, zwei, vier und acht Tagen und dies teilweise auch vor der Plaque-Ablagerung im Gehirnparenchym (MUCKE et al., 2000). Es konnte bestätigt werden, dass eine A β ₄₂ injizierte Kaskade von Ereignissen ausgelöst wird, die den bisher beschriebenen, neuropathologischen Kennzeichen eines frühen MA, das Vergessen von kürzlich erlernten Informationen, ähnelt. Symptomatisch konnte eine kognitive Beeinträchtigung der behandelten Tiere festgestellt werden, die sich in Form einer Störung des deklarativen Gedächtnisses äußerte (Defizit in den Parametern *Wrong Choices* und den *Wrong Choices total*). Andere neurokognitive Parameter des Arbeitsgedächtnisses oder der kognitiven Gesamtleistung waren zwischen den A β ₄₂- und PBS-Gruppen vergleichbar. Trotz dieser signifikanten Beeinträchtigungen im Bereich der Kognition, zeigten sich im Angstverhalten, bei der Grob- und Feinmotorik sowie bei der direkten explorativen Motivation und Erregung kaum Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die pathologischen Kennzeichen eines von der häufigsten altersbedingten neurodegenerativen Erkrankung, des MA, betroffenen Gehirns sind die extrazellulär zu sog. senilen Plaques, akkumulierten Amyloid-Beta (A β)-Peptide und die intrazelluläre Akkumulation von Tau-Protein in neurofibrilläre Bündel (NFTs). Und obwohl es heutzutage keinen Zweifel mehr gibt, dass Ihre Anwesenheit zur Alzheimerpathologie beiträgt und bezeichnend ist, konnten wir keine Plaque-Bildung im Hippokampus oder in einem anderen Hirnbereich detektieren. Bekanntermaßen bedingen es eine kritische A β ₄₂-Konzentration und einen entsprechenden Zeitraum, bis sich nach beginnenden kognitiven Defiziten unlöslicher Amyloid Aggregate nachweisen lassen (MOECHARS et al., 1999; MUCKE et al., 2000; LI et al., 2018). Tatsächlich vermuten wir durch die einmalige Applikation von A β ₁₋₄₂ eher eine möglicherweise großräumige A β -induzierten synaptischen Dysfunktion/Toxizität einhergehend mit oxidativem Stress und beginnender Zell Apoptose. Denn das Vorhandensein der extrazellulären Plaques und der intrazellulären Bündel ist nicht spezifisch für MA und dennoch begleiten der Verlust von Synapsen und der neuronale Tod grundsätzlich die beiden charakteristischen Kennzeichen (PARK et al., 2020). Synapsen spielen eine unverzichtbare Rolle in der neuronalen Netzwerkfunktion über ihre Freisetzung und Aufnahme von Neurotransmittern zwischen den Neuronen (GILLINGWATER und WISHART, 2013). Infolgedessen nimmt man an, dass eine Funktionsstörung oder ein Verlust von Synapsen maßgeblich beteiligt ist an den kognitiven Beeinträchtigungen, die bei MA beobachtet werden und frühzeitige Veränderungen in der Pathophysiologie der Krankheit darstellen (PARK et al., 2020). Sollten aber in zukünftigen Studien deutlichere Symptome erwünscht oder gefordert sein, so muss womöglich auf Mehrfachinjektionen oder noch aggressive Varianten des körpereigenen Proteins Amyloid-Beta (wie das Pyroglutamat-modifiziertes Amyloid-(A β pE3) oder das nitrierte A β (3NTyrA β), zurückgegriffen werden, um mehr differenzierte und deutlichere Effekte zu erzielen. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen mit Hilfe histologischer und weiterer biochemischer Methoden vonnöten. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit könnte einige Ansatzpunkte für weitere Studiendesigns bereitstellen.

Unsere Daten deuten auf einen passenden Untersuchungszeitpunkt für den mHBT zwischen den Tagen zwei bis zwölf nach A β ₁₋₄₂ ICV-Applikation. Dieser Zeitraum dehnt sich teilweise bis Tag sechzehn aus, flacht hier aber schon wieder ab. Somit konnten oben genannten Ergebnisse anderer *in vivo* Studien belegt werden. Als

mögliche Ursachen zeigten sich in der Analyse der Demenzmarker erhöhte Caspase 3-Spiegel mit einem Peak am Tag zehn nach A β ₄₂-Injektion. Einem folgendem signifikanten Abfall auf Tag sechzehn, sowie die Freisetzung von entzündlichen Zytokinen in Form eines TNF α -Nachweises. Die Tiere der Gruppe 4/A β ₄₂ (Start 4 Tage nach Injektion) zeigten die auffälligste Entwicklung der Verhaltensparameter und zu diesem Zeitpunkt die jeweils Höchste Konzentration des oben genannten Marker mit anschließendem Abfall auf. Obwohl die genauen Mechanismen der kognitiven Dysfunktionen immer noch unklar sind, zeigen die nachgewiesenen Änderungen in dem Level von Caspase 3 die entscheidende Rolle der Apoptose in den pathophysiologischen Prozessen von MA. Caspase 3 ist ein bekannter Biomarker von durch oxidativen Stress induziertem Zelltod. Setzt man zu dem noch die Level an zerebralem Tau, einem Indikator für hippokampale Atrophie und neuronaler Degeneration gleich, lässt sich daraus schließen, dass diese Konzentration unsere Verhaltensänderungen im mHBT bedingen. Denn nachweislich wird durch eine A β -Injektion eine Entzündungsreaktion induziert, welche einen massiven und schnellen oxidativen Stress in der ersten und zweiten Woche nach ICV-Injektion beobachten lässt (ZUSSY et al., 2013; CHEIGNON et al., 2018). Der apoptotische Weg ist beschrieben als Beteiligung an der Toxizität von A β Os (MORRONI et al., 2016). Und auch ein Anstieg der Tau-Phosphorylierung bis zu vier Wochen nach ICV-A β O-Injektion wurden bereits nachgewiesen und zeigen das Zusammenwirken der toxischen Eigenschaften von A β Os und Tau, welche sich möglicherweise gegenseitig verstärken (WANG et al., 2012; CHEN und MOBLEY, 2019).

Insbesondere unterstreicht diese Studie, dass der mHBT als einfaches, aber zuverlässiges TM ein gültiges Werkzeug für die Untersuchung und Analyse von A β -Peptiden-vermittelten akuten, aber milden neurotoxischen Effekten sein kann. Wir konnten zeigen, dass die intrazerebroventrikulär A β ₁₋₄₂-Injektion viele ähnliche Eigenschaften aufweist wie das Gehirn von Alzheimererkrankten. Zusammenfassend simuliert diese *In-vivo*-Studie mit A β ₄₂ die frühen kognitiven Defizite, die mit der menschlichen Krankheit vergleichbar sind. Einher geht dieser Schritt vermutlich mittels Zell Apoptose, eine durch oxidative Stress-induzierte DNA-Schädigung. Gleichzeitig werden die Defizite der kognitiven Tests nicht durch Änderungen im Verhalten der Mäuse überlagert. Die deutlichen Unterschiede im Parameter *Wrong Choices* zu den Kontrolltieren können in zukünftigen Studien die Beurteilung der therapeutischen Effekte erleichtern.

Bereits sehr früh nach der Injektion (im Vergleich zu Monaten bis Jahre bei anderen TM) können Veränderungen ermittelt werden (schnelle Reproduzierbarkeit kognitiver Defizite). Das stellt den entscheidenden Vorteil dieses Modells dar. Zudem können tier-, zeit- und kostenschonende Analysen durch Vermeidung der Zucht von transgenen Tieren ermöglicht werden. Der genutzte mHBT erfasst standardisierte und dazu noch eine Vielzahl von Parametern in einem Testansatz. Der Test selbst ist verhältnismäßig einfach in der Durchführung, reproduzierbar und beruht auf dem spontanen Verhalten der Tiere, ohne dass Stresselemente wie Futter- und Wasserentzug oder elektrische Impulse erforderlich sind. Da die Beeinträchtigung der Lern- und Gedächtnisleistung vom Beginn der kognitiven Tests über den gesamten Testzeitraum vorhanden war, ist es unnötig bis Tag acht mit dem Start des mHBT zu warten. Dies hat zum einen große tierschutzrechtliche Relevanz, wenn die Versuchstiere nicht unnötig mehr Zeit in den Versuchen verbringen müssen. Ebenso ist dies aus kostentechnischer Sicht zu bedenken, sowohl bei der Anschaffung der Tiere als auch bei deren Unterbringung. Somit kann unser Modell helfen, den Effekt neuer neuroprotektiver Therapien in solch frühen Stadien der Krankheit abzuschätzen. Und unterstützt das Screening von Arzneimitteln, die die anfänglichen pathologischen Ereignisse im Zusammenhang mit MA verändern können, die auftreten, bevor ausgedehnte Verhaltensänderungen offensichtlich werden. Somit lässt sich zum primären Ziel der Studie, die Optimierung des Modells hinsichtlich des Beginns der Verhaltenstests nach Injektion Folgendes sagen: mit einem Startzeitpunkt an Tag 2 bis 4 nach A β 42-ICV-Injektion können bereits Test stattfinden, um solide Ergebnisse zu erhalten. In diesem Zeitraum weisen die Tiere folgende Beeinträchtigungen auf:

- symptomatisch (*Wrong Choices* der Gruppen 1/A β 42, 2/A β 42 und 4/A β 42, *Wrong Choices total* alle A β 42-Gruppen und *Boli* die 4/A β 42-Gruppe Signifikanz zur PBS-Gruppe)
- Biomarker Veränderungen (Signifikanz der Proteinkonzentrationsänderung im Hippokampus von Tau am Tag 12 zu Tag 16 und von Caspase 3 am Tag 10 zu Tag 16)
- messbare, fein strukturierte Störungen der kognitiven Leistung, mit Defiziten im deklarativen und räumlichen Gedächtnis.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Effekt der intrazerebroventrikulären Injektion von Amyloid-Beta auf Kognition, Verhalten und motorische Fähigkeiten in einem Maus-Modell des frühen Morbus Alzheimer.

Das primäre Ziel unserer Studie war es, den zeitlichen Verlauf von löslichem A β ₄₂-induzierten kognitiven- und Verhaltensänderungen v.a. in der Frühphase beim ICV A β ₄₂-Injektions-TM der Maus weiter zu charakterisieren. Hierfür wurden männliche C57BL/6N Mäusen gleichen Alters randomisiert auf drei Gruppen (und 9 Untergruppen) verteilt. Der chirurgische Eingriff erfolgte unter Anästhesie und beinhaltete das Setzen der 23 G-Führungskanüle in den lateralen Gehirnvtrikel im stereotaktischen Rahmen, gefolgt von einer Regenerationszeit von 14 Tagen. Je nach Gruppenzugehörigkeit erhielten 24 Tiere im Anschluss eine A β ₄₂-Lösung und 24 weitere eine PBS-Lösung injiziert. Die dritte Gruppe bestand aus 6 nativen Mäusen ohne jeglichen chirurgischen Eingriff, die 21 Tage nach Ankunft den Verhaltenstest absolvierten. Die neurokognitiven Funktionen wurde mit dem Testprinzip des mHBT täglich vom 1. bis einschließlich 16. Tag nach ICV-Injektion getestet. Je nach Untergruppe (n = 6) mit Beginn einen, zwei, vier oder acht Tage nach der Injektion. Nach dem acht Tage dauernden Verhaltenstest wurden allen Tieren der Versuchsgruppen am letzten Testtag anästhesiert, *Liquor* entnommen und sie danach durch Dekapitation euthanasiert, die Gehirne entnommen und tiefgefroren. Hirnsegmente von Hippokampus und MPFK wurden zur Bestimmung auf A β ₄₂ mittels eines Human-A β ₄₂-ELISA-Kits untersucht. Im WB-Verfahren wurden die Konzentrationen spezifischer Biomarker (Caspase 3, Tau, P-Tau und TNF α) geprüft.

Die Ergebnisse zeigten, dass die mit A β ₄₂ behandelten Tiere eine Beeinträchtigung der kognitiven Leistung (*Wrong Choices* + *Wrong Choices total*) über den Testzeitraum hinweg aufwiesen. Wir beschreiben also ein Einfaches, aber zuverlässiges und v.a. zeitsparendes Mausmodell, welches durch die Stimulation mit A β ₄₂ ein frühes Ereignis im MA-Prozess, eine Verschlechterung der Lern- und Gedächtnisprozesse, simuliert. Diese frühen kognitiven Defizite ähneln einer frühzeitig beginnenden menschlichen Alzheimersymptomatik und werden vermutlich mittels Zell Apoptose hervorgerufen. Alle anderen neurokognitiven (angst- und motivationsgesteuerte Parameter), motorischen (lokomotorische Aktivität und Feinmotorik) und Verhaltensparameter (zielgerichtetes oder ungerichtetes Erkundungsverhalten und Erregung) waren

vergleichbar zwischen den Gruppen. Entgegen vorbestehenden Annahmen war die Injektion mit A β nicht mit vermehrter Angst assoziiert, womit der kognitiven Tests nicht durch Änderungen im Verhalten der Mäuse überlagert wurde. Die deutlichen Unterschiede im Parameter *Wrong Choices* zu den Kontrolltieren können in zukünftigen Studien die Beurteilung der therapeutischen Effekte erleichtern.

Die Konzentration von Tau, P-Tau sowie TNF α -Werte zeigten zwischen den Versuchsgruppen keinen Unterschied bzw. konnten teilweise nicht analysiert werden. Im Vergleich zu den PBS-Gruppen war der Caspase 3-Spiegel am Tag 10 nach A β ₄₂-Injektion verglichen mit Tag 16 erhöht. Dies lässt vermuten, dass frühzeitige Zell Apoptose im vorliegenden Modell erfolgt ist: es konnte eine geringfügige Neurotoxizität von A β ₄₂ gezeigt werden. An den jeweils letzten Tag des Verhaltenstests konnten keine A β ₁₋₄₂-Monomere in den Hirnarealen der Mäuse nachgewiesen werden. Mittels Methoxy-04-Färbung konnte erwartungsgemäß keine Aggregat-Bildung im Hippokampus oder in einem anderen Hirnbereich nachgewiesen werden. Dies stützt die These, dass strukturelle und funktionelle Neuronen Defizite der extrazellulären Amyloid-Plaque-Bildung vorausgehen, A β ₄₂ auch plaqueunabhängig synaptotoxisch ist und bereits frühzeitig subtile klinische und biochemische Veränderungen induziert (MUCKE et al., 2000).

Durch die in der vorliegenden Arbeit stattgefundene Untersuchung der Startzeitpunkte für die Verhaltenstests lässt sich das bestehende MA-Modell weiter präzisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Tests bereits an Tag 2 bis 4 nach A β ₄₂-ICV-Injektion stattfinden können, um solide Ergebnisse zu erhalten und gleichzeitig tier- und kostenschonend zu arbeiten. Folglich wird das Mausmodell nach weiterer Charakterisierung ein valides Instrument zur Untersuchung von MA sein und kann einen neuen, schnelleren Weg zur Entwicklung neuroprotektiver Therapien für das Frühstadium der Krankheit darstellen.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden an folgenden Stellen vorgestellt, veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

SCHMID, S., JUNGWIRTH, B., GEHLERT, V., BLOBNER, M., SCHNEIDER, G., KRATZER, S., KELLERMANN, K. & RAMMES, G. 2017. Intracerebroventricular injection of beta-amyloid in mice is associated with long-term cognitive impairment in the modified hole-board test. *Behav Brain Res*, 324, 15-20.

VII. SUMMARY

Effect of intracerebral ventricular injection of amyloid-beta on cognition, behaviour and motoric abilities in a mouse model of early-stage of *Morbus Alzheimer*.

The primary goal of this study was to characterize the temporal progression of cognitive and behavioural changes induced by soluble A β ₄₂, particularly in the early stage of ICV A β ₄₂-injection Animal model of mice. For that, male C57BL/6N mice of same age were assigned to 3 randomized groups (and 9 sub-groups). The medical surgical intervention took place under anaesthesia and was made in a stereotactic frame to placed the 23 G-guide cannula in the lateral cerebral ventricle, followed by 14 days of recovery. Depending on the group assignment, 24 animals were injected with A β ₄₂ solution and 24 more a PBS solution, respectively. The third group contained 6 control mice without surgical treatment which took the behaviour test 21 days after arrival. The neurocognitive functions were tested employing the principles of the mHBT daily from the 1st to the 16th day after the ICV injection. Depending on the subgroup (n = 6) starting one, two, four or eight days after the injection. After the test, which lasts for 8 days, a liquor sample was taken from every animal under anaesthesia on the last day of the test. Subsequently, the individuals were euthanized by decapitation and the cerebrum was extracted and frozen stored. To test cerebral segments of hippocampus and MPFK for A β ₄₂ a human A β ₄₂ ELISA kit was used. The concentrations of specific bio markers (caspase 3, tau, p-tau, and TNF α) were examined by Western Blot.

The results show that the animals treated with A β ₄₂ exhibit impaired cognition (*wrong choices* + *wrong choices total*) and thus deficiencies in the declarative and spatial memory during the test. So, we describe a simple, but reliable and most of all timesaving mouse model that which simulates an early event in the process of *Morbus Alzheimer* namely deterioration of learning and memory processes, by a treatment with A β ₄₂. These early cognitive deficits resembled early onset human Alzheimer's symptoms and are likely caused by cell apoptosis. All other neurocognitive (parameters controlled by fear and motivation), motoric (locomotive activity and fine motor skills), and behavioural parameters (target-oriented or undirected explorative behaviour and excitement) were comparable among the groups. Contrary to previous assumptions, the injection with A β ₄₂ was not associated with increased anxiety, so that the cognitive test was not overlaid by changes in the behaviour of the mice. The clear differences between the parameter *Wrong Choices* and the control animals can facilitate the assessment of the therapeutic effect in future studies.

The concentration of tau, p-tau, and TNF α exhibited no differences among the groups or could not be analysed in some cases. Compared to the PBS group the caspase 3 levels on day 10 after A β ₄₂ injection was higher than on day 16. This indicates the presence of early cell apoptosis in the investigated model: a slight neurotoxicity of A β ₄₂ could be demonstrated. On the last day of the behavioural test no A β ₁₋₄₂ monomers were found in the cerebral sections of the mice. Confirming the expectations, no plaque was found in the hippocampus or other cerebral regions by methoxy-04 staining. This supports the hypotheses that structural and functional neuronal deficiencies predate the extracellular amyloid plaque formation, that A β ₄₂ is synaptotoxic independent of plaque formation and early on induces subtle clinical and biochemical degenerations (MUCKE et al., 2000).

The conducted examination of the onset times of the behavioural tests allows further specification of the current model of *Morbus Alzheimer*. The conducted examination of the onset times of the behavioural tests allows further specification of the current model of *Morbus Alzheimer*. It has been shown that tests may begin as early as day 2 after the A β ₄₂-ICV injection to get solid results which are also be cost-saving and animal friendly. Consequently, this mouse model will be, after further characterization, a reliable instrument to investigate *Morbus Alzheimer* and it might represent a novel and faster way to develop neuroprotective therapies for the early stage of the disease.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* 1907; 64: 146-8.
- Amieva H, Mokri H, Le Goff M, Meillon C, Jacqmin-Gadda H, Foubert-Samier A, Orgogozo JM, Stern Y, Dartigues JF. Compensatory mechanisms in higher-educated subjects with Alzheimer's disease: a study of 20 years of cognitive decline. *Brain* 2014; 137: 1167-75.
- Amoroso N, La Rocca M, Bruno S, Maggipinto T, Monaco A, Bellotti R, Tangaro S. Multiplex Networks for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 2018; 10: 365.
- Anastasiou CA, Yannakoulia M, Kosmidis MH, Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Sakka P, Arampatzi X, Bougea A, Labropoulos I, Scarmeas N. Mediterranean diet and cognitive health: Initial results from the Hellenic Longitudinal Investigation of Ageing and Diet. *PLoS One* 2017; 12: e0182048.
- Andreadis A. Tau splicing and the intricacies of dementia. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1220-5.
- Arndt SS, Laarakker MC, van Lith HA, van der Staay FJ, Gieling E, Salomons AR, van't Klooster J, Ohl F. Individual housing of mice--impact on behaviour and stress responses. *Physiol Behav* 2009; 97: 385-93.
- Atkinson RC, Shiffrin RM. Human Memory: A Proposed System and its Control Processes1. In: *Psychology of Learning and Motivation*. Kenneth WS, Janet Taylor S, eds.: Academic Press 1968: 89-195.
- Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, Boza-Serrano A. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci*. 2018; 12: 488.
- Baddeley A. The fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13468-72.
- Baddeley A. The episodic buffer: a new component of working memory? *Trends Cogn Sci* 2000; 4: 417-23.
- Baddeley AD, Hitch G. Working Memory. In: *Psychology of Learning and Motivation*. Gordon HB, ed.: Academic Press 1974: 47-89.
- Baddeley AD, Hitch GJ, Allen RJ. From short-term store to multicomponent working memory: The role of the modal model. *Mem Cognit* 2018;
- Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2295-300.
- Balducci C, Frasca A, Zotti M, La Vitola P, Mhillaj E, Grigoli E, Iacobellis M, Grandi F, Messa M, Colombo L, Molteni M, Trabace L, Rossetti C, Salmona M, Forloni G. Toll-like receptor 4-dependent glial cell activation mediates the impairment in memory establishment induced by beta-amyloid oligomers in an acute mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun* 2017; 60: 188-97.
- Balleza-Tapia H, Huanosta-Gutierrez A, Marquez-Ramos A, Arias N, Pena F. Amyloid beta oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner. *Curr Alzheimer Res* 2010; 7: 453-62.
- Barber RC. Biomarkers for early detection of Alzheimer disease. *The Journal of the American Osteopathic Association* 2010; 110: 10-5.

- Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H. Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2005; 95: 834-47.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC, Dominantly Inherited Alzheimer N. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2012; 367: 795-804.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010; 23: 213-27.
- Bennett DA, Schneider JA, Wilson RS, Bienias JL, Arnold SE. Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Arch Neurol* 2004; 61: 378-84.
- Bertrand J, Plouffe V, Sénéchal P, Leclerc N. The pattern of human tau phosphorylation is the result of priming and feedback events in primary hippocampal neurons. *Neuroscience* 2010; 168: 323-34.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McLaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 2005; 45: 675-88.
- Birbaumer N, Schmidt FR. Lernen und Gedächtnis. In: *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Schmidt FR, Lang F, Heckmann M, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2011: 201-17.
- Blondell SJ, Hammersley-Mather R, Veerman JL. Does physical activity prevent cognitive decline and dementia?: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *BMC Public Health* 2014; 14: 510.
- Bloom GS. Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* 2014; 71: 505-8.
- BMEL. Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2015. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2016; 01.12.16: http://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?notFirst=false&docId=8596776#doc8596776bodyText1.
- Boeddrich A, Haenig C, Neuendorf N, Blanc E, Ivanov A, Kirchner M, Schleumann P, Bayraktaroglu I, Richter M, Molenda CM, Sporberr A, Zenkner M, Schnoegl S, Suenkel C, Schneider LS, Rybak-Wolf A, Kochnowsky B, Byrne LM, Wild EJ, Nielsen JE, Dittmar G, Peters O, Beule D, Wanker EE. A proteomics analysis of 5xFAD mouse brain regions reveals the lysosome-associated protein Arl8b as a candidate biomarker for Alzheimer's disease. *Genome Med.* 2023; 15(1): 50.
- Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, Herzog MC, Radde R, Staufenbiel M, Lewis J, Hutton M, Tolnay M, Jucker M. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol* 2007; 171: 2012-20.
- Boyd-Kimball D, Sultana R, Poon HF, Lynn BC, Casamenti F, Pepeu G, Klein JB, Butterfield DA. Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2005; 132: 313-24.
- Braak E, Braak H, Mandelkow E. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 554-67.

- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239-59.
- Braak H, Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 1998; 53: 127-40.
- Brinet D, Gaie-Levrel F, Delatour V, Kaffy J, Ongerì S, Taverna M. In vitro monitoring of amyloid beta-peptide oligomerization by Electrospray differential mobility analysis: An alternative tool to evaluate Alzheimer's disease drug candidates. *Talanta* 2017; 165: 84-91.
- Brito-Moreira J, Lourenco MV, Oliveira MM, Ribeiro FC, Ledo JH, Diniz LP, Vital JFS, Magdesian MH, Melo HM, Barros-Aragao F, de Souza JM, Alves-Leon SV, Gomes FCA, Clarke JR, Figueiredo CP, De Felice FG, Ferreira ST. Interaction of amyloid-beta (A β) oligomers with neurexin 2 α and neuroligin 1 mediates synapse damage and memory loss in mice. *J Biol Chem* 2017; 292: 7327-37.
- Brown J. Some tests of the decay theory of immediate memory. *Quarterly Journal of Experimental Psychology* 1958; 10: 12-21.
- Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. These authors contributed equally to this work. *Brain Research Reviews* 2000; 33: 95-130.
- Butterfield DA, Lauderback CM. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1050-60.
- Calabrese P, Markowitsch HJ. Memory and brain-neurobiological correlates of memory disturbances. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2003; 71: 211-9.
- Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC. Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol* 2001; 158: 1173-7.
- Candela S, Giubilei F, Orzi F. Heterogeneous pathologies associated with dementia in Parkinsonism share a prion-like spreading mechanism. *Arch Ital Biol* 2013; 151: 169-78.
- Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb Protoc* 2014; 2014: 655-8.
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol* 2018; 14: 450-64.
- Chen S, Zhang XJ, Li L, Le WD. Current experimental therapy for Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 2007; 5: 127-34.
- Chen XQ, Mobley WC. Alzheimer Disease Pathogenesis: Insights From Molecular and Cellular Biology Studies of Oligomeric A β and Tau Species. *Front Neurosci* 2019; 13: 659.
- Cheng IH, Scarce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puolivali J, Lesne S, Ashe KH, Muchowski PJ, Mucke L. Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 2007; 282: 23818-28.
- Clark RE, Squire LR. An animal model of recognition memory and medial temporal lobe amnesia: history and current issues. *Neuropsychologia* 2010; 48: 2234-44.
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005; 8: 79-84.

- Clement Y, Proeschel MF, Bondoux D, Girard F, Launay JM, Chapouthier G. Genetic factors regulate processes related to anxiety in mice. *Brain Res* 1997; 752: 127-35.
- Coraci IS, Husemann J, Berman JW, Hulette C, Dufour JH, Campanella GK, Luster AD, Silverstein SC, El-Khoury JB. CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* 2002; 160: 101-12.
- Cowan N. Chapter 20 What are the differences between long-term, short-term, and working memory? 2008; 169: 323-38.
- Crusio WE, Schwegler H. Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav Brain Funct* 2005; 1: 3.
- Cummings J, Zhou Y, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Cheng F. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2023. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2023 May 25; 9(2): e12385.
- D'Mello GD, Steckler T. Animal models in cognitive behavioural pharmacology: an overview. *Brain Res Cogn Brain Res* 1996; 3: 345-52
- De Pace R, Britt DJ, Mercurio J, Foster AM, Djavaherian L, Hoffmann V, Abebe D, Bonifacino JS. Synaptic Vesicle Precursors and Lysosomes Are Transported by Different Mechanisms in the Axon of Mammalian Neurons. *Cell Rep*. 2020; 31(11): 107775.
- De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem* 2012; 65: 329-52.
- De S, Whiten DR, Ruggeri FS, Hughes C, Rodrigues M, Sideris DI, Taylor CG, Aprile FA, Muyldermans S, Knowles TPJ, Vendruscolo M, Bryant C, Blennow K, Skoog I, Kern S, Zetterberg H, Klenerman D. Soluble aggregates present in cerebrospinal fluid change in size and mechanism of toxicity during Alzheimer's disease progression. *Acta Neuropathol Commun* 2019; 7: 120.
- Decker MW. Animal models of cognitive function. *Crit Rev Neurobiol* 1995; 9: 321-43.
- Delobette S, Privat A, Maurice T. In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 1997; 319: 1-4.
- Dementia in Europe Yearbook. Estimating the prevalence of dementia in Europe. 2019: 1-108.
- Deuschl G, Maier W (2016) S3 - Leitlinie Demenzen. Ed (DGN) DGfN, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 134
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. Informationsblatt 1: Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. 2018: 1-8.
- Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie Psychosomatik und Nervenheilkunde, Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Deutschen Alzheimer Gesellschaft e.V. S3-Leitlinie "Demenzen". 2015: 1-132.
- Di Chiara T, Di Nunno N, Clark J, Lo Bu R, Cline EN, Rollins MG, Gong Y, Brody DL, Sliagar SG, Valesco PT, Viola KL, Kleina WL. Alzheimer's Toxic Amyloid Beta Oligomers: Unwelcome Visitors to the Na/K ATPase alpha3 Docking Station. *Yale J Biol Med*. 2017; 90 (1): 45-61.
- Dineley KT, Kaye R, Neugebauer V, Fu Y, Zhang W, Reese LC, Tagliamonte G. Amyloid-beta oligomers impair fear conditioned memory in a calcineurin-dependent fashion in mice. *J Neurosci Res* 2010; 88: 2923-32.
- Diniz LP, Tortelli V, Matias I, Morgado J, Paula Bergamo Araujo A, Melo HM, Seixas da Silva GS, Alves-Leon SV, de Souza JM, Ferreira ST, De Felice FG, Alcantara

- Gomes FC. Astrocyte transforming growth factor beta 1 protects synapses against Abeta oligomers in Alzheimer's disease model. *J Neurosci* 2017;
- Di Scala C, Armstrong N, Chahinian H, Chabrière E, Fantini J, Yahi N. AmyP53, a Therapeutic Peptide Candidate for the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease: Safety, Stability, Pharmacokinetics Parameters and Nose-to Brain Delivery. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(21): 13383.
- Eckel B, Ohl F, Starker L, Rammes G, Bogdanski R, Kochs E, Blobner M. Effects of isoflurane-induced anaesthesia on cognitive performance in a mouse model of Alzheimer's disease: A randomised trial in transgenic APP23 mice. *Eur J Anaesthesiol* 2013; 30: 605-11.
- Edelmann W, Wittmann S (2012) *Lernpsychologie: Mit Online-Materialien Gebundene Ausgabe* – 7. März 2012; von Beltz Verlag. 288
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 2010; 77: 69-81.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
- Europäische Kommission (2013) Siebenter Bericht über die statistischen Angaben zur Anzahl der in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union für Versuchs- und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Europäische Kommission, Brüssel. 14
- Ewers M, Sperling RA, Klunk WE, Weiner MW, Hampel H. Neuroimaging markers for the prediction and early diagnosis of Alzheimer's disease dementia. *Trends Neurosci* 2011; 34: 430-42.
- Fabbro S, Schaller K, Seeds NW. Amyloid-beta levels are significantly reduced and spatial memory defects are rescued in a novel neuroserpin-deficient Alzheimer's disease transgenic mouse model. *J Neurochem* 2011; 118: 928-38.
- Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol* 2007; 64: 343-9.
- Fagan AM, Xiong C, Jasielc MS, Bateman RJ, Goate AM, Benzinger TL, Ghetti B, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Salloway S, Schofield PR, Sperling RA, Marcus D, Cairns NJ, Buckles VD, Ladenson JH, Morris JC, Holtzman DM, Dominantly Inherited Alzheimer N. Longitudinal change in CSF biomarkers in autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Sci Transl Med* 2014; 6: 226ra30.
- Fendl D (2013) *Phänotypische Charakterisierung eines transgenen Mausmodells der Alzheimer-Krankheit unter Bezug auf Alter und Geschlecht*. Eds Fakultät ZfktdT, München dL-M-U. Universitäts Bibliothek LMU, München. 161
- File SE, Wardill AG. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia* 1975; 44: 53-9.
- Filippi M, Basaia S, Canu E, Imperiale F, Magnani G, Falautano M, Comi G, Falini A, Agosta F. Changes in functional and structural brain connectome along the Alzheimer's disease continuum. *Mol Psychiatry* 2020; 25: 230-9.
- Fišar Z, Hroudová J. CoQ₁₀ and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2024; 13(2): 191.
- Forny-Germano L, Lyra e Silva NM, Batista AF, Brito-Moreira J, Gralle M, Boehnke SE, Coe BC, Lablans A, Marques SA, Martinez AM, Klein WL, Houzel JC, Ferreira ST, Munoz DP, De Felice FG. Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid-beta oligomers in nonhuman primates. *J Neurosci* 2014; 34: 13629-43.

- Fox NC, Freeborough PA, Rossor MN. Visualisation and quantification of rates of atrophy in Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 348: 94-7.
- Fratiglioni L, Ahlbom A, Viitanen M, Winblad B. Risk factors for late-onset Alzheimer's disease: a population-based, case-control study. *Ann Neurol* 1993; 33: 258-66.
- Fu H, Rodriguez GA, Herman M, Emrani S, Nahmani E, Barrett G, Figueroa HY, Goldberg E, Hussaini SA, Duff KE. Tau Pathology Induces Excitatory Neuron Loss, Grid Cell Dysfunction, and Spatial Memory Deficits Reminiscent of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* 2017; 93: 533-41.e5.
- Gabrieli JD. Cognitive neuroscience of human memory. *Annu Rev Psychol* 1998; 49: 87-115.
- Games D, Buttini M, Kobayashi D, Schenk D, Seubert P. Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 133-49.
- Gao CZ, Dong W, Cui ZW, Yuan Q, Hu XM, Wu QM, Han X, Xu Y, Min ZL. Synthesis, preliminarily biological evaluation and molecular docking study of new Olaparib analogues as multifunctional PARP-1 and cholinesterase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2018; 34: 150-62.
- Garcia-Matas S, de Vera N, Aznar AO, Marimon JM, Adell A, Planas AM, Cristofol R, Sanfeliu C. In vitro and in vivo activation of astrocytes by amyloid-beta is potentiated by pro-oxidant agents. *J Alzheimers Dis* 2010; 20: 229-45.
- Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63: 168-74.
- Gaugler J, James B, Johnson T, Weuve J (2017) 2017 Alzheimer's Disease Facts and Figures. The Alzheimer's Association. 86
- Gendron TF, Petrucelli L. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 2009; 4: 13.
- Giannopoulos PF, Chiu J, Pratico D. Antileukotriene therapy by reducing tau phosphorylation improves synaptic integrity and cognition of P301S transgenic mice. *Aging Cell* 2018; 17: e12759.
- Gillingwater TH, Wishart T M. Mechanisms underlying synaptic vulnerability and degeneration in neurodegenerative disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; 39: 320-34.
- Golani I, Kafkafi N, D. D. Phenotyping stereotypic behaviour: collective variables, range of variation and predictability. *Applied Animal Behaviour Science* 1999; 65: 191-220.
- Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10417-22.
- Gordan ML, Jungwirth B, Ohl F, Kellermann K, Kochs EF, Blobner M. Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: a comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test. *Behav Brain Res* 2012; 235: 7-20.
- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by A beta 42 fibrils. *Science* 2001; 293: 1491-5.
- Gotz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 532-44.
- Graeber MB. Changing face of microglia. *Science*. 2010; 330(6005): 783-8.

- Green MC, Grueneberg H, Hertwig P, Heston WE, Lyon MF, Medvedev NN, Snell GD, Staats J. A Revision of the Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *J Hered* 1963; 54: 159-62.
- Gressner AM, Arndt T (2012) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik: Band 1: Klinische Chemie*. Springer Berlin Heidelberg
- Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, Hooli B, Choi SH, Hyman BT, Tanzi RE. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron*. 2013; 78(4): 631-43.
- Gründer G, Benkert O (2012) *Handbuch der Psychopharmakotherapie*, 2 edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 2017; 133: 665-704.
- Gutiérrez-Lerma AI, Ordaz B, Peña-Ortega F. Amyloid Beta Peptides Differentially Affect Hippocampal Theta Rhythms *In Vitro*. *International Journal of Peptides* 2013; 2013: 1-11.
- GV-SOLAS (2014) Tiergerechte Haltung von Labormäusen - Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung. In: *Informationsblatt - Tiergerechte Haltung von Labormäusen*. Gesellschaft für Versuchstierkunde (Society for Laboratory Animal Science) Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung. 1-25
- Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 101-12.
- Hall CS, Ballachey EL (1932) *A Study of the Rat's behavior in a field: A Contribution to Method in Comparative Psychology*. University of California publications in psychology, Berkeley : University of California. 1-12
- Hall CS. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *Journal of Comparative Psychology* 1936; 22: 345-52.
- Hanell A, Marklund N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 252.
- Hanser H (2005) *Lexikon der Neurowissenschaft*. Spektrum Akademischer Verlag
- Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L. Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *The Lancet Neurology* 2006; 5: 228-34.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-6.
- Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 2009; 198: 247-51.
- Heise N, Ansorge U. The roles of scene priming and location priming in object-scene consistency effects. *Front Psychol* 2014; 5: 520.
- Herrup K. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci* 2010; 30: 16755-62.
- Hickman RA, Faustin A, Wisniewski T. Alzheimer Disease and Its Growing Epidemic: Risk Factors, Biomarkers, and the Urgent Need for Therapeutics. *Neurol Clin* 2016; 34: 941-53.
- Hiremathad A, Piemontese L. Heterocyclic compounds as key structures for the interaction with old and new targets in Alzheimer's disease therapy. *Neural Regen Res* 2017; 12: 1256-61.
- Hodges H. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res* 1996; 3: 167-81.

- Holscher C, Gengler S, Gault VA, Harriott P, Mallot HA. Soluble beta-amyloid[25-35] reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning. *Eur J Pharmacol* 2007; 561: 85-90.
- Hsiao K, Chapman P, Nilson S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996; 274:99-102
- Huber CM, Yee C, May T, Dhanala A, Mitchell CS. Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy. *J Alzheimers Dis* 2018; 61: 265-81.
- Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, Martin RL. A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry* 1982; 140: 566-72.
- Ikegawa M, Nirasawa T, Kakuda N, Miyasaka T, Kuzuhara Y, Murayama S, Ihara Y. Visualization of Amyloid beta Deposits in the Human Brain with Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry. *J Vis Exp* 2019;
- Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739: 198-210.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wolfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Gotz J. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 2010; 142: 387-97.
- Jarrard LE. Selective Hippocampal Lesions and Behavior. In: *The Hippocampus: Volume 4*. Isaacson RL, Pribram KH, eds. Boston, MA: Springer US 1986: 93-126.
- Jellinger K. Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) - Eine aktuelle Übersicht. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 2005; 1: 9-18.
- Jellinger KA. The neuropathological diagnosis of Alzheimer disease. *J Neural Transm Suppl* 1998; 53: 97-118.
- Jellinger KA, Korczyn AD. Are dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia the same disease? *BMC Med* 2018; 16: 34.
- Jeneson A, Squire LR. Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. *Learn Mem* 2012; 19: 15-25.
- Johnson GVW, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science* 2004; 117: 5721-9.
- Kamakura R, Kovalainen M, Leppaluoto J, Herzig KH, Makela KA. The effects of group and single housing and automated animal monitoring on urinary corticosterone levels in male C57BL/6 mice. *Physiol Rep* 2016; 4
- Kang JH, Ryoo NY, Shin DW, Trojanowski JQ, Shaw LM. Role of cerebrospinal fluid biomarkers in clinical trials for Alzheimer's disease modifying therapies. *Korean J Physiol Pharmacol* 2014; 18: 447-56.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001; 21: 372-81.
- Kellermann K, Gordan LM, Blobner M, Luppia P, Kochs EF, Jungwirth B. Functional outcome in female rats after 45 minutes of deep hypothermic circulatory arrest: gender matters. *Thorac Cardiovasc Surg* 2013; 61: 52-65.
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, Itzkovitz S, Colonna M,

- Schwartz M, Amit I. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*. 2017; 169(7): 1276-1290.e17.
- Kesner RP, DiMattia BV, Crutcher KA. Evidence for neocortical involvement in reference memory. *Behav Neural Biol* 1987; 47: 40-53.
- Kesner RP, Goodrich-Hunsaker NJ. Developing an animal model of human amnesia: the role of the hippocampus. *Neuropsychologia* 2010; 48: 2290-302.
- Kim B, Noh GO, Kim K. Behavioural and psychological symptoms of dementia in patients with Alzheimer's disease and family caregiver burden: a path analysis. *BMC Geriatr* 2021; 21: 160.
- Kim HY, Lee DK, Chung BR, Kim HV, Kim Y. Intracerebroventricular Injection of Amyloid-beta Peptides in Normal Mice to Acutely Induce Alzheimer-like Cognitive Deficits. *J Vis Exp* 2016;
- Kircher T, Gauggel S, Gauggel S. Was ist Kognition? Grundlagen und Methoden. *Neuropsychologie der Schizophrenie: Symptome, Kognition, Gehirn* 2008: 12-8.
- Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Debnath ML, Holt DP, Wang Y, Hyman BT. Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 797-805.
- Komuro R, Honda Y, Yanaizu M, Nagahama M, Kino Y. Alzheimer's Disease-Associated Alternative Splicing of *CD33* Is Regulated by the HNRNPA Family Proteins. *Cells*. 2023; 12(4): 602.
- Kong LN, Zuo PP, Mu L, Liu YY, Yang N. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 666-72.
- Koss DJ, Jones G, Cranston A, Gardner H, Kanaan NM, Platt B. Soluble pre-fibrillar tau and beta-amyloid species emerge in early human Alzheimer's disease and track disease progression and cognitive decline. *Acta Neuropathol* 2016; 132: 875-95.
- Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, Beckers L, O'Loughlin E, Xu Y, Fanek Z, Greco DJ, Smith ST, Tweet G, Humulock Z, Zrzavy T, Conde-Sanroman P, Gacias M, Weng Z, Chen H, Tjon E, Mazaheri F, Hartmann K, Madi A, Ulrich JD, Glatzel M, Worthmann A, Heeren J, Budnik B, Lemere C, Ikezu T, Heppner FL, Litvak V, Holtzman DM, Lassmann H, Weiner HL, Ochando J, Haass C, Butovsky O. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*. 2017; 47(3): 566-581.e9.
- Kummer MP, Heneka MT. Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther* 2014; 6: 28.
- Kurz A. Das Wichtigste über die Alzheimer-Krankheit und andere Demenzformen. Ratgeber - Das Wichtigste über die Alzheimer-Krankheit und andere Demenzformen 2013; 23: 1-50.
- Labots M, Van Lith HA, Ohl F, Arndt SS. The modified hole board--measuring behavior, cognition and social interaction in mice and rats. *J Vis Exp* 2015;
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- Lal R, Lin H, Quist AP. Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 1966-75.
- Lee VM-Y, Goedert M, Trojanowski JQ. Neurodegenerative tauopathies. *Annual Review of Neuroscience* 2001; 24: 1121-59.

- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006; 440: 352-7.
- Lewczuk P, Riederer P, O'Bryant SE, Verbeek MM, Dubois B, Visser PJ, Jellinger KA, Engelborghs S, Ramirez A, Parnetti L, Jack CR, Jr., Teunissen CE, Hampel H, Lleo A, Jessen F, Glodzik L, de Leon MJ, Fagan AM, Molinuevo JL, Jansen WJ, Winblad B, Shaw LM, Andreasson U, Otto M, Mollenhauer B, Wiltfang J, Turner MR, Zerr I, Handels R, Thompson AG, Johansson G, Ermann N, Trojanowski JQ, Karaca I, Wagner H, Oeckl P, van Waalwijk van Doorn L, Bjerke M, Kapogiannis D, Kuiperij HB, Farotti L, Li Y, Gordon BA, Epelbaum S, Vos SJB, Klijn CJM, Van Nostrand WE, Minguillon C, Schmitz M, Gallo C, Lopez Mato A, Thibaut F, Lista S, Alcolea D, Zetterberg H, Blennow K, Kornhuber J. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers for neurodegenerative dementias: An update of the Consensus of the Task Force on Biological Markers in Psychiatry of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry. *World J Biol Psychiatry* 2018; 19: 244-328.
- Lewejohann L, Reinhard C, Schrewe A, Brandewiede J, Haemisch A, Gortz N, Schachner M, Sachser N. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes Brain Behav* 2006; 5: 64-72.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001; 293: 1487-91.
- Li S, Jin M, Liu L, Dang Y, Ostaszewski BL, Selkoe DJ. Decoding the synaptic dysfunction of bioactive human AD brain soluble Abeta to inspire novel therapeutic avenues for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2018; 6: 121.
- Li XH, Deng YY, Li F, Shi JS, Gong QH. Neuroprotective effects of sodium hydrosulfide against beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Int J Mol Med* 2016; 38: 1152-60.
- Lim KH N, Moestrup V, Zhang X, Wang WA, Møller A, Huang FD. An Improved Method for Collection of Cerebrospinal Fluid from Anesthetized Mice. *J Vis Exp* 2018;
- Liu L, Duff K. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse. *J Vis Exp* 2008;
- Luck T, Riedel-Heller SG. Prevention of Alzheimer's dementia in Germany : A projection of the possible potential of reducing selected risk factors. *Nervenarzt* 2016; 87: 1194-200.
- Lyon MF, Searle AG (1989) *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse* Oxford University Press/Gustav Fischer Verlag, Oxford–New York–Tokyo–Stuttgart
- Mähler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* 2014; 48(3): 178-92.
- Markowitsch HJ (2009) *Dem Gedächtnis auf der Spur: Vom Erinnern und Vergessen*, 1 edn, Darmstadt
- Marquise de Pers J (2010) *Aβ-Peptid- und Tau-Phosphorylierungsmuster im Zusammenhang mit der Verteilung und Aktivierung der extrazellulär regulierten*

- Proteinkinase ERK 1/2 in post mortem Hirngewebe von Alzheimer-Patienten. Ed Erlangen-Nürnberg MFdF-A-U, Erlangen-Nürnberg. 102
- Martin L, Latypova X, Terro F. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2011; 58: 458-71.
- Masuhr KF, Masuhr F, Neumann M (2013) *Duale Reihe Neurologie*. Thieme
- Matsuzaki K, Yamakuni T, Hashimoto M, Haque AM, Shido O, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y. Nobiletin restoring beta-amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci Lett* 2006; 400: 230-4.
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004; 430: 631-9.
- Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, van der Flier WM, Blankenstein MA, Ewers M, Rich K, Kaiser E, Verbeek M, Tsolaki M, Mulugeta E, Rosen E, Aarsland D, Visser PJ, Schroder J, Marcusson J, de Leon M, Hampel H, Scheltens P, Pirttila T, Wallin A, Jonhagen ME, Minthon L, Winblad B, Blennow K. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA* 2009; 302: 385-93.
- Mazanetz MP, Fischer PM. Untangling tau hypophosphorylation in drug desing for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Discovery* 2007; 6(6): 464-79.
- McQuade A, Blurton-Jones M. Microglia in Alzheimer's Disease: Exploring How Genetics and Phenotype Influence Risk. *J Mol Biol*. 2019; 431(9): 1805-1817.
- Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci* 2007; 27: 5394-404.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER. *Cognitive Neuroscience and the Study of Memory*. *Neuron* 1998; 20: 445 - 68.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem* 1999; 274: 6483-92.
- Mondragon R, Mayagoitia L, Lopez-Lujan A, Diaz JL. Social structure features in three inbred strains of mice, C57Bl/6J, Balb/cj, and NIH: a comparative study. *Behav Neural Biol* 1987; 47: 384-91.
- Moran PM, Higgins LS, Cordell B, Moser PC. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 5341-5.
- Morris JC, Heyman A, Mohs RC, Hughes JP, van Belle G, Fillenbaum G, Mellits ED, Clark C. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and neuropsychological assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1989; 39: 1159-65.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11: 47-60.
- Morrone F, Sita G, Tarozzi A, Rimondini R, Hrelia P. Early effects of Abeta1-42 oligomers injection in mice: Involvement of PI3K/Akt/GSK3 and MAPK/ERK1/2 pathways. *Behav Brain Res* 2016; 314: 106-15.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor

- transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 2000; 20: 4050-8.
- Muller EG, Edwin TH, Stokke C, Navelsaker SS, Babovic A, Bogdanovic N, Knapskog AB, Revheim ME. Amyloid-beta PET-Correlation with cerebrospinal fluid biomarkers and prediction of Alzheimer's disease diagnosis in a memory clinic. *PLoS One* 2019; 14: e0221365.
- Nelson PT, Jicha GA, Kryscio RJ, Abner EL, Schmitt FA, Cooper G, Xu LO, Smith CD, Markesbery WR. Low sensitivity in clinical diagnoses of dementia with Lewy bodies. *J Neurol* 2010; 257: 359-66.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 697-709.
- Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C. Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *Lancet Neurol* 2014; 13: 788-94.
- Nussbaum R.L., C.E. E. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *The new england journal of medicine* 2003; *N Engl J Med* 348 (14): 1356-64.
- O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 185-204.
- Obulesu M, Lakshmi MJ. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochem Res* 2014; 39: 2301-12.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 1063-70.
- Ohl F, Oitzl MS, Fuchs E. Assessing cognitive functions in tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage. *J Neurosci Methods* 1998; 81: 35-40.
- Ohl F, Holsboer F, Landgraf R. The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput* 2001; 33: 392-7.
- Ohl F. Testing for anxiety. *Clinical Neuroscience Research* 2003; 3: 233-8.
- Ohl F, Roedel A, Binder E, Holsboer F. Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 128-36.
- Ohl F, Keck ME. Behavioural screening in mutagenised mice - in search for novel animal models of psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol* 2003; 480: 219-28.
- Olariu A, Tran MH, Yamada K, Mizuno M, Hefco V, Nabeshima T. Memory deficits and increased emotionality induced by beta-amyloid (25-35) are correlated with the reduced acetylcholine release and altered phorbol dibutyrate binding in the hippocampus. *J Neural Transm (Vienna)* 2001; 108: 1065-79.
- Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 2016; 17: 777-92.
- Park G, Nhan HS, Tyan SH, Kawakatsu Y, Zhang C, Navarro M, Koo EH. Caspase Activation and Caspase-Mediated Cleavage of APP Is Associated with Amyloid β -Protein-Induced Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *Cell Rep* 2020; 31: 107839.
- Parmar HS, Houdek Z, Pesta M, Cerna V, Dvorak P, Hatina J. Protective effect of aspirin against oligomeric A β 42 induced mitochondrial alterations and neurotoxicity in differentiated EC P19 neuronal cells. *Curr Alzheimer Res* 2017;
- Parsons C, Ruitenber M, Freitag C, Sroka-Saidi K, Russ H, Rammes G. MRZ-99030 - A novel modulator of A β aggregation: I - Mechanism of action (MoA) underlying the potential neuroprotective treatment of Alzheimer's disease,

- glaucoma and age-related macular degeneration (AMD). *Neuropharmacology* 2015; 92:158-169.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* 2edn. Academic Press. 296
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 149-67.
- Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 2010; 77: 32-42.
- Persch A. Die Bedeutung des Explorationsverhaltens bei Versuchstieren. *Tierärztl Umschau* 1994; 49:539-45
- Pettigrew C, Soldan A. Defining Cognitive Reserve and Implications for Cognitive Aging. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2019; 19(1): 1.
- Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. World Alzheimer Report 2016 - Improving healthcare for people living with dementia coverage, quality and costs now and in the future. Alzheimer's Disease International (ADI), London 2016;
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 3-33.
- Quartu M, Serra MP, Boi M, Ibba V, Melis T, Del Fiacco M. Polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the human trigeminal ganglion and brainstem at prenatal and adult ages. *BMC Neurosci* 2008; 9:108.
- Qiu C, Wang YP, Pan XD, Liu XY, Chen Z, Liu LB. Exendin-4 protects A β (1-42) oligomer-induced PC12 cell apoptosis. *Am J Transl Res* 2016; 8(8): 3540-8.
- Raab G, Gernsheimer O, Schindler M (2010) *Neuromarketing: Grundlagen - Erkenntnisse - Anwendungen.* Springer-Verlag. 353
- Rabinovici GD, Carrillo MC, Forman M, DeSanti S, Miller DS, Kozauer N, Petersen RC, Randolph C, Knopman DS, Smith EE, Isaac M, Mattsson N, Bain LJ, Hendrix JA, Sims JR. Multiple comorbid neuropathologies in the setting of Alzheimer's disease neuropathology and implications for drug development. *Alzheimers Dement (N Y)* 2017; 3: 83-91.
- Rajmohan R, Reddy PH. Amyloid-Beta and Phosphorylated Tau Accumulations Cause Abnormalities at Synapses of Alzheimer's disease Neurons. *J Alzheimers Dis* 2017; 57: 975-99.
- Reese LC, Laezza F, Woltjer R, Tagliavola G. Dysregulated phosphorylation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II-alpha in the hippocampus of subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2011; 119: 791-804.
- Rembach A, Evered LA, Li QX, Nash T, Vidaurre L, Fowler CJ, Pertile KK, Rumble RL, Trounson BO, Maher S, Mooney F, Farrow M, Taddei K, Rainey-Smith S, Laws SM, Macaulay SL, Wilson W, Darby DG, Martins RN, Ames D, Collins S, Silbert B, Masters CL, Doecke JD, Aibl Research Group. Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers are not influenced by gravity drip or aspiration extraction methodology. *Alzheimers Res Ther* 2015; 19;7(1):71.
- Richtlinie 2010/63/EU (2010) RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, Amtsblatt der Europäischen Union. 33 - 79
- Rodgers RJ. Animal models of 'anxiety': where next? *Behav Pharmacol* 1997; 8: 477-96; discussion 97-504.
- Romeis B (2010) *Mikroskopische Technik*, 18 edn. Spektrum Akademischer Verlag

- Roney JC, Li S, Farfel-Becker T, Huang N, Sun T, Xie Y, Cheng XT, Lin MY, Platt FM, Sheng ZH. Lipid-mediated motor-adaptor sequestration impairs axonal lysosome delivery leading to autophagic stress and dystrophy in Niemann-Pick type C. *Dev Cell*. 2021; 56(10): 1452-1468.e8.
- Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. University of Michigan, Methuen
- Russo I, Caracciolo L, Tweedie D, Choi SH, Greig NH, Barlati S, Bosetti F. 3,6'-Dithiothalidomide, a new TNF-alpha synthesis inhibitor, attenuates the effect of Abeta1-42 intracerebroventricular injection on hippocampal neurogenesis and memory deficit. *J Neurochem* 2012; 122: 1181-92.
- Sakic B. Cerebrospinal fluid collection in laboratory mice: Literature review and modified cisternal puncture method. *J Neurosci Methods* 2019; 311: 402-7.
- Sala Frigerio C, Wolfs L, Fattorelli N, Thrupp N, Voytyuk I, Schmidt I, Mancuso R, Chen WT, Woodbury ME, Srivastava G, Möller T, Hudry E, Das S, Saido T, Karran E, Hyman B, Perry VH, Fiers M, De Strooper B. The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to A β Plaques. *Cell Rep*. 2019; 27(4): 1293-1306.e6.
- Sandhir R, Puri V, Klein RM, Berman NE. Differential expression of cytokines and chemokines during secondary neuron death following brain injury in old and young mice. *Neurosci Lett* 2004; 369: 28-32.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005; 309: 476-81.
- Savaskan E, Bopp-Kistler I, Buerge M, Fischlin R, Georgescu D, Giardini U, Hatzinger M, Hemmeter U, Justiniano I, Kressig RW, Monsch A, Mosimann UP, Mueri R, Munk A, Popp J, Schmid R, Wollmer MA. Recommendations for diagnosis and therapy of behavioral and psychological symptoms in dementia (BPSD). *Praxis* (2014) 2014; 103: 135-48.
- Schellenberg GD, Montine TJ. The genetics and neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 305-23.
- Schmid S, Jungwirth B, Gehlert V, Blobner M, Schneider G, Kratzer S, Kellermann K, Rammes G. Intracerebroventricular injection of beta-amyloid in mice is associated with long-term cognitive impairment in the modified hole-board test. *Behav Brain Res* 2017; 324: 15-20.
- Schwarz M (1992) *Kognitive Semantiktheorie und neuropsychologische Realität: repräsentationale und prozedurale Aspekte der semantischen Kompetenz*. Walter de Gruyter. 169
- Sebbagh M, Renvoizé C, Hamelin J, Riché N, Bertoglio J, Bréard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 346-52.
- Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015: e52434.
- Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 545-84.
- Sharma S, Verma S, Kapoor M, Saini A, Nehru B. Alzheimer's disease like pathology induced six weeks after aggregated amyloid-beta injection in rats: increased oxidative stress and impaired long-term memory with anxiety-like behavior. *Neurol Res* 2016; 38: 838-50.

- Silva JM, McMahon M. The fastest Western in town: a contemporary twist on the classic Western blot analysis. *J Vis Exp* 2014; e51149.
- Silver ML (1995) *Mouse Genetics: Concepts and Applications*, 1 edn. Oxford University Press
- Silverberg N, Elliott C, Ryan L, Masliah E, Hodes R. NIA commentary on the NIA-AA Research Framework: Towards a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2018; 14: 576-8.
- Simic G, Babic Leko M, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milosevic N, Bazadona D, Buee L, de Silva R, Di Giovanni G, Wischik C, Hof PR. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules* 2016; 6: 6.
- Singewald GM, Nguyen NK, Neumann ID, Singewald N, Reber SO. Effect of chronic psychosocial stress-induced by subordinate colony (CSC) housing on brain neuronal activity patterns in mice. *Stress* 2009; 12: 58-69.
- Smith EE, Jonides J. Working memory: a view from neuroimaging. *Cogn Psychol* 1997; 33: 5-42.
- Smith JS, Angel TE, Chavkin C, Orton DJ, Moore RJ, Smith RD. Characterization of individual mouse cerebrospinal fluid proteomes. *Proteomics* 2014; 14: 1102-6.
- Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 2012; 87(1): 10-20.
- Solomon A, Mangialasche F, Richard E, Andrieu S, Bennett DA, Breteler M, Fratiglioni L, Hooshmand B, Khachaturian AS, Schneider LS, Skoog I, Kivipelto M. Advances in the prevention of Alzheimer's disease and dementia. *J Intern Med* 2014; 275: 229-50.
- Song DK, Im YB, Jung JS, Cho J, Suh HW, Kim YH. Central beta-amyloid peptide-induced peripheral interleukin-6 responses in mice. *J Neurochem* 2001; 76: 1326-35.
- Song M. The Asparaginyl Endopeptidase Legumain: An Emerging Therapeutic Target and Potential Biomarker for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(18): 10223.
- Sperling G. The information available in brief visual presentations. *Psychological Monographs: General and Applied* 1960; 74: 1-29.
- Sprecher CA, Grant FJ, Grimm G, O'Hara PJ, Norris F, Norris K, Foster DC. Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* 1993; 32: 4481-6.
- Squire L, Kandel ER (2009) *Gedächtnis: Die Natur des Erinnerns* von 2edn. Spektrum Akademischer Verlag
- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 1992; 99: 195-231.
- Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 13515-22.
- Squire LR, Wixted JT. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 259-88.
- Stewart S, Cacucci F, Lever C. Which memory task for my mouse? A systematic review of spatial memory performance in the Tg2576 Alzheimer's mouse model. *J Alzheimers Dis* 2011; 26: 105-26.
- Stine WB, Jr., Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278: 11612-22.

- Struyfs H, Niemantsverdriet E, Goossens J, Fransen E, Martin JJ, De Deyn PP, Engelborghs S. Cerebrospinal Fluid P-Tau181P: Biomarker for Improved Differential Dementia Diagnosis. *Front Neurol* 2015; 6: 138.
- Svitek J, Wiltfang J, Weih M. Diagnostik und Differenzialdiagnostik der Demenzen. *Psychiatrie und Psychotherapie up2date* 2008; 6: 1-13.
- Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int* 2017; 67: 185-93.
- Tasi YC, Chin TY, Chen YJ, Huang CC, Lee SL, Wu TY. Potential natural products for Alzheimer's disease: targeted search using the internal ribosome entry site of tau and amyloid-beta precursor protein. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 8789-810.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992; 24: 145-9.
- Tulving E. Episodic and semantic memory. *Organization of Memory*. London: Academic 1972; 381: 382-404.
- Tulving E, Markowitsch HJ. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* 1998; 8: 198-204.
- Van Cauwenberghe C, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med* 2016; 18: 421-30.
- van der Staay FJ. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res Rev* 2006; 52: 131-59.
- van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct* 2009; 5: 11.
- Vatandousta SM, Ghiasib R, Nejadc GG, Shahabia P. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Status in CSF and Blood Content of the WAG/Rij Rat Models Suffering from Absence Epilepsy. *Journal of Experimental and Clinical Neurosciences* 2016; 3.
- Vidal-Itriago A, Radford RAW, Aramideh JA, Maurel C, Scherer NM, Don EK, Lee A, Chung RS, Graeber MB, Morsch M. Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Front Immunol*. 2022; 13: 997786.
- Voderholzer U, Hohagen F (2017) *Therapie psychischer Erkrankungen 2017 State of the Art*. Urban & Fischer in Elsevier. 554
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2: 322-8.
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 59-68.
- Wang Z, Yang L, Zheng H. Role of APP and Abeta in synaptic physiology. *Curr Alzheimer Res* 2012; 9: 217-26.
- Waterston RH, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420: 520-62.
- Watson D, Castaño E, Kokjohn TA, Kuo YM, Lyubchenko Y, Pinsky D, Connolly ES, Jr., Esh C, Luehrs DC, Stine WB, Rowse LM, Emmerling MR, Roher AE. Physicochemical characteristics of soluble oligomeric Abeta and their pathologic role in Alzheimer's disease. *Neurol Res* 2005; 27: 869-81.
- Weintraub S, Wicklund AH, Salmon DP. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006171.
- Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepijan SV, Chafai M, Kootar S, Hornburg D, Evans LD, Moore S, Daria A, Hampel H, Muller V, Giudici C, Nuscher B, Wenninger-Weinzierl A, Kremmer E, Heneka MT, Thal DR, Giedraitis V,

- Lannfelt L, Muller U, Livesey FJ, Meissner F, Herms J, Konnerth A, Marie H, Haass C. eta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 2015; 526: 443-7.
- Wilson RS, Krueger KR, Arnold SE, Schneider JA, Kelly JF, Barnes LL, Tang Y, Bennett DA. Loneliness and risk of Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64: 234-40.
- Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, Cedazo-Minguez A, Dubois B, Edvardsson D, Feldman H, Fratiglioni L, Frisoni GB, Gauthier S, Georges J, Graff C, Iqbal K, Jessen F, Johansson G, Jonsson L, Kivipelto M, Knapp M, Mangialasche F, Melis R, Nordberg A, Rikkert MO, Qiu C, Sakmar TP, Scheltens P, Schneider LS, Sperling R, Tjernberg LO, Waldemar G, Wimo A, Zetterberg H. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol* 2016; 15: 455-532.
- Winkel S, Petermann F, Petermann U (2012) *Lernpsychologie*
- Wirths O, Bayer TA. Die modifizierte Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Demenz - intraneuronales Abeta induziert Neurodegeneration *NeuroForum* 2009; 3.09: 76-82.
- Xu Y, Zhu N, Xu W, Ye H, Liu K, Wu F, Zhang M, Ding Y, Zhang C, Zhang H, O'Donnell J, Pan J. Inhibition of Phosphodiesterase-4 Reverses Abeta-Induced Memory Impairment by Regulation of HPA Axis Related cAMP Signaling. *Front Aging Neurosci* 2018; 10: 204.
- Yang B, Liang G, Khojasteh S, Wu Z, Yang W, Joseph D, Wei H. Comparison of neurodegeneration and cognitive impairment in neonatal mice exposed to propofol or isoflurane. *PLoS One* 2014; 9: e99171.
- Yang T, Hong S, O'Malley T, Sperling RA, Walsh DM, Selkoe DJ. New ELISAs with high specificity for soluble oligomers of amyloid beta-protein detect natural Abeta oligomers in human brain but not CSF. *Alzheimers Dement* 2013; 9: 99-112.
- Yiannopoulou KG, Anastasiou AI, Zachariou V, Pelidou SH. Reasons for Failed Trials of Disease-Modifying Treatments for Alzheimer Disease and Their Contribution in Recent Research. *Biomedicines*. 2019; 7(4): 97.
- Zhang L, Wang Y, Liu T, Mao Y, Peng B. Novel Microglia-based Therapeutic Approaches to Neurodegenerative Disorders. *Neurosci Bull*. 2023; 39(3): 491-502.
- Zare N, Motamedi F, Digaleh H, Khodagholi F, Maghsoudi N. Collaboration of geldanamycin-activated P70S6K and Hsp70 against beta-amyloid-induced hippocampal apoptosis: an approach to long-term memory and learning. *Cell Stress Chaperones* 2015; 20: 309-19.
- Zhou Z-d, Chan CH-s, Ma Q-h, Xu X-h, Xiao Z-c, Tan E-K. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis. *Cell Adhesion & Migration* 2014; 5: 280-92.
- Zussy C, Brureau A, Delair B, Marchal S, Keller E, Ixart G, Naert G, Meunier J, Chevallier N, Maurice T, Givalois L. Time-course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an amyloid beta fragment in rats. *Am J Pathol* 2011; 179: 315-34.
- Zussy C, Brureau A, Keller E, Marchal S, Blayo C, Delair B, Ixart G, Maurice T, Givalois L. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid-beta peptide injection in rats. *PLoS One* 2013; 8: e53117.

IX. ANHANG

1. Zusätzliche Tabellen und Abbildungen der untersuchten Parameter im mHBT

Angegeben sind die ausführlichen Tabellen mit den errechneten Mittelwerten (MW) und Standardabweichungen (engl. Standard Deviation, SD) für die analysierten Parameter der jeweiligen Gruppen zu den verschiedenen Untersuchungstagen und die erweiterten graphischen Darstellungen ($MW \pm SEM$) aller 3 Gruppen mit Untergruppen (einzeln aufgeschlüsselt) im Zeitverlauf im mHBT.

1.1. Kognitive Parameter

1.1.1. Gesamtdurchlaufzeit (*Time Trial*)

Tabelle 8: Benötigte Gesamtdurchlaufzeit (*Time Trial*) in Sekunden (s) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als $MW \pm SD$)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/AB ₄₂	268 ± 32	239 ± 46	235 ± 53	200 ± 57	236 ± 44
2/AB ₄₂	286 ± 16	285 ± 19	281 ± 18	250 ± 49	276 ± 22
4/AB ₄₂	275 ± 33	259 ± 36	234 ± 51	229 ± 66	249 ± 41
8/AB ₄₂	299 ± 1	277 ± 28	234 ± 61	232 ± 60	261 ± 36
1/PBS	266 ± 32	222 ± 44	232 ± 71	228 ± 71	237 ± 46
2/PBS	291 ± 18	280 ± 28	252 ± 35	190 ± 81	253 ± 35
4/PBS	257 ± 51	204 ± 73	230 ± 64	186 ± 82	219 ± 63
8/PBS	253 ± 69	249 ± 75	205 ± 84	150 ± 82	214 ± 72
N	236 ± 55	209 ± 59	202 ± 44	149 ± 60	199 ± 47

Im Mittel brauchen alle Tiergruppen bereits ab dem ersten Durchgang an Tag 1 weniger als 300 s für die Bewältigung des mHBT. Alle Gruppen reduzieren die Zeit über die Dauer des Tests: am längsten benötigen die AB₄₂-Gruppen ($MW = 255.7$, $SD = 35.9$) gefolgt von abnehmenden Werten in den PBS-Gruppen ($MW = 237.7$, $SD = 54.0$) und den nativen Mäusen ($MW = 198.8$, $SD = 46.9$).

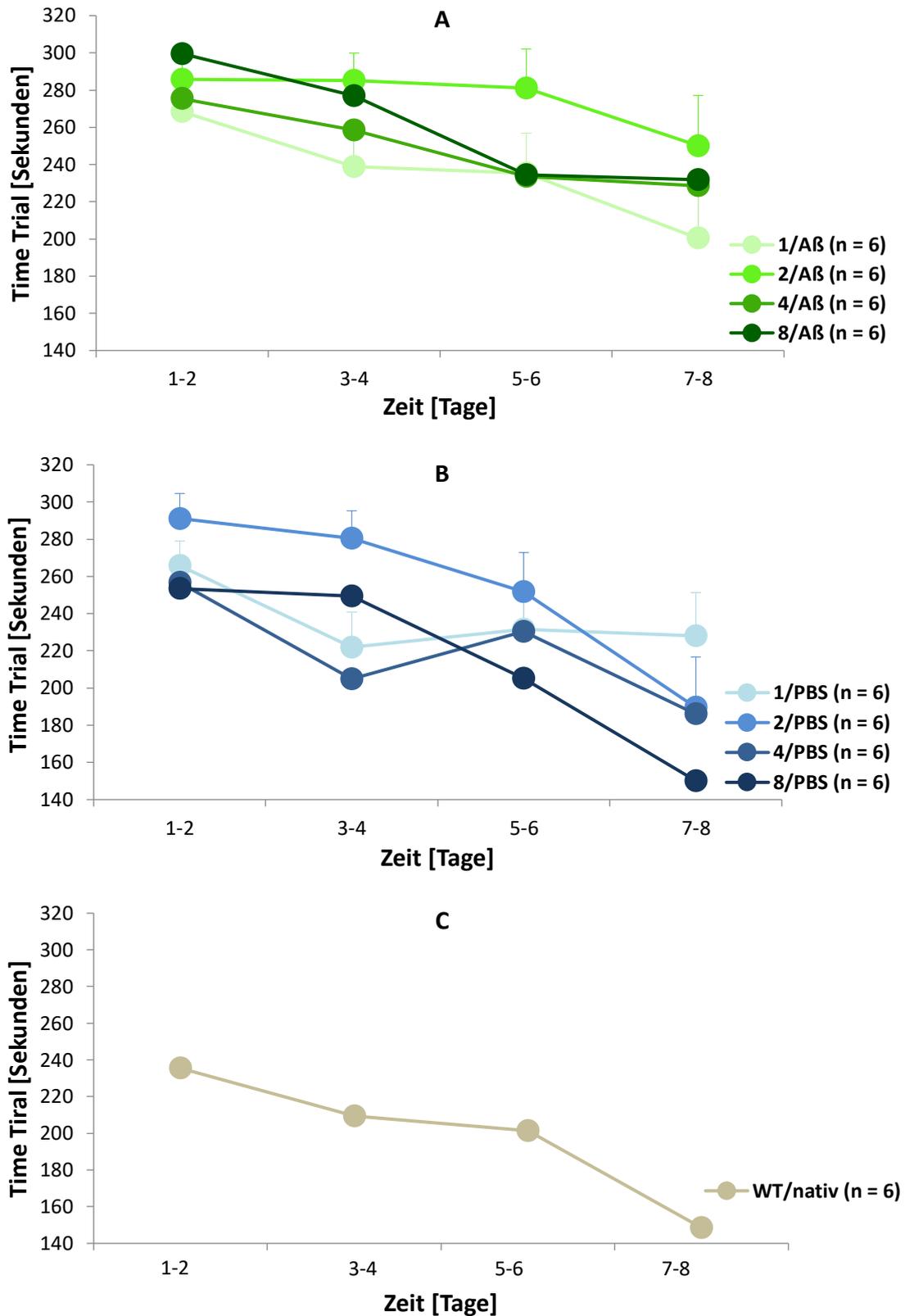


Abbildung 38: Graphische Darstellung zum Vergleich der benötigten Gesamtdurchlaufzeit (*Time Trial*) in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.1.2. Fehlbesuche (*Wrong Choices*)

Tabelle 9: Anzahl der Fehlbesuche (*Wrong Choices*) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/A β ₄₂	3.6 \pm 1.7	3.6 \pm 1.9	3.4 \pm 1.9	3.6 \pm 1.2	3.5 \pm 1.5
2/A β ₄₂	2.1 \pm 1.4	3.2 \pm 1.7	3.9 \pm 2.3	5.2 \pm 2.8	3.6 \pm 1.7
4/A β ₄₂	3.3 \pm 1.6	3.3 \pm 1.6	4.3 \pm 1.8	4.5 \pm 1.1	3.8 \pm 0.7
8/A β ₄₂	1.3 \pm 1.1	3.7 \pm 2.6	3.3 \pm 2.5	2.9 \pm 1.7	2.8 \pm 1.9
1/PBS	2.7 \pm 0.8	1.6 \pm 1.1	1.4 \pm 0.5	1.4 \pm 0.5	1.7 \pm 0.7
2/PBS	1.3 \pm 1.0	1.6 \pm 1.5	2.0 \pm 1.4	2.1 \pm 1.4	1.8 \pm 0.6
4/PBS	1.6 \pm 1.4	1.6 \pm 1.3	1.5 \pm 1.1	1.1 \pm 0.7	1.0 \pm 1.5
8/PBS	1.6 \pm 1.1	1.3 \pm 0.8	1.9 \pm 1.0	1.7 \pm 0.6	1.6 \pm 0.3
N	2.4 \pm 1.3	1.8 \pm 0.5	2.2 \pm 0.8	1.7 \pm 0.4	2.0 \pm 0.4

Die Daten der Mittelwerte und Standardabweichungen zeigen, dass die Werte bei allen Gruppen schwanken. Bei den nativen Mäusen, den mit PBS injizierten Tieren und der 8/A β ₄₂-Gruppe pegelt sie sich jedoch in einem Abwärtstrend ein. Die restlichen A β ₄₂-Gruppen deuten einen Aufwärtstrend an. Insgesamt liegt die Fehlerquote der *Wrong Choices* bei den A β ₄₂-Tieren (MW = 3.4, SD = 1.5) deutlich über den Werten der PBS- (MW = 1.5, SD = 0.8) und der N-Tiere (MW = 2.0, SD = 0.4).

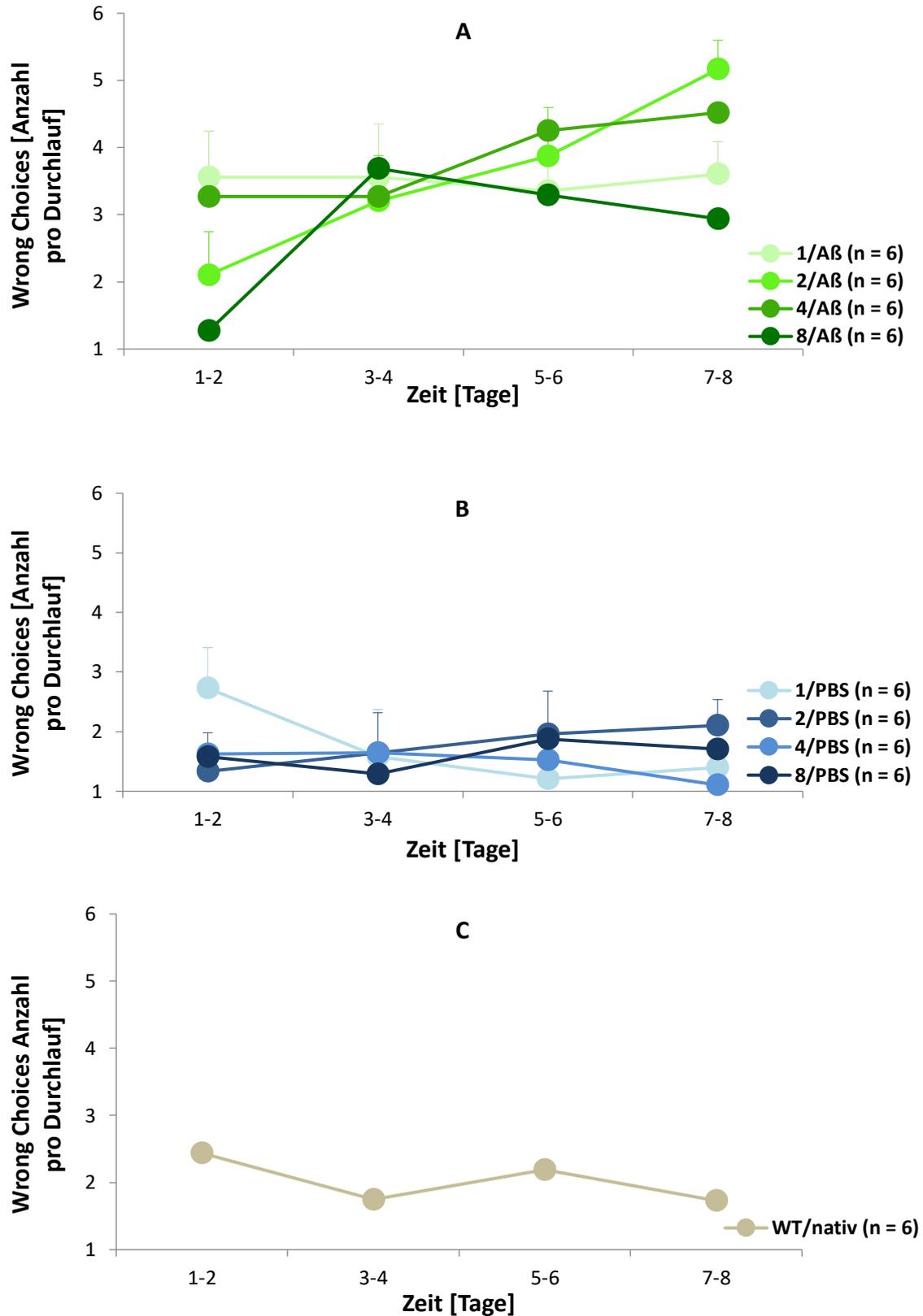


Abbildung 39: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Fehlbesuche (*Wrong Choices*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.1.3. Auslassungsfehler (*Omission Error*)

Tabelle 10: Anzahl der Auslassungsfehler (*Omission Errors*) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW±SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aß ₄₂	1.3 ± 1.0	0.9 ± 1.0	0.9 ± 1.0	0.8 ± 0.9	1.0 ± 0.9
2/Aß ₄₂	2.1 ± 0.7	1.2 ± 1.1	1.0 ± 1.0	0.7 ± 0.9	1.2 ± 0.9
4/Aß ₄₂	1.5 ± 1.0	1.3 ± 0.9	0.9 ± 1.0	0.6 ± 0.8	1.1 ± 0.7
8/Aß ₄₂	2.5 ± 0.5	1.7 ± 0.9	1.3 ± 1.2	1.3 ± 1.2	1.7 ± 0.9
1/PBS	1.1 ± 0.9	0.8 ± 1.0	0.8 ± 1.0	1.0 ± 1.0	0.9 ± 0.9
2/PBS	2.2 ± 0.8	1.9 ± 1.0	1.2 ± 0.9	0.8 ± 1.0	1.5 ± 0.8
4/PBS	1.7 ± 1.1	1.2 ± 1.3	1.2 ± 1.3	1.0 ± 1.3	1.3 ± 1.2
8/PBS	2.0 ± 1.2	1.6 ± 1.2	1.1 ± 1.1	0.5 ± 1.0	1.3 ± 1.0
N	1.0 ± 1.0	0.6 ± 0.6	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.4

Über die Dauer des mHBT hinweg verhalten sich die Tiere der einzelnen Gruppen ähnlich: die Aß₄₂- (MW = 1.25, SD = 0.85) und PBS-Gruppen (MW = 1.26, SD = 0.98) haben zu Beginn mehr Auslassungsfehler als die nativen Tiere (MW = 0.54, SD = 0.4). Bei allen reduziert sich die Anzahl der Fehler über die Zeit.

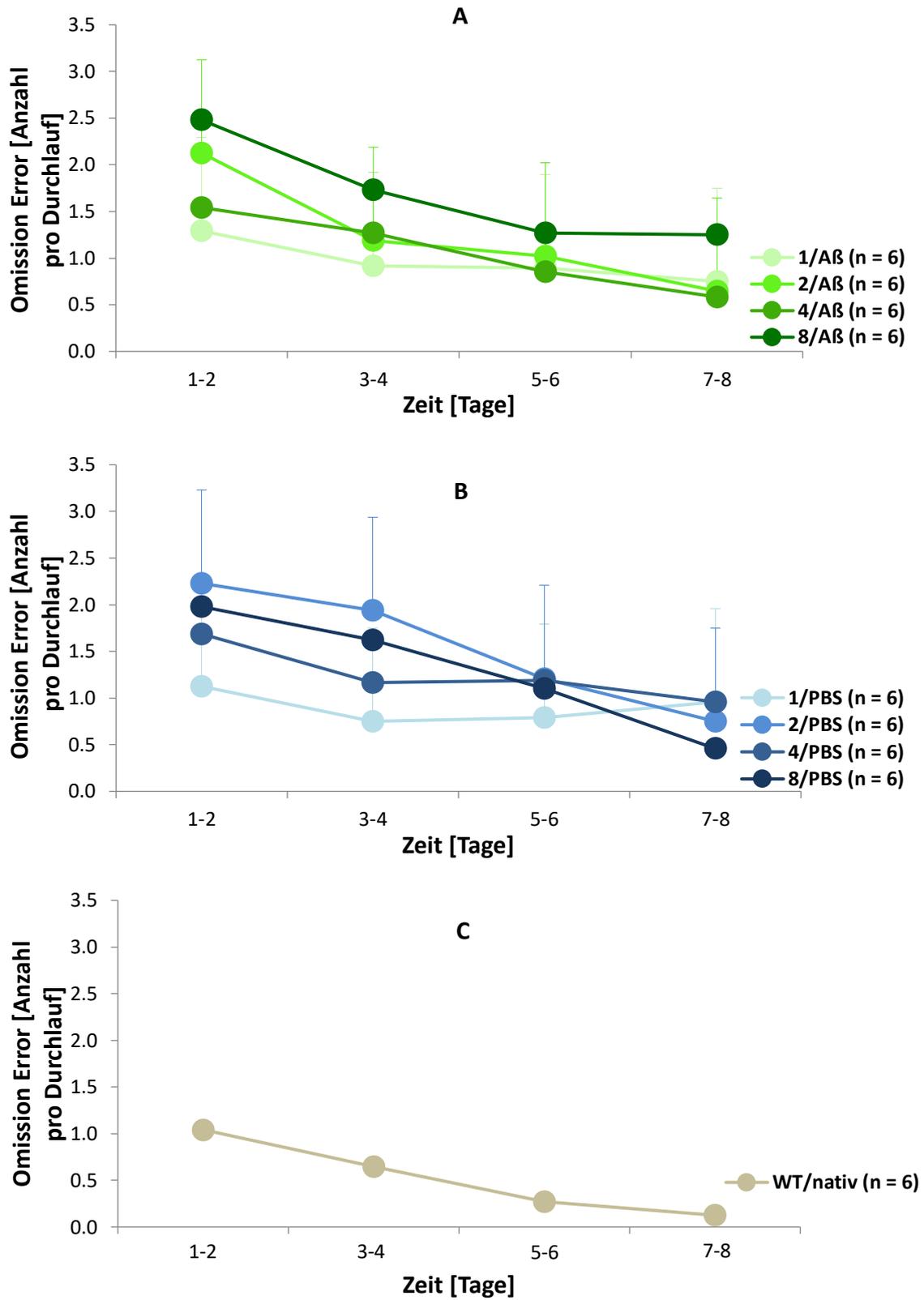


Abbildung 40: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Auslassungsfehler (*Omission Errors*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW±SEM) je Gruppeneinteilung

1.1.4. Gesamtfehler eines Durchlaufes (*Wrong Choices total*)

Tabelle 11: Anzahl der Gesamtfehler (*Wrong Choices total*) in einem Durchgang aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/A β ₄₂	4.9 \pm 1.0	4.5 \pm 1.5	4.3 \pm 1.0	4.4 \pm 1.1	4.5 \pm 0.9
2/A β ₄₂	4.2 \pm 0.9	4.4 \pm 1.1	4.9 \pm 1.7	5.8 \pm 2.0	4.8 \pm 1.1
4/A β ₄₂	4.8 \pm 0.9	4.5 \pm 1.5	5.1 \pm 1.3	5.1 \pm 1.2	4.9 \pm 0.7
8/A β ₄₂	3.8 \pm 0.8	5.4 \pm 1.8	4.6 \pm 1.6	4.2 \pm 0.7	4.5 \pm 1.1
1/PBS	3.9 \pm 0.7	2.3 \pm 1.0	2.0 \pm 0.8	2.4 \pm 0.7	2.6 \pm 0.8
2/PBS	3.6 \pm 0.8	3.6 \pm 0.6	3.2 \pm 1.4	2.9 \pm 1.5	3.3 \pm 0.5
4/PBS	3.3 \pm 0.5	2.8 \pm 0.6	2.7 \pm 0.6	2.1 \pm 0.8	2.7 \pm 0.4
8/PBS	3.6 \pm 0.4	2.9 \pm 0.6	3.0 \pm 1.6	2.2 \pm 1.3	2.9 \pm 0.8
N	3.5 \pm 0.5	2.4 \pm 0.5	2.5 \pm 0.9	1.9 \pm 0.5	2.5 \pm 0.6

Die Gruppe der nativen Tiere (MW = 2.58, SD = 0.71) und der mit PBS behandelten (MW = 2.91, SD = 0.98) zeigen eine niedrigere Anzahl der Gesamtfehler (*Wrong Choices total*) pro Durchlauf und reduzieren die Anzahl über den Versuchszeitraum hinweg. Die mit A β ₁₋₄₂ behandelten Gruppen (MW = 4.69, SD = 0.95) hingegen weisen einen höheren *Wrong Choices total* auf und erhöhen teilweise die Fehlerquote über die Zeit.

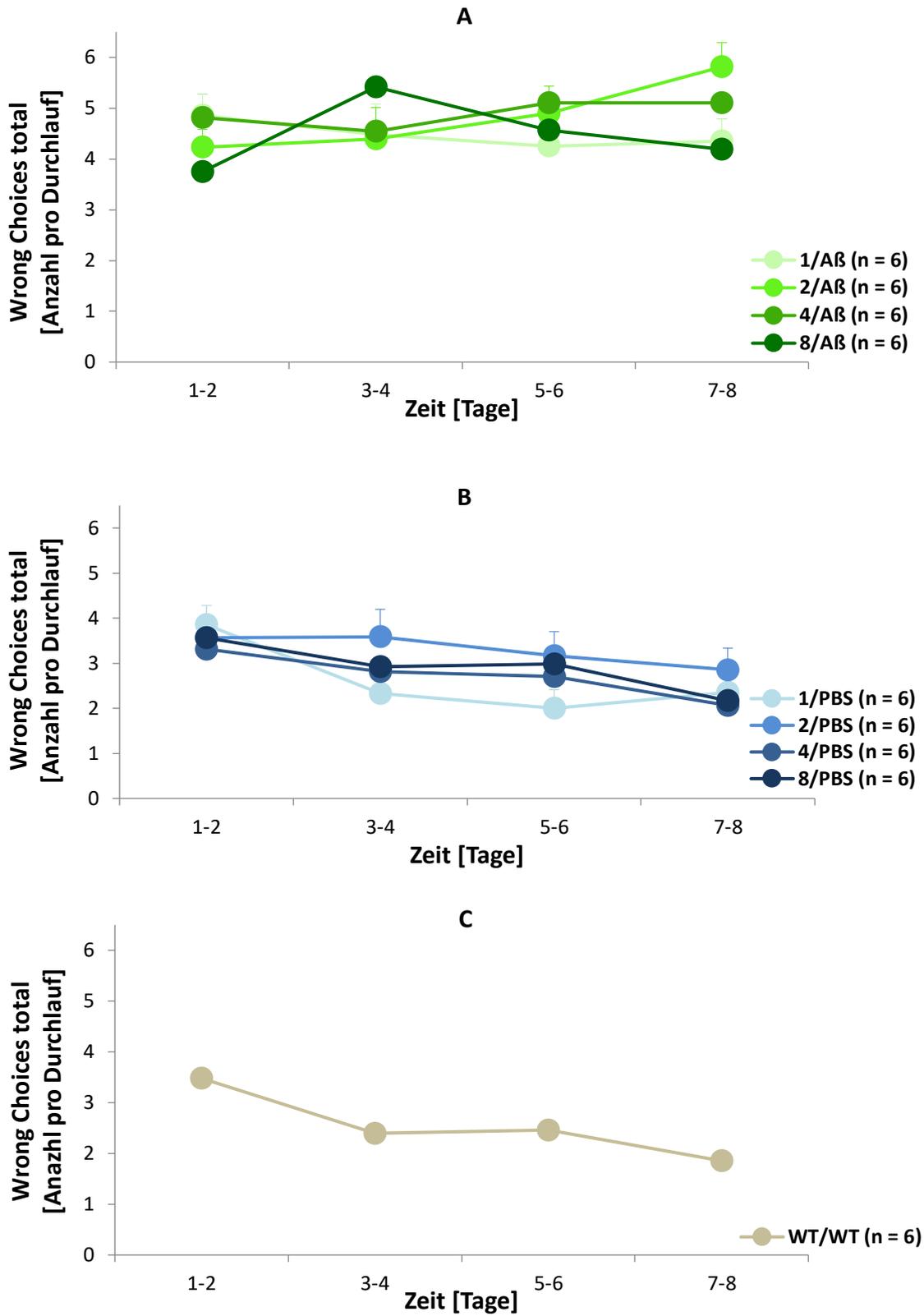


Abbildung 41: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der Gesamtfehler (*Wrong Choices total*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.1.5. Wiederholungsfehler (*Repeated Choices*)

Tabelle 12: Anzahl der Wiederholungsfehler (*Repeated Choices*) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/A β ₄₂	1.4 \pm 0.9	1.0 \pm 0.7	1.4 \pm 0.9	1.2 \pm 0.6	1.3 \pm 0.6
2/A β ₄₂	0.6 \pm 0.7	1.0 \pm 0.7	1.1 \pm 0.6	1.6 \pm 0.8	1.1 \pm 0.6
4/A β ₄₂	1.3 \pm 1.1	1.2 \pm 0.8	1.7 \pm 0.9	1.4 \pm 0.7	1.4 \pm 0.7
8/A β ₄₂	0.4 \pm 0.4	1.1 \pm 0.9	1.1 \pm 0.9	1.1 \pm 0.9	0.9 \pm 0.7
1/PBS	1.3 \pm 0.6	1.4 \pm 0.8	0.9 \pm 0.5	0.7 \pm 0.4	1.1 \pm 0.5
2/PBS	0.5 \pm 0.7	0.9 \pm 1.0	1.3 \pm 0.7	1.1 \pm 0.7	1.0 \pm 0.6
4/PBS	1.0 \pm 0.7	0.9 \pm 0.7	0.8 \pm 0.7	1.0 \pm 0.7	0.9 \pm 0.6
8/PBS	0.7 \pm 1.0	0.6 \pm 0.9	1.4 \pm 0.8	1.1 \pm 0.6	1.0 \pm 0.6
N	1.3 \pm 0.8	1.0 \pm 0.6	1.6 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3	1.2 \pm 0.3

Alle 3 Gruppen (A β ₄₂: MW = 0.97, SD = 0.92, PBS: MW = 1.18, SD = 0.99, N: MW = 1.23, SD = 0.73) schwanken im Verlauf der 8 Tage bei der Anzahl der Wiederholungsfehler.

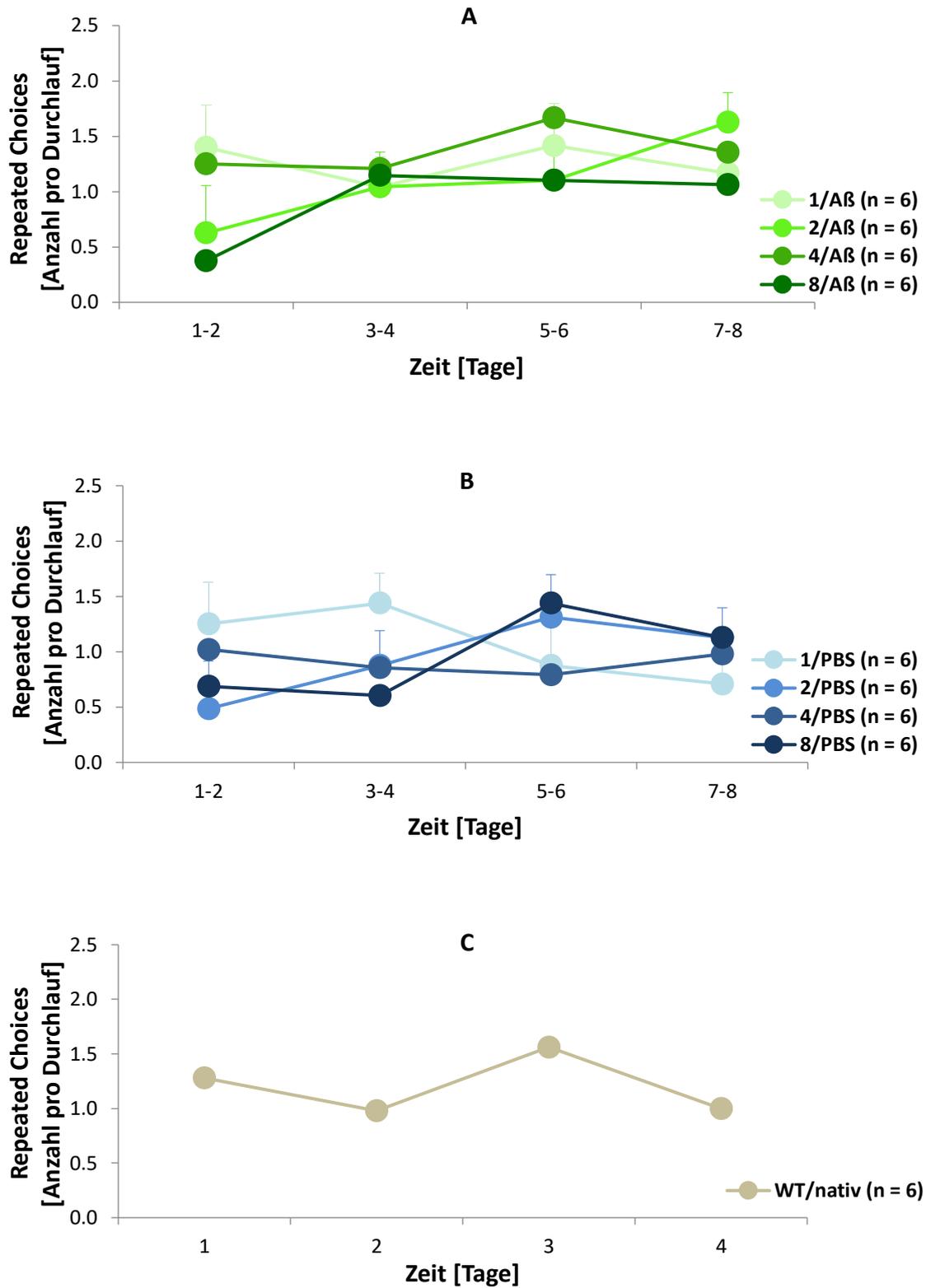


Abbildung 42: Graphische Darstellung zum Vergleich der Wiederholungsfehler (*Repeated Choices*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.2. Motorische Parameter

1.2.1. Linienüberschreitung (*Line Crossing*)

Tabelle 13: Anzahl der Linienüberschreitungen (*Line Crossing*) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/A β ₄₂	7.4 \pm 1.6	7.4 \pm 2.4	7.1 \pm 2.6	8.4 \pm 2.9	7.6 \pm 2.2
2/A β ₄₂	9.7 \pm 2.1	7.6 \pm 2.2	8.5 \pm 3.0	9.3 \pm 2.6	8.8 \pm 2.0
4/A β ₄₂	10.0 \pm 1.1	9.3 \pm 2.3	8.4 \pm 1.7	8.3 \pm 2.0	9.0 \pm 1.7
8/A β ₄₂	9.2 \pm 3.7	7.1 \pm 3.4	6.4 \pm 3.9	6.4 \pm 4.0	7.3 \pm 3.7
1/PBS	8.1 \pm 1.7	5.1 \pm 1.5	6.6 \pm 1.9	7.0 \pm 1.0	6.7 \pm 1.3
2/PBS	8.5 \pm 1.9	6.0 \pm 3.0	5.6 \pm 2.5	6.3 \pm 1.9	6.6 \pm 2.2
4/PBS	7.8 \pm 1.7	5.7 \pm 2.8	6.4 \pm 2.1	6.0 \pm 2.1	6.5 \pm 2.1
8/PBS	7.9 \pm 2.9	7.5 \pm 5.3	5.4 \pm 3.3	5.0 \pm 2.8	6.5 \pm 3.4
N	9.0 \pm 1.6	7.3 \pm 1.1	7.5 \pm 1.7	7.8 \pm 1.2	7.9 \pm 1.1

Die Daten der Mittelwerte und Standardabweichungen zeigen, dass die Anzahl der Linienüberschreitungen bei allen Gruppen der Versuchstiere anfänglich abnimmt und dann über die restliche Versuchszeit hinweg tendenziell stabil bleibt (A β ₄₂: MW = 8.17, SD = 6.21, PBS: MW = 6.56, SD = 1.72, N: MW = 7.91, SD = 1.73).

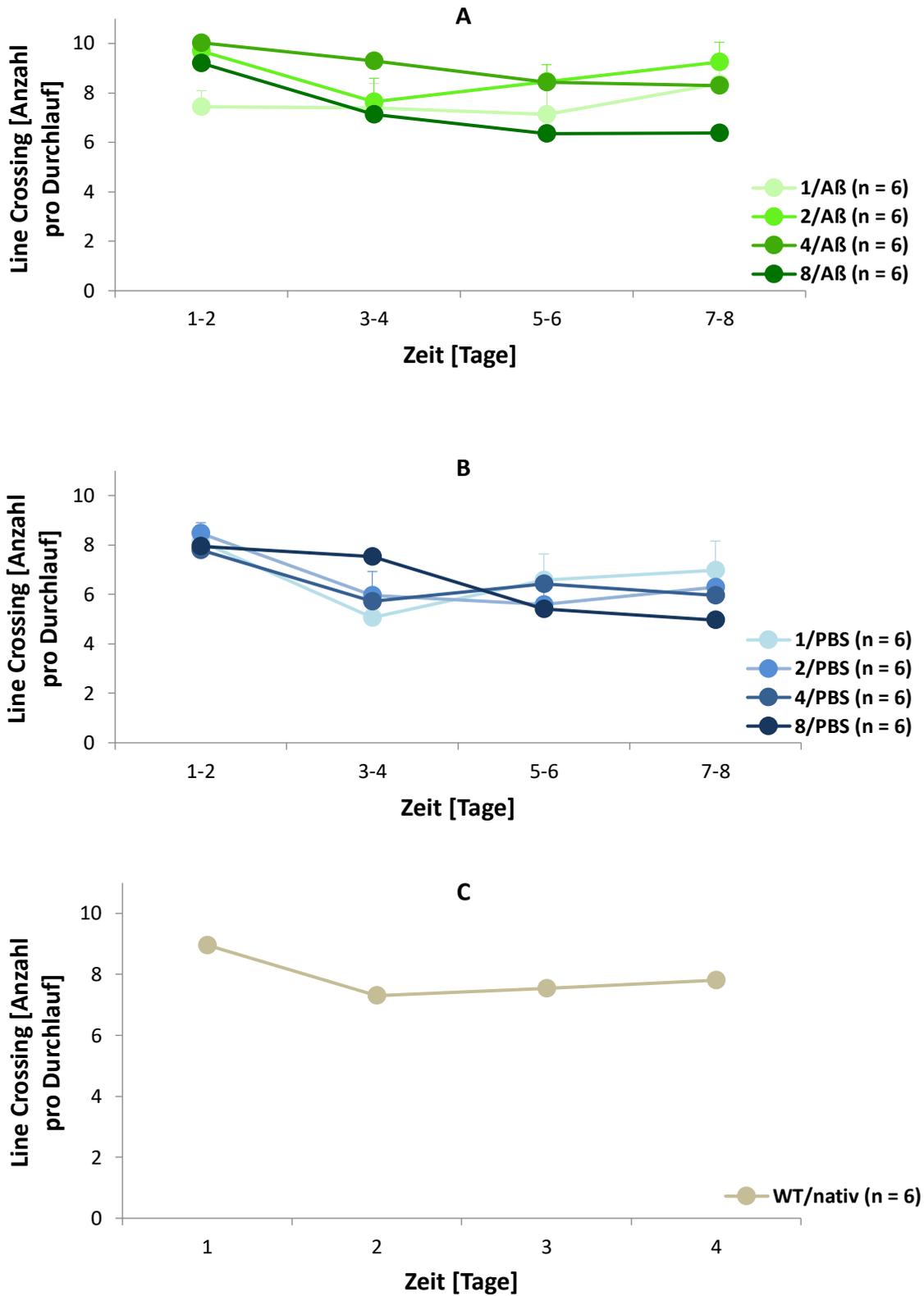


Abbildung 43: Graphische Darstellung zum Vergleich der Linienüberschreitungen (*Line Crossing*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.2.1. Fresszeit (*Time Food Intake*)

Tabelle 14: Fresszeit einer Futterbelohnung (*Time Food Intake*) in Sekunden (s) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW ± SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aß₄₂	3.1 ± 1.9	3.7 ± 2.0	4.3 ± 2.1	4.9 ± 2.1	4.0 ± 1.9
2/Aß₄₂	2.3 ± 2.0	3.9 ± 2.4	4.9 ± 2.3	4.7 ± 2.3	4.0 ± 2.0
4/Aß₄₂	2.5 ± 1.7	3.4 ± 2.0	4.1 ± 2.0	5.5 ± 1.8	3.9 ± 1.3
8/Aß₄₂	1.7 ± 1.3	3.6 ± 2.7	3.9 ± 2.8	4.4 ± 3.2	3.4 ± 2.3
1/PBS	3.9 ± 1.9	5.8 ± 2.7	5.5 ± 2.7	5.6 ± 2.9	5.2 ± 2.5
2/PBS	1.5 ± 1.4	1.9 ± 2.0	3.4 ± 2.5	4.0 ± 2.0	2.7 ± 1.6
4/PBS	3.6 ± 2.4	4.4 ± 3.2	4.5 ± 3.2	4.6 ± 2.9	4.3 ± 2.8
8/PBS	2.3 ± 2.8	2.4 ± 3.1	5.0 ± 2.7	6.1 ± 2.9	3.9 ± 2.4
N	4.0 ± 2.4	5.9 ± 2.2	7.0 ± 1.9	6.9 ± 1.4	5.9 ± 1.5

Die benötigte Zeit zum Fressen einer Futterbelohnung pro Durchlauf steigt bei allen 3 Gruppen über die Dauer des mHBT kontinuierlich an. Dabei weisen die Aß₄₂- und die PBS-Gruppen eine ähnliche Performanz auf (Aß₄₂: MW = 3.81, SD = 2.46, PBS: MW = 4.02, SD = 3.04). Die Nativen Tiere beginne von Anfang an mit einer etwas längeren Fresszeit, zeigen aber einen ähnlichen Trend auf (N: MW = 5.93, SD = 2.25).

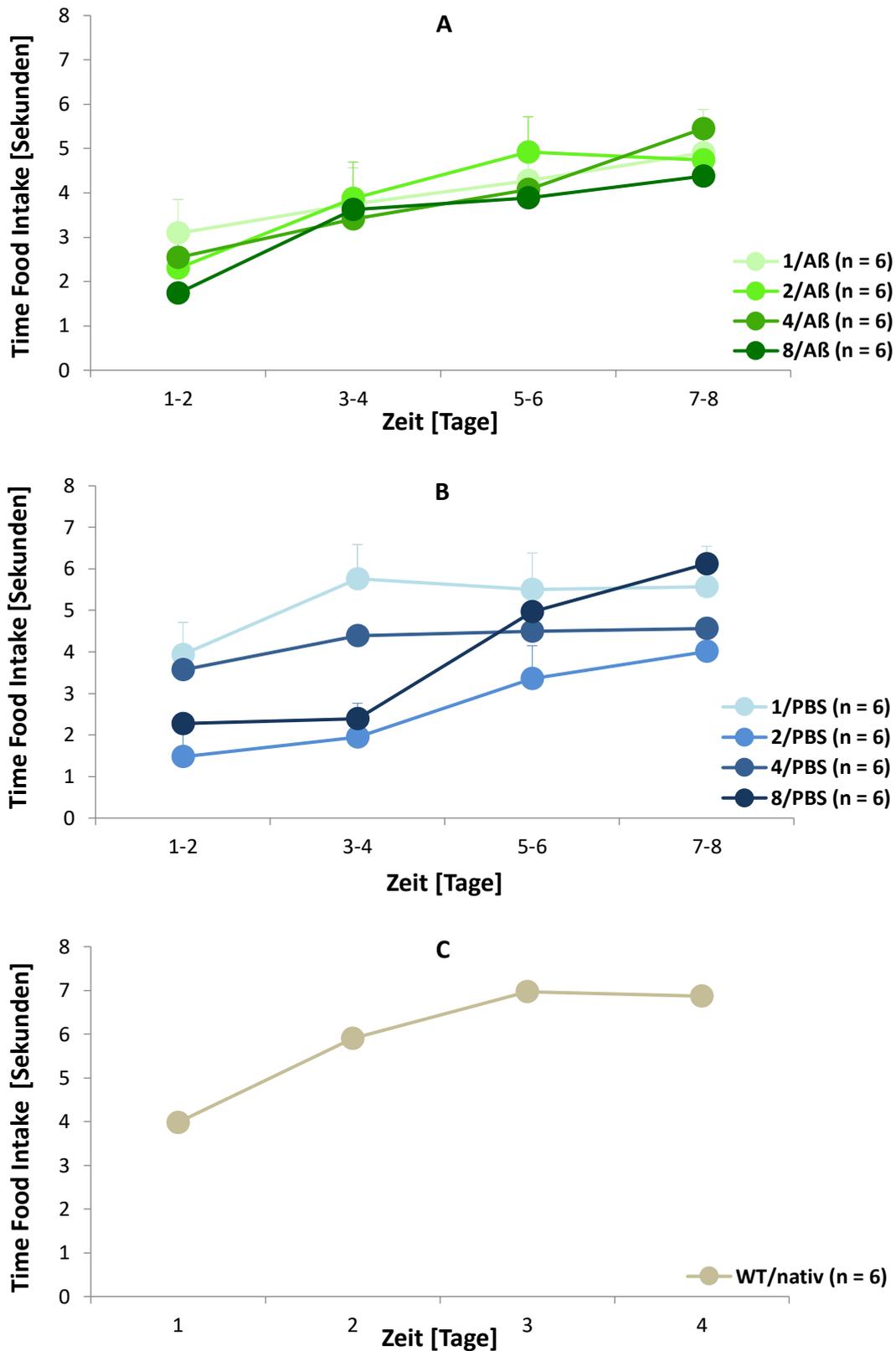


Abbildung 44: Graphische Darstellung zum Vergleich der benötigten Fresszeit einer Futterbelohnung (*Time Food Intake*) in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW+SEM) je Gruppeneinteilung

1.3. Verhaltensparameter

1.3.1. Angstverhalten

1.3.1.1. Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (*Latency First Board Entry*)

Tabelle 15: Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (*Latency First Board Entry*) in Sekunden (s) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW±SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aß ₄₂	102.5 ± 65.2	96.9 ± 66.9	91.1 ± 76.4	53.5 ± 27.7	86.0 ± 57.0
2/Aß ₄₂	134.3 ± 79.7	100.6 ± 100.0	84.1 ± 99.0	71.2 ± 95.7	97.5 ± 87.2
4/Aß ₄₂	90.9 ± 40.0	69.7 ± 38.3	57.7 ± 28.5	49.9 ± 21.7	67.1 ± 24.5
8/Aß ₄₂	121.7 ± 60.4	110.3 ± 81.1	103.0 ± 89.8	90.9 ± 90.8	106.5 ± 79.5
1/PBS	26.6 ± 71.1	27.3 ± 99.6	31.2 ± 67.7	11.3 ± 53.0	23.3 ± 72.8
2/PBS	122.4 ± 79.5	127.6 ± 107.5	94.1 ± 100.1	82.6 ± 98.7	106.7 ± 94.4
4/PBS	98.6 ± 97.4	97.9 ± 103.9	68.3 ± 104.9	66.2 ± 105.3	82.7 ± 100.8
8/PBS	90.9 ± 75.7	70.9 ± 71.89	69.2 ± 63.0	44.3 ± 44.3	68.7 ± 62.3
N	39.4 ± 26.7	33.2 ± 27.9	25.6 ± 14.3	23.9 ± 14.4	30.5 ± 15.0

Beim direkten Vergleich der Versuchsgruppen (Aß₄₂, PBS und N) untereinander, hinsichtlich des Parameters Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch, ist die Zeit der N-Tiere von Tag 1 des mHBT an auffallend gering. Sie sinkt aber wie bei allen Gruppen über den Versuchszeitraum hinweg. So war die Performanz am höchsten in den Aß₄₂-Gruppen (MW = 89.27 SD = 76.48) und nahm ab in den PBS-Gruppen (MW = 82.74 SD = 89.33) und N-Gruppe (MW = 30.53 SD = 24.58), in dieser Reihenfolge.

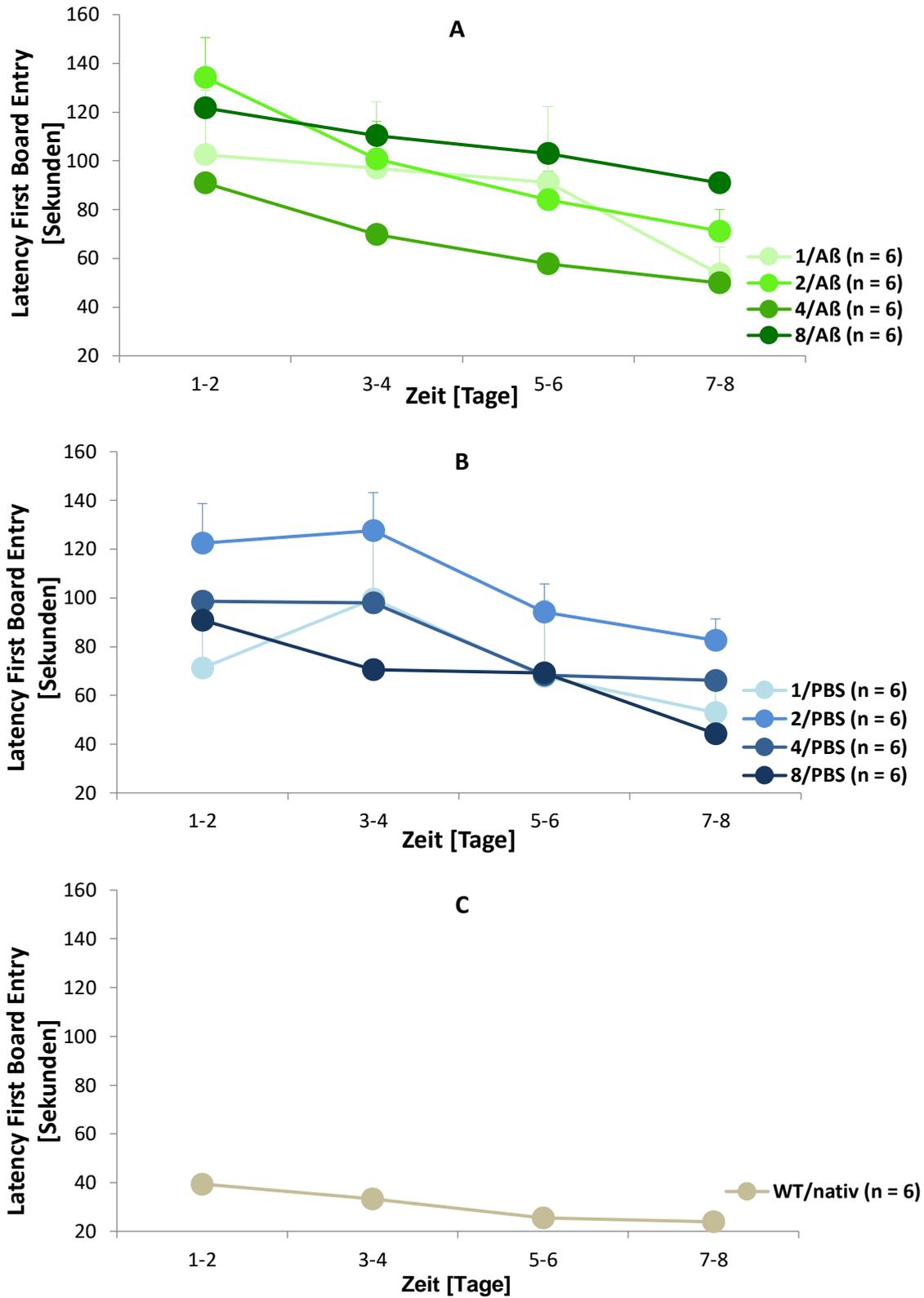


Abbildung 45: Graphische Darstellung zum Vergleich der Latenzzeit bis zum ersten Boardbesuch (*Latency First Board Entry*) in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW±SEM) je Gruppeneinteilung

1.3.1.2. Gesamtzeit auf dem Board (*Time on Board*)

Tabelle 16: Gesamtzeit auf dem Board (*Time on Board*) in % der Gesamtzeit aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW±SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aß ₄₂	20.2 ± 11.7	22.9 ± 12.3	23.6 ± 13.7	28.9 ± 12.8	23.9 ± 12.1
2/Aß ₄₂	13.2 ± 10.1	23.0 ± 14.7	24.0 ± 13.1	29.0 ± 15.2	22.3 ± 12.5
4/Aß ₄₂	18. ± 10.3	22.6 ± 9.6	27.4 ± 11.7	29.0 ± 11.9	24.4 ± 9.0
8/Aß ₄₂	8.8 ± 4.7	15.9 ± 11.3	21.3 ± 16.4	24.3 ± 18.1	17.6 ± 12.5
1/PBS	25.0 ± 12.2	28.3 ± 13.3	27.1 ± 13.6	31.3 ± 17.2	27.9 ± 12.8
2/PBS	11.9 ± 9.2	11.2 ± 9.9	19.2 ± 10.9	33.3 ± 20.4	18.9 ± 10.5
4/PBS	22.6 ± 18.2	29.1 ± 21.1	33.2 ± 22.2	39.8 ± 25.3	31.2 ± 21.0
8/PBS	20.0 ± 19.9	24.3 ± 28.7	36.2 ± 28.8	48.9 ± 27.0	32.3 ± 25.2
N	31.5 ± 15.3	34.7 ± 11.6	42.4 ± 4.3	47.8 ± 11.5	39.1 ± 7.4

Bei allen 3 Gruppen nimmt die Zeit, die die Tiere auf dem Board pro Durchlauf verbringen, über die Dauer des Versuches kontinuierlich zu. Dennoch starten die nativen Tiere von Beginn an mit einer längeren Aufenthaltszeit auf dem Board (MW = 26.39, SD = 18.25), gefolgt von den Tieren den PBS-Gruppen (MW = 27.57, SD = 21.47). Beide Gruppen haben im Vergleich zu den Aß₄₂-Gruppen (MW = 22.28, SD = 13.96) eine höhere Durchschnittszeit und einen steileren Kurvenverlauf.

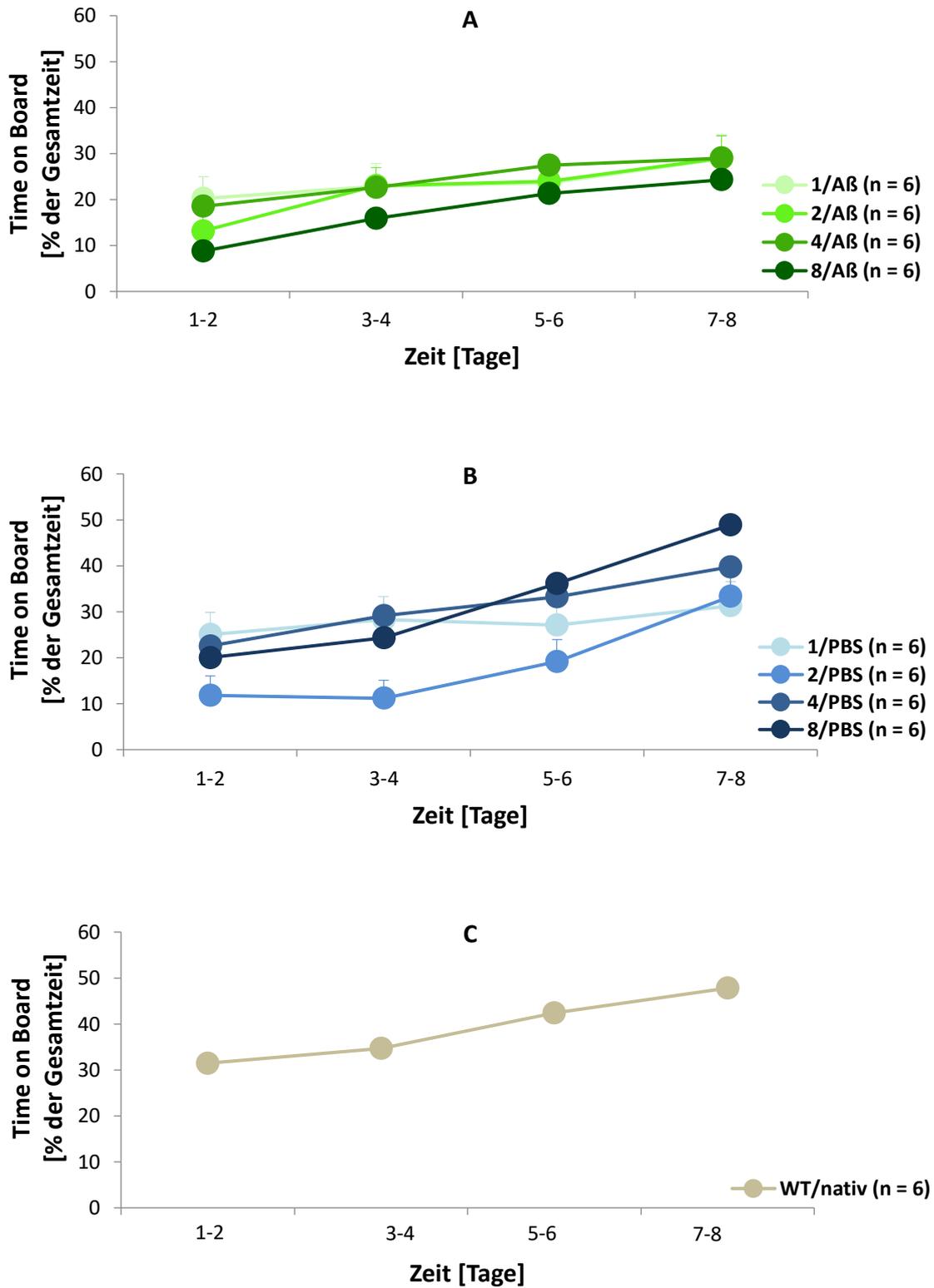


Abbildung 46: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit auf dem Board (*Time on Board*) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.3.1.3. Immobilitätsphase (*Immobility*)

Tabelle 17: Gesamtzeit der Immobilitätsphasen (*Immobility*) % der Gesamtzeit aller 9 Untergruppen (n= 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aβ₄₂	6.2 \pm 5.0	4.8 \pm 3.3	5.3 \pm 5.3	1.5 \pm 1.4	4.4 \pm 3.2
2/Aβ₄₂	5.4 \pm 7.7	11.9 \pm 17.3	9.0 \pm 17.0	6.9 \pm 13.7	8.3 \pm 13.3
4/Aβ₄₂	5.6 \pm 5.2	3.5 \pm 3.7	3.8 \pm 4.4	4.4 \pm 4.5	4.3 \pm 2.9
8/Aβ₄₂	12.8 \pm 13.8	14.3 \pm 16.9	14.4 \pm 20.4	14.0 \pm 24.7	13.9 \pm 18.6
1/PBS	5.3 \pm 9.9	12.5 \pm 23.4	10.0 \pm 20.9	2.7 \pm 5.6	7.6 \pm 14.9
2/PBS	6.9 \pm 8.7	18.0 \pm 27.1	17.0 \pm 26.3	12.1 \pm 15.6	13.5 \pm 19.4
4/PBS	6.4 \pm 10.8	11.7 \pm 18.3	7.4 \pm 16.1	8.4 \pm 17.4	8.7 \pm 15.6
8/PBS	6.6 \pm 9.6	8.5 \pm 15.7	8.7 \pm 14.3	6.4 \pm 13.1	7.5 \pm 13.1
N	0.5 \pm 1.0	1.2 \pm 1.6	0.7 \pm 0.7	0.3 \pm 0.8	0.7 \pm 0.7

Bei den Mittelwerten und Standardabweichungen der Gesamtzeit der Immobilitätsphasen zeigt die Gruppe der nativen Tiere (MW = 0.69 SD = 1.34) eine deutlich geringerer Gesamtzeit im Gegensatz zu den PBS- (MW = 8.91 SD = 17.24) und A β ₄₂-Gruppen (MW = 7.74 SD = 13.56). Bei diesen Gruppen kommt es zu starken Schwankungen der Daten.

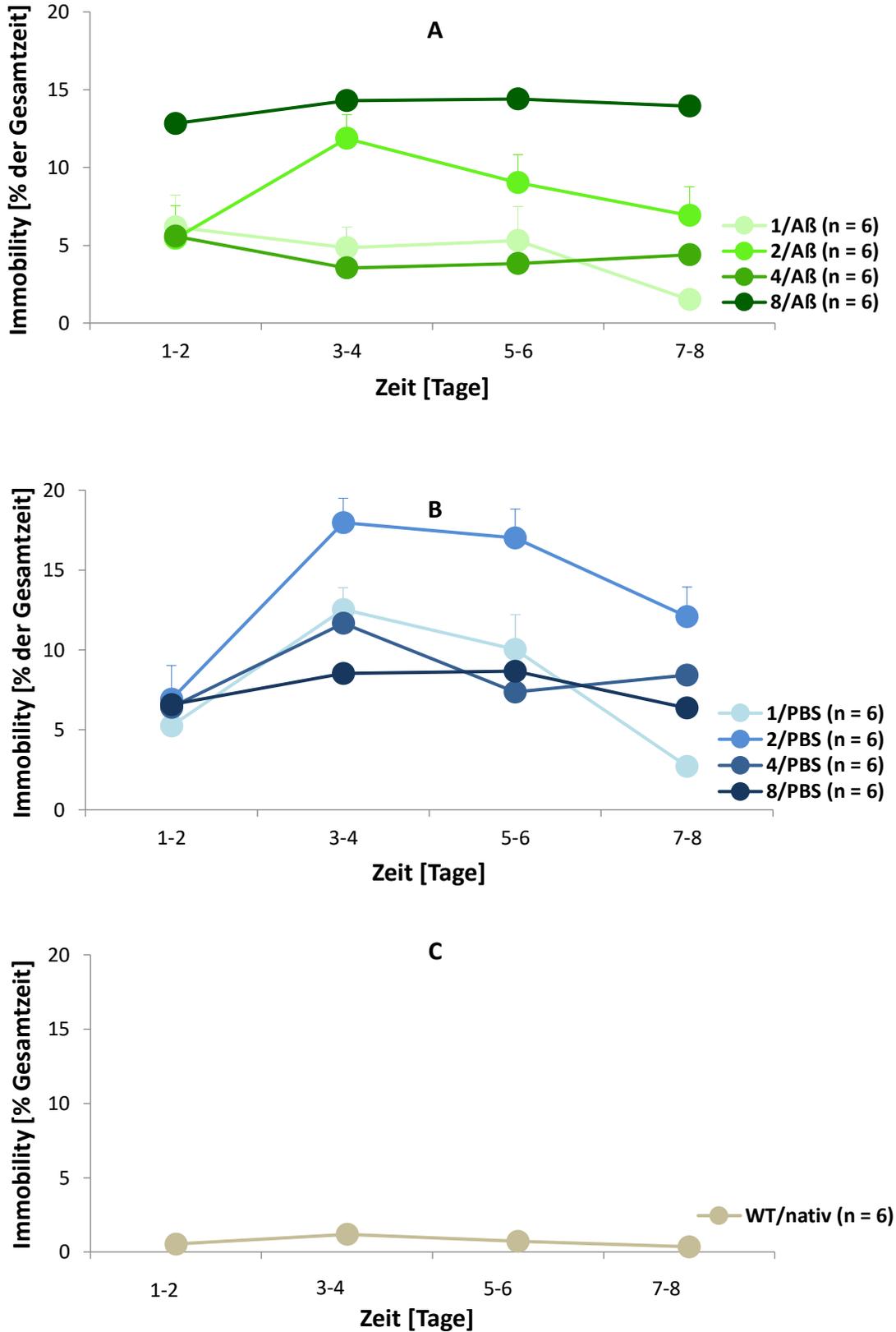


Abbildung 47: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit der Immobilitätsphase (*Immobility*) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.3.2. Erkundungsverhalten

1.3.2.1. Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch (*Latency First Hole Visit*)

Tabelle 18: Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch (*Latency First Hole Visit*) in Sekunden (s) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aβ₄₂	171.6 \pm 66.8	127.9 \pm 76.0	128.2 \pm 81.3	97.6 \pm 63.6	131.3 \pm 69.6
2/Aβ₄₂	220.1 \pm 49.3	143.5 \pm 81.5	104.9 \pm 90.7	89.4 \pm 99.0	139.5 \pm 75.4
4/Aβ₄₂	163.1 \pm 57.7	124.4 \pm 58.8	93.0 \pm 50.6	66.3 \pm 30.7	111.7 \pm 33.6
8/Aβ₄₂	244.9 \pm 44.0	163.2 \pm 88.4	130.4 \pm 107.5	119.1 \pm 105.0	164.4 \pm 82.6
1/PBS	148.8 \pm 59.1	130.7 \pm 70.6	123.7 \pm 85.4	101.7 \pm 75.1	126.2 \pm 68.8
2/PBS	222.0 \pm 45.5	188.6 \pm 83.6	139.5 \pm 85.3	99.5 \pm 96.5	162.4 \pm 71.8
4/PBS	189.4 \pm 100.6	142.0 \pm 115.2	113.5 \pm 121.0	107.2 \pm 120.4	138.0 \pm 110.4
8/PBS	187.0 \pm 83.1	158.2 \pm 93.3	117.4 \pm 77.60	62.3 \pm 56.3	131.3 \pm 73.6
N	139.2 \pm 74.6	87.3 \pm 45.8	60.6 \pm 26.7	43.5 \pm 24.7	82.7 \pm 29.7

Die Daten der Mittelwerte und Standardabweichungen zeigen, dass die Latenzzeit über die Dauer des mHBT bei allen Gruppen der Versuchstiere kontinuierlich abnimmt. Die Zeit bis zum Besuch des ersten Zylinders ist bei den nativen Tieren (MW = 82.65 SD = 49.27) am geringste, gefolgt von den PBS-Gruppen (MW = 139.46 SD = 95.33) und den A β ₄₂-Gruppen (MW = 136.73 SD = 83.14) in dieser Reihenfolge.

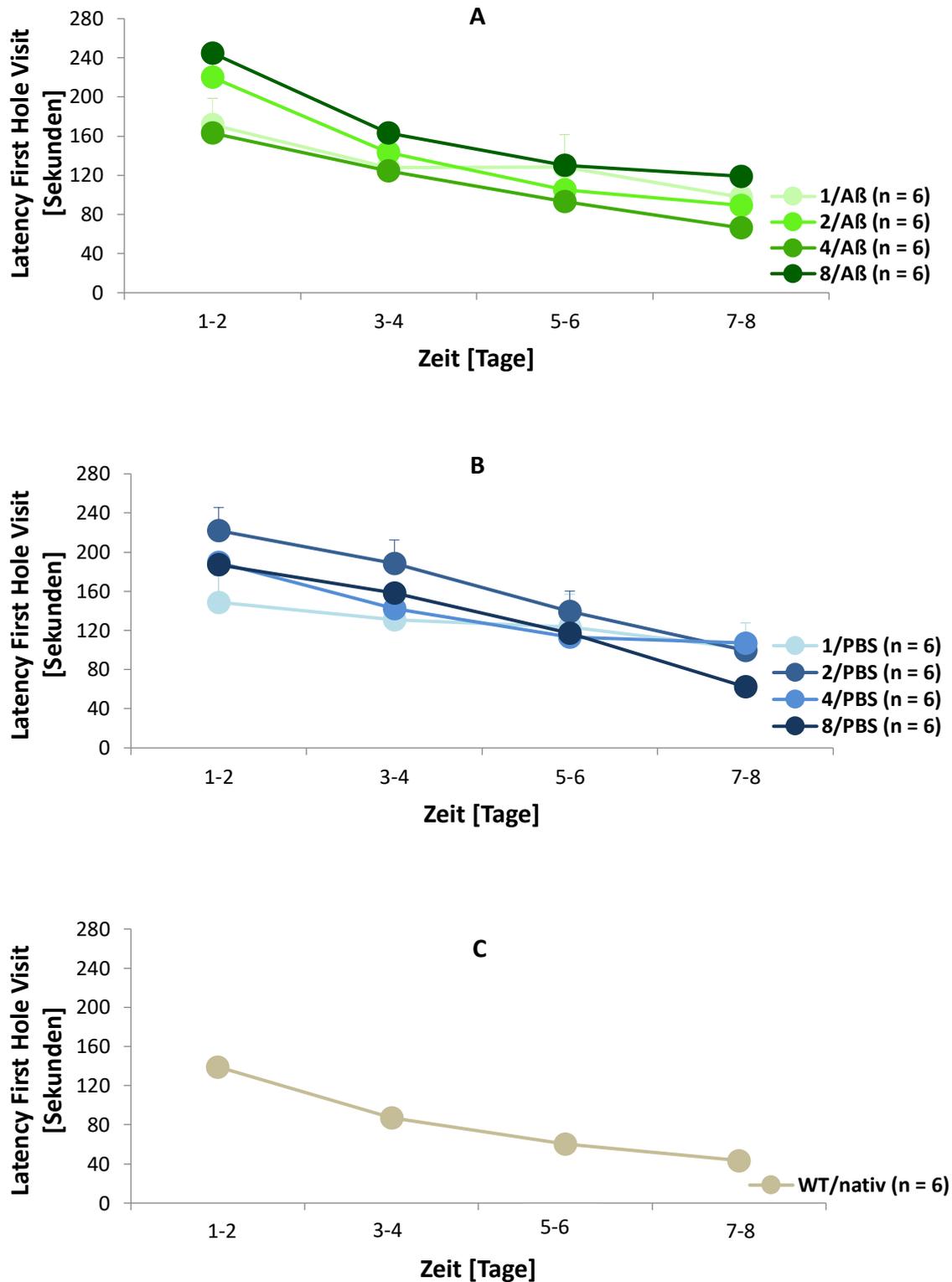


Abbildung 48: Graphische Darstellung zum Vergleich der Latenzzeit bis zum ersten Zylinderbesuch mit Markierung (*Latency First Hole Visit*) in Sekunden (s) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) (A) je

Gruppeneinteilung

1.3.2.2. Anzahl der besuchten markierten Zylinder (*Correct Hole Visits*)

Tabelle 19: Anzahl der besuchten markierten Zylinder (*Correct Hole Visits*) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aβ₄₂	2.1 \pm 1.3	2.3 \pm 1.1	2.4 \pm 1.3	2.7 \pm 0.5	2.3 \pm 1.0
2/Aβ₄₂	1.5 \pm 1.1	2.2 \pm 1.3	2.1 \pm 1.0	2.6 \pm 1.2	2.1 \pm 1.0
4/Aβ₄₂	1.9 \pm 1.4	2.2 \pm 1.0	2.4 \pm 1.2	3.2 \pm 0.8	2.3 \pm 0.8
8/Aβ₄₂	0.8 \pm 0.7	1.6 \pm 1.1	1.9 \pm 1.4	1.9 \pm 1.3	1.5 \pm 1.0
1/PBS	2.4 \pm 1.0	2.5 \pm 1.2	2.4 \pm 1.1	2.3 \pm 1.3	2.4 \pm 1.1
2/PBS	1.0 \pm 1.0	1.2 \pm 1.1	2.1 \pm 1.0	2.5 \pm 1.2	1.7 \pm 1.0
4/PBS	1.7 \pm 1.3	2.0 \pm 1.4	2.1 \pm 1.5	2.7 \pm 1.3	2.0 \pm 1.4
8/PBS	1.3 \pm 1.4	1.6 \pm 1.3	2.1 \pm 1.1	2.6 \pm 1.2	1.9 \pm 1.1
N	2.4 \pm 0.9	2.8 \pm 0.5	3.2 \pm 0.2	3.4 \pm 0.5	3.0 \pm 0.4

Bei allen Versuchsgruppen nimmt die Anzahl der besuchten markierten Zylinder mit Futterbelohnung über die Dauer des mHBT hinweg zu. Die Tiere der Gruppe N besuchen insgesamt über die Zeit häufiger die markierten mit Futterbelohnung gefüllten Zylinder (MW = 2.81 SD = 0.76) als die Tiere der PBS- (MW = 2.08 SD = 1.35) und A β ₄₂-Gruppen (MW = 2.02 SD = 1.34).

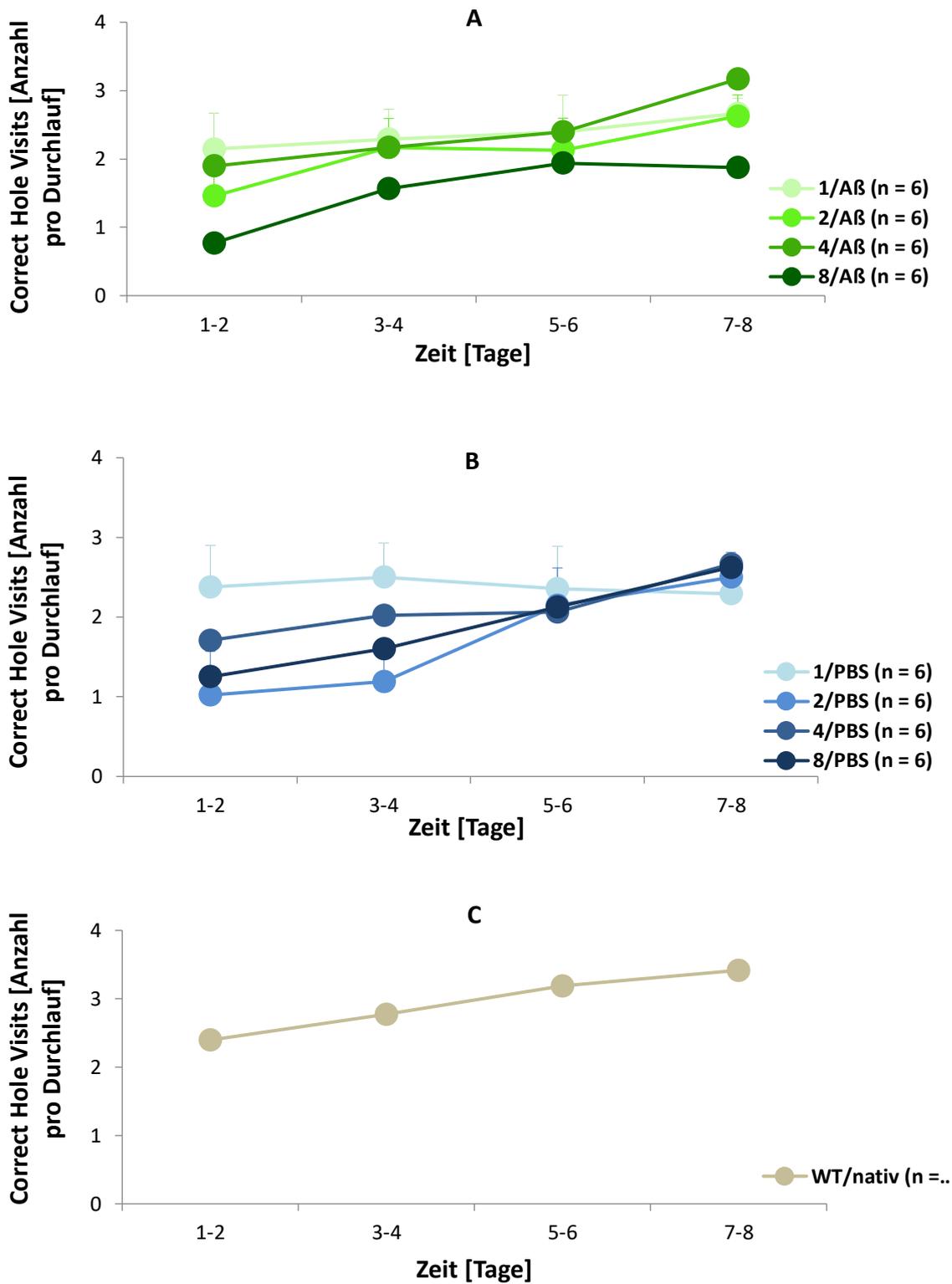


Abbildung 49: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl der besuchten markierten Zylinder (*Correct Hole Visits*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten (MW \pm SEM) je Gruppeneinteilung

1.3.2.3. Aufrichten auf die Hinterbeine (*Rearing*)

Tabelle 20: Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (*Rearing*) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW±SD)

Gruppe	Tag 1- 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aß ₄₂	23.2 ± 4.2	23.2 ± 5.5	20.8 ± 3.6	23.9 ± 11.8	22.8 ± 4.7
2/Aß ₄₂	25.6 ± 6.5	22.8 ± 11.8	29.0 ± 15.9	30.4 ± 12.7	26.9 ± 10.8
4/Aß ₄₂	28.5 ± 7.1	28.6 ± 7.5	23.5 ± 10.4	21.9 ± 9.2	25.6 ± 6.9
8/Aß ₄₂	28.6 ± 13.1	25.7 ± 16.7	19.9 ± 16.4	23.9 ± 17.8	24.5 ± 14.8
1/PBS	23.2 ± 7.9	12.6 ± 5.7	19.5 ± 6.7	25.2 ± 10.0	20.1 ± 6.8
2/PBS	29.9 ± 9.3	24.5 ± 12.6	18.1 ± 8.0	13.5 ± 6.1	21.5 ± 7.3
4/PBS	22.6 ± 3.5	13.4 ± 5.6	22.4 ± 9.2	15.4 ± 6.0	18.4 ± 4.8
8/PBS	20.1 ± 9.3	25.7 ± 15.8	13.9 ± 10.8	9.2 ± 7.5	17.2 ± 10.2
N	23.6 ± 9.4	20.6 ± 8.8	19.8 ± 5.8	14.2 ± 7.6	19.6 ± 5.9

Tendenziell ist bei allen Tieren der 3 Hauptgruppen (bis auf die 2/Aß₄₂- und die 1/PBS-Gruppe) ein Abwärtstrend in der Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine pro Durchlauf zu erkennen: die Aß₄₂-Gruppen mit den höchsten Mittelwerten (MW = 25.01 SD = 12.94), abfallend gefolgt von den Nativen Tieren (MW = 19.56 SD = 9.89) und den PBS-Gruppen (MW = 19.35 SD = 11.10) welche recht ähnlich im Mittelwertvergleich sind.

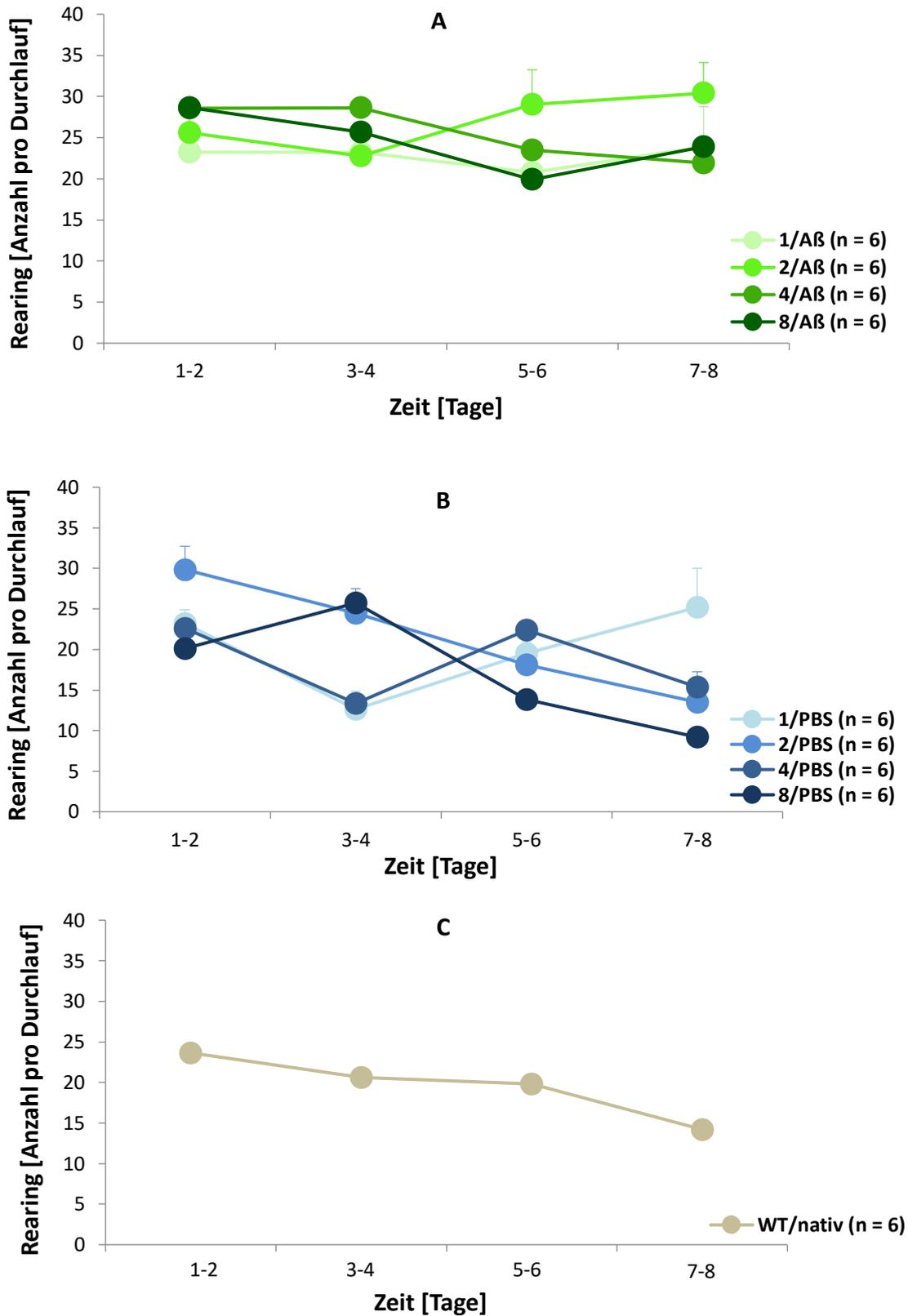


Abbildung 50: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (*Rearing*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.3.3. Erregung

1.3.3.1. Putzphasen (*Grooming*)

Tabelle 21: Gesamtzeit der Putzphasen (*Grooming*) in % der Gesamtzeit aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aβ₄₂	2.9 \pm 1.2	4.3 \pm 2.0	4.9 \pm 1.4	5.1 \pm 2.8	4.3 \pm 1.5
2/Aβ₄₂	3.3 \pm 1.0	4.4 \pm 2.0	3.2 \pm 1.7	2.8 \pm 1.8	3.4 \pm 1.3
4/Aβ₄₂	2.9 \pm 1.3	3.0 \pm 1.5	4.1 \pm 2.1	5.4 \pm 2.9	3.9 \pm 1.7
8/Aβ₄₂	2.3 \pm 0.9	3.7 \pm 2.4	3.9 \pm 0.7	2.7 \pm 1.0	3.1 \pm 0.8
1/PBS	3.9 \pm 1.6	5.2 \pm 1.8	3.8 \pm 1.1	4.3 \pm 1.4	4.3 \pm 1.1
2/PBS	3.5 \pm 1.4	5.0 \pm 2.3	4.7 \pm 2.2	4.7 \pm 1.9	4.5 \pm 1.3
4/PBS	1.1 \pm 0.4	2.9 \pm 1.7	2.7 \pm 1.6	2.8 \pm 2.3	2.4 \pm 1.2
8/PBS	2.7 \pm 1.1	2.8 \pm 1.2	3.0 \pm 1.6	3.0 \pm 1.6	2.9 \pm 1.3
N	3.3 \pm 1.5	2.9 \pm 0.9	2.5 \pm 0.7	3.1 \pm 2.5	3.0 \pm 1.1

Bei allen 3 Hauptgruppen (A β ₄₂: MW = 3.68 SD = 2.20, PBS: MW = 3.52 SD = 2.17, N: MW = 2.96 SD = 2.08) ist ein stark schwankender Verlauf während der 8 Testtage in den Putzphasen zu sehen. Wobei der Trend im Verlauf des mHBT bei den mit A β ₄₂- und PBS behandelten Tieren eher steigend und bei den nativen Tieren abfallend ist.

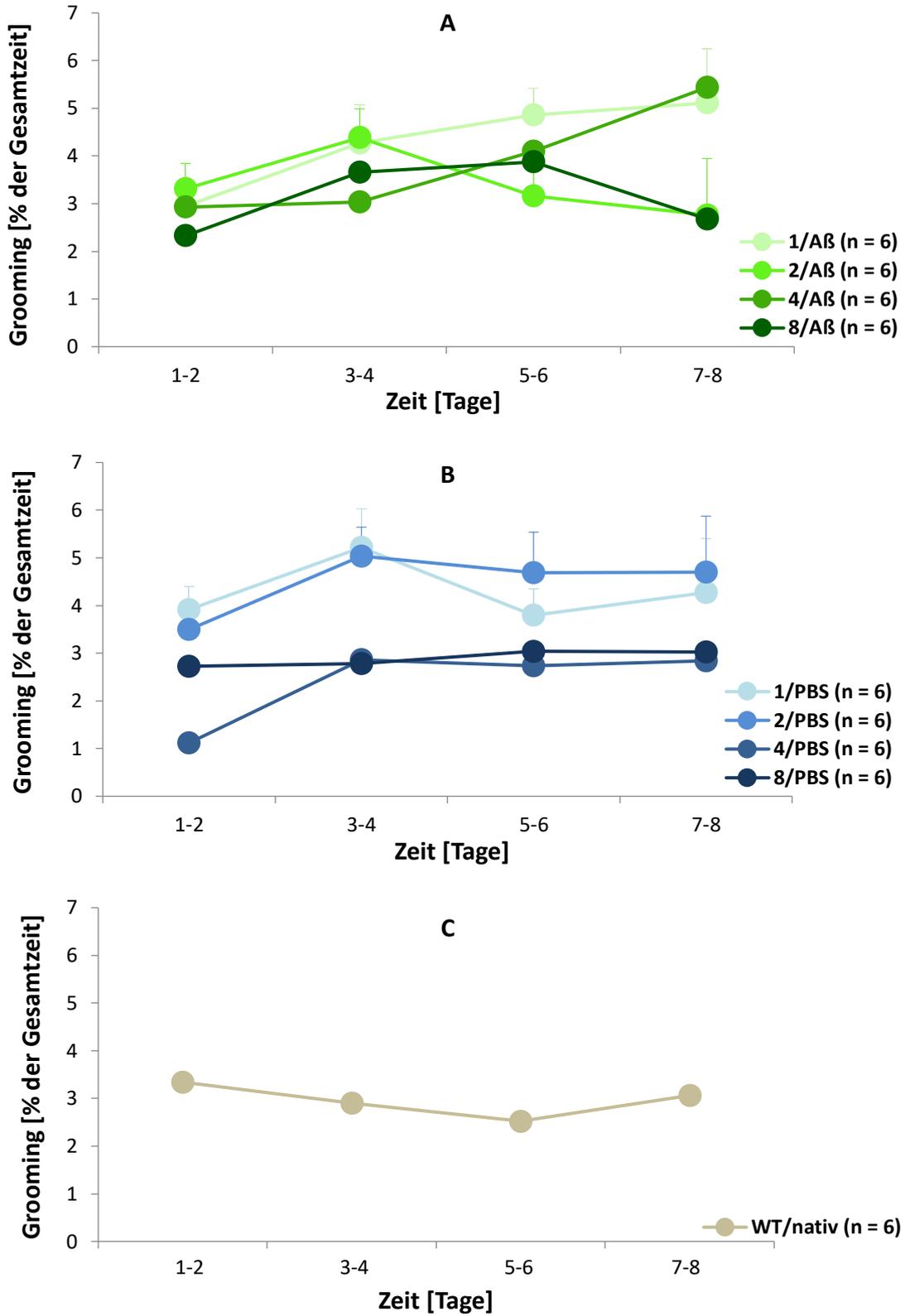


Abbildung 51: Graphische Darstellung zum Vergleich der Gesamtzeit der Putzphase (*Grooming*) in % der Gesamtzeit pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

1.3.3.2. Kotabsatz (*Boli*)

Tabelle 22: Anzahl des Kotabsatzes (*Boli*) aller 9 Untergruppen (n = 6) im mHBT (dargestellt als MW \pm SD)

Gruppe	Tag 1 - 2	Tag 3 - 4	Tag 5 - 6	Tag 7 - 8	Tag 1 - 8
1/Aβ₄₂	3.9 \pm 1.8	2.8 \pm 1.3	1.5 \pm 1.4	0.9 \pm 0.6	2.3 \pm 1.2
2/Aβ₄₂	3.4 \pm 1.9	2.3 \pm 2.2	1.1 \pm 1.6	0.7 \pm 0.9	1.9 \pm 1.6
4/Aβ₄₂	1.2 \pm 1.0	0.4 \pm 0.5	0.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.4
8/Aβ₄₂	2.2 \pm 1.4	1.0 \pm 1.6	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.8 \pm 0.7
1/PBS	0.7 \pm 2.0	0.5 \pm 1.5	0.6 \pm 0.9	0.2 \pm 0.3	0.5 \pm 1.2
2/PBS	1.5 \pm 1.0	1.3 \pm 1.4	0.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.2	0.8 \pm 0.7
4/PBS	3.9 \pm 1.6	1.5 \pm 1.8	0.2 \pm 0.3	0.3 \pm 0.5	1.5 \pm 0.9
8/PBS	1.0 \pm 1.2	0.6 \pm 1.1	0.4 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.7
N	1.2 \pm 1.6	0.6 \pm 1.3	0.3 \pm 0.6	0.3 \pm 0.5	0.6 \pm 1.0

Bei allen Gruppen des mHBT reduziert sich über die Dauer des Versuches die Anzahl des Kotabsatzes pro Durchlauf. Dabei zeigen die nativen Tiere die niedrigsten Werte (MW = 0.60, SD = 1.11) gefolgt von den PBS-Gruppen (MW = 0.99, SD = 1.18) und den A β ₄₂-Gruppen (MW = 1.37, SD = 1.53), in dieser Reihenfolge.

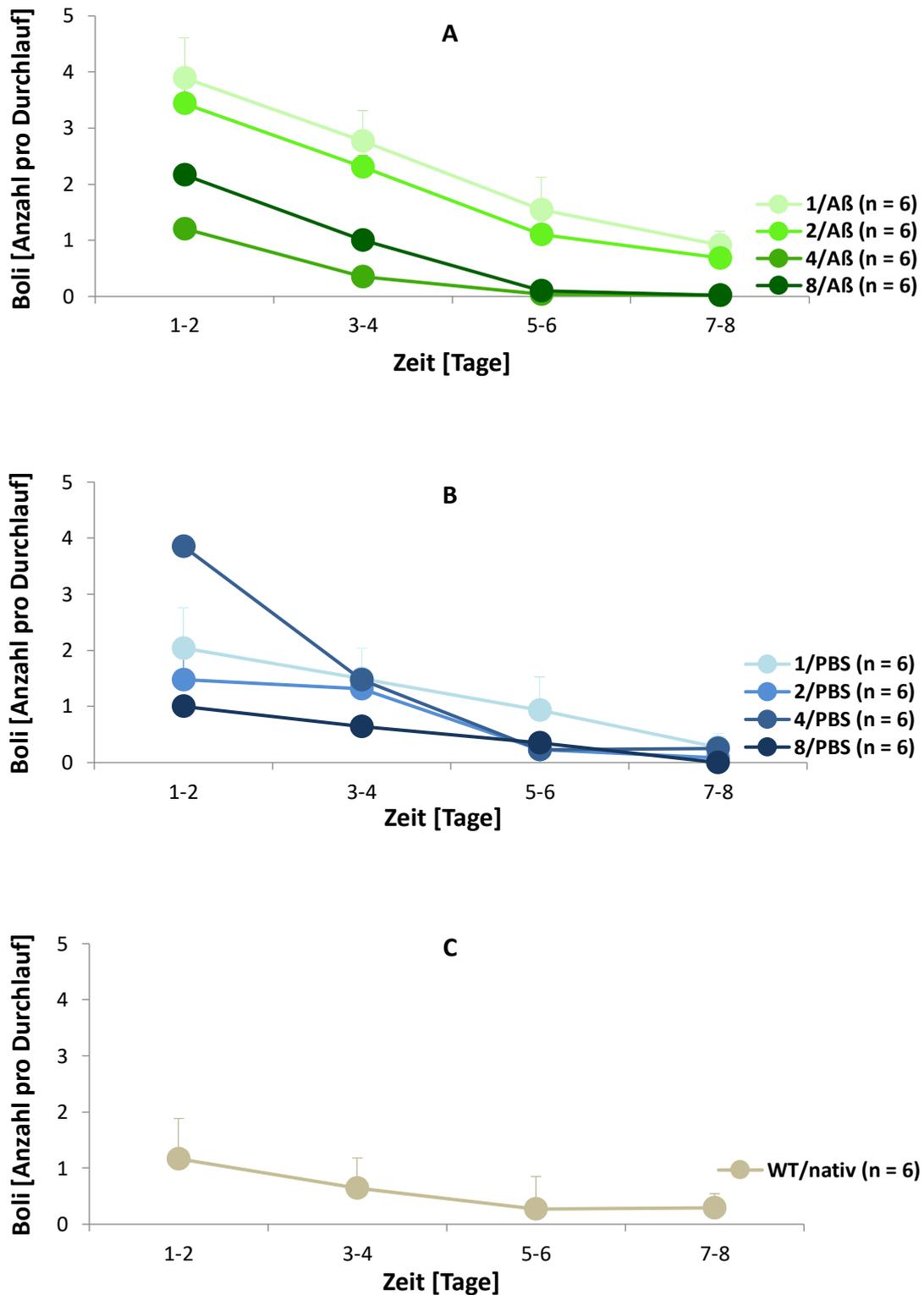


Abbildung 52: Graphische Darstellung zum Vergleich der Anzahl des Kotabsatzes (*Boli*) pro Durchlauf zu den festgelegten Untersuchungszeitpunkten ($MW \pm SEM$) je Gruppeneinteilung

2. Rezepte Verzeichnis

2.1. Proteinaufbereitung der Proben

Extraktionslösung (für 1ml):

Substanz	Mengenangaben
Lysepufferlösung (Ripa Buffer, dt. Radioimmunpräzipitations-Assay Puffer)	970 µl
50 x Complete (Mini Protease Inhibitor Cocktail)	20 µl
100 x Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	10 µl
Pepstatin	1 µl

2.2. Gelelektrophorese

Sodiumdodecylsulfat (SDS) -Laufpuffer:

Substanz	Hersteller der Ausgangssubstanz	Mengenangaben
Tris	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim	3.0 g
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	14.4 g
SDS	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg	1.0 g
H₂O dest.	Laboreigene Herstellung	ad 1 l

Transferpuffer:

Substanz	Hersteller der Ausgangssubstanz	Mengenangaben
Tris	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim	30.0 g
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	69.0 g
H₂O dest.	Laboreigene Herstellung	ad 1 l

TBS/T (pH 7.7 mit HCl):

Substanz	Hersteller der Ausgangssubstanz	Mengenangaben
Tris	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim	3 g
NaCl	B. Braun Melsungen AG, Puchheim	11.1 g
Tween 20	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	1 ml
H₂O dest.	Laboreigene Herstellung	ad 1 l

2.3. ELISA

Guanidinpuffer (5 mol / l, pH 8.0):

50 mmol / l 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Trometamol, Tris)

Kaseinpuffer (pH 8.0):

0.25 % Kasein + 0.05 % Natriumazid + 20 µg / ml Aprotinin + 5 mmol / l

Ethylendiamintetraessigsäure + 10 µg / ml Leupeptin in PBS

Tabelle 23: Übersicht über die Rezeptorproteine mit ihren jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern in den gewählten Verdünnungs-stufen

Rezeptorprotein	Caspase 3	Tau	P-Tau	TNF α
Primärantikörper	Cell Signaling # 9662	Cell Signaling # 4019	Cell Signaling # 11834	ProSci XP-5284
Molekulargewicht	polyklonal	monoklonal	polyklonal	polyklonal
Hersteller	Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA	Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA	Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA	ProSci™, California, USA
Verdünnung mit TBS/T	1 : 1.000	1 : 1.000	1 : 1.000	1 : 1.000
Sekundärantikörper	Anti-rabbit IgG, HRP- linked Antibody Cell Signaling # 7074	Anti-Maus IgG, HRP-linked Antibody Cell Signaling # 7076	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody Cell Signaling # 7074	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody Cell Signaling # 7074
Hersteller	Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA	Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA	Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA	Cell Signaling Technology®, Massachusetts, USA
Verdünnung	1 : 10.000	1 : 10.000	1 : 10.000	1 : 10.000

X. DANKSAGUNG

Nach Abschluss meiner Doktorarbeit möchte ich einen besonderen Dank bei meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek für die Übernahme des Themas an der Tierärztlichen Fakultät der LMU München aussprechen. Das mir entgegengebrachte Vertrauen, die unkomplizierte Form der externen Betreuung, die hilfreiche und entgegenkommende Durchsicht und Korrektur meiner Arbeit, sowie die stets freundliche Unterstützung und Beratung. Ohne Ihre Hilfe und offene Art wäre ich den letzten Schritt wahrscheinlich nicht mehr gegangen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. med., Dipl. phys. E. Kochs, ehemaliger Direktor und Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner, für die Möglichkeit die Dissertation an der Klinik für Anästhesiologie des Klinikums rechts der Isar der TU München durchführen zu können.

Dabei auch vielen Dank allen Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie und der Arbeitsgruppe Experimentelle Neuropharmakologie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, Überlassung des Themas und unzähligen Arbeitsstunden.

Danke auch an Nina Bayer und Andreas Blaschke für die Unterstützung in allen Laborangelegenheiten, sonst stünde ich vermutlich noch heute dort.

Vielen, vielen lieben Dank geht an all meine Freunden, allen voran Matthias, Kris, Tine und Franzi. Für die tatkräftige Unterstützung, die Zuversicht und den emotionalen Support in allen Phasen der Arbeit. Ihr habt mich von Anfang an auf diesem irren Weg begleitet, mir stets großartige Unterstützung zuteilwerden lassen und mich wirklich bei jedem Zaudern überzeugt: es lohnt sich weiterzukämpfen! Es ist wunderbar Euch in meinem Leben zu wissen!

Von ganzen Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern Carmen und Jochen Grimm durch Euch war es mir möglich Tiermedizin zu studieren und diese Promotion anzufertigen. Euch, meinen Schwiegereltern und den Rest der Familie danke ich, insbesondere für den Glauben an mich, Eure Liebe und den konstanten Beistand in jeglicher Hinsicht, besonders für die emotionale Unterstützung. Danke!

Abschließend gilt mein unermesslicher Dank meinem wunderbarem Mann Nico. Ohne Deine Unterstützung und ständigen Ansporn wäre diese Doktorarbeit wohl niemals zustande gekommen bzw. hätte ihren erfolgreichen Abschluss gefunden. Ich danke Dir, dass Du mir durch Deine Geduld, Deine moralische und finanzielle Unterstützung in den letzten Jahren, um nicht zu sagen im letzten Jahrzehnt, meinen Traum, Tierarzt zu werden, ermöglicht hast. Du hast mich auf wunderbare Weise in jedem Moment der Promotionszeit und erst recht in den besonderen letzten Wochen mit einem zweiten Herzen unter meiner Brust, emotional mit unglaublicher Liebe, Geduld und Optimismus unterstützt. Dir widme ich diese Arbeit (inklusive Deiner Farbwahl ;))! Ich Liebe Dich!