

**Verhaltensdefizite und deren pharmakologische Beeinflussung durch  
Methylphenidat bei männlichen 5xFAD-Alzheimermäusen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Franziska Schneider

geb. am 17.08.1983 in Halle(Saale)

Gutachter: Prof. Dr. Klaus Reymann  
Prof. Dr. Steffen Roßner

eingereicht am: 26.05.2014

verteidigt am: 15.09.2014

Für meine Eltern und meinen Bruder

„Am Ende des Weges mag der Pessimist Recht bekommen,  
aber unterwegs hat es der Optimist leichter.“

OTTO ERNST (1862 – 1926)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Die Alzheimer-Krankheit .....	1
1.2	Mausmodell .....	4
1.3	Neurotransmittersysteme bei Alzheimer .....	5
1.4	Dopamin .....	6
1.4.1	Dopamin-Synthese .....	7
1.4.2	Dopamin-Signaltransduktion .....	10
1.4.3	Dopamin-Systeme .....	12
1.4.4	Die Rolle von Dopamin beim Lernen .....	14
1.5	Stimulation des Dopamin-Systems.....	18
1.6	Ziel der Arbeit .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.1	Puffer und Lösungen .....	23
2.2	Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....	25
2.3	Phänotypische Charakterisierung .....	25
2.4	Substanzinjektion.....	26
2.5	Verhaltensuntersuchungen.....	26
2.5.1	<i>Elevated plus maze</i> .....	28
2.5.2	<i>Open field</i> .....	28
2.5.3	<i>Adhesive removal test</i> .....	29
2.5.4	<i>Morris water maze</i> .....	29
2.5.5	Fußchock-Sensitivitätstest .....	30
2.5.6	<i>Fear conditioning</i> .....	30
2.5.7	Aktivität im Heimkäfig und Laufrad.....	32
2.6	Gehirnpräparation .....	32
2.7	Immunhistochemie .....	33
2.8	Mikroskopische Auswertung und Zellzählung.....	34

2.9	Statistik .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1	Charakterisierung der 5xFAD-Maus .....	36
3.1.1	Immunhistochemische Färbung der Plaques .....	36
3.1.2	Phänotypische Charakterisierung .....	39
3.1.3	Nestbau alter 5xFAD-Mäuse .....	40
3.1.4	Untersuchung zur Sensomotorik – <i>Adhesive removal test</i> .....	41
3.1.5	Untersuchung zur Sensorik – Fußschock-Sensitivitätstest .....	42
3.2	Verhalten der 5xFAD-Maus ohne pharmakologische Stimulation .....	43
3.2.1	<i>Elevated plus maze</i> ohne pharmakologische Stimulation .....	43
3.2.2	<i>Open field</i> ohne pharmakologische Stimulation .....	45
3.2.3	<i>Morris water maze</i> ohne pharmakologische Stimulation .....	46
3.2.4	<i>Fear conditioning</i> ohne pharmakologische Stimulation .....	51
3.3	Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung Tyrosinhydroxylase- (TH-) und Aminosäuredecarboxylase- (AADC-) positiver Neurone .....	52
3.4	Pharmakologische Stimulation der 5xFAD-Maus zum Zeitpunkt beginnender Verhaltensdefizite .....	54
3.4.1	<i>Elevated plus maze</i> 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation .....	54
3.4.2	<i>Open field</i> 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation ..	56
3.4.3	<i>Morris water maze</i> 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation .....	60
3.4.4	<i>Fear conditioning</i> 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation .....	64
3.5	Pharmakologische Stimulation der 5xFAD-Maus zum Zeitpunkt bestehender Verhaltensdefizite .....	66
3.5.1	<i>Elevated plus maze</i> 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation .....	66
3.5.2	<i>Open field</i> 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation ..	68

3.5.3	<i>Morris water maze</i> 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation .....	72
3.5.4	<i>Fear conditioning</i> 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation .....	76
3.5.5	Aktivität im Heimkäfig und im Laufrad 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.....	78
3.6	Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung des Dopamin-Transporters (DAT) .....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>86</b>
4.1	Die Entwicklung der Alzheimer-Pathologie bei der 5xFAD-Maus .....	87
4.1.1	Immunhistochemische Beschreibung.....	87
4.1.2	Charakterisierung der 5xFAD-Maus .....	89
4.1.3	Verhaltensbiologische Beeinträchtigungen bei 5xFAD-Männchen.....	92
4.1.4	5xFAD-Männchen als Verhaltensmodell zur Untersuchung der Alzheimer-Krankheit .....	96
4.2	Pharmakologische Stimulation männlicher 5xFAD-Alzheimermäuse.....	100
4.2.1	Einfluss von Methylphenidat auf das Verhalten von 5xFAD-Männchen .....	102
4.2.2	Aufhebung Alzheimer-symptomatischer Defizite durch Methylphenidat .....	109
4.3	Ausblick.....	111
4.4	Schlussfolgerung .....	112
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>137</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>138</b>

# 1 Einleitung

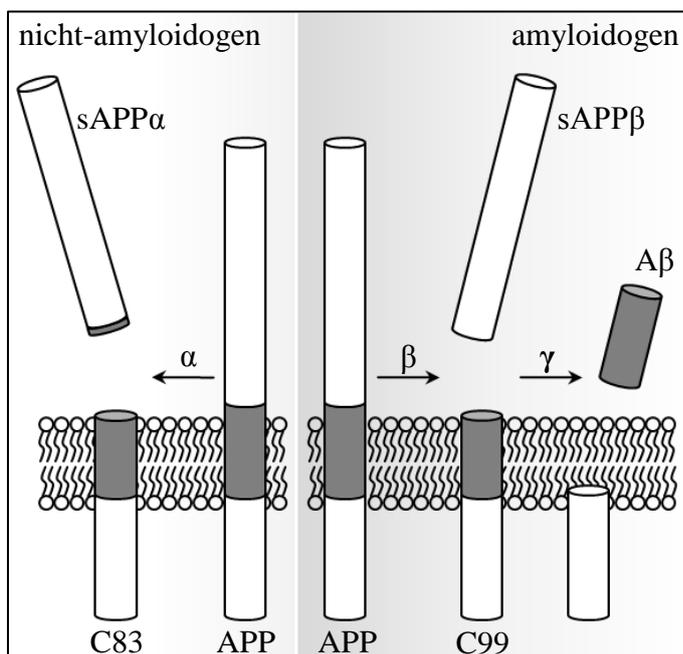
## 1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit (lat.: Morbus Alzheimer), benannt nach dem deutschen Psychiater Alois Alzheimer, ist eine neurodegenerative Erkrankung, von der vor allem Personen über dem 65. Lebensjahr betroffen sind. Sie macht rund 75 % der Demenzfälle aus (QIU ET AL. 2009) und betrifft ca. 35,6 Millionen Menschen weltweit (ITTNER UND GÖTZ 2011). Pro Jahr treten etwa 5 Mio. neue Fälle auf. Dabei steigt die Rate der Inzidenzfälle mit zunehmendem Alter bis 85 Jahren exponentiell an (QIU ET AL. 2009). Neben der vor allem im höheren Alter sporadisch auftretenden Erscheinungsform machen genetisch bedingte Fälle etwa 2-5 % der Erkrankung aus (QIU ET AL. 2009), bei denen sich die Symptome bereits vor dem 65. Lebensjahr manifestieren (BLENNOW ET AL. 2006).

Charakteristisch für die Alzheimer-Krankheit ist der Verlust der Hirnleistung, was durch mehrere Symptome gekennzeichnet ist. Neben einer zunehmenden Verschlechterung der Kognition (Problemlösungs-, Rechen- und Abstraktionsvermögen) und einer gestörten Merkfähigkeit (zuerst im Kurzzeitgedächtnis, später auch im Langzeitgedächtnis) sowie Schwierigkeiten in der räumlichen Orientierung zeichnet sich die Alzheimer-Krankheit in späteren Stadien durch Störungen in der Sprache (Wortfindungsstörungen), Depressionen, Unruhe und Stimmungsschwankungen aus (HOUGHTON UND HOWES. 2005). Die Alzheimer-Krankheit nimmt einen progredienten Verlauf und führt in der Regel nach sechs bis zwölf Jahren zum Tod des Betroffenen, meist durch Sekundärerkrankungen, wie Lungen- und Harnwegsinfektionen (MÖLLER UND GRAEBER 1998).

Bereits vor dem sichtbaren Auftreten dieser spezifischen Symptome kommt es zur Bildung von extrazellulären, senilen Plaques und intrazellulären Neurofibrillen (NFTs; WALDAU UND SHETTY 2008). Das gebildete fibrilläre Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ), welches kontinuierlich während des Zellmetabolismus gebildet wird (GÖTZ ET AL. 2008), entsteht während der Endoproteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins (APP; LAFERLA ET AL. 2007). Das APP ist ein integrales *singlepass*-Transmembranprotein mit einem großen extrazellulären, glykosylierten Amino-(N-) Terminus und einem kürzeren, cytoplasmatischen Carboxy-(C-) Terminus. Es tritt in verschiedenen Isoformen auf, welche eine Länge von 695 bis 770 Aminosäuren aufweisen können (MATTSON 2004). Die Abspaltung und Prozessierung von APP erfolgt entweder über den nicht-amyloidogenen oder den amyloidogenen Weg (Abb. 1). Dabei spielen drei Enzyme oder Enzymkomplexe eine entscheidende Rolle: die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase

(LAFERLA *ET AL.* 2007). Über den vorwiegend nicht-amyloidogenen Weg spaltet die  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der APP-Sequenz, wobei eine große N-terminale Ektodomäne (sAPP $\alpha$ ) in das extrazelluläre Medium sezerniert wird und das C-terminale Fragment aus 83 Aminosäuren (C83) in der Membran zurückbleibt. Das C83 wird anschließend durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten, wobei ein kurzes Fragment (P3) entsteht. Über diesen Weg bleibt die Bildung von A $\beta$  aus. Über den alternativen amyloidogenen Weg spaltet die  $\beta$ -Sekretase zuerst an der Position 99 des C-Terminus, womit sAPP $\beta$  in den extrazellulären Raum entlassen wird und der C-terminale Rest aus 99 Aminosäuren (C99) in der Membran verbleibt. Die anschließende Spaltung des C99 durch die  $\gamma$ -Sekretase setzt A $\beta$  frei (LAFERLA *ET AL.* 2007), welches anschließend zu Oligomeren, Fibrillen und extrazellulären Plaques aggregiert (WALDAU UND SHETTY 2008). In diesem Zusammenhang konnte in Alzheimer-Gehirnen bereits eine erhöhte Menge an  $\beta$ -Sekretase nachgewiesen werden (ZHAO *ET AL.* 2007, O'CONNOR *ET AL.* 2008). A $\beta$  kommt in verschiedenen Isoformen zwischen 38 und 43 Aminosäureresten vor. Neben dem vorwiegend auftretenden A $\beta$ 40 existieren auch längere Formen, wie z.B. das A $\beta$ 42, das eine höhere Tendenz zur Aggregation besitzt und somit vorwiegend zur Pathologie der Alzheimer-Krankheit beiträgt (LAFERLA *ET AL.* 2007).



**Abb. 1: Proteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins (APP).** Das APP wird vorwiegend über den nicht-amyloidogenen Weg mittels der  $\alpha$ -Sekretase ( $\alpha$ ) gespalten, wobei kein A $\beta$  gebildet wird (links). Die Spaltung über den amyloidogenen Weg mit Hilfe der  $\beta$ -Sekretase ( $\beta$ ) und anschließenden  $\gamma$ -Sekretase ( $\gamma$ ) setzt A $\beta$  frei (rechts; modifiziert nach LAFERLA *ET AL.* 2007).

Der Abbau von A $\beta$  erfolgt unter normalen Bedingungen im Parenchym durch Peptidasen, wie durch das Insulin-abbauende Enzym, Neprilysin oder das Endothelin-konvertierende Enzym. Weiterhin kann es mit Hilfe des *low-density lipoproteine receptor-related* Proteins (LRP)-1 oder des p-Glykoproteins direkt ins Blut aufgenommen werden. A $\beta$  kann aber auch perivaskulär mit anderen gelösten Substanzen über den interstitiellen Strom entlang der

Arterien- und Kapillarwände abfließen. Mit steigendem Alter werden diese Mechanismen zunehmend fehlerhaft, wodurch das A $\beta$  nicht mehr vollständig eliminiert werden kann und Ablagerungen entstehen (BLENNOW *ET AL.* 2006, WELLER *ET AL.* 2008). Es entsteht somit ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung und der Spaltung bzw. dem Abtransport von A $\beta$ , was letztendlich zur neuronalen Degeneration und Demenz führt (BLENNOW *ET AL.* 2006).

Neben der Bildung von Amyloid-Plaques wird bei der Alzheimer-Krankheit eine Aggregation des hyperphosphorylierten Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau zu NFTs beschrieben. Tau als solches tritt unter normalen, physiologischen Bedingungen vorwiegend im Axon sowie in geringeren Mengen in Dendriten auf. Es trägt zur Stabilisierung von Mikrotubuli und zur Regulation des axonalen Transports bei (ITTNER UND GÖTZ 2011). Zusätzlich zu den beiden charakteristischen Merkmalen der A $\beta$ -Ablagerungen und Aggregation der NFTs werden für die Alzheimer-Krankheit auch eine Neuroinflammation und zusätzliche Störungen der zellulären Funktion durch eine Calcium-Dishomöostase und oxidativen Stress beschrieben (MORRISSETTE *ET AL.* 2009).

Die am häufigsten vertretene Hypothese für die Ursache von Alzheimer ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese von HARDY UND SELKOE (2002). Sie besagt, dass aus einer Punktmutation im Gen für APP, Präsenilin 1 (PS1) oder Präsenilin 2 (PS2) eine Akkumulation von oligomeren A $\beta$ -Peptiden erfolgt, die zu einer Hyperphosphorylierung von Tau und somit zur Bildung von intrazellulären Fibrillen führt. Daraus resultiert ein synaptischer und neuronaler Verlust (HARDY UND SELKOE 2002). Diese Hypothese kann dadurch gestützt werden, dass die in der familiären Form auftretenden Mutationen in den beiden Genen für das Substrat (APP) und das Schlüsselenzym (Präsenilin) vorkommen. Beide Mutationen erhöhen die A $\beta$ 42-Produktion. Zusätzlich gibt es einen weiteren Aspekt, der den Einfluss einer Überexpression von APP als Trigger für die Ablagerung von A $\beta$  stützt: Am Down-Syndrom (Trisomie 21) erkrankte Patienten, die ein zusätzliches, auf dem Chromosom 21 lokalisiertes APP-Gen besitzen, entwickeln in jungen Jahren Plaques und weisen häufig eine Demenz auf (BLENNOW *ET AL.* 2006).

Trotz der bekannten Pathomechanismen, die der Alzheimer-Krankheit zugrunde liegen, ist die Ursache nicht vollständig geklärt (BURNS UND ILIFFE 2009). Da sie jedoch eine multifaktorielle Erkrankung darstellt, werden mit ihr einige Risikofaktoren in Zusammenhang gebracht. Während ein hohes Alter das größte Risiko darstellt, spielen die genetische Prädisposition, psychosoziale und biologische Faktoren sowie Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle (QIU *ET AL.* 2009). Dazu zählen z.B. die Familienanamnese, der Status

des Apolipoproteins (Apo) E4, mögliche Kopfverletzungen, Depressionen, Bluthochdruck, Diabetes, ein hoher Cholesterinspiegel, Herzvorhofflimmern, Embolien im Gehirn sowie wenig körperliche und kognitive Aktivitäten (BURNS UND ILIFFE 2009). Aus genetischer Sicht ist Alzheimer eine heterogene Krankheit, die sowohl familiär als auch sporadisch auftritt (BLENNOW *ET AL.* 2006). Für die familiäre, autosomal dominant vererbte Form der Alzheimer-Krankheit (FAD) sind Mutationen in den Genen für das APP und für das PS1 und PS2 auf den Chromosomen 21, 14 bzw. 1 sowie für das Apo E4 auf dem Chromosom 19 verantwortlich (BURNS UND ILIFFE 2009, QIU *ET AL.* 2009). Der einzige bisher bekannte genetische Risikofaktor, Alzheimer im späten Alter zu entwickeln, ist das ApoE (ein A $\beta$ -bindendes Protein). Vom ApoE existieren drei Genformen: das ApoE e2, ApoE e3 und ApoE e4 (BURNS UND ILIFFE 2009, HASHIMOTO *ET AL.* 2012). Dabei wird der Besitz von nur einem e4-Allel mit einem dreifach höheren Risiko verbunden, Alzheimer zu entwickeln, während homozygote Bedingungen ein achtfach höheres Risiko mit sich bringen (BURNS UND ILIFFE 2009). Im Vergleich zum verbreiteten ApoE  $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3-Genotyp, ist die Vererbung von zwei Kopien des ApoE  $\epsilon$ 4-Allels mit einem mehr als zehnfachem Risiko assoziiert, Alzheimer auszubilden (HASHIMOTO *ET AL.* 2012). Das  $\epsilon$ 4-Allel tritt bei etwa 20 bis 25 % der Population und bei 40 bis 50 % der späten Alzheimer-Fälle auf (NICHOL *ET AL.* 2009). Basierend auf Zwillingsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass das Ausmaß der Erblichkeit für sporadischen Alzheimer bei annähernd 80 % liegt (BLENNOW *ET AL.* 2006). Dem gegenüber belegen einige Arbeiten, dass die Wahrscheinlichkeit zu erkranken, durch gezielte Lebensweisen vermindert werden kann. Eine Einnahme von Homocystein-ähnlichen Vitaminen (z.B. Vitamin B12 und Folate), Antioxidantien wie Vitamin C und E, ungesättigte Fettsäuren und auch moderater Alkoholkonsum (vorzugsweise Wein) können das Risiko reduzieren, an Alzheimer zu erkranken. Doch sind die Daten nicht aussagekräftig genug, um generelle, diätische Empfehlungen einzuräumen (BLENNOW *ET AL.* 2006).

## 1.2 Mausmodell

Ein geeignetes Versuchsobjekt, das für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurde, ist die 5xFAD-Alzheimermaus (Tg6799), die 2006 von OAKLEY generiert wurde. Sie ist eine doppelt transgene Maus und besitzt fünf familiäre Mutationen, wobei das humane APP (die schwedische Mutation: K670N, M671L; die Florida Mutation: I716V; die London Mutation: V717I) und das Präsenilin PS1 (M146L; L286V) unter dem Neuronen-spezifischen Maus-Thy-1 Promotor überexprimiert werden (OHNO *ET AL.* 2007, OHNO 2009). Bei der 5xFAD-Maus ist der Gehalt cerebraler A $\beta$ -Peptide, spezifisch das neurotoxische A $\beta$ 42 erhöht. Die

schwedische Mutation erhöht dabei den absoluten Gehalt an A $\beta$ , während die anderen vier Mutationen für den spezifischen Anstieg der A $\beta$ (1-42)-Bildung verantwortlich sind (OHNO 2009, DEVI UND OHNO 2010A). Die 5xFAD-Maus bildet mit etwa zwei Monaten sehr frühe und aggressive extrazelluläre Amyloid-Plaques aus (OAKLEY *ET AL* 2006, OHNO *ET AL* 2006, 2007), jedoch entwickelt sie keine Neurofibrillen (OAKLEY *ET AL* 2006). Die A $\beta$ -Plaques treten zuerst im Subiculum und Hippocampus sowie in der Schicht 5 des Cortex auf. Anschließend breiten sie sich sehr zügig im Thalamus, Hirnstamm und im Riechkolben (OAKLEY *ET AL*. 2006) bis zu einem Alter von sechs Monaten aus (KIMURA UND OHNO 2009). Intra neuronale A $\beta$ -Aggregate werden bei der 5xFAD-Maus mit einer Amyloid-Plaques-Bildung, einer Neurodegeneration und mit einem Neuronenverlust in Zusammenhang gebracht (OAKLEY *ET AL*. 2006, OHNO *ET AL*. 2007). Derweil konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass die kognitiven Beeinträchtigungen transgener 5xFAD-Mäuse nicht mit dem Zelltod, sondern mit einer funktionellen, synaptischen Unterbrechung und Neuorganisation innerhalb der corticalen Mikroerschaltungen zusammenhängen, die mit der A $\beta$ -Akkumulation korrelieren (LISON *ET AL*. 2014). Die 5xFAD-Maus zeigt Hippocampus-abhängige Erinnerungsdefizite sowie die Hauptpathologien und Verhaltenscharakteristiken der Alzheimer-Krankheit (OAKLEY *ET AL*. 2006, OHNO *ET AL*. 2006, DEVI UND OHNO 2010A, JAWHAR *ET AL*. 2012). Diese Beeinträchtigungen sollen im Rahmen einer ausführlichen Verhaltenscharakterisierung der 5xFAD-Männchen mit Hilfe motorischer Tests als auch mittels Lernexperimenten in Voruntersuchungen belegt werden.

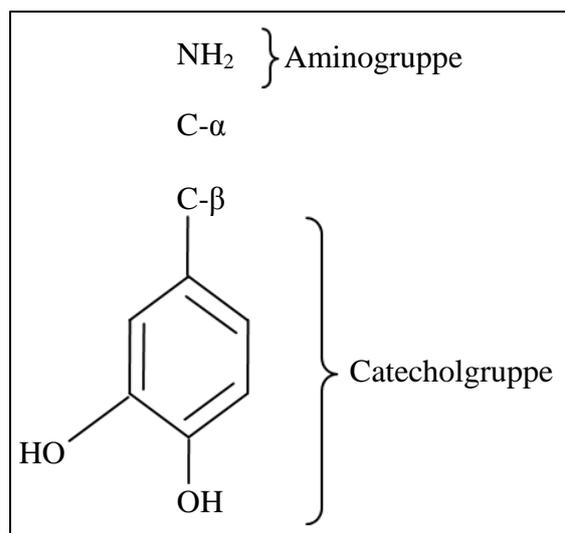
### 1.3 Neurotransmittersysteme bei Alzheimer

Neben der oben aufgeführten Pathologieentwicklung bei Alzheimer Betroffenen werden auch Veränderungen von Neurotransmittern und –modulatoren, deren synthetischer Enzyme sowie Abweichungen in der Morphologie der produzierenden Neurone beschrieben (SELKOE 1991). Abgesehen von einem Defizit der hippocampalen und corticalen Cholin-Acetyltransferase (ChAT) können cholinerge Neurone, die dem Nucleus basalis (Meynert; Nbas) entstammen (MARIEN *ET AL*. 2004) und ins basale Vorderhirn projizieren, schrumpfen oder verloren gehen (SELKOE 1991). Bereits MARCHBANKS (1982) stellte einen Zusammenhang zwischen der Plaquebelastung und der Abnahme der ChAT fest, d.h., ein cholinerges Defizit korreliert mit dem Demenzgrad (MARCHBANKS 1982). Obwohl das cholinerge System bei der Alzheimer-Krankheit die größte Anomalität zeigt, können auch andere Transmitter betroffen sein, so z.B. die Monoamintransmitter Noradrenalin, Serotonin (5-HT) und Dopamin sowie Glutamat, die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Somatostatin, das Neuropeptid Y, der *Corticotropin releasing*

*factor*, die Substanz P (REINIKAINEN *ET AL.* 1990, SELKOE 1991, HOUGHTON UND HOWES 2005). Nach REINIKAINEN *ET AL.* (1990) ist die Dopaminkonzentration im temporalen und hippocampalen Cortex sowie im Hippocampus bei Alzheimer-Patienten um 18-27 % gesenkt. Daneben berichtete schon MARCHBANKS (1982) von einem Defizit an Catecholaminen als auch von einem reduzierten Gehalt der  $\beta$ -Hydroxylase und somit von einer Abnahme von Noradrenalin bei der Alzheimer-Krankheit.

## 1.4 Dopamin

Zu den Catecholaminen gehört neben Noradrenalin und Adrenalin auch Dopamin (KANDEL *ET AL.* 2000, S. 282, Review: ZEISS 2005). Kennzeichnendes Merkmal der Catecholamine sind der Catecholkern (ein 3,4-dihydroxylierter Benzolring) und eine Aminogruppe (Abb. 2; THOMPSON 1994, S. 152).



**Abb. 2: Allgemeine Struktur der Catecholamine.** Charakteristisch ist die Catecholgruppe (ein Benzolring mit zwei benachbarten Hydroxylgruppen, OH) und eine Aminogruppe, NH<sub>2</sub> (nach THOMPSON 1994, S. 151).

Catecholaminerge Neurone kommen im Hirnstamm (von der Medulla oblongata bis zum Diencephalon), im Riechkolben und in der Retina vor (ZEISS 2005). Der catecholaminerge Neurotransmitter Dopamin ist hochkonserviert und in Invertebraten, wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* als auch in allen Vertebraten präsent (VIGGIANO *ET AL.* 2003). Die geschätzte Zahl mesodiencephaler Dopamin-Neurone variiert zwischen 20.000 und 30.000 bei der Maus, 40.000 und 45.000 bei der Ratte, 160.000 und 320.000 beim Affen bis hin zu 400.000 und 600.000 beim Menschen (BJÖRKLUND UND DUNNETT 2007, VAN DEN HEUVEL UND PASTERKAMP 2008). Obwohl in Bezug auf die Gesamtanzahl aller Nervenzellen nur wenige Dopamin-Neurone im Gehirn vorkommen (<1/100.000 Gehirneuronen), sind sie essentiell für die Regulierung grundlegender Funktionen (GIRAULT UND GREENGARD 2004).

Dopamin spielt bei der Regulation des Blutdruckes, bei motorischen Funktionen, bei der Aufmerksamkeit und Belohnung, bei der Motivation und Emotion sowie beim Lernen und Gedächtnis eine entscheidende Rolle (VIGGIANO *ET AL.* 2003, KNAB UND LIGHTFOOT 2010). Im Besonderen ist es bei der Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses und der Langzeitpotenzierung (LTP) beteiligt (MATTHIES 1989, REYMANN UND FREY 2007). Es vermittelt viele positive Ereignisse und wird daher auch als des Gehirns „*pleasure chemical*“ bezeichnet (CANNON UND BSEIKRI 2004). Dopamin kommt im Gehirn vor allem in den basalen Nuclei und deren Projektionen vor. Im peripheren Nervensystem dient es zum geringen Teil als Neurotransmitter, größtenteils fungiert es in den sympathischen Neuronen und dem adrenalen System als Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin (ZEISS 2005).

Da Dopamin zahlreiche Funktionen hat, wird eine Vielzahl von Krankheiten mit dopaminergen Dysfunktionen in Zusammenhang gebracht. Die am häufigsten mit Dopamin in Verbindung gebrachte Krankheit ist die Parkinson-Krankheit, bei der ein Dopaminmangel beschrieben wurde (ZEISS 2005, BEAULIEU UND GAINETDINOV 2011). In höheren Konzentrationen führt Dopamin zur Hyperaktivität (ZEISS 2005). Bei einer Dysregulation können Symptome auftreten, die bei der Schizophrenie, beim Tourette- sowie Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) und auch bei manischen Depressionen bekannt sind. Daneben spielt Dopamin bei der Huntington-Krankheit eine Rolle und es vermittelt den verstärkenden Effekt bei vielen suchterzeugenden Substanzen, sodass es beim Drogenmissbrauch und Suchtverhalten von großer Bedeutung ist (ZEISS 2005, BEAULIEU UND GAINETDINOV 2011). Ferner werden andere Krankheiten mit einer anormalen Dopamintransmission in Verbindung gebracht, wie beispielsweise bipolare Störungen, Dyskinesien sowie verschiedene somatische Krankheiten, inklusive der Hypertension und Nieren-Fehlfunktionen (BEAULIEU UND GAINETDINOV 2011).

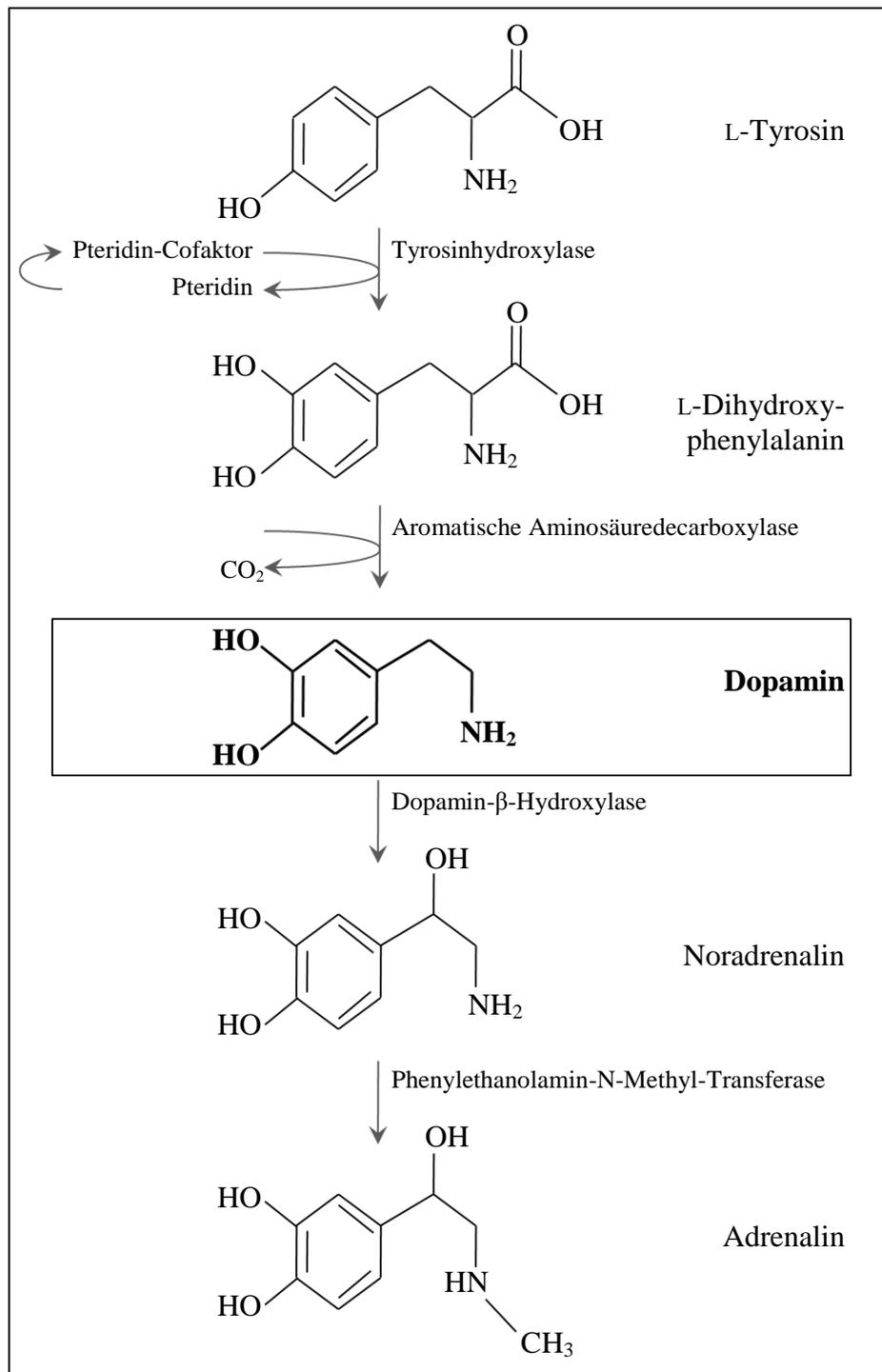
### 1.4.1 Dopamin-Synthese

Dopamin wird im neuronalen Cytoplasma aus der Aminosäure L-Tyrosin synthetisiert, die mit Hilfe eines membrangebundenen Aminosäure-Transporters in das Neuron transportiert wird. Im Synthese-limitierenden Schritt wird L-Tyrosin mittels der Tyrosinhydroxylase (TH) hydroxyliert, wobei L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) entsteht (ZEISS 2005). Die TH kommt in allen Catecholamin-produzierenden Neuronen vor (KANDEL *ET AL.* 2000, S.282). Nach einer Decarboxylierung durch die L-Aminosäuredecarboxylase (AADC) entsteht Dopamin (Abb. 3; ZEISS 2005), ein 3,4-Dihydroxy-Derivat von Phenylethylamin (MOLINOFF

UND AXELROD 1971). Die ersten beiden Umsetzungen der Dopamin-Synthese erfolgen im Cytosol der Zellen (KLEINE UND ROSSMANITH 2007, S. 88). Dopamin wird durch den vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT-2) in synaptische Vesikel transportiert und darin gelagert (ZEISS 2005). In noradrenergen und adrenergen Neuronen wird es durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase in Vesikeln zu Noradrenalin umgewandelt, welches mittels der Phenylethanolamin-N-Methyl-Transferase zu Adrenalin umgebildet wird (ZEISS 2005).

Dopamin wird in den synaptischen Spalt entlassen, nachdem Calcium in die präsynaptischen Terminalien eingeströmt ist. Anschließend wird Dopamin durch Diffusion und Wiederaufnahme mit Hilfe des membranständigen Dopamin-Transporters (DAT) aus dem synaptischen Spalt entfernt und in die präsynaptischen Endigungen aufgenommen (ZEISS 2005). Kokain, Amphetamine (AMPH) und andere Psychostimulanzien greifen hier ein, indem sie mit dem DAT interagieren. Somit erhöhen sie die extrazelluläre Konzentration an Dopamin, z.B. in den Belohnungszentren des Gehirns und erzielen folglich stimulierende und suchterzeugende Effekte. (VIGGIANO *ET AL.* 2003, ZEISS 2005).

Nachdem Dopamin seine Funktion erfüllt hat, erfolgt die Eliminierung durch eine intrazelluläre Desaminierung oder O-Methylierung (LÖFFLER 2005, S. 709) mittels der Monoaminoxidase (MAO) oder mit Hilfe der Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) im Cytoplasma der meisten Zellen, aber hauptsächlich in der Leber und der Niere (KANDEL *ET AL.* 1996, S. 309). Dabei entsteht 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylelessigsäure (Homovanillinsäure), die über den Urin ausgeschieden wird (MOLINOFF UND AXELROD 1971). Sowohl die COMT als auch die MAO bewirken eine Inaktivierung der Catecholamine, doch keines der Enzyme ist maßgebend für die Terminierung der physiologischen Funktion. Eine schnelle Inaktivierung der Catecholamine erfolgt vorwiegend durch die Aufnahme in präsynaptischer Nervenendigungen, in denen sie bis zur Wiederverwendung gespeichert werden (MOLINOFF UND AXELROD 1971).



**Abb. 3: Synthese von Dopamin.** Tyrosin wird durch die Tyrosinhydroxylase (TH) in L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) umgewandelt, aus welchem mittels der Aromatischen L-Aminosäuredecarboxylase (AADC) Dopamin gebildet wird. Dopamin selbst dient als Vorstufe von Noradrenalin und Adrenalin; mit Hilfe der  $\beta$ -Hydroxylase wird Noradrenalin gebildet, welches durch die Phenylethanolamin-N-Methyl-Transferase zu Adrenalin umgebildet wird (modifiziert nach KANDEL *ET AL.* 2000, S. 282-283).

### 1.4.2 Dopamin-Signaltransduktion

Dopamin ist kein einfacher exzitatorischer oder inhibitorischer Neurotransmitter. Vielmehr stellt es einen Neuromodulator dar, der je nach funktioneller Beschaffenheit seiner Zielneurone erregenden oder hemmenden Einfluss ausübt (GIRAULT UND GREENGARD 2004). Die modulatorischen Funktionen von Dopamin werden durch fünf Dopamin-Rezeptoren vermittelt, die basierend auf ihrer Sequenzhomologie und Pharmakologie als D1-Typ-Rezeptoren (D1-, D5-Rezeptoren) und D2-Typ-Rezeptoren (D2-, D3-, D4-Rezeptoren) klassifiziert werden (VIGGIANO *ET AL.* 2003, PIERCE UND KUMARESAN 2006, BEAULIEU UND GAINETDINOV 2011). Dopamin-Rezeptoren sind im Gehirn und in der Peripherie weit verbreitet (BEAULIEU UND GAINETDINOV 2011), doch differieren sie in ihrer anatomischen Lokalisation auf den Neuronen, variieren in ihrer Dichte in den spezifischen Hirnregionen und können in Abhängigkeit vom Gewebe und/oder den Neuronen sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein. Weiterhin unterscheiden sie sich in ihrer Affinität zu ihrem natürlichen Liganden Dopamin, außerdem in ihrer Rezeptor-Aktivität und infolgedessen in ihrer physiologischen Aktivität (KNAB UND LIGHTFOOT 2010). Dopamin-Rezeptoren werden in fast allen Hirnbereichen exprimiert. Der Expressionsgrad der Dopamin-Rezeptoren kann durch den Dopamingehalt im System, durch eine pharmakologische Stimulation und durch andere externe Stimuli, die das Verhalten über das Belohnungssystem vermitteln, wie beispielsweise eine sexuelle Aktivität oder körperliche Betätigungen, beeinflusst werden. Dies wirkt sich letztlich auf das Verhalten aus (KNAB UND LIGHTFOOT 2010).

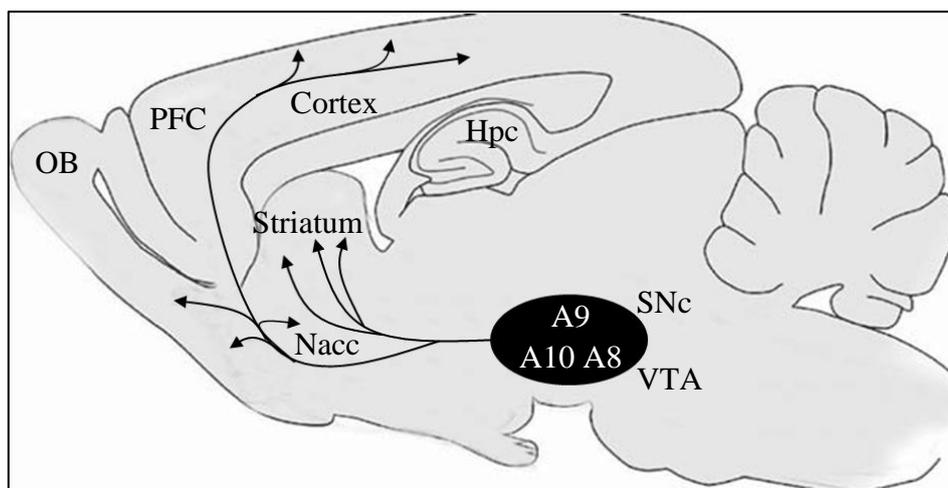
Alle fünf Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt (Guanosin-Triphosphat bindend) und modulieren eine Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden, die die neuronale Aktivität beschleunigen oder inhibieren (WALL *ET AL.* 2011). Rezeptoren des D1-Typs sind an heterodimere G-Proteine gekoppelt, die die  $G_{\alpha_s}$ -Untereinheit in den meisten Geweben bzw. die  $G_{\alpha_{olf}}$ -Untereinheit im Striatum oder Riechkolben enthalten (CALLIER *ET AL.* 2003, WALL *ET AL.* 2011). Sie aktivieren die Adenylyl-Zyklase, induzieren die unmittelbare frühe Genexpression und die Modulation von Ionenkanälen, die die neuronale Erregbarkeit beschleunigen und die LTP exzitatorischer Synapsen erleichtern (FREY *ET AL.* 1990, WALL *ET AL.* 2011). Dagegen sind D2-Typ-Rezeptoren an heterodimere G-Proteine gekoppelt, die die  $G_{i/o}$ -Untereinheit beinhalten (WALL *ET AL.* 2011). Eine Aktivierung der D2-Rezeptoren resultiert typischerweise in einer Inhibierung der Adenylyl-Zyklase, in der Aktivierung von Kalium-Kanälen und in der Modulation vieler anderer Ionenkanäle, die die neuronale Erregbarkeit dämpfen und die Langzeitdepression exzitatorischer Synapsen begünstigen.

Diese Funktionen gelten generell, können aber in Abhängigkeit vom Zelltyp und von der Hirnregion variieren (WALL *ET AL.* 2011). Dopamin-Neurone können zudem auch D2-Typ-Rezeptoren exprimieren, die als Autorezeptoren fungieren, z.B. im ventralen Tegmentum (VTA). So wird das durch Dopamin beeinflusste Verhalten reguliert, indem die Autorezeptoren die Membran hyperpolarisieren (VIGGIANO *ET AL.* 2003). Diese negative Rückkopplung an den präsynaptisch lokalisierten D2-Autorezeptoren führt zu einer kurzzeitigen Regulierung der neuronalen Feuerungsrate, der Synthese und der Neurotransmitterfreisetzung durch Änderungen des extrazellulären Dopamingehaltes (BEAULIEU UND GAINETDINOV 2011). Zusätzlich wird diese kurzzeitige Regulation der Dopaminfreisetzung durch die exzitatorischen und inhibitorischen Eingänge von Neuronen der Raphe Nuclei (5-HT), vom Locus coeruleus (Noradrenalin), von GABA-Interneuronen der VTA, von mittleren dornigen Neuronen (*spiny neurons*) des Nucleus accumbens (Nacc) und von frontalen, glutamatergen Neuronen kontrolliert (VIGGIANO *ET AL.* 2003).

Dopamin-Neurone weisen im gesunden Gehirn unterschiedliche Arten der Aktivierung auf: das tonische und phasische Feuern (AGGARWAL *ET AL.* 2012). Das tonische Feuern ist minimal mit unregelmäßiger Rate. Dies ist vor allem bei intrinsischen Mechanismen beobachtbar. Sie wird, ähnlich wie ein Schrittmacher, durch eine Depolarisation mit langsamer und großer Amplitude angetrieben, die in Einzelspikes endet und von einer Hyperpolarisation gefolgt wird. Diese Schrittmacher-ähnliche Aktivität unterliegt dem hohen regulären Feuermuster, wie sie in Dopamin-Neuronen und in *in vitro*-Hirnschnittpräparaten beobachtet werden kann (AGGARWAL *ET AL.* 2012). Das phasische Feuern indes tritt zwar in einem Teil der Neurone auf, ist aber in der Mehrheit der Neurone durch synaptische Inputs gestört. Ein inhibitorischer Input verursacht eine Verzögerung oder Verhinderung von Aktionspotentialen durch ein Zurücksetzen des Membranpotentials (AGGARWAL *ET AL.* 2012). Die inhibitorische Kontrolle der Dopamin-Nervenzellen ist weitaus wichtiger als die exzitatorische. Einzelne dopaminerge Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNc) empfangen über 8000 bis 9000 Synapsen, wovon etwa 65-70 % GABAerg und 30 % glutamaterg sind. Dies ist sehr viel höher als in anderen Hirnregionen (AGGARWAL *ET AL.* 2012). Neben den extrinsischen Inputs verschiedener Nuclei auf die Dopamin-Neurone existieren in der VTA sowie in der SNc auch GABAerge Interneurone, die von Natur aus eine hemmende Wirkung ausüben. Diese Interneurone zählen aber zu einer relativ kleinen Fraktion GABAerger Neurone, die auf Dopamin-Neurone wirken. Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die Aktivierung dopaminerger Neurone auf zwei Ereignissen basiert: ein Anstieg exzitatorischer Inputs und ein Abfall inhibitorischer Inputs (AGGARWAL *ET AL.* 2012).

### 1.4.3 Dopamin-Systeme

Die Zellkörper der Dopamin-Neurone sind im gesamten ventralen Teil des Gehirns verteilt. Obwohl auch einzelne Zellen identifiziert werden können (VIGGIANO *ET AL.* 2003), durchzieht die Mehrheit mesodiencephaler Dopamin-Neurone drei bedeutende, anatomisch und funktionell verschiedene Bahnen: das nigrostriatale, das mesocorticale und das mesolimbische Dopamin-System (Abb. 4; VAN DEN HEUVEL UND PASTERKAMP 2008). Der nigrostriatale (oder mesostriatale) Weg umfasst hauptsächlich die lateralen A9-Neurone, die der SNc entspringen und in das dorsale Striatum projizieren (VAN DEN HEUVEL UND PASTERKAMP 2008). Daneben innervieren sie auch corticale und limbische Gebiete (BJÖRKLUND UND DUNNETT 2007). Dieses Dopamin-System ist in Bewegungsvorgänge involviert und hat eine profunde Bedeutung bei der Parkinson-Krankheit. Hier spielt es eine kausale Rolle bei den auftretenden, motorischen Defekten, die durch eine Degeneration der SNc-Neurone verursacht werden und für diese Krankheit kennzeichnend sind (VAN DEN HEUVEL UND PASTERKAMP 2008). Das mesocorticale und mesolimbische System werden durch die medialen A8- und A10-Neurone definiert, welche dem retrorubalen Feld (A8-Neurone) und der VTA (A10-Neurone) entstammen. Sie innervieren vor allem das ventromediale Striatum und den präfrontalen Cortex (PFC) sowie Teile des limbischen Systems (VAN DEN HEUVEL UND PASTERKAMP 2008), zu dem unter anderem der Nacc, der Riechhügel, die Amygdala, das Septum und der Hippocampus zählen (ALCARO *ET AL.* 2007).



**Abb. 4: Verteilung und hauptsächlich Projektionen der dopaminergen A8-, A9- und A10-Neurone im Nagergehirn (Sagittalschnitt).** Hpc - Hippocampus, Nacc - Nucleus accumbens, OB - Riechkolben, PFC - Präfrontaler Cortex, SNc - Substantia nigra (pars compacta), VTA - Ventrales Tegmentum (modifiziert nach HAUBER 2010)

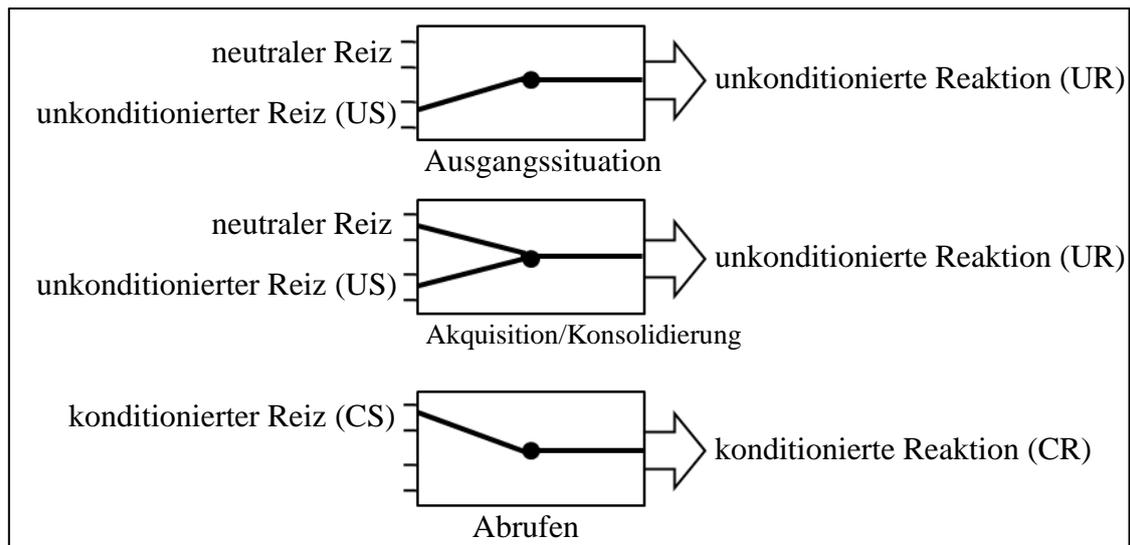
Neben den drei hauptsächlichen Dopamin-Systemen existieren auch andere dopaminerge Zellgruppen (A11-A14) in der mediobasalen Region des Hypothalamus, die die Eminentia mediana und die Hypophyse innervieren und die Entwicklung und Erhaltung der Hypophyse sowie die Genexpression und den Metabolismus der Hypophysen-Hormone modulieren (KOBAYASHI 2001). So unterbindet Dopamin aus den hypothalamischen Zellgruppen die Prolaktinausschüttung aus den laktotropen Zellen der Hypophyse (KLEINE UND ROSSMANITH 2007, S. 90). Außerdem wurden dopaminerge Neurone im olfaktorischen Tuberkel (A15) und Riechkolben (A16) sowie in der Retina (A17) identifiziert (KANDEL *ET AL.* 2000, S. 893).

Die Grenzen zwischen den einzelnen Dopamin-Systemen sind nicht eindeutig definiert. Die Dopamin-Zellen der SNc und der VTA gehen stufenlos ineinander über und projizieren zu benachbarten und sich überlappenden, terminalen Feldern (WISE 2004). Da ebenso erhebliche Überschneidungen zwischen den VTA-Zellen existieren, werden das mesocorticale und mesolimbische Dopamin-System zum mesocorticolimbischen (Belohnungs-) System zusammengefasst (WISE 2004). Dieses System ist wichtig bei Fragestellungen, die im Zusammenhang mit Drogensucht, Depression und Schizophrenie stehen (VAN DEN HEUVEL UND PASTERKAMP 2008). Es ist entscheidend an Gedächtnisvorgängen (KANDEL *ET AL.* 2000, S. 1009) sowie an der Regulation von Emotionen und von Belohnungsprozessen beteiligt (VAN DEN HEUVEL UND PASTERKAMP 2008). Als wichtiges Nervenfaserbündel des Belohnungssystems gilt das mediale Vorderhirnbündel (mVb). Es entstammt dem Mittelhirn und projiziert in den ventrolateralen Teil des Telencephalons. Das mVb beinhaltet mesodiencephale (und nicht-mesodiencephale) Dopamin-Projektionen zu den verschiedenen Vorderhirnregionen, wie dem Striatum und dem cerebralen Cortex (VAN DEN HEUVEL UND PASTERKAMP 2008). Das Belohnungssystem erfüllt drei grundlegende Funktionen des Verhaltens: Erstens hat es eine appetitive und zum Teil aufmerksamkeitssteigernde Funktion. Zweitens dienen appetitive Stimuli als positive Verstärker, indem sie die Wahrscheinlichkeit bestimmter Verhaltensreaktionen erhöhen sowie das dadurch gelernte Verhalten speichern und selbiges vor einer Extinktion bewahren. Drittens haben appetitive Reize eine emotionale Funktion, welche durch die Aktivierung subjektiver Gefühle, wie Vergnügen und Lust verursacht werden. Aversive Stimuli haben einen direkt gegenteiligen Effekt (SCHULTZ 1997).

#### 1.4.4 Die Rolle von Dopamin beim Lernen

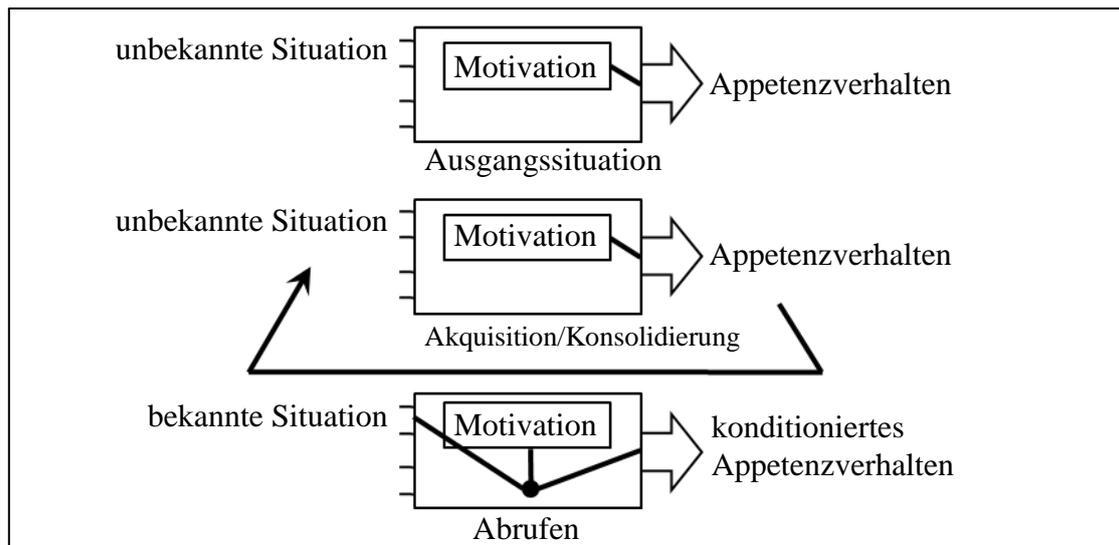
Dopamin als wichtigster Botenstoff des Belohnungssystems kann Lernen induzieren (SCHULTZ 1997). Lernen ist eine mehr oder weniger permanente Änderung des Verhaltens, welche aus der Erfahrung heraus resultiert. Nach Kandel sind Lernen und Erinnern (also das Gedächtnis) kontinuierliche Prozesse, wobei das Lernen die Akquise von Wissen und das Erinnern die Kodierung, Speicherung und Abrufung des akquirierten Wissens darstellt (SHARMA *ET AL.* 2010). Lernen dient demnach der Modifizierung von anschließendem Verhalten, während das Gedächtnis die Fähigkeit darstellt, sich an frühere Erfahrungen zu erinnern (SHARMA *ET AL.* 2010). Auf neuronaler Ebene beruht Lernen und Erinnern auf einer Veränderung der Proteinsynthese, die auf einer Änderung der Genexpression basiert (WINGER *ET AL.* 2005). Vom Lernen abgegrenzt ist die Kognition, die einen weitläufigen Begriff beschreibt, der Prozesse wie beispielsweise das Gedächtnis, Assoziationen, Sprache, Aufmerksamkeit, Konzeptbildung und Problemlösung umfasst (SHARMA *ET AL.* 2010). Der Lernprozess und die Erinnerung als solches können nicht direkt beobachtet werden. Sie können nur aus den Änderungen des Verhaltens gefolgert werden (HEISE 1984).

Lernen ist auf verschiedenen Wegen möglich. Man unterscheidet das nicht-assoziative Lernen, wie z.B. die Habituation und das assoziative Lernen, welches über Assoziationsprozesse erfolgt, die über das Prinzip der Konditionierung untersucht werden können (HEISE 1984). Das assoziative Lernen wird in zwei Grundtypen unterteilt: Die einfachste Form ist die klassische oder Pawlow'sche Konditionierung (Abb. 5). Ein zunächst neutraler oder uneffektiver Reiz wird gemeinsam mit einem unconditionierten, reaktionsauslösenden Reiz (US) dargeboten. Nach genügendem Training wird der neutrale Reiz zu einem bedingten, konditionierten Reiz (CS) und löst dieselbe, konditionierte Reaktion (CR) aus wie der unconditionierte Reiz (HEISE 1984, FANSELOW UND POULOS 2005). Die Pawlow'sche Konditionierung beinhaltet die drei Phasen der Akquisition, der Konsolidierung und des Abrufens (ACHAT-MENDES *ET AL.* 2007). Sie wird für gewöhnlich angewandt, um Reaktionen zu erlernen, denen ein erkennbarer Stimulus zuverlässig vorangeht und die automatisch oder reflexiv sind, wie z.B. das Augenzwinkern (KIRSCH *ET AL.* 2004). Erstmals wurde diese Art des assoziativen Lernens 1927 von Pawlow beschrieben (DICKINSON 1981).



**Abb. 5: Prinzip der klassischen Konditionierung.** Ein ursprünglich neutraler Reiz wird zusammen mit einem unconditionierten Reiz (US) präsentiert und wird somit zum konditionierten Reiz (CS), der eine konditionierte Reaktion (CR) auslöst (modifizierte Graphik nach GATTERMANN).

Über das Prinzip der operanten (oder instrumentellen) Konditionierung wird das Verhalten zum Instrument des Erfolges (Abb. 6). Es erfolgt die Verbindung zwischen einem ursprünglich neutralen Reiz und der Verhaltensantwort nach der Befriedigung eines Triebes, sodass schließlich allein der anfänglich neutrale Reiz ein gerichtetes Appetenzverhalten auslöst. Die Wahrscheinlichkeit eines Verhaltens wird durch die Darbietung eines positiven Verstärkers (z.B. Futter) bzw. durch die Eliminierung eines aversiven Stimulus (z.B. ein Fußschock) erhöht (HEISE 1984). Umgekehrt wird die Wahrscheinlichkeit durch die Präsentation eines negativen Stimulus bzw. durch die Entfernung eines positiven Reizes verringert (DICKINSON 1981). Die operante Konditionierung belagert eher aktives Verhalten und seine Konsequenzen an (HOLMES *ET AL.* 2010). Sie unterscheidet sich zudem von der klassischen Konditionierung, bei welcher die Präsentation des unconditionierten Reizes (Futter oder Schock) nicht von der Verhaltensantwort des Tieres auf den konditionierten Stimulus abhängig ist (HEISE 1984).



**Abb. 6: Prinzip der operanten Konditionierung.** Es entsteht eine Verknüpfung zwischen einem ursprünglich neutralen Reiz und der Verhaltensantwort des Tieres, wodurch nach hinreichendem Training der jetzt konditionierte Reiz das konditionierte Appetenzverhalten verursacht (modifizierte Graphik nach GATTERMANN).

Es besteht ein breiter Konsens, dass Dopamin sowohl bei der Pawlow'schen als auch instrumentellen Konditionierung eine wichtige Rolle spielt (STARK *ET AL.* 2004, DI CHIARA UND BASSAREO 2007, TOMIE *ET AL.* 2008, HAZY *ET AL.* 2010, CLARK *ET AL.* 2012, ILANGO *ET AL.* 2012, HOLMES UND FAM 2013). Dabei sind sowohl D1- als auch D2-Rezeptoren entscheidend, wobei D1-Rezeptoren bedeutender sind als D2-Rezeptoren (LEX UND HAUBER 2008). Eine spezifische Blockierung der D1- und D2-Rezeptoren unterbindet die Aufrechterhaltung einer späten LTP, die ein Modell der zugrunde liegenden Mechanismen der Gedächtnisbildung darstellt, und kann somit die Konsolidierung klassisch konditionierten Verhaltens stören (FREY *ET AL.* 1989, FREY *ET AL.* 1991, REYMANN UND FREY 2007). Das bedeutet, Dopamin ist auch in der Festigung des Gedächtnisses involviert (ACHAT-MENDES *ET AL.* 2007). Weiterhin ist mesocorticolimbisches Dopamin wichtig bei Verhaltensreaktionen auf eine primäre Belohnung und bei motivationsabhängigen Reaktionen auf konditionierte Stimuli. Die Präsentation konditionierter Stimuli ist mit der neuronalen Aktivität oder der Dopamin-Freisetzung in den terminalen Regionen des mesocorticolimbischen Systems, inklusive des Nacc, der Amygdala und des PFC verbunden (STARK *ET AL.* 1999, ZELLNER UND RANALDI 2010). Die Aktivität in der VTA, als Ursprung mesolimbischen Dopamins, korreliert ebenso mit der Darbietung konditionierter Reize und ist zweifellos eine wichtige Bedingung zur Reaktion auf konditionierte Stimuli. Sie scheint mit der Darbietung der Stimulus-Belohnung-Abhängigkeit erworben zu sein, wobei die zugrunde liegenden, neurobiologischen Prozesse noch immer nicht eindeutig geklärt sind (ZELLNER UND RANALDI 2010).

Ein sehr effektiver Test zur Untersuchung konditionierter Reaktionen ist die Pawlow'sche Angstkonditionierung, das sog. *Fear conditioning* (PEZZE UND FELDON 2004). Ein emotional neutraler, konditionierter Stimulus (CS, z.B. ein diskreter Stimulus, wie ein Ton und/oder ein kontextabhängiger Reiz, wie eine bestimmte Umgebung) wird während der Akquise mit einem aversiven, unkonditionierten Reiz (US, beispielsweise einem Fußschock) gepaart. Als Ergebnis verursacht der konditionierte Stimulus aversiv verstärkende Eigenschaften und löst konditionierte Angstreaktionen (CR) aus und zwar auf dem gleichen Wege wie der unkonditionierte Fußschock selbst (PEZZE UND FELDON 2004). Neben der Option, die Magnitude des Erschreckens (*startle response*) zu messen, ist es möglich, die CS-US-Assoziation über das konditionierte "*Freezing*"-Verhalten (dt.: Einfrieren) zu quantifizieren. Dies ist durch die immobile Körperhaltung beobachtbar (PEZZE UND FELDON 2004). Unvermeidbare Angststimuli, wie ein Ton oder ein Kontext, die unmittelbar mit dem Fußschock verbunden wurden, induzieren normalerweise ein konditioniertes *Freezing*, was eine schützende Antwort darstellt, denn Prädatoren reagieren besonders auf Bewegungen und attackieren diese bevorzugt (PEZZE UND FELDON 2004). Das *Fear conditioning* wird favorisiert zur Untersuchung emotionaler Mechanismen angewandt, denn Angst wird schnell erlernt und lange erinnert. Zudem ist sie leicht induzierbar, modulierbar und quantifizierbar. Dopamin ist zudem ein potentieller Neuromodulator von Angstverhalten und Ängstlichkeit. Infolgedessen ist das *Fear conditioning* ein ausgezeichnetes Paradigma, um die dem Lernen und Erinnern zugrunde liegenden Prozesse und Mechanismen zu entschlüsseln (PEZZE UND FELDON 2004). Das *Fear conditioning* wurde bereits von OHNO (2009) erfolgreich zur Messung der konditionierten Angst bei der 5xFAD-Maus angewandt, wobei diese Verhaltenseigenschaft bei transgenen Mäusen üblicherweise ab sechs Monaten reduziert ist (OHNO 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wird das *Fear conditioning* als ein zentraler Lerntest verwendet.

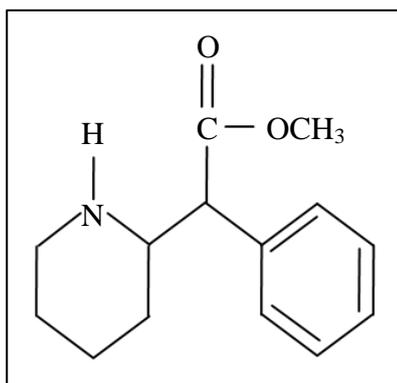
Der zweite Lerntest, der in den Untersuchungen Anwendung findet, ist das *Morris water maze*. Das *Morris water maze* ist ein populärer und weit verbreiteter Verhaltenstest, um räumliches Lernen und Erinnern von Nagern zu untersuchen. Üblicherweise wird es verwendet, um neurokognitive Fähigkeiten von Tiermodellen oder die Effizienz von Medikamenten und anderen Behandlungen zu untersuchen (LI ET AL. 2011). Mit Hilfe des *Water maze* sind Beeinträchtigungen des Gedächtnisses und damit Defizite im Hippocampus demonstrierbar (LEE ET AL. 2011). Es können Rückschlüsse auf die neuronalen Hintergründe des räumlichen Lernens und auf das Arbeitsgedächtnis gezogen werden (MORRIS 1984). Das *Water maze* ist ein sehr sensibler Test bezüglich kognitiver Fehlfunktionen (MYHRER 2003).

Der Test per se basiert auf dem Prinzip, dass das Versuchstier eine Plattform aufsuchen soll, welche sich unter der Wasseroberfläche in einem mit getrübbtem Wasser gefüllten Bassin befindet. Um die Plattform räumlich zu orten, orientiert sich das Tier ausschließlich an räumlichen Landmarken in der unmittelbaren Umgebung des Wasserbassins. Nach entsprechendem Training wird die Plattform von gesunden Tieren direkt und ohne Umwege aufgesucht. (MORRIS 1984). Das räumliche Lernen im *Water maze* wird durch verschiedene Neurotransmitter beeinflusst, wobei Dopamin neben Glutamat und GABA die bedeutendste Rolle spielt (MYHRER 2003). Hinsichtlich dieser Tatsache ist dieses Lernparadigma besonders geeignet, um eine Beeinflussung des Lernens über das Dopamin-System zu demonstrieren. Dopamin ist demnach sowohl beim prozeduralen Gedächtnis (Fähigkeiten, Gewohnheiten) als auch bei motivationalen Prozessen von Bedeutung, was diesen Transmitter sehr wichtig für das Lernen und Gedächtnis macht (SCHEICH *ET AL.* 1997, MYHRER 2003, STARK *ET AL.* 2000, 2004, ROTHE *ET AL.* 2009, SHUMAKE *ET AL.* 2010, SCHICKNICK *ET AL.* 2012).

### **1.5 Stimulation des Dopamin-Systems**

Da Dopamin beim Lernen und Gedächtnis von entscheidender Bedeutung ist, könnte eine Stimulation des Dopamin-Systems einen positiven Einfluss auf das Lernen und Gedächtnis haben. Defizite, wie sie bei Alzheimer auftreten, könnten durch die Anregung des Dopamin-Systems reduziert werden. Dies könnte zu einer Erhaltung, unter Umständen sogar zu einer Verbesserung der Lebensqualität der von Alzheimer betroffenen Patienten führen. Zudem leistet eine Steigerung der Lebensqualität auch einen denkbar wirtschaftlichen Beitrag. Allein in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union beliefen sich die geschätzten Kosten für Demenz-Erkrankungen im Jahre 2008 auf 160 Billionen Dollar (22000 Dollar je Patient im Jahr, WIMO *ET AL.* 2010). 2011 wurden die jährlichen Kosten in Deutschland auf 13.080 Euro je Patient geschätzt. Am kostenintensivsten war dabei die (Langzeit-) Pflege, die über 43 % der Gesamtkosten ausmachte. Weiterhin ist ein zunehmendes Fortschreiten der Krankheit mit höheren Unkosten verbunden (REESE *ET AL.* 2011). Doch abgesehen vom ökonomischen Beitrag ist die Selbstständigkeit bzw. die Verzögerung der Pflegeabhängigkeit der von Alzheimer-betroffenen Patienten von ausschlaggebenderer Wichtigkeit. Denn Patienten, die länger ohne Pflege auskommen, haben eine gesteigerte Lebensqualität und nicht zuletzt hängt die Lebensqualität von den zunehmenden Beeinträchtigungen des Lernens und Gedächtnisses ab.

Um das Erinnerungsvermögen und/oder das Lernen aufrecht zu erhalten, soll im Rahmen der folgenden Untersuchungen geprüft werden, ob das vom Alzheimer-betroffene Gedächtnis dadurch positiv beeinflusst werden kann, indem der extrazelluläre Dopamingehalt im synaptischen Spalt mittels einer pharmakologischen Stimulation erhöht wird. Die Konzentration an Dopamin im synaptischen Spalt basiert auf einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Dopaminfreisetzung und -abbau. Während die Freisetzung von Dopamin gänzlich vom Aktionspotential abhängt, erfolgt der Dopaminabbau durch die Wiederaufnahme mit Hilfe des DAT (BENOIT-MARAND *ET AL.* 2011). Pharmakologisch kann eine Erhöhung des Transmittergehaltes durch D1-Agonisten oder D2-Antagonisten erzielt werden (BENOIT-MARAND *ET AL.* 2011). Allgemein werden Dopamin-Agonisten beispielsweise zur Behandlung von Hypokinesien bei der Parkinson-Krankheit angewendet, während Dopamin-Rezeptor-Antagonisten z.B. zur effektiven Behandlung von Halluzinationen und Wahnvorstellungen bei Schizophrenie-Patienten Anwendung finden (DZIEDZICKA-WASYLEWSKA 2004). Psychostimulanzien, wie Kokain, AMPH oder Methylphenidat (MPH) werden als nützliche Medikation eingesetzt, um diverse Krankheiten zu behandeln, die unter anderem das dopaminerge System betreffen (HAN UND GU 2006). MPH (auch bekannt unter dem Namen Ritalin, Abb. 7) wird dabei sehr häufig als Therapeutikum bei ADHS (JEZIERSKI *ET AL.* 2007, BALCIOGLU *ET AL.* 2009, BETHANCOURT *ET AL.* 2009, 2011) und Narkolepsie verwendet (FERREIRA *ET AL.* 2010). Pharmakologisch ähnlich den AMPH und Kokain (YANO UND STEINER 2007, DOW-EDWARDS *ET AL.* 2008) stimuliert es die Freisetzung der Catecholamine Dopamin und Noradrenalin und blockiert deren Wiederaufnahme. Dabei bindet es an die zugehörigen Transporter und inhibiert hauptsächlich die Aufnahme von Dopamin (FERREIRA *ET AL.* 2010). Somit wird der Gehalt an extrazellulärem Dopamin im PFC (KODA *ET AL.* 2010), Putamen und Nacc erhöht (KUCZENSKI UND SEGAL 1997), was mit verstärkenden Eigenschaften in Verbindung gebracht wird (FERREIRA *ET AL.* 2010). Dabei wird der Dopamingehalt im PFC durch MPH effektiver erhöht als in striatalen Strukturen (ARNSTEN 2011).



**Abb. 7: Struktur von Methylphenidat** (nach YANO UND STEINER 2007)

MPH wird jedoch nicht nur zur Therapie von Krankheiten angewandt, sondern auch von Collegestudenten in den USA benutzt, um ihre akademische Leistung zu verbessern (MARCO *ET AL.* 2011, SADASIVAN *ET AL.* 2012). Die jährliche Prävalenz zur Nutzung von MPH stieg in den letzten Jahren beachtlich an. Oftmals wird MPH zur Aufmerksamkeitsfokussierung, zum Gewichtsverlust oder zur Erzeugung euphorischer Effekte konsumiert. Die Mehrheit der Collegestudenten in den USA missbraucht es derweil, um leistungssteigernde Effekte zu erzielen (MARCO *ET AL.* 2011). Weiterhin konnte bereits durch Einzelfallstudien an Demenzpatienten gezeigt werden, dass MPH das Verhalten beeinflusst, besonders die Apathie, Willenlosigkeit und Unlust (GALYNKER *ET AL.* 1997). Bei einem 78-jährigen, an familiären Alzheimer erkrankten Patienten konnten nach der Einnahme von MPH (5 bis 10 mg, b.i.d.) neben einer Senkung der Apathie ein verbessertes Schlafverhalten und eine wiedererlangte Mimik festgestellt werden (KITTUR UND HAUSER 1999). Auch beim Nager konnte ein Einfluss von MPH auf das Verhalten nachgewiesen werden. So ist bekannt, dass die Exploration und Lokomotion gesteigert, die Ängstlichkeit hingegen gesenkt wurde (MCFADYEN-LEUSSIS *ET AL.* 2004, MIORANZZA *ET AL.* 2010, NIIMI *ET AL.* 2011). Auch das Lernen im *Morris water maze* konnte positiv beeinflusst werden (MCFADYEN-LEUSSIS *ET AL.* 2004). Indessen gibt es bisher keine Literaturbefunde zum Einfluss von MPH auf Lern- und Gedächtnisdefizite bei einem Alzheimer-Tiermodell.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Ausgehend von der Theorie, dass Dopamin eine wesentliche Rolle beim Lernen und Gedächtnis spielt und MPH sowohl anregend auf die Produktion und gleichzeitig hemmend auf den Abbau von vor allem Dopamin wirkt, sollen mittels einer pharmakologischen Stimulation durch MPH Verhaltensdefizite reduziert werden, um so eine verbesserte Merk- und Lernfähigkeit zu verursachen. Dadurch könnten Alzheimer-typische Lern- und Gedächtnisdefizite, wie sie beim 5xFAD-Mausmodell postuliert sind, reduziert werden. Es ist jedoch zu betonen, dass die Untersuchung keine Kausaltherapie darstellen soll, d.h., nicht die Ursachen der Alzheimer-Krankheit sollen behoben werden, sondern vielmehr sollen Symptome unterbunden und ggf. verbessert werden. Dazu soll die pharmakologische Stimulation in unterschiedlichen Altersstufen erfolgen. Einerseits wird behandelt, sobald die Verhaltensdefizite bei der 5xFAD-Maus phänotypisch erstmals sichtbar werden (mit 6 Monaten), andererseits wenn sie vollends ausgebildet sind (mit 9 Monaten). Die pharmakologische Behandlung transgener 5xFAD-Tiere könnte ein verbessertes Lernverhalten im *Morris water maze* erkennen lassen und/oder wieder eine vermehrte

Angstreaktionen im *Fear conditioning* aufweisen. Denkbar wäre ein Ergebnis, dass sich auf einem Niveau zwischen nicht stimulierten transgenen Tieren und Wildtypen (d.h. nicht-transgenen Geschwistertieren) ansiedelt. In den Untersuchungen werden ausschließlich Männchen betrachtet, um einen möglichen Effekt des Östrogenstoffwechsels auf den Dopaminhaushalt auszuschließen (HRUSKA UND NOWAK 1988, LÉVESQUE UND DI PAOLO 1989, KÜPPERS *ET AL.* 2000, IVANOVA UND BEYER 2003, JOHNSON *ET AL.* 2010).

Zu Beginn der Arbeit werden die Versuchstiere grundlegend charakterisiert. Dazu werden phänotypische als auch immunhistochemische Untersuchungen angestellt. Es folgen Verhaltensversuche ohne pharmakologische Stimulation, womit die Ausprägung der Lern- und Gedächtnisdefizite bei den 5xFAD-Männchen eruiert werden soll. Zur Etablierung eines geeigneten Verhaltenstests wird das Verhalten nicht-transgener und transgener 5xFAD-Männchen in unterschiedlichen Altersstadien von 3, 6 und 9 Monaten analysiert. Dabei wird eine Batterie von Experimenten durchgeführt, die sowohl einfache motorische Tests, wie das *Elevated plus maze* und das *Open field* als auch Lernversuche, wie das *Morris water maze* und das *Fear conditioning* involviert. Da ein positives Ergebnis im *Fear conditioning* sowohl als "Angstverhalten" als auch als "Lernen" interpretiert werden kann, werden die zuvor angestellten Tests für eine eindeutige Interpretation herangezogen. Nachdem die Verhaltensuntersuchungen unbeeinflusster Versuchstiere abgeschlossen sind, werden dieselben Verhaltenstests bei den pharmakologisch behandelten Tieren angewandt.

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der wesentlichen Frage, ob und inwiefern Lern- und Gedächtnisdefizite bei der etablierten 5xFAD-Alzheimermaus durch eine pharmakologischen Stimulation mittels MPH *in vivo* beeinflusst werden können. Dabei stützte sich der experimentelle Teil auf folgende Fragestellungen:

### *Die Entwicklung der Alzheimer-Pathologie bei der 5xFAD-Maus*

- Wie und in welchem Umfang erfolgt die Ausprägung und Verteilung der A $\beta$ -Plaques bei der 5xFAD-Maus?
- Ab wann sind phänotypischen Unterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen sichtbar?
- Inwieweit unterscheidet sich der Nestbau der beiden Genotypen?
- Gibt es Unterschiede in der Sensorik bzw. sensorischen Perzeption bei transgenen und nicht-transgenen Mäusen?
- Wie ist die Ängstlichkeit von 5xFAD-Männchen in den verschiedenen Altersstufen von 3, 6 und 9 Monaten und zwischen den Genotypen ausgeprägt?
- Gibt es Veränderungen im Lokomotions- und Explorationsverhalten mit zunehmendem Alter bei transgenen oder nicht-transgenen 5xFAD-Männchen?
- Inwiefern unterscheidet sich das räumliche Lernverhalten und Gedächtnis zwischen den Altersstufen und Genotypen?
- Können die altersabhängigen Unterschiede in der Konditionierung des Angstverhaltens laut Literatur bestätigt werden?
- Wie unterscheiden sich die untersuchten Parameter vom B6SJLF1/J-Hintergrundstamm und zur Literatur zu den 5xFAD-Weibchen?

### *Pharmakologische Stimulation männlicher 5xFAD-Alzheimermäuse*

- Bis zu welchem Alter sind die Voraussetzungen für eine pharmakologische Stimulation gegeben? Kann ein Abbau von funktionellen Dopamin-Neuronen bei alten bzw. transgenen 5xFAD-Männchen beobachtet werden?
- Hat eine pharmakologische Stimulation *in vivo* mittels MPH einen Einfluss auf die Ängstlichkeit oder auf die Lokomotion bzw. Exploration bei 6 bzw. 9 Monate alten 5xFAD-Männchen?
- Kann das räumliche Lernverhalten der 5xFAD-Männchen durch MPH beeinflusst werden?
- Beeinflusst MPH die Angst-Konditionierung?
- Was können mögliche Ursachen für die MPH-Effekte bei den 5xFAD-Männchen sein? Weist der Dopamin-Transporter quantitative Veränderungen zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren auf?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Puffer und Lösungen

#### Substanzinjektion

Natriumchlorid 0,9 %

Methylphenidat (Hydrochlorid)

(3 mg/kg, 10 mg/kg; gelöst in 0,9 % NaCl)

#### HERSTELLER

BRAUN

SIGMA

#### Verhaltensversuche

Iso-Propanol

Seifenlauge

Magermilchpulver (3g/l)

PROCURA

BODE

SALITER

#### Gehirnpräparation

Halothan (2-Brom-2-chlor-1,1,1-trifluorethan)

PBS (0,1 M, pH 7,4)

SIGMA

#### Lösung 1 (saurer Bestandteil)

NaCl 1,82 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 2,73 g

(ad 200 ml Aqua dest.)

SIGMA-ALDRICH

ROTH

#### Lösung 2 (basischer Bestandteil)

NaCl 7,26 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 14,25 g

(ad 800 ml Aqua dest.)

- Titration mit saurer Lösung auf pH 7,4

SIGMA-ALDRICH

ROTH

#### PFA (Paraformaldehyd-Lösung)

Paraformaldehyd 40 g

PBS (0,1 M) 1000 ml

- Erhitzen der Lösung bis sie klar ist

- Filtration mittels Faltenfilter

- ggf. 1 Tropfen 1 N NaOH (MERCK) zugeben

MERCK

Saccharose (30 %ig)

30 g Saccharose

ROTH

*ad* 100 ml PBS (0,1 M)

### Aufarbeitung der Gehirne

Kryoprotektionslösung (CPS)

Ethylenglycol	250 ml	ROTH
Glycerin	250 ml	ROTH
PBS 0,1 M	500 ml	

- Lagerung bei Raumtemperatur (ca. 23 °C)

### Immunhistochemie

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid) MOBITEC

DNS (Eselserum) SIGMA

PBS/TritonX-100 0,5 %

5 ml Triton X-100 (C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>O<sub>11</sub>) ROTH

*ad* 1000 ml PBS (0,1 M, pH 7,4)

- mit dem Rührkern vermischen

*Entwässern*

DPX FLUKA

2-Propanol (Optal) ROTH

Rotisol ROTH

Xylol ROTH

**Tab. 1: Verwendete Primärantikörper**

Primärer Antikörper	Verdünnung	HERSTELLER
Maus anti-Amyloid-β	1:250	IBL
Ziege anti-Aromatische Aminosäuredecarboxylase	1:500	SANTA CRUZ
Kaninchen anti-Dopamin-Transporter	1:1500	MILLIPORE
IB4 (Cy3-konjugiert)	1:500	VECTOR
STL-FITC (Solanum tuberosum Lectin, Fluoreszin-konjugiert)	1:100	VECTOR
Kaninchen anti-Tyrosinhydroxylase	1:1000	MILLIPORE

Die Sekundärantikörper (DIANOVA) stammen aus Esel. Sie waren Cy2-, Cy3- oder Cy5-konjugiert und wurden in einer Verdünnung von 1:500 angewandt.

## 2.2 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Zuchtlinie 5xFAD (Tg6799) stammte aus der hauseigenen Zucht des DZNE (Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Standort Magdeburg). Die Stammtiere waren Nachkommen der Lieferung von JACKSON LABORATORY. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgten in einem klimatisierten Zuchtraum bei  $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , bei einer relativen Luftfeuchte von  $55 \pm 10\%$  und einem Licht-Dunkel-Wechsel von L:D 12:12 mit Licht an ab 6:00 Uhr (MEZ). Die Tiere wurden in Gruppen (maximal 5 Tiere eines Wurfes) in einem IVC-Käfig (39 x 19 x 12 cm, TECNIPLAST) gehalten. Wasser und Futterpellets (SNIFF) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Zusätzlich wurde Nestbaumaterial zur Verfügung gestellt. Am Zuchtkäfig wurden für die Tiere die Zuchtlinie, die Eltern, die Anzahl der im Käfig befindlichen Mäuse, das Geburts- und Absetzdatum sowie für die laufende Tiernummer die Ohrmarkierung, der Genotyp und Bemerkungen wie die Fellfarbe vermerkt. Tiere, die sich im Versuch befanden, wurden einzeln in einem Macrolonkäfig Typ II (EBECO) gehalten. Sie wurden kodiert und erhielten eine substituierte Tierkarte, sodass keine Rückschlüsse auf den Genotyp gemacht werden konnten. Daneben wurden lediglich noch die Zuchtlinie sowie das Geburtsdatum, die Ohrmarkierung und die Fellfarbe festgehalten. Für die Verhaltensexperimente wurden die Tiere aus ihren Haltungskäfigen in die Versuche genommen und nach Beendigung des Versuches wieder in die Heimkäfige zurückgesetzt, damit sie möglichst wenig Stress ausgesetzt waren. Für die Untersuchungen (ausgenommen der phänotypischen Charakterisierung und der immunhistochemischen Färbungen der Plaques) wurden ausschließlich Männchen verwendet. Alle Tierversuche wurden von der Ethikkommission des Bundeslandes Sachsen-Anhalt genehmigt und gehen mit den Deutschen Richtlinien für Tierversuche konform.

## 2.3 Phänotypische Charakterisierung

Zur Charakterisierung der 5xFAD-Maus wurden die transgenen und nicht-transgenen Geschwistertiere phänotypisch untersucht. Neben einer Einschätzung der Motorik und Agilität wurde die Haltung der Vorder- und Hinterpfoten beobachtet. Zudem wurden die Tiere auf ihre Fallreflexe hin untersucht, indem sie am Schwanz festgehalten und kontrolliert auf die Tischplatte zubewegt wurden. Ein Ausstrecken der Pfoten indizierte dabei gesunde Reflexe, während ein Faustballen (sog. *Clasping*) motorische Störungen aufzeigte. Weiterhin erfolgte eine quantitative Analyse des Nestbaus vor sämtlichen Verhaltensversuchen, indem analog zu FILALI ET AL. (2011B) die fünf folgenden Kategorien festgelegt wurden: das

Nestbaumaterial wurde 1 = gar nicht angerührt; 2 = teilweise gerissen; 3 = meist geschreddert, aber auf keiner identifizierbaren Seite platziert; 4 = zu einem flachen Nest verarbeitet; 5 = zu einem perfekten Nest verarbeitet.

## 2.4 Substanzinjektion

Für die pharmakologische Stimulation wurde Methylphenidat (Hydrochlorid, MPH) in den Konzentrationen von 3 mg/kg bzw. 10 mg/kg oder Natriumchlorid (NaCl; 0,9 %) als Kontroll- und Trägersubstanz sowohl den transgenen als auch den nicht-transgenen Geschwistertieren intraperitoneal (i.p.) 45 min vor den Verhaltensuntersuchungen injiziert. Dabei erfolgte die Injektion einmalig vor dem *Elevated plus maze*-Test, vor dem ersten *Trial* des *Open field*-Tests, vor jedem Trainingstag im *Morris water maze* und vor der ersten Habituation im *Fear conditioning*.

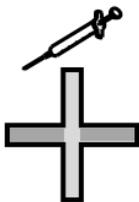
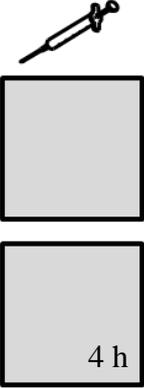
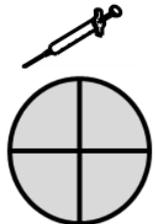
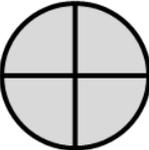
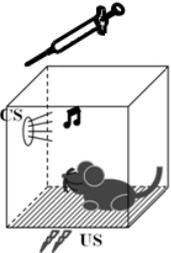
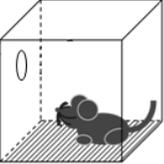
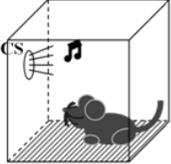
## 2.5 Verhaltensuntersuchungen

Zur Etablierung eines geeigneten Verhaltenstests wurde das Verhalten von zunächst unstimulierten, transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen erforscht. Zuerst erfolgten Analysen im *Adhesive removal test* und im Fußschocksensitivitätstest. Anschließend wurden andere Versuchstiere hinsichtlich ihrer Ängstlichkeit, ihres Explorations- und Lokomotionsverhaltens sowie ihres räumlichen Gedächtnisses und konditionierten Angstverhaltens auch im Vergleich zum Hintergrundstamm B6SJLF1/J untersucht. Dazu wurden drei, sechs und neun Monate alte Tiere verwendet. Nach der grundlegenden Charakterisierung erfolgten dieselben Tests mit pharmakologisch stimulierten 5xFAD-Tieren im Alter von sechs und neun Monaten. Die wesentlichen Verhaltensversuche, die für die Auswertung relevant waren und die im Zusammenhang mit der pharmakologischen Stimulation durchgeführt wurden, waren das *Elevated plus maze*, das *Open field*, das *Morris water maze* und das *Fear conditioning*. Dabei durchlief jedes Versuchstier eine spezifische Abfolge der Tests (Tab. 2).

Die Beobachtungen der Versuchstiere im *Elevated plus maze*, *Open field* und *Morris water maze* wurden mit dem Video-Aktivitäts-Messsystem „Video Mot 2“ (Version 5.76, TSE SYSTEMS, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt. Eine über den Apparaturen angebrachte Kamera zeichnete die Bewegungen des Tieres auf. Mit Hilfe der zugehörigen Software konnten dann die dem Test entsprechenden Parameter ausgewertet werden. Die

Reinigung der Versuchsaapparaturen erfolgte nach jedem Durchgang mit 70 %igem 2-Propanol (ausgenommen das *Water maze* und der *Trial 3* des *Fear conditioning*), um eine olfaktorische Beeinflussung der einzelnen Versuchstiere zu vermeiden. Alle Verhaltensuntersuchungen wurden zwischen 8:00 Uhr und 17:00 Uhr (MEZ) durchgeführt.

**Tab. 2: Paradigma für die Verhaltensuntersuchungen.** Die Spritze symbolisiert eine einmalige i.p.-Verabreichung von MPH (3 mg/kg bzw. 10 mg/kg) oder NaCl (0,9 %).

	Tag1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
W o c h e  1	<p><i>Elevated plus maze</i></p> 	<p><i>Open field</i></p> 	<p><i>Open field</i></p> 		
W o c h e  2	<p><i>Water maze</i></p> 	<p><i>Water maze</i></p> 	<p><i>Water maze</i></p> 	<p><i>Water maze</i></p> 	<p><i>Water maze</i></p> 
W o c h e  3	<p><i>Fear conditioning</i></p> 	<p><i>Fear conditioning</i></p> 	<p><i>Fear conditioning</i></p> 		

### 2.5.1 *Elevated plus maze*

Das *Elevated plus maze* diente der Messung der natürlichen Ängstlichkeit. Gesunde Mäuse verbringen mehr Zeit in den geschlossenen Armen und vermeiden die offenen Arme, um sich zu schützen. Die aus Kunststoff bestehende Apparatur (TSE SYSTEMS, Bad Homburg, Deutschland, Höhe 60 cm) bestand aus vier Armen (B x L: 5 x 28 cm), die plusförmig im 90 °-Winkel voneinander angeordnet waren. Zwei sich gegenüberliegende Arme waren offen, die anderen beiden sich gegenüberliegenden geschlossen, indem sie durch Wände (Höhe 15,5 cm) an den drei Außenseiten umgeben wurden. Zu Beginn wurde die Maus in das Zentrum des *Maze* gesetzt. Die Explorationszeit im *Elevated plus maze* betrug 5 min. Die Zeit und die Anzahl der Kreuzungen in den offenen bzw. geschlossenen Armen sowie die Aufenthaltsdauer in der Mitte der Apparatur wurden protokolliert. Wenn die Maus von einem offenen Arm herunterfiel, galt der Versuch als nicht gültig und die Daten dieses Tieres wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

### 2.5.2 *Open field*

Im *Open field* konnte die lokomotorische Aktivität und das Explorationsverhalten analysiert werden. Gesunde Mäuse explorieren im Feld und richten sich an den Wänden als Zeichen der Agilität auf. Das Zentrum des Feldes wird für gewöhnlich gemieden. Das Versuchstier wurde in die Mitte des leeren Feldes (B x L: 40 x 40 cm, TSE SYSTEMS) eingesetzt und explorierte 5 Minuten ohne Einfluss von Störfaktoren. Lichtschranken an zwei sich gegenüber liegenden Seiten dienten der Messung einer vertikalen Aktivität, d.h. wenn sich das Versuchstier aufrichtete (*Rearings*). Das *Open field* wurde imaginär in 4x4-Unterfelder unterteilt, sodass eine räumliche Trennung der Versuchsapparatur in ein Zentrum (die vier zentralen Felder) und ein Randgebiet (die das Zentrum umgebenden Felder) entstand. Diese Einzelfelder konnten mit Hilfe des Analyseprogrammes separat ausgewertet werden. Aus den Protokollen wurden die zurückgelegte Strecke, die Kreuzungen der Felder (*Crossings*), die Summe des Aufrichtens (*Rearings*), sowie die Zeit im Zentrum des Versuchsfeldes für jeden Versuchslauf analysiert. Wenn die Lichtschranken durchbrochen wurden, weil das Tier zu groß war oder der Schwanz senkrecht ausgerichtet war, wurden die *Rearing*-Werte dieses Tieres aus der Auswertung ausgeklammert. Mittels der Habituation im *Open field*-Tests war es möglich, Rückschlüsse auf das Erinnerungsvermögen der Tiere zu machen. Nach der Akquise wurden die Versuchstiere 4 Stunden (*Recall*) und 24 Stunden (*Re-recall*) später noch einmal getestet. Die zurückgelegte Strecke und die Anzahl der *Rearings* dienten dabei als Parameter. Waren

die Tiere bezüglich der Lokomotion und Exploration ähnlich aktiv wie in der Akquise, wurde dies als Beeinträchtigung des Kurzzeitgedächtnisses (4 h, *Recall*) bzw. Langzeitgedächtnisses (24 h, *Re-recall*) gewertet. Dieses Paradigma wurde zusätzlich in den Versuchen der pharmakologischen Stimulation angewandt.

### **2.5.3 Adhesive removal test**

Der *Adhesive removal test* diente der Untersuchung sensomotorischer Fähigkeiten. Angelehnt an die Ausführungen von FRERET *ET AL.* (2009) wurde der Maus an der Unterseite beider Vorderpfoten Klebeband (0,6 x 0,6 cm) befestigt. Anschließend wurde das Tier in eine Box (B x L x H: 19 x 29 x 19 cm) platziert und die benötigte Zeit, bis beide *Tapes* von den Pfoten entfernt waren, wurde dokumentiert. Nach maximal 120 s wurde der Versuch beendet.

### **2.5.4 Morris water maze**

Das *Morris water maze* diente der Durchführung von Experimenten zum räumlichen Lernen und Gedächtnis. Die Versuchstiere lernten eine nicht sichtbare Plattform in einem Wasserbecken (TSE SYSTEMS) zu lokalisieren. Dazu wurde das Wasser in einem Kunststoffbecken (Ø 120 cm, Höhe 60 cm,  $V \approx 333$  L) mit Milchpulver (3 g/l; SALITER) getrübt. Alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel des Milchwassers. Die Wassertemperatur betrug  $20 \pm 2$  °C, um eine Hypo- bzw. Hyperthermie der Maus zu vermeiden. Die Plattform (Durchmesser: 10 cm, Höhe 29 cm) wurde in einem der vier definierten Quadranten fixiert und befand sich 0,5 cm unter der Wasseroberfläche. Vier Landmarken, welche zur räumlichen Orientierung dienten, wurden an die das *Maze* umgebenden Paravents angebracht. In der Akquisitionsphase wurden die Tiere vier Tage in je vier Experimenten (*Trials*) mit einem *Inter-Trial*-Intervall von 30 min trainiert (*Trial* 1-16). Die Startposition wurde bei jedem Durchgang (sowohl zwischen den *Trials* an einem Tag als auch zwischen den Versuchstagen) randomisiert, um zu vermeiden, dass das Tier die Wegstrecke bis zum Ziel lernte. Die Plattform sollte innerhalb von 120 s lokalisiert werden, wohingegen der *Trial* beendet war, wenn die Maus die Plattform erreicht hatte, auf der sie anschließend weitere 10 s verharrte. Erreichte das Versuchstier das Ziel nicht in der vorgegebenen Zeit, wurde es zur Plattform geführt. Anschließend wurde die Maus im Käfig unter Rotlicht (Typ HP3643, PHILIPS) getrocknet. In der Akquisitionsphase wurde die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform registriert. Am fünften Tag (*Trial* 17) erfolgte der Testlauf 24 Stunden nach dem letzten Training. Dazu wurde die Plattform aus dem Becken entfernt und das Versuchstier wurde in

das Bassin im gegenüberliegenden Quadranten der ursprünglich lokalisierten Plattform eingesetzt. Die Testdauer betrug für jedes Versuchstier 120 s, wobei die Maus während dieser Zeit frei im Wasser schwamm. Für die Auswertung wurden die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattformregion, die gesamte, geschwommene Strecke, die Besuche der Plattformregion und des Zielquadranten, die Zeit in der Plattformregion und im Zielquadranten sowie die Schwimgeschwindigkeit festgehalten.

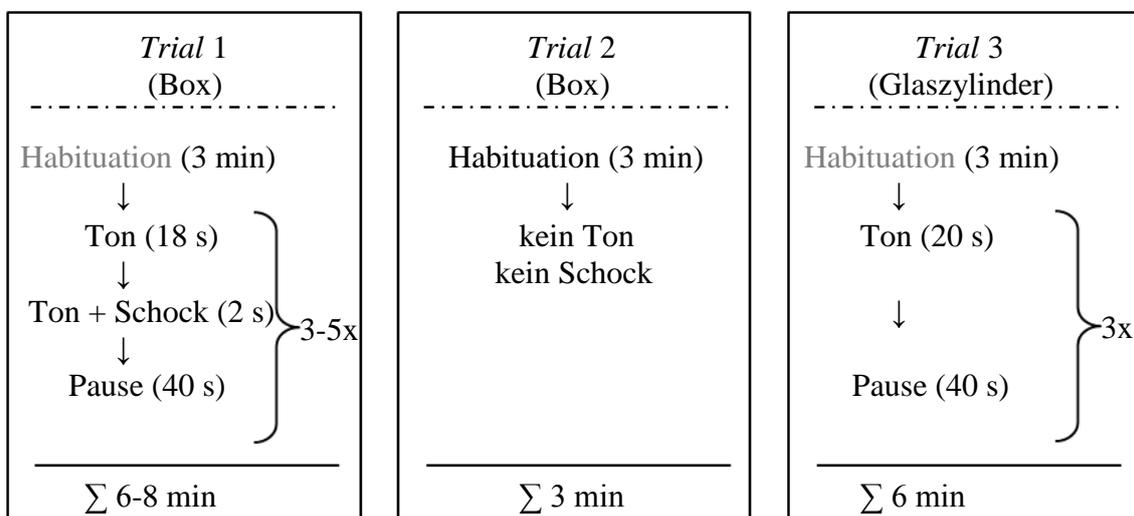
### **2.5.5 Fußchock-Sensitivitätstest**

Für die Bestimmung der Sensitivität auf einen Fußchock wurde sich der Methode von PAMPLONA *ET AL.* (2010) bedient. In einem isolierten Kompartiment einer *Shuttle Box* (B x L x H: 17 x 15 x 19 cm, HASOMED, Magdeburg, Deutschland) wurde der Schwellenwert durch Hoch- und Herunterregulation der Stromstärke ermittelt. Mit Hilfe des Learning Analysis Systems (LAS; HASOMED) erfolgte die Konfiguration der Versuchseinstellung. Nach einer Habituationszeit von 1 min wurde eine Serie von Fußchocks (für je 1 s) in einem 10 s-Intervall über ein Metallgitter verabreicht. Die Schockintensitäten erstreckten sich von 0,02 mA bis 0,6 mA mit einer sukzessiven Zunahme um 0,02 mA. Als erster Indikator auf den nozizeptiven Stimulus wurde ein Zusammenzucken des Tieres gewertet. Dieses Zusammenzucken ist für gewöhnlich die erste Reaktion auf einen aversiven Fußchock und wurde als Antwort auf den entsprechenden Schwellenwert interpretiert. Mit zunehmenden Intensitäten ändern sich die Verhaltensweisen über eine Lautgebung (z.B. quieken) bis hin zu Sprüngen oder der *Freezing*-Reaktion (Ausbleiben jeglicher Bewegung, außer der Atmung). Nach der schrittweisen Steigerung der Stromintensität bis auf das Maximum von 0,6 mA wurde diese im gleichen Muster wieder gesenkt, um den exakten Schwellenwert der Stromstärke zu manifestieren.

### **2.5.6 Fear conditioning**

Das *Fear conditioning*-Paradigma sollte als schneller und erfolgreicher Test zur Messung klassisch konditionierter Angstreaktionen Anwendung finden (Abb. 8). Die vier Außenwände der Versuchsbox (B x L x H: 17 x 15 x 19 cm) bestanden an der Vorder- und Hinterseite aus Acrylglas (Kontext). Die Konfiguration der Versuchseinstellungen erfolgte über das Learning Analysis System (LAS, HASOMED). Im *Trial 1* wurde das Tier über einen aufklappbaren Deckel in die Box gesetzt. In diesem ersten Kontext wurde dem Tier nach einer Habituationszeit von 3 min ein Ton (1-2 kHz; 99 dB) für 20 s über Lautsprecher präsentiert.

Diesem schloss sich ein Fußschock ( $I = 500 \mu\text{A}$ , während der letzten 2 s der Tondarbietung) an, welcher über einen aus Metallstäben bestehenden Fußboden gegeben wurde. Es folgte eine Pause von 40 s. Die Darbietung der Stimuli wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Bei Tieren ab einem Alter von 6 Monaten wurde die Konditionierungsphase auf fünf Wiederholungen erhöht, um eine bessere Erinnerungsfestigung zu gewährleisten (KIMURA UND OHNO 2009). Der Fußschock führte zum *Freezing* des Tieres, welches notiert wurde. Nach der letzten Darbietung des Fußschockes verblieb das Versuchstier für weitere 30 s in der Versuchsapparatur, um eine Assoziationsbildung zwischen dem aversiven Fußschock und dem Experimentator zu vermeiden. 24 Stunden später (*Trial 2*) wurde in der gleichen Umgebung die Summe der *Freezing*-Reaktionszeit innerhalb von 3 min ohne die Präsentation des Tones oder Fußschockes gemessen. Diese Reaktionszeit galt als Maß für die konditionierte Angst-Reaktion. 48 Stunden nach dem Training (*Trial 3*) erfolgte die Messung der *Freezing*-Zeit in einer anderen Umgebung (bedeckter Glaszylinder ( $\varnothing$ : 20 cm, H: 20 cm), China-Öl zur Geruchsveränderung). Das Versuchstier erhielt keinen Fußschock, ausschließlich der Ton, der nach der Habituationszeit von 3 min für 3x 20 s ertönte, war der Maus bekannt. Zwischen den Tönen wurde eine Pause von 40 s dargeboten. Die Reinigung des Glaszylinders erfolgte ausschließlich mit Seifenlauge.



**Abb. 8: Fear conditioning-Paradigma.** Während des ersten *Trials* erfolgte nach einer Habituationszeit von drei Minuten die Konditionierung des Versuchstieres auf die Umgebung und den Ton. Der Test zur Konditionierung auf die Umgebung erfolgte 24 Stunden, der zur Konditionierung auf den Ton 48 Stunden nach dem Training. Ton: 1-2 kHz;  $I = 3 \times 500 \mu\text{A}$  (3 Monate alte Tiere);  $5 \times 500 \mu\text{A}$  (ab 6 Monate alte Tiere)

### 2.5.7 Aktivität im Heimkäfig und Laufrad

Um die Wirkungsdauer von MPH *in vivo* zu analysieren, wurden 9 Monate alte transgene und nicht-transgene Mäuse über den Zeitraum von einer Woche unter pharmakologischer Stimulation im Heimkäfig beobachtet. Am Käfig selbst war ein Infra Mot-System (TSE SYSTEMS) installiert, welches die Aktivität des Tieres im Heimkäfig mittels der Software „PhenoMaster“ kontinuierlich erfasste. Die Registrierung erfolgte durch einen Bewegungssensor, der aus einem 180°, aus einzelnen Segmenten zusammengesetzten Facettenauge bestand. Das Infra Mot-System indizierte eine Aktivität, sobald neben der Bewegung auch die Körperwärme des Tieres erfasst wurde. Ferner erhielten die Mäuse freien Zugang zu einem im Käfig befindlichen Laufrad. Die Aktivität im Laufrad wurde über einen zweiten Computer mit demselben Programm „PhenoMaster“ analysiert. Nach einer Habituationszeit von drei Tagen erhielten die Versuchstiere für vier Tage einmal am Tag zwischen 12:00 Uhr und 13:00 Uhr entweder eine MPH-Injektion (10 mg/kg) oder als Kontrollsubstanz NaCl (0,9 %). Für die Auswertung wurden die datierte Aktivität und die gelaufene Strecke im Laufrad jeweils in einer separaten CSV-Datei gesichert. Es wurde der Durchschnitt der Aktivitäten der vier Injektionstage gebildet und anschließend die erste minimale Aktivität nach der Injektion sowie der maximale Effekt von MPH abgelesen.

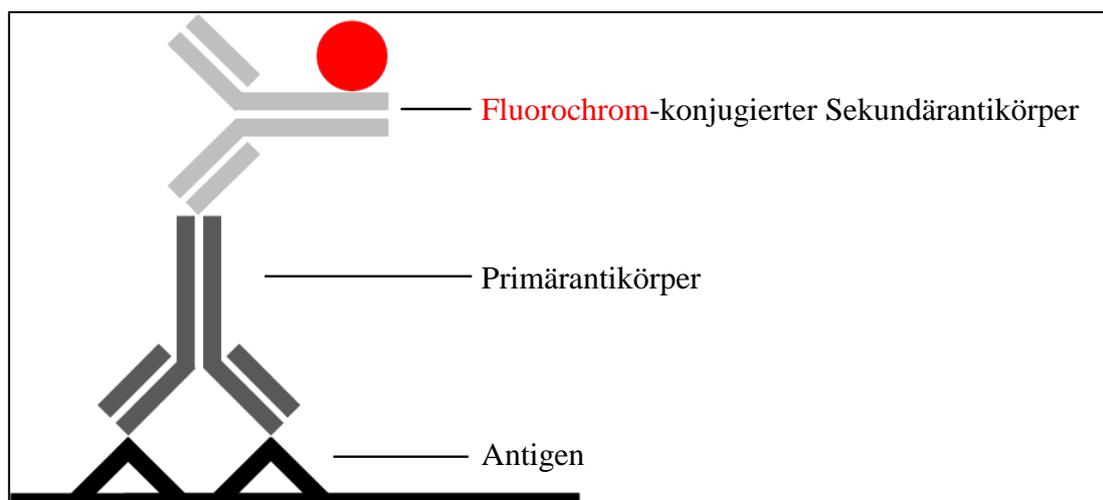
## 2.6 Gehirnpräparation

Für die immunhistochemischen Analysen wurden die Tiere perfundiert und die Gehirne entnommen. Dazu wurden die Mäuse zuerst mit einem Gemisch, bestehend aus Distickstoffmonoxid und Sauerstoff (1:1) sowie Halothan (2-3 %) betäubt. Nach der anschließenden Freipräparation des Herzens wurden mit Hilfe einer Flexüle über einen Katheter 30 ml PBS (0,1 M, pH 7,4) und 30 ml 4 %iges PBS-PFA in die linke Herzkammer eingespült. Durch Anschneiden der rechten Vorkammer wurde der Blutkreislauf geöffnet, sodass ein Durchspülen desselbigen gewährleistet wurde. Nach der Dekapitation wurde der Schädel freipräpariert, die Schädeldecke abgelöst und das Gehirn heraus präpariert. Im Anschluss wurden die Gehirne nochmals für eine Stunde in PFA nachfixiert. Für weitere 2x 3 Tage wurden sie in 30 %iger Saccharose-Lösung gelagert, um das restliche Wasser aus den Zellen zu substituieren. Im Anschluss wurde die Gehirne bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren. Vor den immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Gehirne geschnitten. Dazu wurden sie 24 Stunden vor dem Schneiden von -80 °C in -20 °C überführt. Mit einem Kryostaten (LEICA CM3050) wurden bei einer Kammertemperatur von -16 °C und

Objekttemperatur von  $-11\text{ }^{\circ}\text{C}$  30  $\mu\text{m}$  dicke Coronalschnitte angefertigt. Zur Lagerung wurden die Schnitte in CPS überführt.

## 2.7 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen der coronalen Gehirnschnitte erfolgten nach der indirekten Methode (Abb. 9). Die Gehirnschnitte wurden mit PBS 3x 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde für 2 Stunden mit Hilfe von PBS/0,5 % TritonX-100 und 10 % Eselserum bei Raumtemperatur ( $21\text{-}23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) geblockt. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in PBS/0,5 % TritonX-100 und 5 % Eselserum. Am darauf folgenden Tag wurden die Gehirnschnitte 3x 5 Minuten in PBS gewaschen. Der in PBS verdünnte, sekundäre Antikörper wurde für mindestens 2 Stunden im Dunkeln inkubiert, um ein Ausbleichen des Chromophors zu vermeiden. Dabei wurden aus Esel gewonnene Cy2-, Cy3- und Cy5-konjugierte Farbstoffe (1:500) verwendet. Danach wurden die Schnitte für 3x 5 Minuten in PBS gewaschen und zur Färbung der Zellkerne für maximal 15 Minuten mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid; 1:10000) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten (3x 10 Minuten) in PBS wurden die Gehirnschnitte in einem Gemisch aus Aqua dest. + PBS (1:1) + TritonX-100 auf Objektträger aufgezogen und im Dunkeln luftgetrocknet. Im Anschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigende Alkoholreihe (je 5 Minuten 50 %, 70 %, 90 %, 100 % Rotisol, Optal (2-Propanol), Xylol I/II) entwässert und mit DPX eingedeckelt. Nachdem das Einbettmedium erhärtet war, erfolgt die konfokale Auswertung der Färbungen.



**Abb. 9: Prinzip der indirekten Immunhistochemie.** Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das Antigen der zu untersuchenden Probe. Der Chromophor enthaltende sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper. Der Farbstoff erscheint bei der konfokalmikroskopischen Analyse je nach Markierung grün (Cy2), rot (Cy3) oder purpur (Cy5).

## 2.8 Mikroskopische Auswertung und Zellzählung

Die konfokale Analyse der immunhistochemischen Färbungen wurde mit Hilfe des Konfokalmikroskopes LSM 5 Pascal Exciter (CARL ZEISS, Jena) und der Software LSM 5 Pascal v4.0 durchgeführt. Das Konfokalmikroskop verfügte über drei Laser (Argon  $\lambda_{Em} = 450\text{--}530$  nm, Helium/Neon  $\lambda_{Em} = 543$  nm, Helium/Neon  $\lambda_{Em} = 633$  nm) sowie eine Diode ( $\lambda_{Em} = 405$  nm) zur Anregung der Fluorochrome. Die Schnitte wurden im *Multitracking*-Verfahren gescannt, um eine Überlappung der Kanäle zu vermeiden. Für die Aufnahmen der Plaques im Hippocampus wurde die 10-fache Vergrößerung, EC Plan Neofluar (NA 0,3) und in den restlichen Hirnregionen die 20-fache Vergrößerung, Plan-Apochromat (NA 0,8) verwendet. Einzelne Plaques wurden in der 63-fachen Vergrößerung, Plan-Apochromat (NA 1,4; Öl) dargestellt.

Die Zellzählung der TH- (Tyrosinhydroxylase-) und AADC- (Aromatische Aminosäuredecarboxylase-) positiven Zellen in der VTA in 40-facher Vergrößerung, EC Plan Neofluar (NA 1,3; Öl) und der DAT- (Dopamin-Transporter) positiven Zellen im PFC in 63-facher Vergrößerung, Plan-Apochromat (NA 1,4; Öl) erfolgte mittels des Programmes ZEN 2012 (CARL ZEISS). TH-positive Neurone wurden bestimmt, um die Gesamtzahl positiv gefärbter Zellen in der VTA zu analysieren. AADC-positive Zellen wurden berücksichtigt, um auf die Anzahl funktioneller Dopamin-Neurone zu schließen. Für die DAT-Zählung im PFC dienten als Referenz DAPI-positive Zellen. Je Gehirnschnitt wurden vier Bilder aufgenommen, d.h. je zwei auf der linken und rechten Hemisphäre. Eine Aufnahme in der 40-fachen Vergrößerung umfasste ein quadratisches Feld von  $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$  (Gesamtfläche  $0,04\ \text{mm}^2/\text{Bild} = 0,16\ \text{mm}^2/\text{Schnitt}$ ). In der 63-fachen Vergrößerung ergab sich ein quadratisches Feld von  $130\ \mu\text{m} \times 130\ \mu\text{m}$  (Gesamtfläche  $0,0169\ \text{mm}^2/\text{Bild} = 0,0676\ \text{mm}^2/\text{Schnitt}$ ). Ergaben sich mehrere Schnitte pro Tier, wurde der Mittelwert der Werte gebildet.

## 2.9 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Der Mann-Whitney Rank Sum Test fand bei dem Vergleich der beiden Genotypen Anwendung und der Kruskal Wallis ANOVA Test diente der Gegenüberstellung der verschiedenen Altersstadien und der unterschiedlich stimulierten Gruppen eines Genotyps (Sigma Plot, Version 12.3). Die Zwei-Wege ANOVA mit wiederholter Messung wurde bei der Varianzanalyse der Latenzzeiten im

*Morris water maze* und der Analyse der Aktivitäten im Heimkäfig und Laufrad angewandt (GraphPad Prism 6 (Version 6.01)). Zusätzlich wurden die *Area under curves* (AUC) zur Analyse der Lernkuven im *Morris water maze* und der Aktivitätskurven im Heimkäfig und Laufrad bestimmt. Die Rangkorrelation nach Spearman wurde zur Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen der Aktivität im Heimkäfig und Laufrad bei transgenen bzw. nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen benutzt. Den statistischen Analysen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  zu Grunde gelegt. Mögliche „Ausreißer“ wurden je nach Stichprobengröße mit Hilfe des Ausreißertests nach Grubb (großer Stichprobenumfang) oder nach Dean-Dixon (kleine Stichprobengröße) bestimmt und aus der statistischen Analyse ausgeklammert.

### 3 Ergebnisse

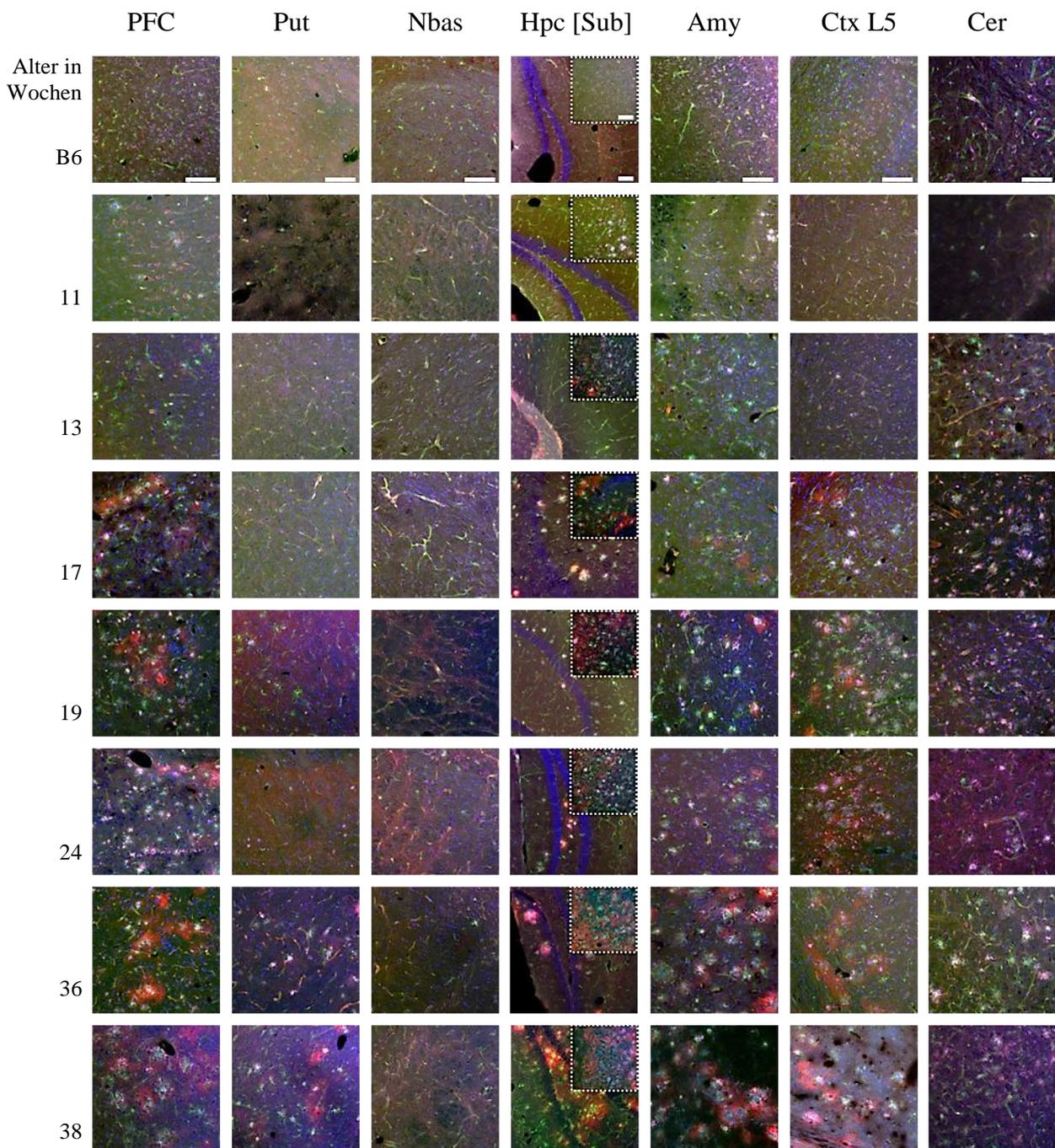
#### 3.1 Charakterisierung der 5xFAD-Maus

##### 3.1.1 Immunhistochemische Färbung der Plaques

Mittels der immunhistochemischen Analyse der Plaques (Abb. 10) wurde nachgewiesen, dass sich bei transgenen 5xFAD-Mäusen mit etwa 11 Wochen (~2,5 Monate) kleine diffuse Plaques, zuerst im PFC und Subiculum bildeten. Im Anschluss entstanden Plaques ab etwa 13 Wochen (~3 Monate) in der Amygdala und im Cortex in der Schicht 5 sowie im Cerebellum und ab ca. 17 Wochen (~4 Monate) im Hippocampus. Im Putamen des Striatums traten die ersten Plaques erst mit 36 Wochen (~8,3 Monate) auf. Der Nucleus basalis (Meynert) als wichtigster Acetylcholin-produzierender Kern wies in den Gehirnen der untersuchten 5xFAD-Maus keine Plaque-Ablagerung auf.

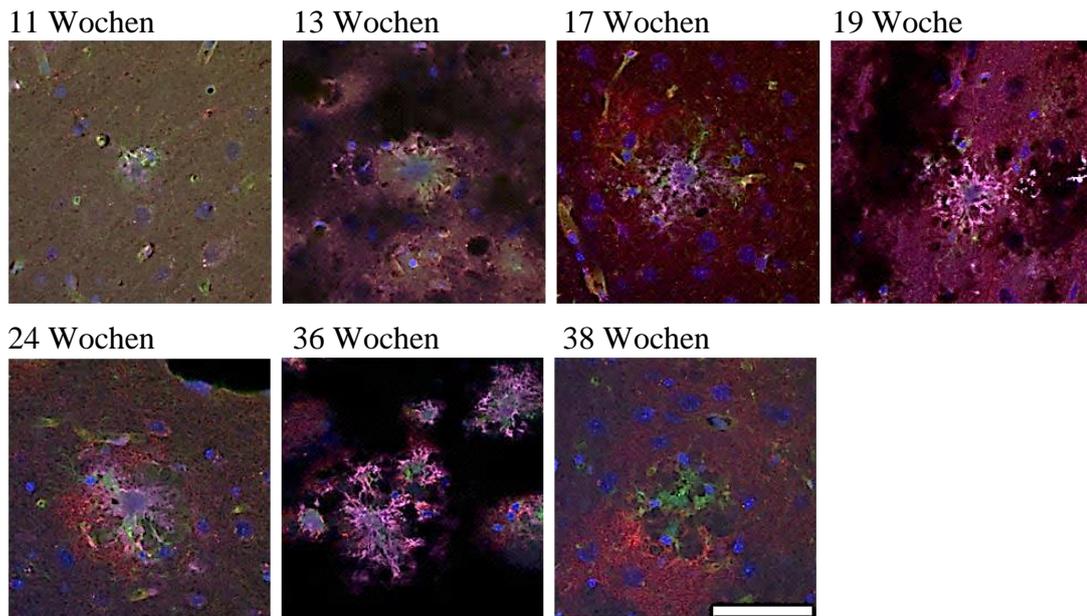
Aus den kleinen diffusen Plaques bildeten sich später große und sehr dichte Plaques (Abb. 11) mit ihrer Wagenrad-ähnlichen Struktur (Abb. 12). Zudem wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung der Färbungen beobachtet, dass Weibchen im Vergleich zu Männchen eher Plaques bildeten. Die Darstellung der Übersichtsfärbungen wurde jedoch nicht nach Geschlecht unterschieden.

Mit der Plaque-Beladung ging eine Ansammlung von Mikroglia um die Plaques (rot) einher. Die aktivierten Mikroglia traten erstmals in der 13. Woche im Subiculum, in der 17. Woche im PFC, Hippocampus, in der Amygdala und in der Schicht 5 des Cortex auf. Ab der 38. Woche (~8,5 Monate) waren die Mikroglia auch im Putamen beobachtbar. Im Cerebellum war keine Ansammlung von Mikroglia um die Plaques in den hier untersuchten Altersstadien auszumachen.

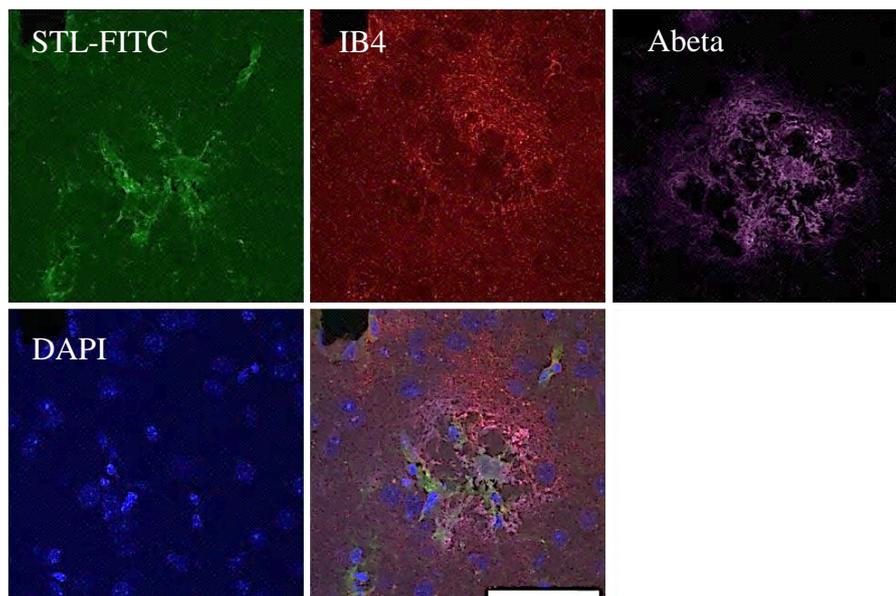


**Abb. 10: Plaque-Färbung in verschiedenen Gehirnregionen der 5xFAD-Maus in Abhängigkeit vom Alter.**

Ab ca. 11 Wochen begann die Plaque-Beladung im PFC und Subiculum (weißer Kasten) und breitete sich bis zur 17. Woche in die Amygdala, in die Schicht 5 des Cortex, ins Cerebellum und in den Hippocampus aus. Im Putamen begann die Plaque-Beladung in der 36. Woche. Im Nucleus basalis entstanden keine Plaques. Zudem war ab der 13. bzw. 17. Woche eine deutliche Anhäufung von Mikroglia um die Plaques (rot) zu erkennen. PFC – Präfrontaler Cortex, Put – Putamen im Striatum, Nbas – Nucleus basalis (Meynert), Hpc – Hippocampus, Sub – Subiculum, Amy – Amygdala, Ctx L5 – Cortex Schicht 5, Cer – Cerebellum, B6 - C57BL/6J; STL-FITC, IB4, Abeta, DAPI (Maßstab 100 µm)



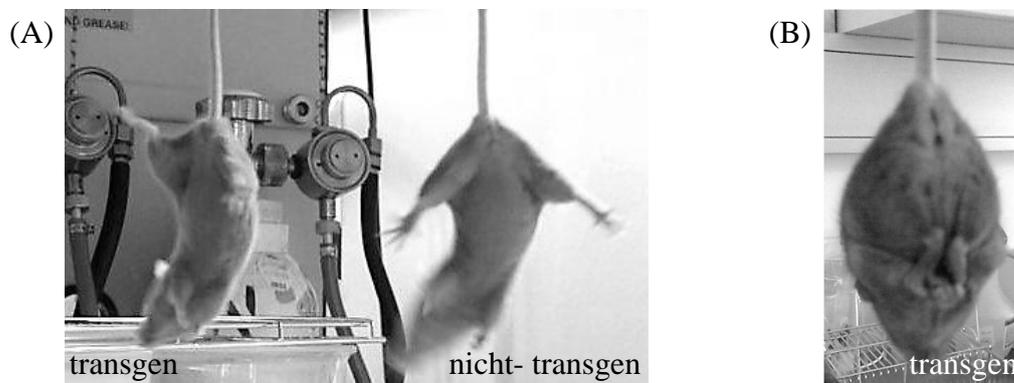
**Abb. 11: Plaque-Entwicklung im präfrontalen Cortex.** Aus kleinen, diffusen Plaques entstanden große, dichte Plaques. Ab der 17. Woche war eine Mikrogliose erkennbar (rot angefärbt). STL-FITC, IB4, Abeta, DAPI (Maßstab 50 µm)



**Abb. 12: Plaque eines 39. Wochen alten Tieres.** Erkennbar war die typische Wagenrad-ähnlichen Struktur, kolokalisiert mit Mikroglia (Maßstab 50 µm).

### 3.1.2 Phänotypische Charakterisierung

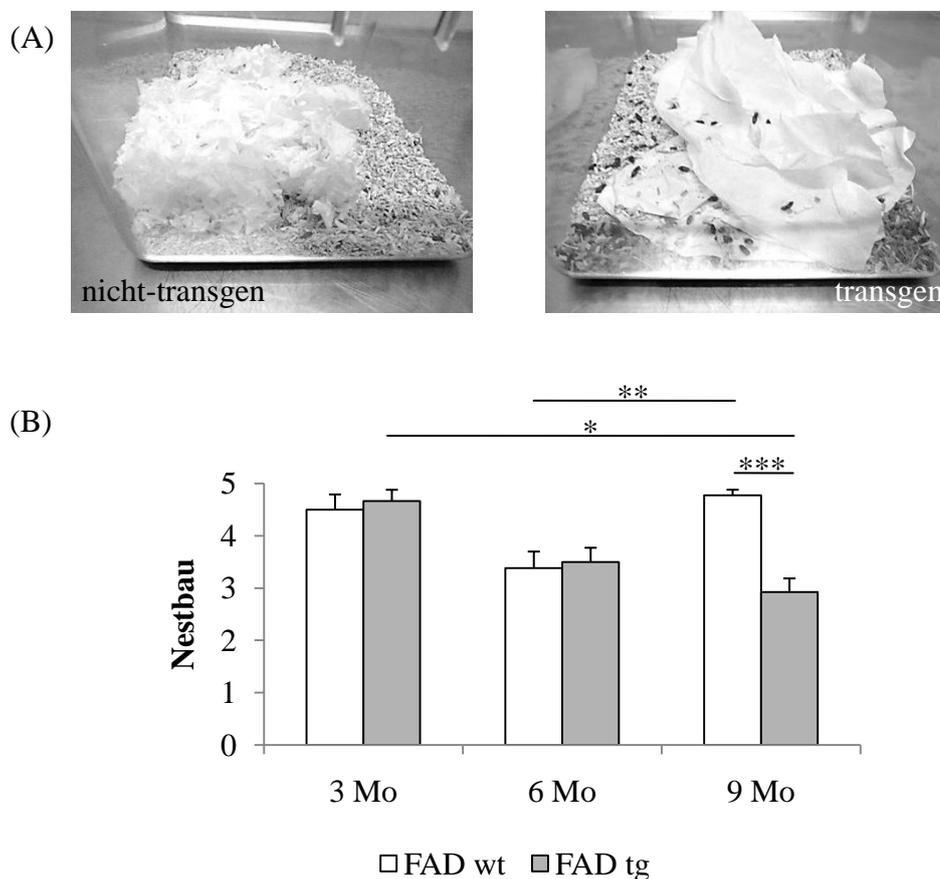
Mit Hilfe der phänotypischen Verhaltensuntersuchung der transgenen und nicht-transgenen (Wildtyp-) 5xFAD-Mäuse wurden bis zu einem Alter von einschließlich 8 Monaten keine Auffälligkeiten zwischen den beiden Genotypen festgestellt. Die Tiere waren agil und wiesen eine gewöhnliche Motorik und normale Reflexe auf. Mit steigendem Alter (8,5 Monate) zeigten transgene Mäuse erste Veränderungen, wie beispielsweise motorische Probleme, eine Rigidität der Pfoten und beginnende fehlende Reflexe, welche ab 9 Monate bereits deutlich sichtbar waren. Ab 12 Monaten waren diese Beeinträchtigungen sehr weit fortgeschritten (Abb. 13A). Mit fortschreitendem Alter war das Fell zudem z.T. ungepflegt, was auf ein fehlendes bzw. reduziertes Putzverhalten zurückzuführen war. Zusätzlich waren bei transgenen Tieren Veränderungen in der Haltung der Vorder- und Hinterpfoten zu erkennen, die sich in einer Art Faustballen (*Clasping*) widerspiegeln (Abb. 13B). Gelegentlich wurden Stereotypien beobachtet, die sich in Salto-Schlagen, Kreislaufen, Auf-und-Ab-Springen oder sehr schnelles Umherlaufen im Heimkäfig äußerten. 9 von 139 Mäusen zeigten diese Stereotypien, was 6,5 % der Versuchstiere ausmachte. Dabei waren 4 Tiere transgen (2,9 %) und 5 nicht-transgen (3,6 %).



**Abb. 13: Phänotypische Beschreibung der 5xFAD-Maus.** (A) Bei alten, transgenen 5xFAD-Tieren (> 12 Monate, links) waren im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-transgenen Geschwistertieren (rechts) deutliche Beeinträchtigungen der Reflexe und (B) der Haltung der Pfoten zu erkennen.

### 3.1.3 Nestbau alter 5xFAD-Mäuse

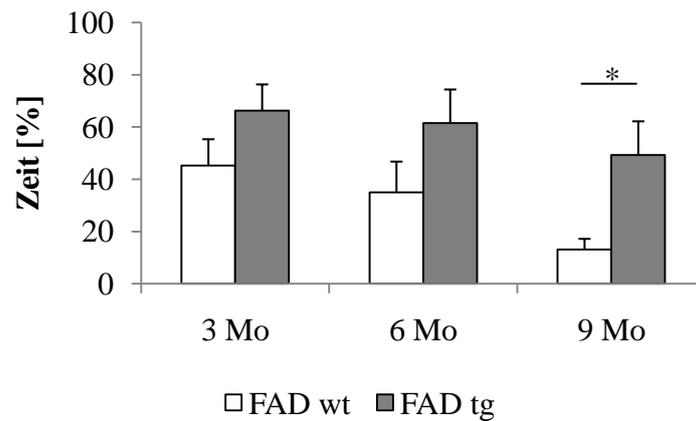
Mit zunehmendem Alter wurde ein Unterschied im Nestbau (Abb. 14A) zwischen transgenen (rechts) und nicht-transgenen Geschwistertieren (links) beobachtet. Im Alter von 9 Monaten war der Nestbau transgener Tiere ( $2,93 \pm 0,25$  Punkte) im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-transgenen Mäusen ( $4,78 \pm 0,10$  Punkte,  $p < 0,001$ ) und zu 3 Monate alten transgenen 5xFAD-Mäusen ( $4,67 \pm 0,21$  Punkte,  $p = 0,009$ ) signifikant minderwertiger (Abb. 14B), was sich in einer geringeren Verarbeitung (Schreddergrad) und mangelhafter Anordnung (Nestform) widerspiegelte. Daneben zeigten nicht-transgene Mäuse im Alter von 6 Monaten einen signifikant schlechteren Nestbau ( $3,38 \pm 0,31$  Punkte), verglichen mit 9 Monate alten nicht-transgenen Tieren ( $p = 0,001$ ).



**Abb. 14: Nestbau der 5xFAD-Maus.** (A) Die Verarbeitung des Nestbaumaterials war bei transgenen 5xFAD-Mäusen (rechts) ab einem Alter von 9 Monaten deutlich minderwertiger als bei gleichaltrigen nicht-transgenen Tieren (links). (B) Quantitative Analyse: transgene 5xFAD-Mäuse zeigten einen signifikant schlechteren Nestbau als gleichaltrige nicht-transgene Tiere und 3 Monate alte transgene Mäuse (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ \*\*\* $p < 0,001$ ). Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; weiß;  $n = 4$  (3 Mo);  $n = 13$  (6 Mo);  $n = 18$  (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 10$  (6 Mo);  $n = 27$  (9 Mo))

### 3.1.4 Untersuchung zur Sensomotorik – *Adhesive removal test*

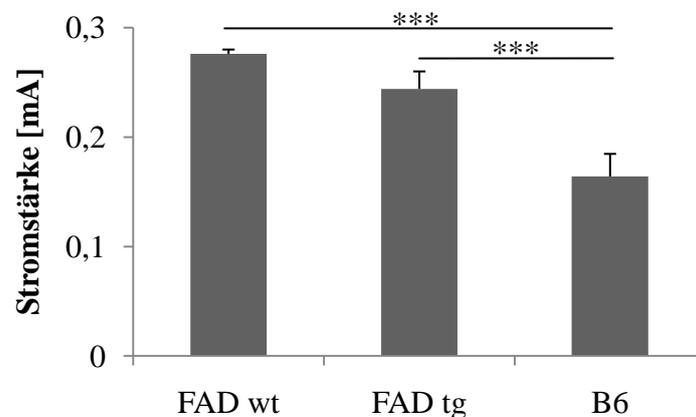
Im *Adhesive removal test* (Abb. 15) benötigten die transgenen Versuchstiere im Alter von 9 Monaten signifikant mehr Zeit ( $49,33 \pm 12,83 \%$ ), um das Klebeband von den Vorderpfoten zu entfernen als ihre nicht-transgenen Geschwistertiere im selben Alter ( $13,17 \pm 4,01 \%$ ,  $p = 0,008$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Altersstufen von 3, 6 und 9 Monaten wurde bei transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen nicht festgestellt ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 15: *Adhesive removal test* bei der 5xFAD-Maus.** 9-monatige transgene 5xFAD-Mäuse benötigten im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren signifikant mehr Zeit, um das Klebeband von den Vorderpfoten zu entfernen (\* $p < 0,05$ ). Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; weiß;  $n = 7$  (3 Mo);  $n = 4$  (6 Mo);  $n = 5$  (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau;  $n = 10$  (3 Mo);  $n = 8$  (6 Mo);  $n = 5$  (9 Mo))

### 3.1.5 Untersuchung zur Sensorik – Fußchock-Sensitivitätstest

Die Reaktionen der Tiere auf einen Stromstoß im Fußchock-Sensitivitätstest waren von der Intensität des Fußchocks abhängig. Die Stromstärke war bei den transgenen ( $0,24 \pm 0,02$  mA) und nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen ( $0,28 \pm 0,004$  mA) im Alter von 6 Monaten signifikant höher als bei C57BL/6J-Kontrolltieren ( $0,16 \pm 0,02$  mA,  $p < 0,001$ ; Abb. 16). Demnach benötigten sowohl transgene, aber auch nicht-transgene 5xFAD-Tiere eine höhere Stromstärke, um den Fußchock zu registrieren als gleichaltrige, gesunde C57BL/6J-Mäuse. Dies spiegelte sich auch in der verwendeten Stromstärke im *Fear conditioning* wider (siehe *Fear conditioning*-Versuche).

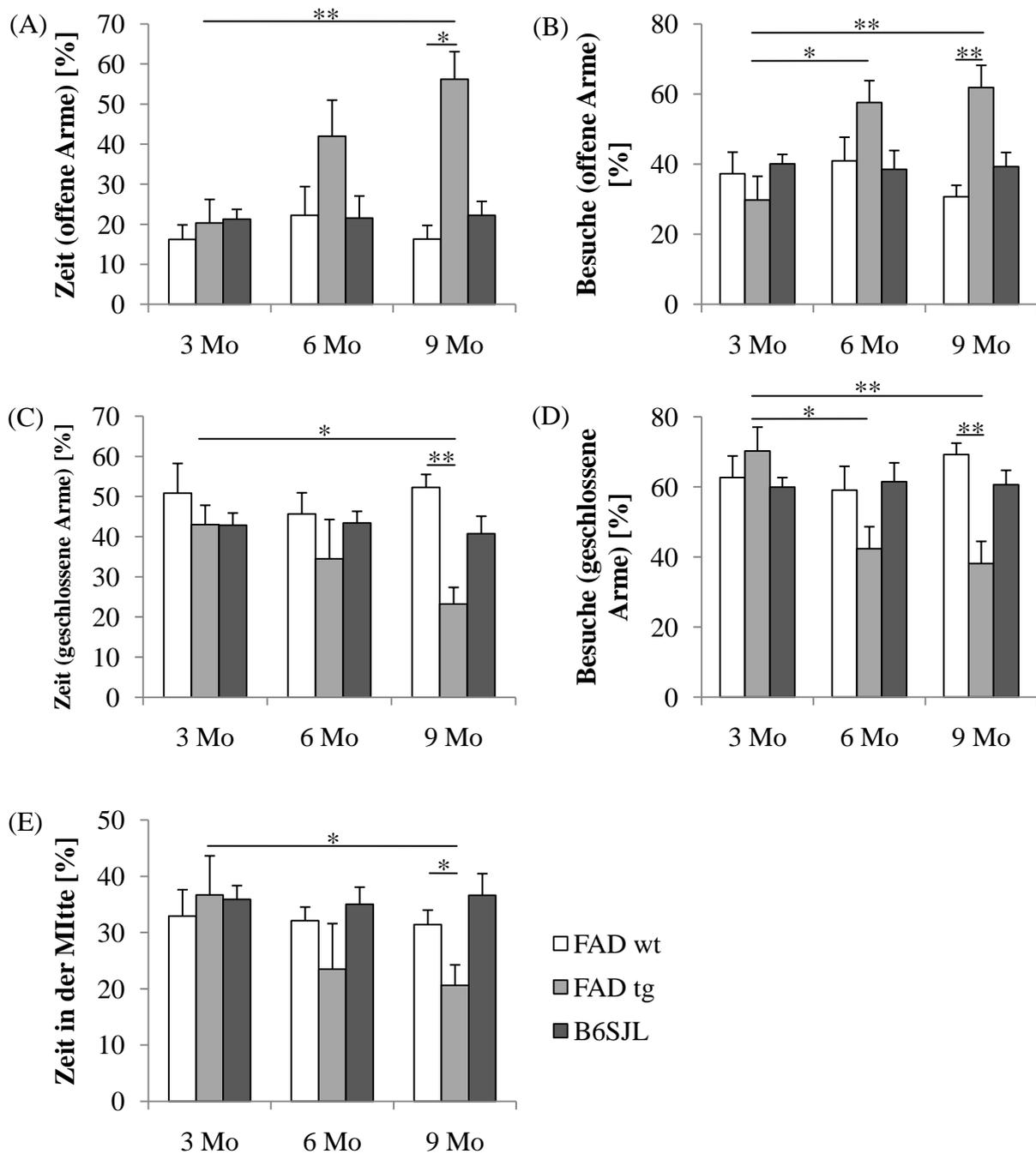


**Abb. 16: Fußchock-Sensitivitätstest bei 6 Monate alten 5xFAD-Tieren.** Sowohl transgene (FAD tg,  $n = 5$ ) als auch nicht-transgene (FAD wt,  $n = 5$ ) 5xFAD-Versuchstiere benötigten eine signifikant höhere Stromstärke zur Registrierung des Fußchocks, verglichen mit C57BL/6J-Mäusen (B6,  $n = 5$ ;  $***p < 0,001$ ).

## 3.2 Verhalten der 5xFAD-Maus ohne pharmakologische Stimulation

### 3.2.1 *Elevated plus maze* ohne pharmakologische Stimulation

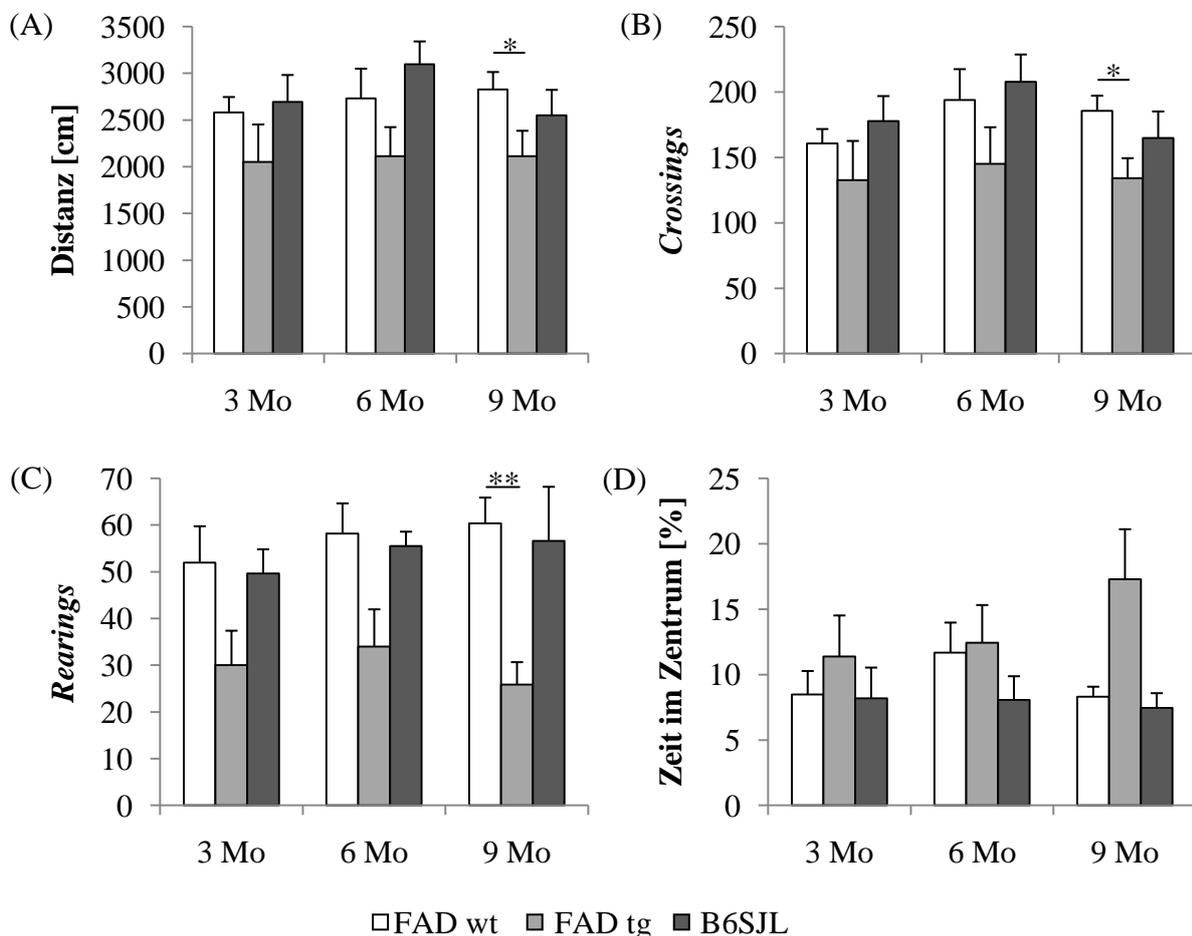
Im *Elevated plus maze* wurde gezeigt, dass 9 Monate alte transgene 5xFAD-Tiere signifikant mehr Zeit in den offenen Armen verbrachten ( $56,18 \pm 6,94$  %) als gleichaltrige nicht-transgene Geschwistertiere ( $16,29 \pm 3,44$  %,  $p = 0,031$ ) und 3 Monate alte transgene 5xFAD-Mäuse ( $20,32 \pm 5,92$  %,  $p = 0,002$ ; Abb. 17A). Gleichzeitig besuchten 9-monatige transgene 5xFAD-Mäuse die offenen Arme signifikant häufiger ( $61,89 \pm 6,36$  %) als 9 Monate alte nicht-transgene Versuchstiere ( $30,76 \pm 3,25$  %,  $p = 0,002$ ) und als 3-monatige transgene Mäuse ( $29,77 \pm 6,81$  %,  $p = 0,002$ ; Abb. 17B). Bereits 6 Monate alte transgene Mäuse besuchten die offenen Arme signifikant häufiger ( $57,62 \pm 6,27$  %) als 3 Monate alte transgene Tiere ( $p = 0,026$ ). Demgegenüber hielten sich die 9-monatigen transgenen Tiere signifikant weniger im geschlossenen Arm auf ( $23,20 \pm 4,16$  %), verglichen mit 9-monatigen nicht-transgenen Tieren ( $52,30 \pm 3,20$  %,  $p = 0,004$ ) bzw. 3-monatigen transgenen Tieren ( $43,01 \pm 4,81$  %,  $p = 0,029$ ; Abb. 17C). Zudem besuchten die 9 Monate alten transgenen Mäuse die geschlossenen Arme auch signifikant weniger ( $38,11 \pm 6,36$  %) als 9-monatige nicht-transgene Geschwistertiere ( $69,24 \pm 3,25$  %,  $p = 0,002$ ) bzw. 3-monatige alte transgene 5xFAD-Mäuse ( $70,23 \pm 6,81$  %,  $p = 0,002$ ; Abb. 17D). Schon im Alter von 6 Monaten besuchten die transgenen 5xFAD-Mäuse die geschlossenen Arme signifikant weniger ( $42,38 \pm 6,27$  %) als 3-monatige transgene Mäuse ( $p = 0,026$ ). Zuletzt waren die 9 Monate alten transgenen 5xFAD-Tiere ( $20,62 \pm 3,62$  %) signifikant weniger im Zentrum des *Maze*, im Vergleich zu 9 Monate alten nicht-transgenen Tieren ( $31,41 \pm 2,56$  %,  $p = 0,026$ ) und zu 3 Monate alten transgenen 5xFAD-Tieren ( $36,67 \pm 6,94$  %,  $p = 0,012$ ; Abb. 17E). Im Vergleich zum B6SJLF1/J-Stamm wurden keine signifikanten Unterschiede der 5xFAD-Mäuse beobachtet.



**Abb. 17: Elevated plus maze-Test bei der 5xFAD-Maus ohne pharmakologische Stimulation.** Der Vergleich alter, transgener Tiere (9 Mo) zu alten nicht-transgenen Tieren (9 Mo) und zu jungen, transgenen Tieren (3 Mo) zeigte, dass die Aufenthaltsdauer und die Besuche in den offenen Armen signifikant erhöht und im geschlossenen Arm bzw. im Zentrum signifikant erniedrigt waren (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ). (A) Zeit in den offenen Armen, (B) Besuche der offenen Arme, (C) Zeit in den geschlossenen Armen, (D) Besuche der geschlossenen Arme, (E) Aufenthaltsdauer in der Mitte. Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, weiß;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 6$  (6 Mo);  $n = 15$  (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 6$  (6 Mo);  $n = 13$  (9 Mo)), B6SJL<sup>F1/J</sup>-Hintergrundstamm (B6SJL, dunkelgrau;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 6$  (6 Mo);  $n = 10$  (9 Mo))

### 3.2.2 Open field ohne pharmakologische Stimulation

Im *Open field*-Test wurde beobachtet, dass transgene 5xFAD-Vesuchstiere in einem Alter von 9 Monaten ( $2111,60 \pm 274,54$  cm) im Vergleich zu 9-monatigen nicht-transgenen Geschwistertieren ( $2827,07 \pm 188,00$  cm) eine signifikant geringere Strecke liefen ( $p = 0,008$ ; Abb. 18A). Parallel dazu kreuzten die 9-monatigen transgenen 5xFAD-Tiere das Feld signifikant weniger ( $134,13 \pm 15,36$ ) als 9 Monate alte nicht-transgene Geschwistertiere ( $185,53 \pm 11,71$ ,  $p = 0,039$ ; Abb. 18B). Weiterhin richteten sich 9 Monate alte transgene 5xFAD-Mäuse ( $25,88 \pm 4,81$ ) auch signifikant weniger auf als 9 Monate alte nicht-transgene Mäuse ( $60,40 \pm 5,52$ ,  $p = 0,002$ ; Abb. 18C). Verglichen mit den B6SJLF1/J-Mäusen zeigten die 5xFAD-Mäuse keinen Unterschied in den untersuchten Parametern.

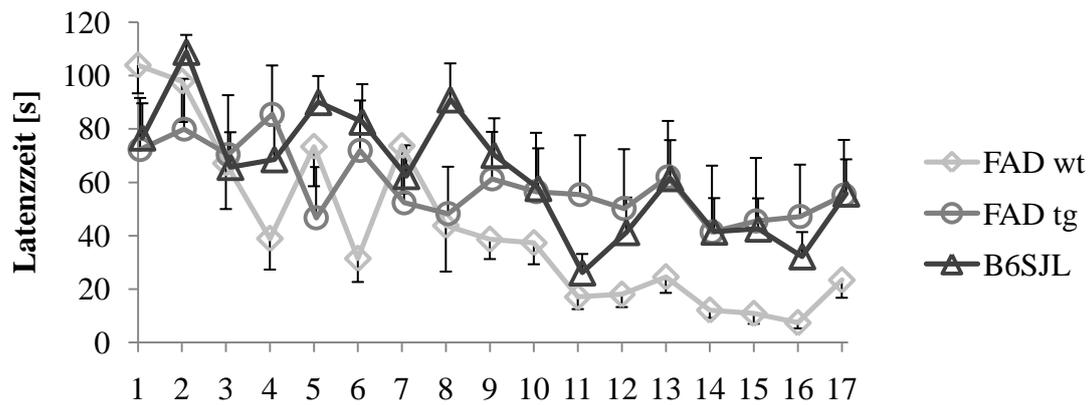


**Abb. 18: Open field-Test bei der 5xFAD-Maus ohne pharmakologische Stimulation.** 9 Monate alte transgene 5xFAD-Mäuse legten eine signifikant geringere Strecke zurück, kreuzten das Feld signifikant weniger und richteten sich signifikant weniger auf, verglichen mit 9 Monate alten nicht-transgenen Tieren (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ). (A) zurückgelegte Strecke, (B) Anzahl der Kreuzungen im Feld, (C) Anzahl der *Rearings*, (D) Zeit im Zentrum. Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; weiß;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 6$  (6 Mo);  $n = 15$  (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 8$  (6 Mo);  $n = 17$  (9 Mo)), B6SJLF1/J-Hintergrundstamm (B6SJL, dunkelgrau;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 6$  (6 Mo);  $n = 10$  (9 Mo))

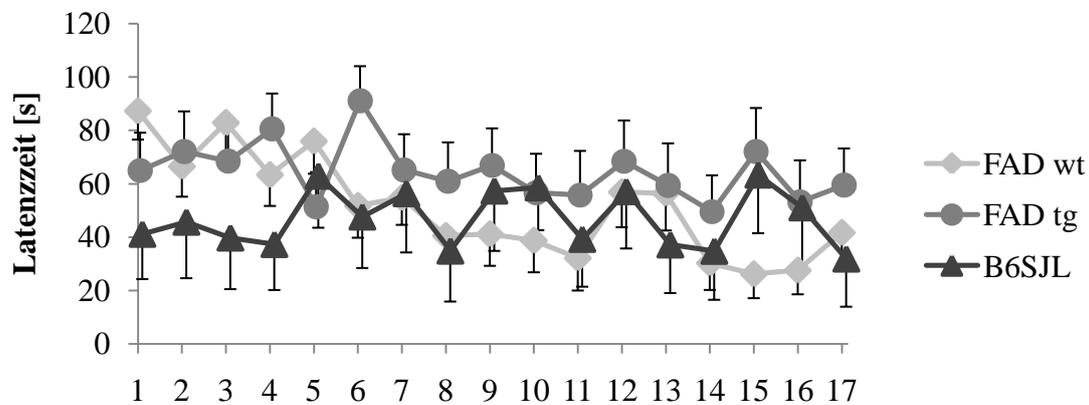
### 3.2.3 *Morris water maze* ohne pharmakologische Stimulation

Im *Morris water maze* zeigte der Vergleich der Latenzzeiten zwischen transgenen und nicht-transgenen 5xFAD- und den B6SJLF1/J-Mäusen in einem Alter von 3 (Abb. 19A) und 6 Monaten (Abb. 19B) keinen signifikanten Unterschied, jedoch war eine tendenzielle Erhöhung der Latenzzeit bei den transgenen 5xFAD-Tieren zu beobachten. Ab 9 Monaten war die Latenzzeit der transgenen 5xFAD-Mäuse im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-transgenen Versuchstieren signifikant erhöht ( $F(1, 14) = 5,940$ ;  $p = 0,026$ ; Abb. 19C). Im Vergleich zu dem B6SJLF1/J-Stamm wurde bei transgenen 5xFAD-Tieren im Alter von 9 Monaten kein signifikanter Unterschied beobachtet.

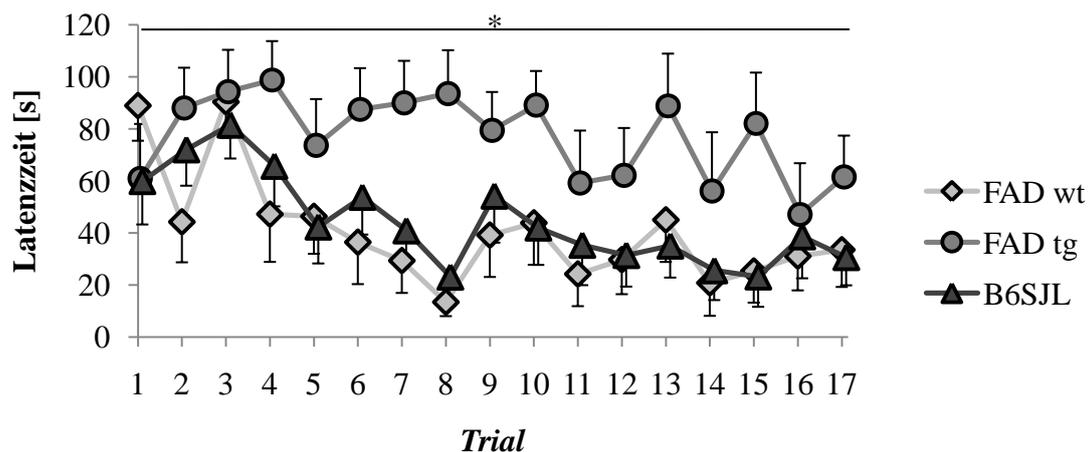
## (A) 3 Monate



## (B) 6 Monate

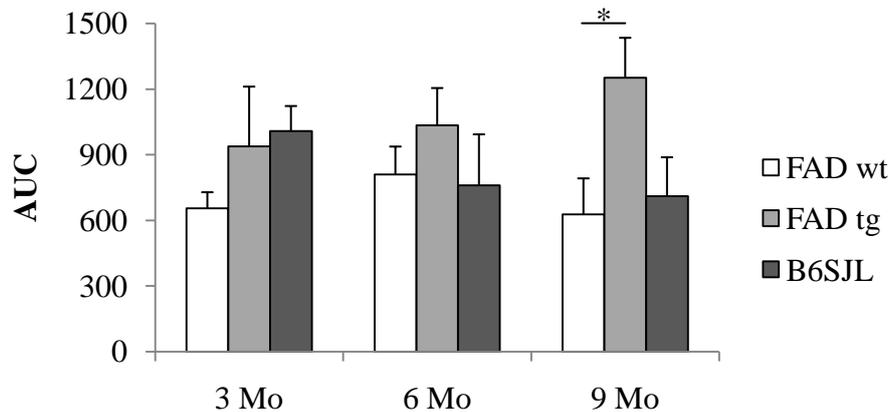


## (C) 9 Monate



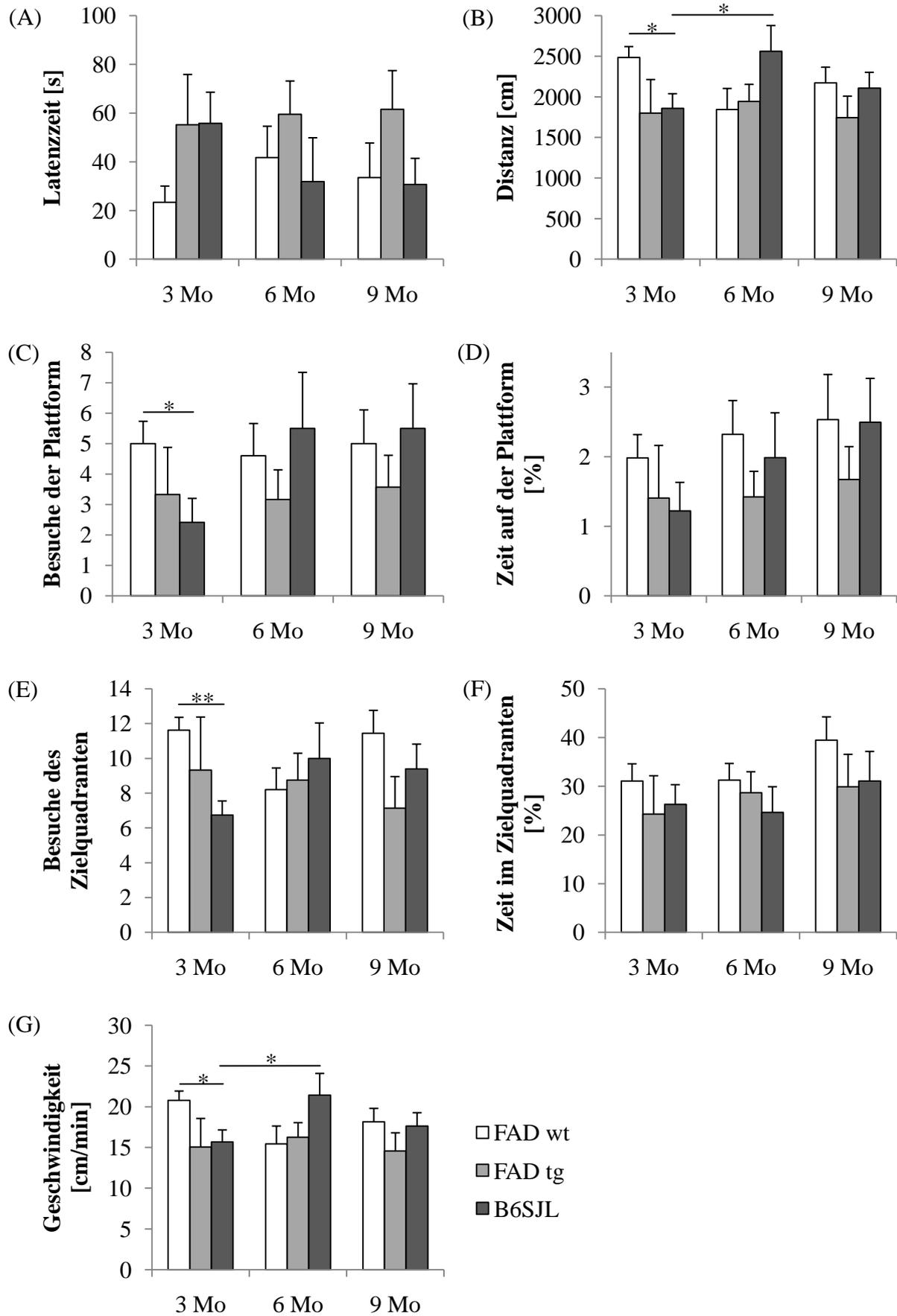
**Abb. 19: Latenzzeiten im Morris water maze-Test (Trial 1-17) bei der 5xFAD-Maus ohne pharmakologische Stimulation.** Die Latenzzeit transgener Tiere war im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren im Alter von 9 Monaten signifikant erhöht (\* $p < 0,05$  FAD wt vs. FAD tg). (A) 3 Monate, (B) 6 Monate, (C) 9 Monate alte Tiere. Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, Rauten;  $n = 8$  (3 Mo);  $n = 15$  (6 Mo);  $n = 9$  (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, Kreise;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 12$  (6 Mo);  $n = 7$  (9 Mo)), B6SJL1/J-Hintergrundstamm (B6SJL, Dreiecke;  $n = 12$  (3 Mo);  $n = 6$  (6 Mo);  $n = 10$  (9 Mo))

Die Berechnung der Fläche unter den Kurven (*Area under curve*, AUC) für die Latenzzeit erbrachte eine signifikant größere Fläche der 9-monatigen transgenen 5xFAD-Versuchstiere ( $1251,74 \pm 182,72$ ), verglichen mit 9 Monate alten nicht-transgenen 5xFAD-Tieren ( $628,13 \pm 163,79$ ;  $p = 0,026$ ; Abb. 20), nicht jedoch im Vergleich zu 9-monatigen B6SJLF1/J-Tieren.



**Abb. 20: Area under curve (AUC) für die Latenzzeit im Morris water maze bei der 5xFAD-Maus ohne pharmakologische Stimulation.** Die AUC 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse war signifikant höher als die nicht-transgener Tiere im selben Alter (\* $p < 0,05$ ). Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, weiß;  $n = 8$  (3 Mo);  $n = 15$  (6 Mo);  $n = 9$  (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 12$  (6 Mo);  $n = 7$  (9 Mo)), B6SJLF1/J-Hintergrundstamm (B6SjL, dunkelgrau;  $n = 12$  (3 Mo);  $n = 6$  (6 Mo);  $n = 10$  (9 Mo))

Im Gedächtnis-Test (*Trial 17*) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen beobachtet. Jedoch war die Latenzzeit (Abb. 21A) der transgenen Tiere im Alter von 9 Monaten im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-transgenen Geschwistertieren und B6SJLF1/J-Mäusen tendenziell erhöht, während die Besuche der Plattformregion (Abb. 21C) und des Zielquadranten (Abb. 21E) oder die Zeit in der Plattformregion (Abb. 21D) und im Zielquadranten (Abb. 21F) tendenziell reduziert waren. Daneben wurde nachgewiesen, dass die geschwommene Strecke der 3-monatigen B6SJLF1/J-Tiere signifikant niedriger war ( $1858,80 \pm 180,98$  cm) als die 3-monatigen nicht-transgenen 5xFAD-Tiere ( $2484,02 \pm 135,42$  cm,  $p = 0,023$ ) und als die 6 Monate alten B6SJLF1/J-Mäuse ( $2561,86 \pm 317,76$  cm,  $p = 0,044$ ; Abb. 21B). Des Weiteren besuchten die 3-monatigen B6SJLF1/J-Versuchstiere die Plattformregion ( $2,42 \pm 0,78$ ;  $p = 0,038$ ) bzw. den Zielquadranten ( $6,75 \pm 0,80$ ;  $p = 0,001$ ) signifikant weniger als gleichaltrige nicht-transgene 5xFAD-Mäuse ( $5 \pm 0,73$  bzw.  $11,63 \pm 0,73$ ; Abb. 21C und E). Zudem schwammen die 3-monatigen B6SJLF1/J-Männchen ( $15,67 \pm 1,48$  cm/min) signifikant langsamer im Vergleich zu 3 monatigen nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen ( $20,78 \pm 1,14$  cm/min,  $p = 0,023$ ) und zu 6-monatigen B6SJLF1/J-Tieren ( $21,42 \pm 2,66$  cm/min,  $p = 0,044$ ; Abb. 21G).



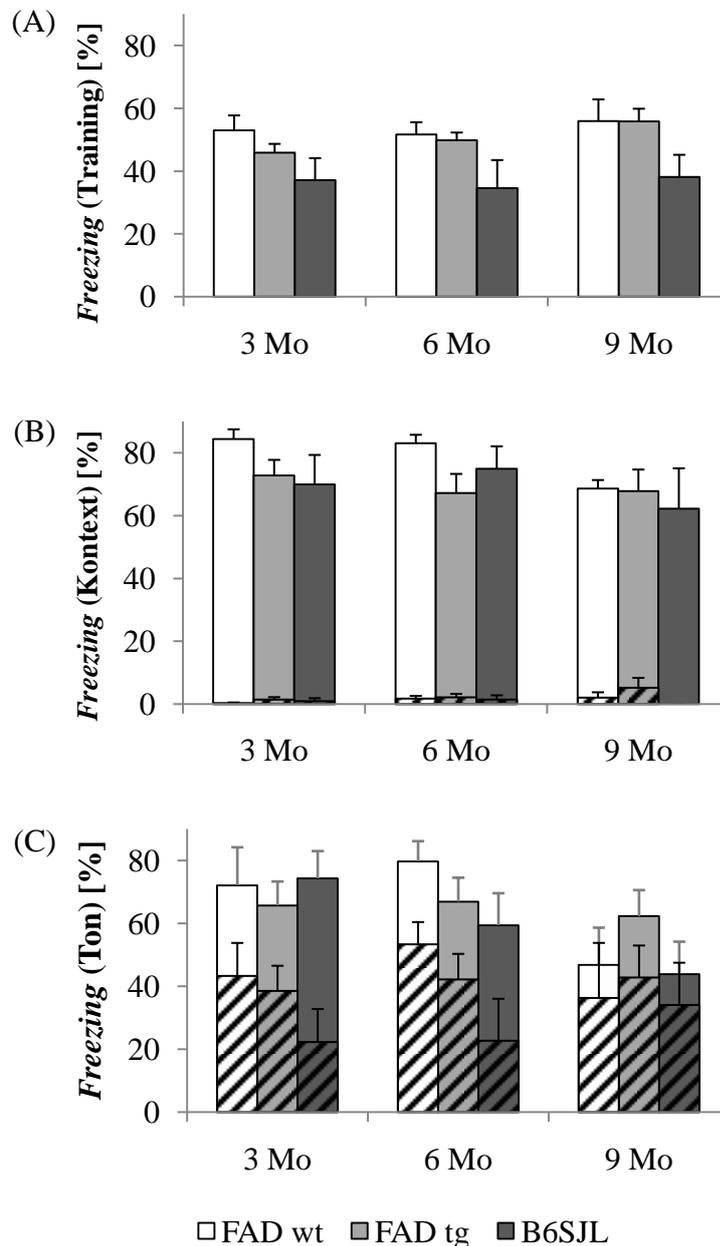
**Abb. 21: Morris water maze-Test (Trial 17) bei der 5xFAD-Maus ohne pharmakologische Stimulation.** Transgene 5xFAD-Tiere wiesen eine tendenziell höhere Latenzzeit und eine tendenziell reduzierte Anzahl der Besuche der Plattformregion und des Zielquadranten sowie eine tendenziell kürzere Zeit in der Plattformregion und im Zielquadranten im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-transgenen Tieren im Alter von 9 Monaten auf. 3-monatige B6SJLF1/J-Mäuse unterschieden sich in der Distanz, in den Besuchen der Plattformregion und des Zielquadranten und in der Schwimmggeschwindigkeit signifikant von 3 Monate alten nicht-transgenen 5xFAD-Tieren. Zudem schwammen sie weniger und langsamer als 6 Monate alte B6SJLF1/J-Tiere (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ). (A) Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattformregion, (B) geschwommene Strecke; (C) Besuche der Plattformregion, (D) Zeit in der Plattformregion, (E) Besuche des Zielquadranten, (F) Zeit im Zielquadranten, (G) Schwimmggeschwindigkeit. Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, weiß;  $n = 8$  (3 Mo);  $n = 15$  (6 Mo);  $n = 9$  (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau;  $n = 6$  (3 Mo);  $n = 12$  (6 Mo);  $n = 7$  (9 Mo)), B6SJLF1/J-Hintergrundstamm (B6SJL, dunkelgrau;  $n = 12$  (3 Mo);  $n = 6$  (6 Mo);  $n = 10$  (9 Mo))

←

---

### 3.2.4 Fear conditioning ohne pharmakologische Stimulation

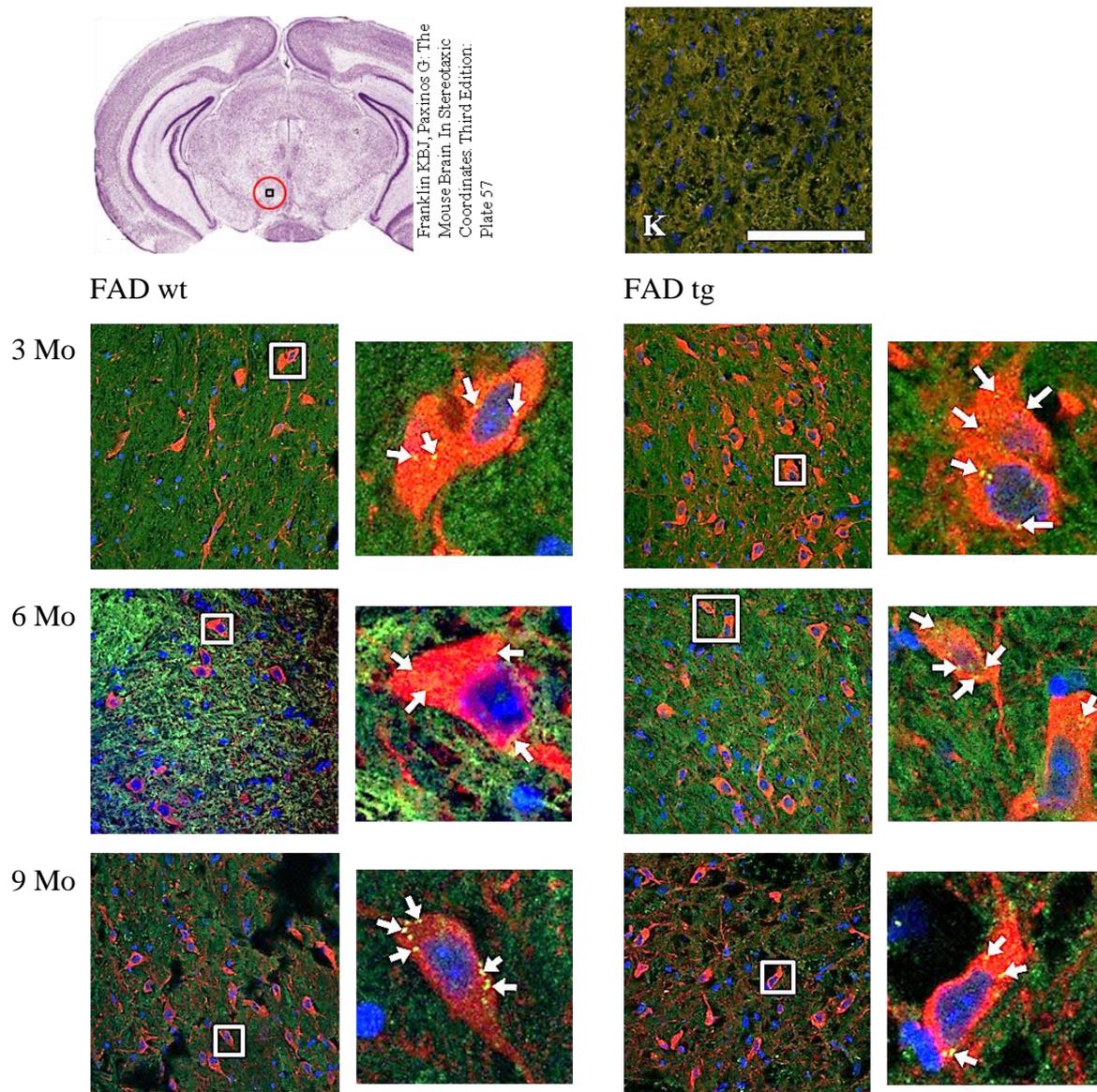
Mit Hilfe der *Fear conditioning*-Versuche wurde in den relevanten Tests zum kontext- und tonabhängigen Angstgedächtnis (Abb. 22B und C) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen oder Altersstufen nachgewiesen.



**Abb. 22: Fear conditioning-Test bei der 5xFAD-Maus ohne pharmakologische Stimulation.** Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen oder Altersstufen. (A) *Freezing* während des Trainings, (B) *Freezing* in Abhängigkeit der Umgebung (*contextual fear conditioning*) mit dazugehöriger *Freezing*-Zeit während der Habituationsphase (diagonal gestreift), (C) *Freezing* in Abhängigkeit vom gelernten Ton (*cued fear conditioning*) mit dazugehöriger *Freezing*-Zeit während der Habituationsphase (diagonal gestreift); Fußschock I = 500  $\mu$ A, Ton = 1-2 kHz. Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, weiß; n = 9 (3 Mo); n = 14 (6 Mo); n = 5 (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau; n = 12 (3 Mo); n = 13 (6 Mo); n = 8 (9 Mo)), B6SJL/J-Hintergrundstamm (B6SJL, dunkelgrau; n = 6 (3 Mo); n = 6 (6 Mo); n = 7 (9 Mo))

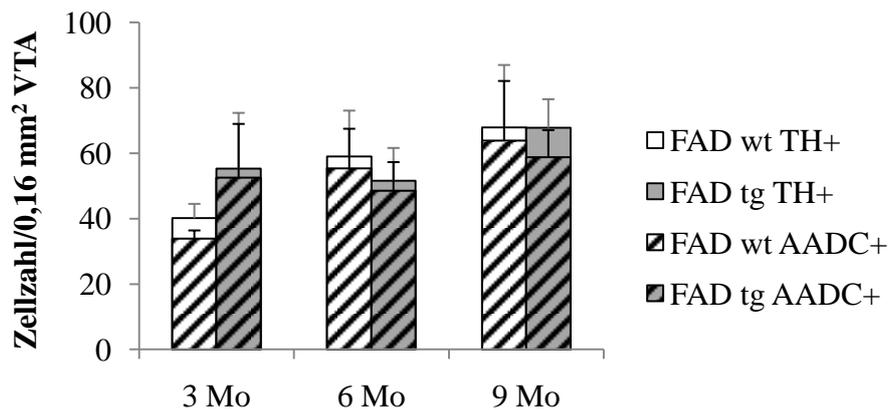
### 3.3 Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung Tyrosinhydroxylase- (TH-) und Aminosäuredecarboxylase- (AADC-) positiver Neurone

Als unabdingbare Voraussetzung für die pharmakologische Stimulation galt es zu prüfen, ob eine hinreichende Anzahl TH- als auch AADC-positiver, d.h. funktionstüchtiger, dopaminerger Neurone existierten. Es wurde zunächst gezeigt, dass sowohl TH- (rot) als auch AADC- (grün, weiße Pfeile) positive Neurone in der VTA transgener und nicht-transgener 5xFAD-Mäuse in einem Alter von 3, 6 und 9 Monaten vorhanden waren (Abb. 23).



**Abb. 23: Färbung TH- und AADC-positiver Zellen in der VTA in unterschiedlichen Altersstufen.** TH- (rot) und AADC- (grün, weiße Pfeile) positive Zellen wurden bei nicht-transgenen und transgenen 5xFAD-Tieren bis ins Alter von 9 Monaten detektiert. 1. Zeile links: Lokalisation der VTA mit Hilfe des Maus-Atlas (FRANKLIN UND PAXINOS 2007), rechts: Antikörperkontrollfärbung (K), ab 2. Zeile oben: 3 Monate, Mitte: 6 Monate, unten: 9 Monate; links: nicht-transgene 5xFAD (FAD wt), rechts: transgene 5xFAD (FAD tg). **Aromatische Aminosäuredecarboxylase, Tyrosinhydroxylase, DAPI** (Maßstab 100 µm)

Die Quantifizierung der TH- und AADC-positiven Neurone (Abb. 24) zeigte, dass sich deren Anzahl sowohl bei transgenen als auch nicht-transgenen Tieren mit zunehmendem Alter bis 9 Monate nicht änderte. Für die folgenden Untersuchungen zur pharmakologischen Behandlung des dopaminergen Systems bedeutete dies, dass die Voraussetzung funktioneller, dopaminergener Neurone für eine Stimulation bis ins hohe Alter von 9 Monaten bei der 5xFAD-Maus gegeben waren.

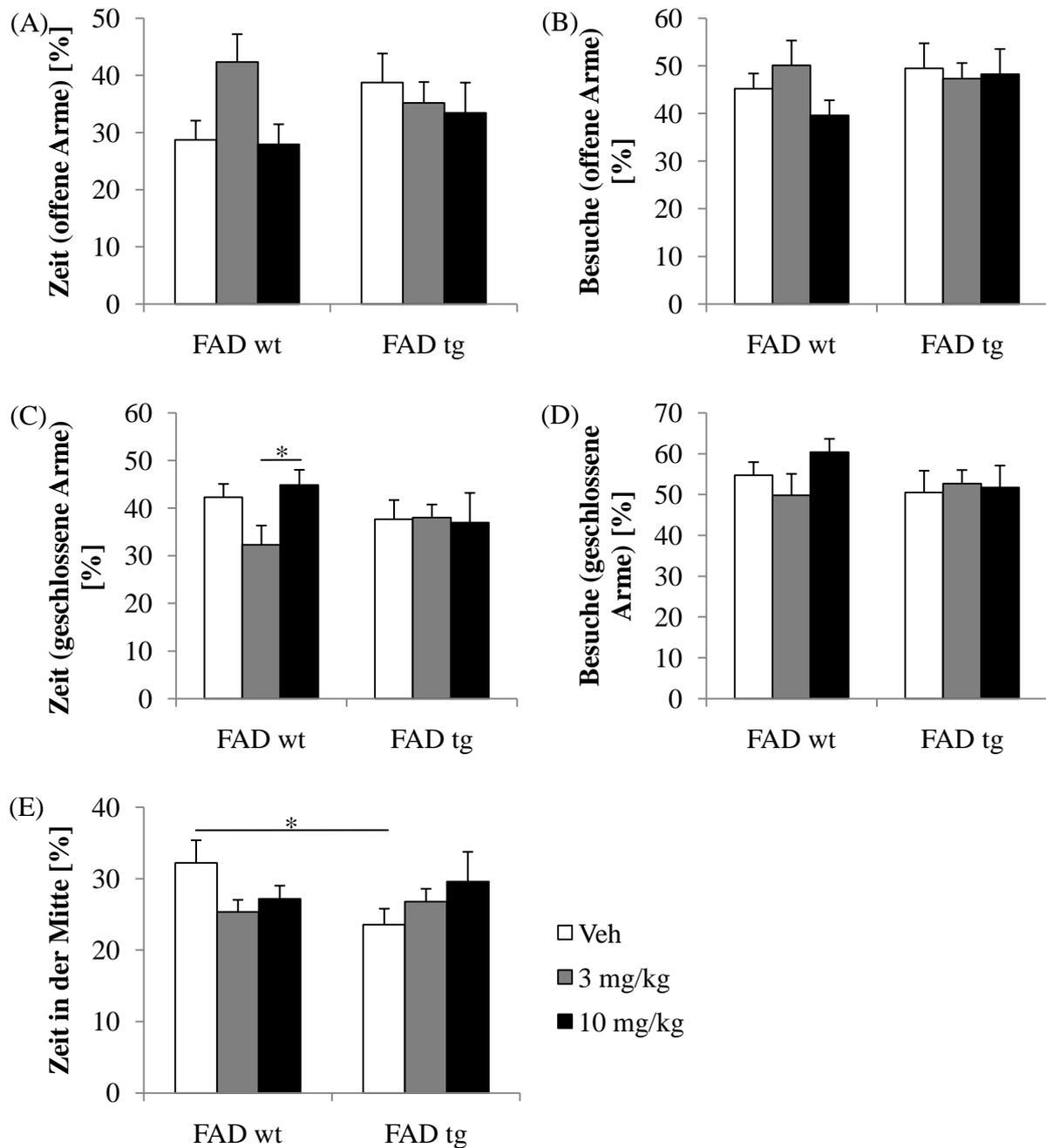


**Abb. 24: Quantifizierung TH- und AADC-positiver Zellen in der VTA (0,16 mm<sup>2</sup> Fläche).** Die Zellzahl doppelt positiv markierter, dopaminergener Zellen (TH+ und AADC+) änderte sich in der VTA bis zu einem Alter von 9 Monaten nicht. Tyrosinhydroxylase-positive Zellen (TH+; gefüllte Balken), Aminosäuredecarboxylase-positive Zellen (AADC+; gestreift), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, weiß; n = 4 (3 Mo); n = 4 (6 Mo); n = 5 (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau; n = 4 (3 Mo); n = 4 (6 Mo); n = 7 (9 Mo))

### **3.4 Pharmakologische Stimulation der 5xFAD-Maus zum Zeitpunkt beginnender Verhaltensdefizite**

#### **3.4.1 *Elevated plus maze* 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation**

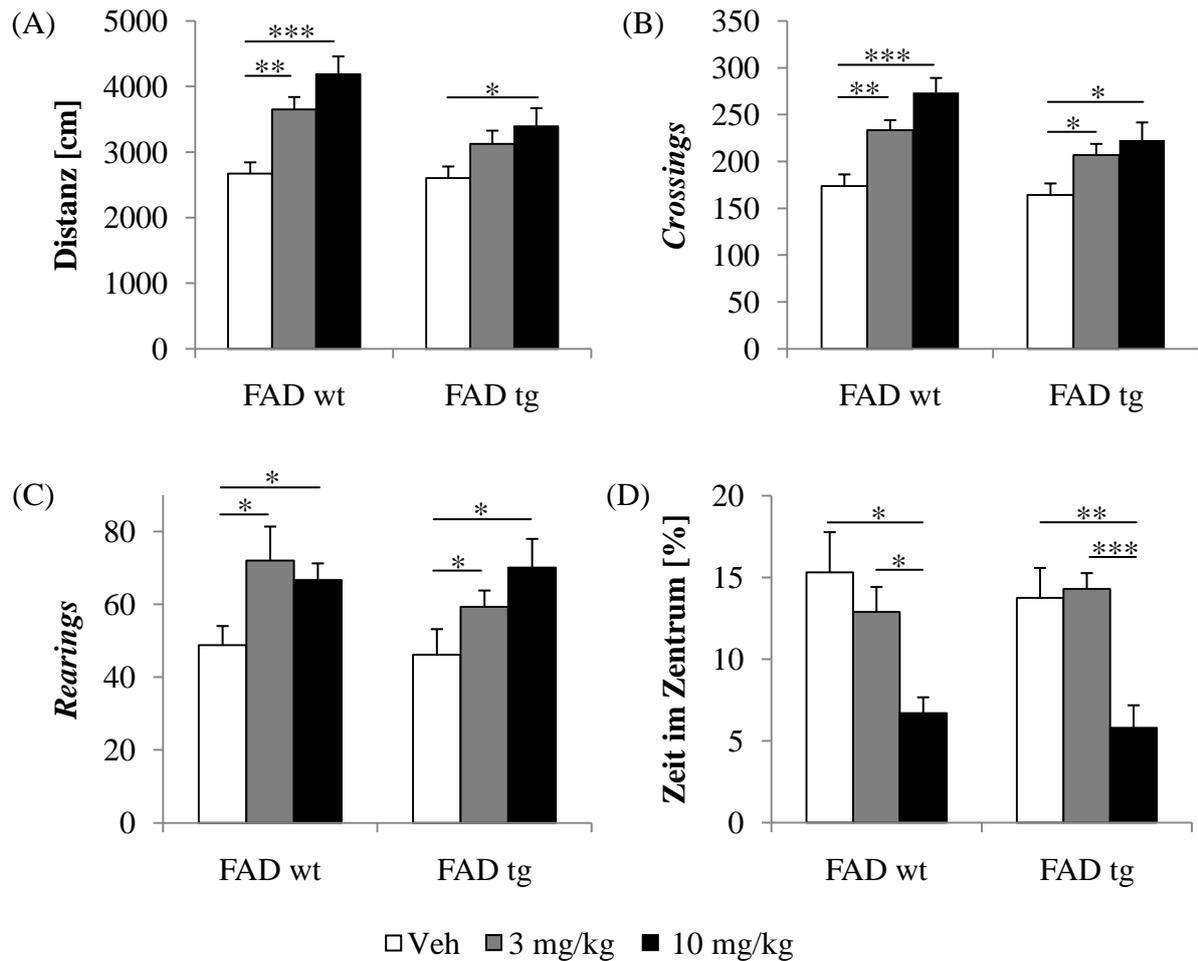
Im *Elevated plus maze* verdeutlichte der Vergleich der pharmakologisch behandelten 6-monatigen Versuchstiere, dass nicht-transgene, mit 10 mg/kg MPH stimulierte Tiere signifikant mehr Zeit im geschlossenen Arm verbrachten ( $44,89 \pm 3,14$  %) als nicht-transgene Versuchstiere, die 3 mg/kg MPH erhielten ( $32,29 \pm 4,05$  %,  $p = 0,009$ ; Abb. 25C). Weiterhin wurde beobachtet, dass sich nicht-transgene Vehikeltiere signifikant mehr in der Mitte des *Maze* aufhielten ( $32,22 \pm 3,16$  %) als transgene Kontrolltiere ( $23,55 \pm 2,26$  %,  $p = 0,038$ ; Abb. 25E). Andere Effekte waren bei 6 Monate alten 5xFAD-Mäusen durch MPH nicht nachzuweisen.



**Abb. 25: Elevated plus maze-Test 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Sowohl 3 mg/kg als auch 10 mg/kg MPH hatten bei 6 Monate alten Tieren keinen signifikanten Einfluss auf das Verhalten im *Elevated plus maze*. (A) Zeit in den offenen Armen, (B) Besuche der offenen Arme, (C) Zeit in den geschlossenen Armen, (D) Besuche der geschlossenen Arme, (E) Aufenthaltsdauer in der Mitte. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 18 (Veh); n = 15 (3 mg/kg); n = 13 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 14 (Veh); n = 14 (3 mg/kg); n = 11 (10 mg/kg))

### 3.4.2 *Open field* 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation

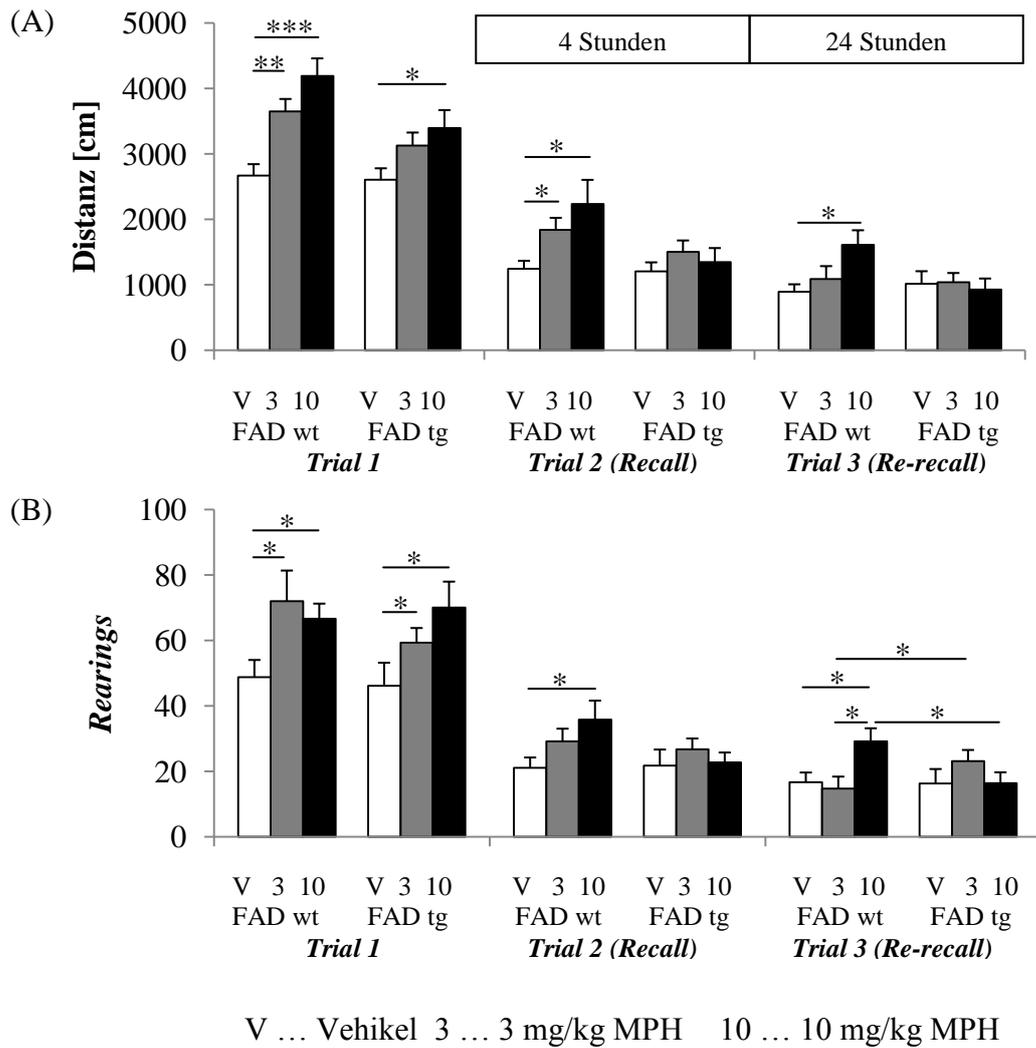
Im *Open field* wurde beobachtet, dass die Verabreichung von MPH die zurückgelegte Strecke der 6 Monate alten Versuchstiere beeinflusst (Abb. 26A). Bei den nicht-transgenen 5xFAD-Tieren war die Strecke nach der Gabe von 3 mg/kg MPH ( $3651,36 \pm 190,43$  cm,  $p = 0,003$ ) bzw. von 10 mg/kg MPH ( $4189,29 \pm 272,55$  cm,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrolltieren ( $2671,09 \pm 174,71$  cm) signifikant erhöht, während bei den transgenen Versuchstieren 10 mg/kg MPH eine Erhöhung der Distanz ( $3393,93 \pm 277,96$  cm) bewirkten, verglichen mit transgenen, mit NaCl-behandelten 5xFAD-Mäusen ( $2603,63 \pm 179,02$  cm,  $p = 0,006$ ). Gleichzeitig kreuzten die nicht-transgenen Versuchstiere nach der Verabreichung von 3 mg/kg ( $233,33 \pm 10,90$ ;  $p = 0,003$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $273,54 \pm 15,80$ ;  $p < 0,001$ ) das Feld signifikant häufiger als nicht-transgene Kontrolltiere ( $173,61 \pm 12,71$ ). Bei den transgenen Tieren bewirkte die Injektion von 3 mg/kg ( $206,79 \pm 12,12$ ;  $p = 0,033$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $222,77 \pm 19,06$ ;  $p = 0,005$ ) ebenso eine signifikante Steigerung der *Crossings* im Vergleich zu den transgenen NaCl-Tieren ( $164,36 \pm 12,33$ ; Abb. 26B). Auch das *Rearing* wurde durch MPH beeinflusst (Abb. 26C). Nicht-transgene Tiere richteten sich im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrolltieren ( $48,81 \pm 5,24$ ) signifikant häufiger auf, nachdem sie 3 mg/kg ( $72,00 \pm 9,37$ ;  $p = 0,024$ ) bzw. 10 mg/kg MPH erhielten ( $66,67 \pm 4,60$ ;  $p = 0,018$ ). Die Anzahl der *Rearings* transgener Versuchstiere war bezüglich der transgenen Vehikeltiere ( $46,21 \pm 6,99$ ) nach der Administration von 3 mg/kg ( $59,36 \pm 4,45$ ;  $p = 0,034$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $70,08 \pm 7,90$ ;  $p = 0,023$ ) ebenso signifikant erhöht. Dahingegen war die Zeit im Zentrum bei den nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen nach der Injektion von 10 mg/kg MPH vermindert ( $6,71 \pm 0,97$  %), verglichen mit den nicht-transgenen Kontrolltieren ( $15,33 \pm 2,45$  %,  $p = 0,015$ ) und nicht-transgenen Tieren, die 3 mg/kg MPH appliziert bekamen ( $12,89 \pm 1,54$  %,  $p = 0,009$ ). Auch transgene Versuchstiere hielten sich nach der Injektion von 10 mg/kg MPH signifikant weniger im Zentrum des Feldes auf ( $5,81 \pm 1,38$  %) als transgene Kontrolltiere ( $13,76 \pm 1,83$  %,  $p = 0,004$ ) bzw. transgene Mäuse, denen 3 mg/kg MPH injiziert wurden ( $14,30 \pm 0,98$  %,  $p < 0,001$ ; Abb. 26D).



**Abb. 26: Open field-Test (Trial 1) 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** MPH bewirkte eine Erhöhung der Distanz bei transgenen (10 mg/kg) und nicht-transgenen Tieren (3 mg/kg bzw. 10 mg/kg). Die Anzahl der *Crossings* und *Rearings* waren bei beiden Genotypen nach der Injektion von 3 mg/kg sowie 10 mg/kg MPH erhöht. Die Zeit im Zentrum war bei beiden Genotypen nach der Verabreichung von 10 mg/kg MPH signifikant gesenkt (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). (A) zurückgelegte Strecke, (B) Anzahl der Kreuzungen im Feld, (C) Anzahl der *Rearings*, (D) Zeit im Zentrum. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt;  $n = 17$  (Veh);  $n = 15$  (3 mg/kg);  $n = 13$  (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg;  $n = 14$  (Veh);  $n = 14$  (3 mg/kg);  $n = 13$  (10 mg/kg))

Bezüglich der Habituation im *Open field* wurde bei 6 Monate alten Mäusen im *Recall*-Test beobachtet, dass sowohl 3 mg/kg ( $1838,89 \pm 187,04$  cm,  $p = 0,026$ ) als auch 10 mg/kg MPH ( $2235,37 \pm 370,33$  cm,  $p = 0,008$ ) einen signifikant steigernden Einfluss auf die gelaufene Strecke der nicht-transgenen 5xFAD-Tiere im Vergleich zu den Vehikeltieren ( $1247,25 \pm 122,01$  cm) hatten (Abb. 27A). Im *Re-recall*-Test war die zurückgelegte Strecke der nicht-transgenen Versuchstiere nach der Gabe von 10 mg/kg MPH signifikant höher ( $1612,35 \pm 223,82$  cm) als die der nicht-transgenen Vehikeltiere ( $892,10 \pm 118,49$  cm,  $p = 0,008$ ).

Hinsichtlich der Anzahl der *Rearings* (Abb. 27B) wurde im *Recall*-Test bei den nicht-transgenen Tieren, die 10 mg/kg MPH appliziert bekamen, eine signifikante Erhöhung ( $35,83 \pm 5,79$ ) im Vergleich zu nicht-transgenen Vehikeltieren ( $21,06 \pm 3,19$ ) beobachtet ( $p = 0,019$ ). Im *Re-recall*-Test war die Anzahl der *Rearings* bei den nicht-transgenen Tieren nach der Verabreichung von 10 mg/kg MPH ( $29,17 \pm 4,01$ ) gegenüber den nicht-transgenen Kontrolltieren ( $16,75 \pm 2,91$ ;  $p = 0,018$ ), den nicht-transgenen Tieren, die 3 mg/kg MPH erhielten ( $14,80 \pm 3,60$ ;  $p = 0,02$ ) und gegenüber den transgenen, mit 10 mg/kg MPH stimulierten Tieren ( $16,42 \pm 3,31$ ;  $p = 0,035$ ) signifikant erhöht. Bei den transgenen Tieren bewirkten im *Re-recall*-Test 3 mg/kg MPH eine signifikante Steigerung der *Rearings* ( $23,14 \pm 3,40$ ) im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren, die 3 mg/kg MPH bekamen ( $p = 0,04$ ).

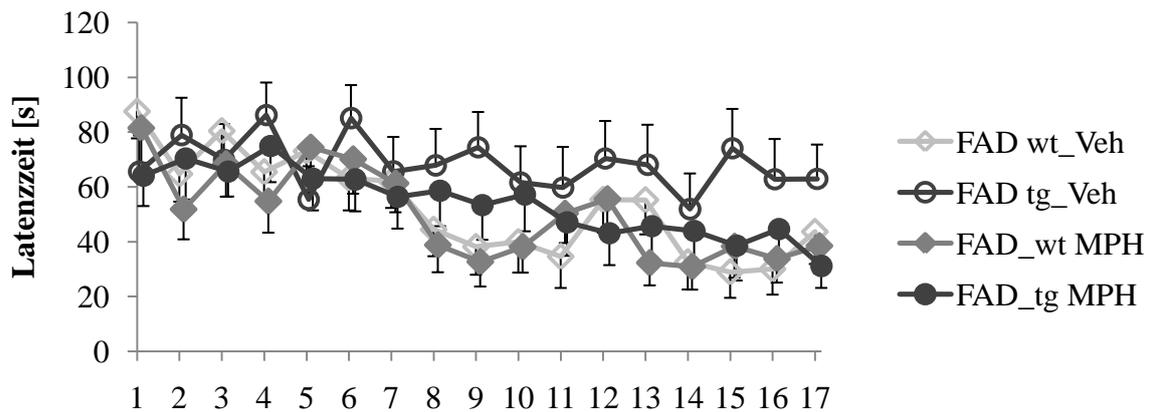


**Abb. 27: Habituation im *Open field*-Test (Trial 2 und 3) 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Ausschließlich bei den nicht-transgenen Mäusen wurde eine signifikante Erhöhung der zurückgelegten Strecke und der Anzahl der *Rearings* im *Recall*-Test und im *Re-recall*-Test nach der Injektion von 10 mg/kg MPH gegenüber den nicht-transgenen Kontrolltieren nachgewiesen (\* $p < 0,05$ ). (A) zurückgelegte Strecke, (B) Anzahl der *Rearings*. Nicht-transgene 5xFAD-Vehikel (FAD wt\_Veh, weiß,  $n = 17$ ), nicht-transgene 5xFAD-MPH 3 mg/kg (FAD wt\_3 mg/kg, grau,  $n = 15$ ), nicht-transgene 5xFAD-MPH 10 mg/kg (FAD wt\_10 mg/kg, schwarz,  $n = 14$ ), transgene 5xFAD-Vehikel (FAD tg\_Veh, kariert,  $n = 14$ ), transgene 5xFAD-MPH 3 mg/kg (FAD tg\_3 mg/kg, diagonal gestreift,  $n = 14$ ), transgene 5xFAD-MPH 10 mg/kg (FAD tg\_10 mg/kg, horizontal gestreift,  $n = 12$ )

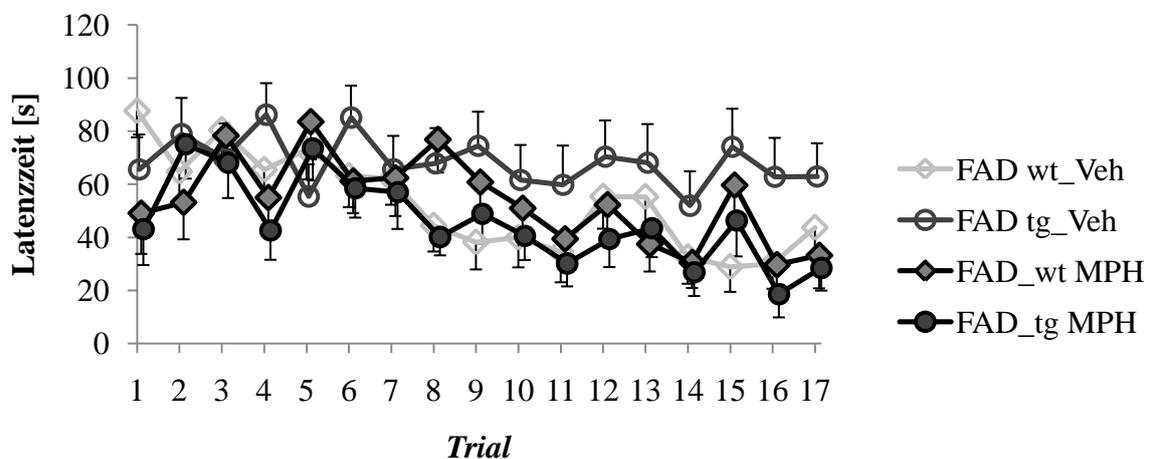
### 3.4.3 *Morris water maze* 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation

Der Vergleich 6-monatiger Versuchstiere im *Morris water maze* veranschaulichte, dass es weder einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen der Kontrolltiere gab, noch 3 mg/kg oder 10 mg/kg MPH Einfluss auf die Latenzzeit hatte (Abb. 28A und B).

#### (A) 3 mg/kg MPH

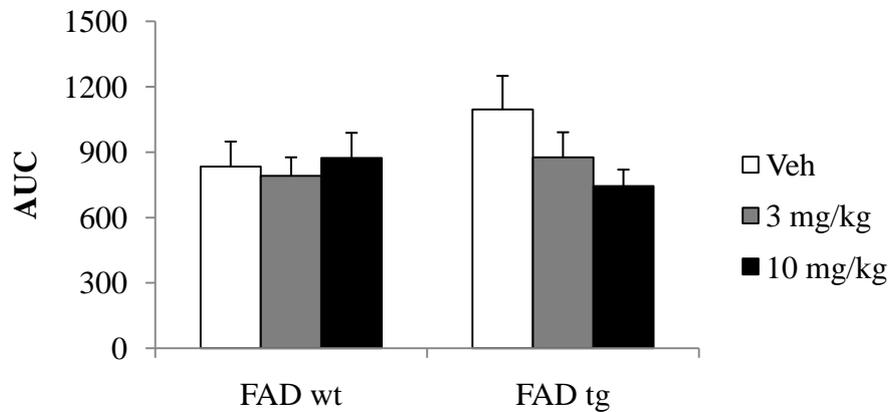


#### (B) 10 mg/kg MPH



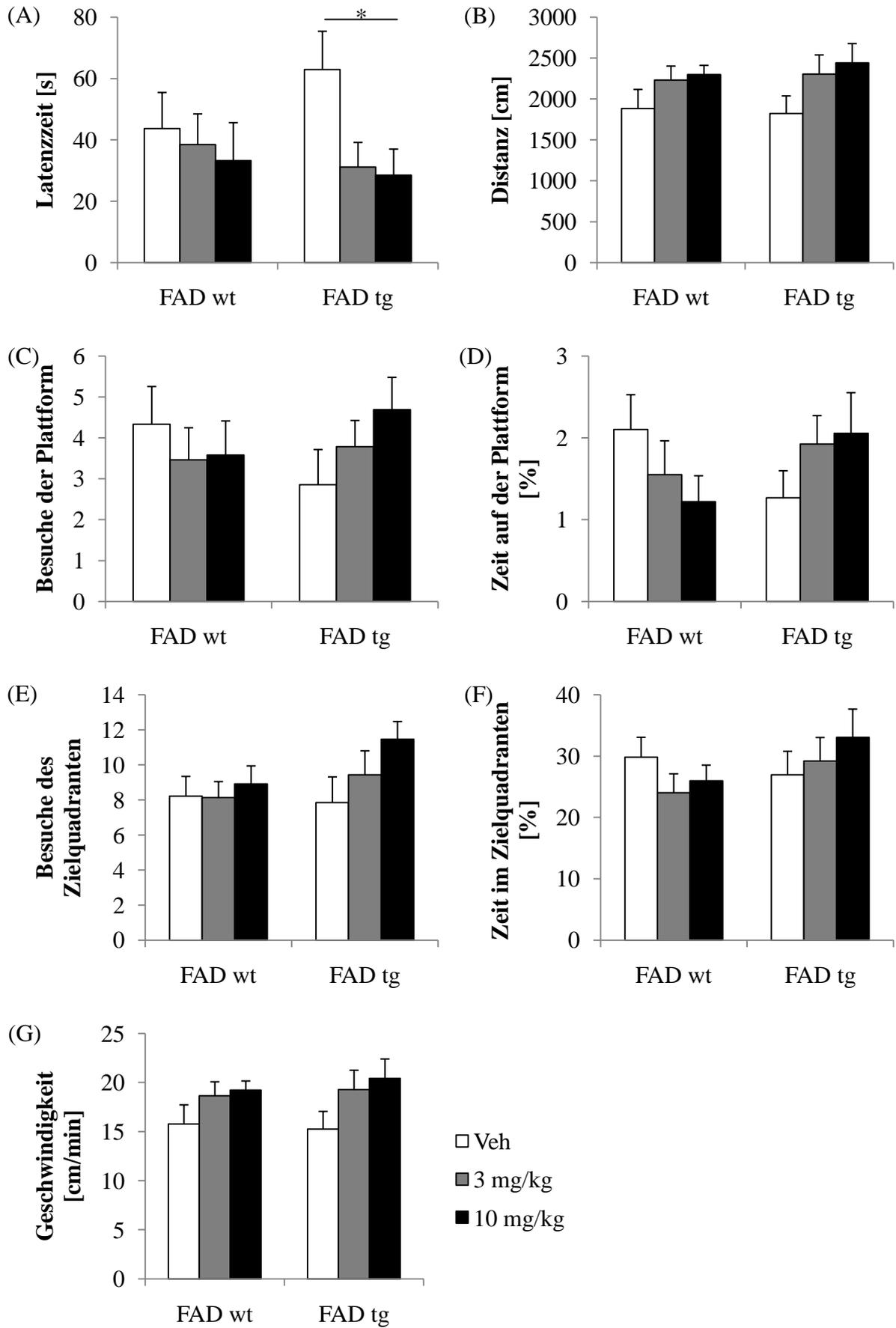
**Abb. 28: Latenzzeiten im *Morris water maze*-Test (Trial 1-17) 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Die Latenzzeit wurde bei 6 Monate alten 5xFAD-Tieren durch MPH nicht beeinflusst. (A) MPH 3 mg/kg (gefüllte Symbole), (B) MPH 10 mg/kg (gefüllte Symbole mit schwarzem Rahmen). Kontrollsubstanz (Veh, offene Symbole), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, Rauten; n = 18 (Veh); n = 15 (3 mg/kg); n = 12 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg, Kreise; n = 14 (Veh); n = 14 (3 mg/kg); n = 13 (10 mg/kg))

Auch die Berechnung der *Area under curve* (AUC) für die Latenzzeit der 5xFAD-Männchen im Alter von 6 Monaten ergab weder einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen, noch zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen (Abb. 29).



**Abb. 29: Area under curve (AUC) für die Latenzzeit im Morris water maze 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Die AUC der mit MPH behandelten 5xFAD-Mäuse war im Vergleich zu den Vehikeltieren nicht verändert. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 18 (Veh); n = 15 (3 mg/kg); n = 12 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 14 (Veh); n = 14 (3 mg/kg); n = 13 (10 mg/kg))

Im *Morris water maze*-Test (*Trial 17*) der 6 Monate alten Versuchstiere war die Latenzzeit der transgenen 5xFAD-Tiere ( $28,51 \pm 8,52$  s) nach der Verabreichung von 10 mg/kg MPH im Vergleich zu den transgenen Vehikeltieren ( $62,94 \pm 12,50$  s) signifikant reduziert ( $p = 0,043$ ; Abb. 30A). Die übrigen Parameter wurden durch MPH bei 6 Monate alten 5xFAD-Mäusen nicht beeinflusst.



**Abb. 30: Morris water maze-Test (Trial 17) 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Die Latenzzeit wurde nach der Verabreichung von 10 mg/kg MPH bei den transgenen 5xFAD-Tieren im Vergleich zu den transgenen Vehikeltieren signifikant gesenkt. **(A)** Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattformregion, **(B)** geschwommene Strecke; **(C)** Besuche der Plattformregion, **(D)** Zeit in der Plattformregion, **(E)** Besuche des Zielquadranten, **(F)** Zeit im Zielquadranten, **(G)** Schwimmgeschwindigkeit. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 18 (Veh); n = 15 (3 mg/kg); n = 12 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 14 (Veh); n = 14 (3 mg/kg); n = 13 (10 mg/kg))

←

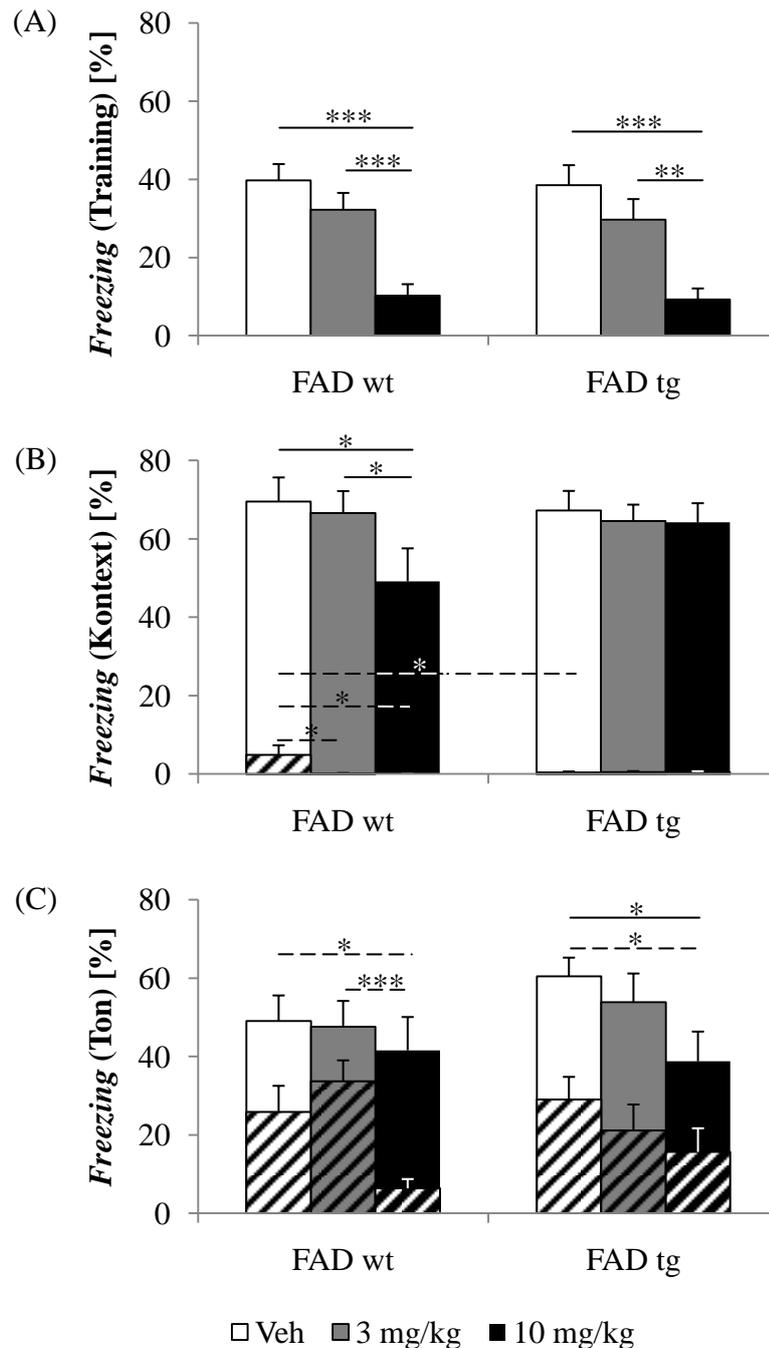
---

### 3.4.4 *Fear conditioning* 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation

Während des Trainings im *Fear conditioning* bei 6 Monate alten Mäusen (Abb. 31A) war das *Freezing* nicht-transgener Versuchstiere, die 10 mg/kg MPH erhielten ( $10,22 \pm 2,98$  %) im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollen ( $39,72 \pm 4,22$  %,  $p < 0,001$ ) und zu den nicht-transgenen Tieren, die 3 mg/kg MPH appliziert bekamen ( $32,24 \pm 4,32$  %,  $p < 0,001$ ) signifikant reduziert. Zudem zeigten auch transgene, mit 10 mg/kg MPH behandelte Tiere ( $9,28 \pm 2,83$  %) ein signifikant geringeres *Freezing* als transgene Kontrolltiere ( $38,50 \pm 5,17$  %,  $p < 0,001$ ) und mit 3 mg/kg MPH behandelte transgene Tiere ( $29,67 \pm 5,32$  %,  $p = 0,002$ ).

In der ersten Habituationsphase (Abb. 31B, diagonal gestreift) zeigten transgene Kontrolltiere ein signifikant geringeres *Freezing* ( $0,40 \pm 0,28$  %) als nicht-transgene Kontrollen ( $4,88 \pm 2,48$  %,  $p = 0,03$ ; unterbrochene Linie). Gleichzeitig war das *Freezing* der nicht-transgenen mit 3 mg/kg ( $0,19 \pm 0,09$  %,  $p = 0,044$ ; unterbrochene Linie) bzw. 10 mg/kg MPH behandelten Gruppe ( $0 \pm 0$  %,  $p = 0,005$ , unterbrochene Linie) im Vergleich zu den nicht-transgenen Vehikeltieren signifikant reduziert. Im relevanten Test des kontextabhängigen *Fear conditioning* (Abb. 31B) war das *Freezing* nach der Gabe von 10 mg/kg MPH bei den nicht-transgenen Versuchstieren ( $49,17 \pm 8,43$  %) im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrolltieren ( $69,53 \pm 6,17$  %,  $p = 0,01$ ) und zu den nicht-transgenen, mit 3 mg/kg MPH behandelten Tieren ( $66,56 \pm 5,67$  %,  $p = 0,037$ ) signifikant gesenkt.

Im dritten *Trial* wurde in der Habituationsphase vor dem tonabhängigen Test (Abb. 31C, diagonal gestreift) ein signifikant geringeres *Freezing* der nicht-transgenen, mit 10 mg/kg MPH behandelten Gruppe ( $6,34 \pm 2,38$  %) im Vergleich zu der nicht-transgenen Kontrollgruppe ( $25,85 \pm 6,66$  %,  $p = 0,014$ ; unterbrochene Linie) und zu der nicht-transgenen, mit 3 mg/kg MPH behandelten Gruppe ( $33,63 \pm 5,37$  %,  $p < 0,001$ ; unterbrochene Linie) beobachtet. Transgene Tiere, die 10 mg/kg MPH erhielten, zeigten in dieser Habituationsphase ein signifikant geringeres *Freezing* ( $15,64 \pm 6,04$  %) als transgene Kontrolltiere ( $29,05 \pm 5,74$  %,  $p = 0,044$ , unterbrochene Linie). Bezüglich des tonabhängigen Tests war ein signifikant niedrigeres *Freezing* der transgenen 10 mg/kg MPH-Gruppe ( $38,76 \pm 7,58$  %) im Vergleich zu den transgenen Kontrolltieren ( $60,44 \pm 4,78$  %) beobachtbar ( $p = 0,013$ ).

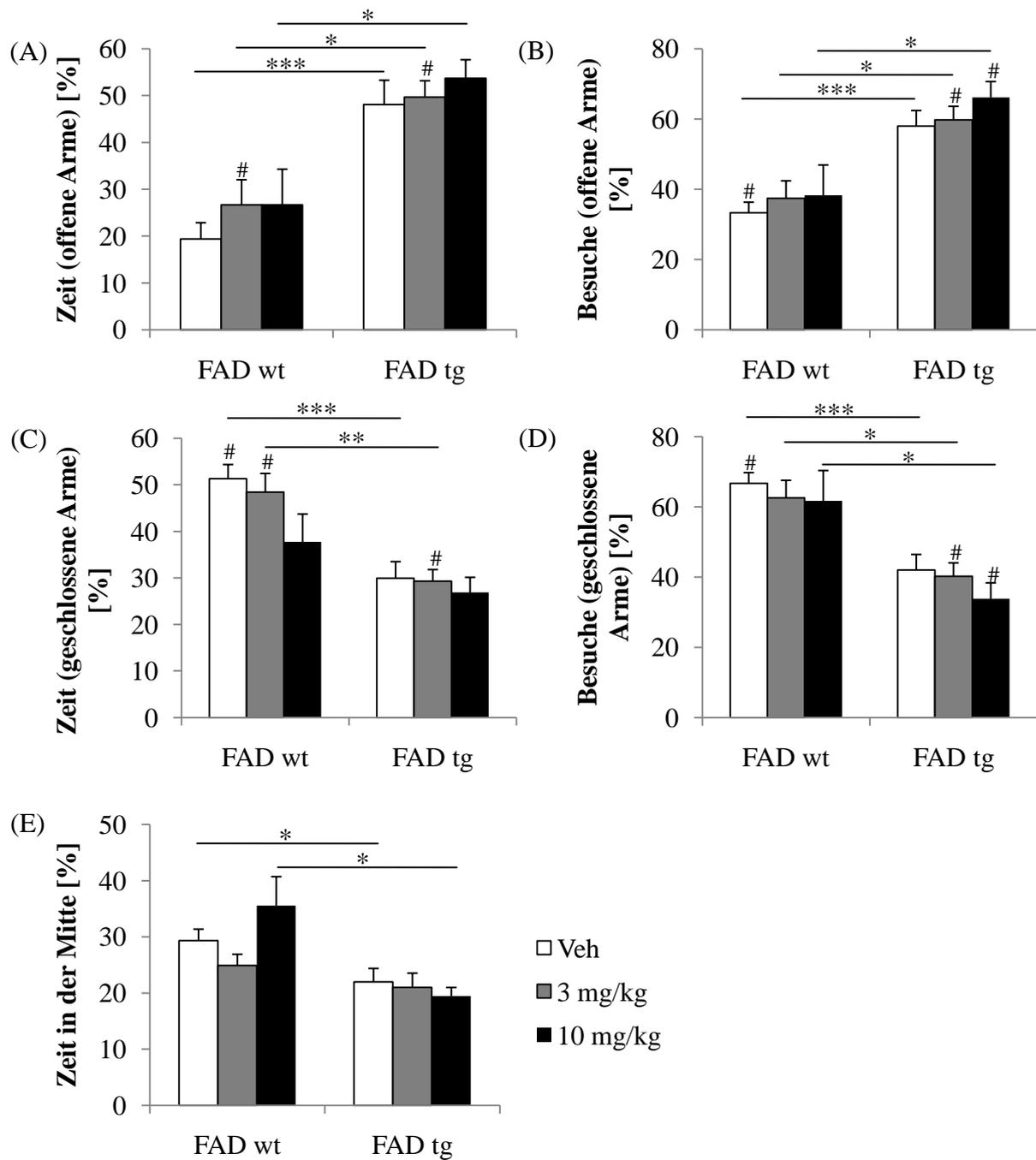


**Abb. 31: Fear conditioning-Test 6 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Im relevanten Test des kontextabhängigen *Fear conditioning* war das *Freezing* nach der Gabe von 10 mg/kg MPH bei den nicht-transgenen 5xFAD-Tieren signifikant gesenkt. Im tonabhängigen *Fear conditioning* wurde eine signifikante Minderung des *Freezing* bei den transgenen 5xFAD-Mäusen nach der Verabreichung von 10 mg/kg MPH beobachtet (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Signifikanz in der Habituationsphase: unterbrochene Linie). (A) *Freezing* während des Trainings, (B) *Freezing* in Abhängigkeit der Umgebung (*contextual fear conditioning*) mit dazugehöriger *Freezing*-Zeit während der Habituationsphase (diagonal gestreift), (C) *Freezing* in Abhängigkeit vom gelernten Ton (*cued fear conditioning*) mit dazugehöriger *Freezing*-Zeit während der Habituationsphase (diagonal gestreift); Fußschock I = 500  $\mu$ A, Ton = 1-2 kHz. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 18 (Veh); n = 15 (3 mg/kg); n = 12 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 14 (Veh); n = 14 (3 mg/kg); n = 13 (10 mg/kg))

### 3.5 Pharmakologische Stimulation der 5xFAD-Maus zum Zeitpunkt bestehender Verhaltensdefizite

#### 3.5.1 *Elevated plus maze* 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation

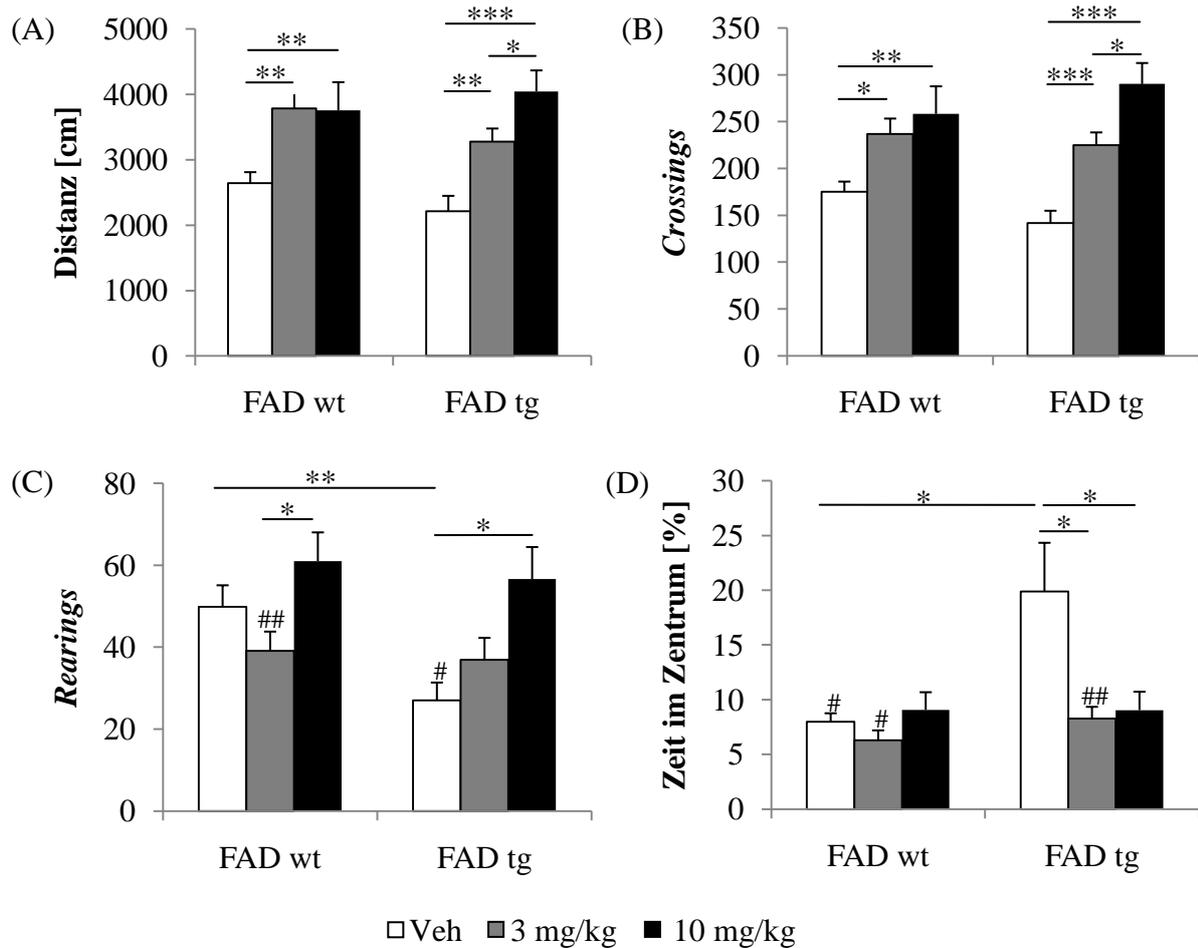
Es wurde nachgewiesen, dass MPH weder in der Konzentration von 3 mg/kg, noch von 10 mg/kg einen signifikanten Einfluss auf das Verhalten 9 Monate alter transgener und nicht-transgener 5xFAD-Mäuse im *Elevated plus maze* hatte. Transgene Versuchstiere, die entweder NaCl ( $48,09 \pm 5,22$  %), 3 mg/kg ( $49,70 \pm 3,49$  %) oder 10 mg/kg MPH ( $53,68 \pm 4,01$  %) erhielten, waren signifikant mehr in den offenen Armen als nicht-transgene Geschwistertiere mit derselben Behandlung (FAD wt\_Veh =  $19,39 \pm 3,49$  %,  $p < 0,001$ ; FAD wt\_3 mg/kg =  $26,65 \pm 5,42$  %,  $p = 0,008$ ; FAD wt\_10 mg/kg =  $26,65 \pm 7,66$  %,  $p = 0,008$ ; Abb. 32A). Gleichzeitig besuchten die transgenen Mäuse die offenen Arme signifikant häufiger als ihre nicht-transgenen Geschwistertiere, die die analoge Injektion erhielten (Veh: FAD tg vs. FAD wt =  $57,99 \pm 4,48$  % vs.  $33,30 \pm 3,06$  %,  $p < 0,001$ ; 3 mg/kg: FAD tg vs. FAD wt =  $59,79 \pm 3,87$  % vs.  $37,43 \pm 5,00$  %,  $p = 0,008$ ; 10 mg/kg: FAD tg vs. FAD wt =  $66,16 \pm 4,54$  % vs.  $38,29 \pm 8,66$  %,  $p = 0,008$ ; Abb. 32B). Dem gegenüber waren die transgenen Vehikel-Tiere ( $29,92 \pm 3,59$  %) bzw. die transgenen, mit 3 mg/kg MPH stimulierten Tiere ( $29,27 \pm 2,56$  %) signifikant weniger in den geschlossenen Armen als die nicht-transgenen Vehikel-Tiere ( $51,29 \pm 3,09$  %,  $p < 0,001$ ) bzw. die nicht-transgenen Mäuse, die 3 mg/kg MPH erhielten ( $48,44 \pm 4,03$  %,  $p = 0,003$ ; Abb. 32C). Der Vergleich der Besuche in den geschlossenen Armen zeigte eine signifikant geringere Anzahl bei den transgenen Tieren jeder Behandlungsgruppe, verglichen mit den nicht-transgenen Versuchstieren mit der analogen Behandlung (Veh: FAD tg vs. FAD wt =  $42,01 \pm 4,48$  % vs.  $66,70 \pm 3,06$  %,  $p < 0,001$ ; 3 mg/kg: FAD tg vs. FAD wt =  $40,21 \pm 3,87$  % vs.  $62,57 \pm 5,00$  %,  $p = 0,008$ ; 10 mg/kg: FAD tg vs. FAD wt =  $33,84 \pm 4,54$  % vs.  $61,71 \pm 8,66$  %,  $p = 0,008$ ; Abb. 32D). Letztlich war die Aufenthaltsdauer in der Mitte bei den transgenen, mit NaCl ( $21,99 \pm 2,40$  %) bzw. mit 10 mg/kg MPH behandelten Tieren ( $19,46 \pm 1,54$  %) signifikant niedriger als die bei nicht-transgenen Tieren, die mit NaCl ( $29,31 \pm 2,06$  %,  $p = 0,012$ ) bzw. 10 mg/kg MPH behandelt wurden ( $35,58 \pm 5,13$  %,  $p = 0,008$ ; Abb. 32E).



**Abb. 32: Elevated plus maze-Test 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** MPH hatte weder in der Konzentration von 3 mg/kg noch von 10 mg/kg Einfluss auf die bestehenden Verhaltensdefizite im *Elevated plus maze*. Zwischen den transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Tieren mit derselben Behandlung waren nahezu alle Parameter im *Elevated plus maze* signifikant verschieden zueinander (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,05$  = signifikanter Unterschied zu 6 Monate alten Tieren derselben behandelten Gruppe). (A) Zeit in den offenen Armen, (B) Besuche der offenen Arme, (C) Zeit in den geschlossenen Armen, (D) Besuche der geschlossenen Arme, (E) Aufenthaltsdauer in der Mitte. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt;  $n = 23$  (Veh);  $n = 11$  (3 mg/kg);  $n = 9$  (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg;  $n = 21$  (Veh);  $n = 13$  (3 mg/kg);  $n = 13$  (10 mg/kg))

### 3.5.2 *Open field* 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation

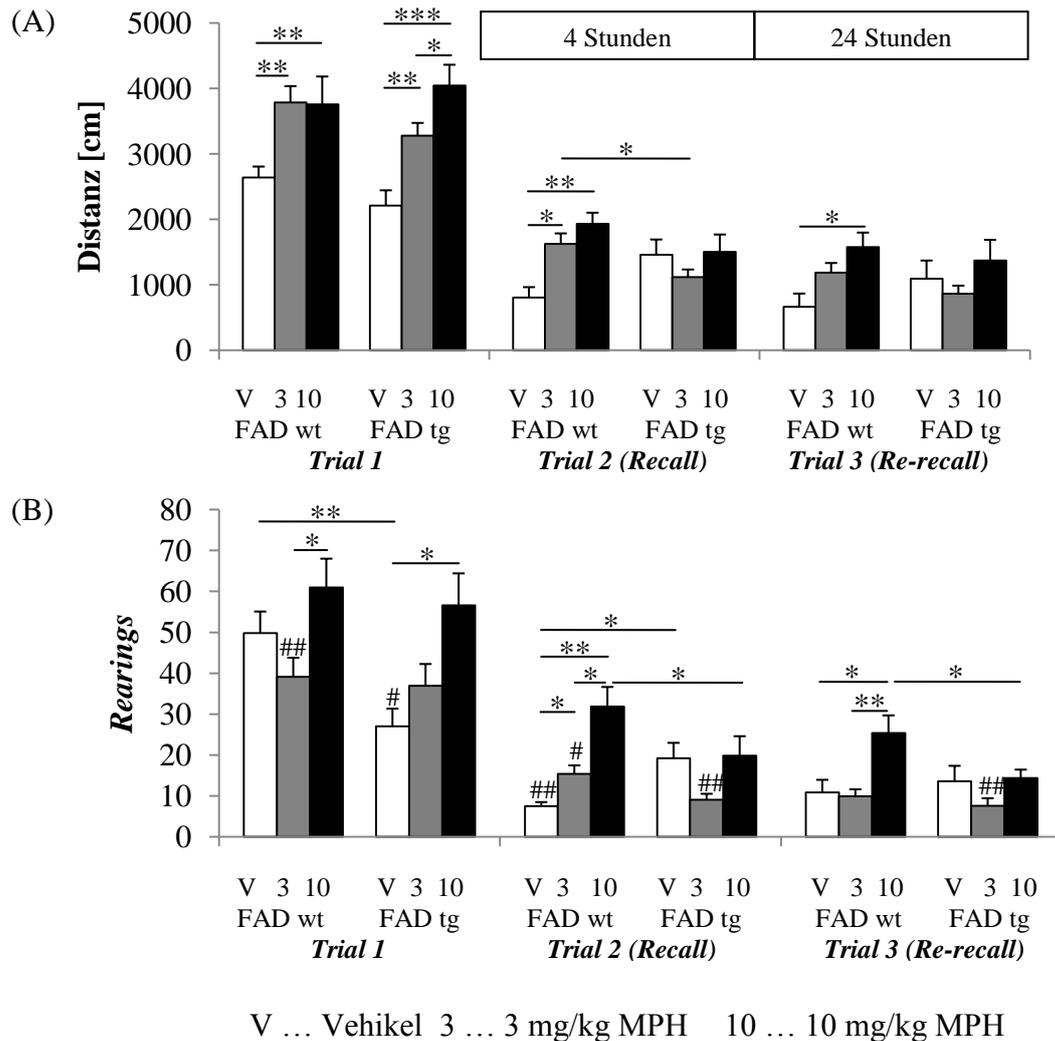
Im *Open field* wurde bei 9-monatigen 5xFAD-Tieren beobachtet, dass die zurückgelegte Strecke ( $p = 0,087$ ; Abb. 33A) und die Anzahl der *Crossings* ( $p = 0,059$ ; Abb. 33B) der transgenen 5xFAD-Vehikeltiere tendenziell geringer war als die nicht-transgener Vehikeltiere ( $p = 0,087$ ). Nach der Verabreichung von 3 mg/kg ( $3785,87 \pm 252,32$  cm,  $p = 0,001$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $3755,13 \pm 429,76$  cm,  $p = 0,004$ ) war die Strecke der nicht-transgenen Tiere im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrolltieren ( $2641,08 \pm 168,12$  cm) signifikant erhöht. Auch bei den transgenen 5xFAD-Versuchstieren war die Strecke nach der Verabreichung von 3 mg/kg ( $3277,28 \pm 198,86$  cm,  $p = 0,002$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $4043,83 \pm 320,96$  cm,  $p < 0,001$ ) signifikant höher als die transgener Kontrolltiere ( $2212,61 \pm 234,11$  cm). Weiterhin war die Anzahl der *Crossings* bei den nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen nach der Applikation von 3 mg/kg ( $236,91 \pm 16,52$ ;  $p = 0,006$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $258,44 \pm 29,43$ ;  $p = 0,002$ ) im Vergleich zu den nicht-transgenen Vehikeltieren ( $175,09 \pm 11,04$ ) gesteigert. Bei den transgenen Versuchstieren, die 3 mg/kg ( $224,82 \pm 13,82$ ;  $p < 0,001$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $290,30 \pm 22,47$ ;  $p < 0,001$ ) erhielten, war die Anzahl der *Crossings* im Vergleich zu den transgenen Kontrolltieren ( $141,73 \pm 13,26$ ) ebenso signifikant erhöht. Die Anzahl der *Rearings* (Abb. 33C) war bei den transgenen Vehikeltieren ( $27,05 \pm 4,29$ ) signifikant niedriger als bei den nicht-transgenen Kontrolltieren ( $49,83 \pm 5,25$ ;  $p = 0,003$ ). Nach der Verabreichung von 10 mg/kg MPH richteten sich die nicht-transgenen Versuchstieren ( $61,00 \pm 7,00$ ) im Vergleich zu den nicht-transgenen, mit 3 mg/kg MPH behandelten Tieren ( $39,09 \pm 4,68$ ) signifikant häufiger auf ( $p = 0,015$ ). Die Anzahl der *Rearings* transgener, mit 10 mg/kg MPH behandelte Tiere ( $56,63 \pm 7,79$ ) war im Vergleich zu den transgenen NaCl-Tieren signifikant größer ( $p = 0,029$ ). Schließlich hielten sich die transgenen Kontrolltiere signifikant länger ( $19,88 \pm 4,44$  %) im Zentrum des Feldes auf als nicht-transgene Vehikeltiere ( $7,98 \pm 0,77$  %,  $p = 0,008$ ; Abb. 33D). Bei den transgenen Tieren war die Aufenthaltsdauer nach der Applikation von 3 mg/kg ( $8,27 \pm 1,06$  %,  $p = 0,048$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $9,03 \pm 1,68$  %,  $p = 0,036$ ) im Vergleich zu den transgenen NaCl-Tieren signifikant reduziert.



**Abb. 33: Open field-Test (Trial 1) 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Durch die Verabreichung von 3 mg/kg bzw. 10 mg/kg MPH waren die Distanz und die Anzahl der *Crossings* bei den transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Tieren signifikant erhöht. Gleichzeitig bewirkten 10 mg/kg MPH eine Steigerung der Anzahl der *Rearings* beider Genotypen. Zuletzt hielten sich die mit 3 mg/kg bzw. 10 mg/kg MPH stimulierten, transgenen Tiere weniger im Zentrum des Feldes auf als transgene Kontrolltiere (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,005$  = signifikanter Unterschied zu 6 Monate alten Tieren derselben behandelten Gruppe). (A) zurückgelegte Strecke, (B) Anzahl der Kreuzungen im Feld, (C) Anzahl der *Rearings*, (D) Zeit im Zentrum. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt;  $n = 23$  (Veh);  $n = 11$  (3 mg/kg);  $n = 9$  (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg;  $n = 20$  (Veh);  $n = 14$  (3 mg/kg);  $n = 14$  (10 mg/kg))

Mittels der Untersuchungen zur Habituation im *Open field* wurde bei 9 Monate alten Mäusen im *Recall*-Test gezeigt, dass die nicht-transgenen 5xFAD-Tiere nach dem Erhalt von 3 mg/kg MPH eine signifikant größere Distanz zurücklegten ( $1626,44 \pm 161,76$  cm), verglichen mit nicht-transgenen Vehikeltieren ( $804,53 \pm 162,37$  cm,  $p = 0,012$ ) und 3 mg/kg MPH behandelten transgenen Tieren ( $1116,58 \pm 119,77$  cm,  $p = 0,046$ ; Abb. 34A). Zudem war auch die Distanz der mit 10 mg/kg MPH behandelten nicht-transgenen Tiere im *Recall*-Test ( $1930,42 \pm 173,58$  cm) signifikant größer als die nicht-transgener Mäuse, denen NaCl injiziert wurde ( $p = 0,002$ ). Weiterhin legten nicht-transgene Mäuse, die 10 mg/kg MPH erhielten, auch eine tendenziell größere Strecke zurück als transgene, mit 10 mg/kg MPH behandelte Tiere ( $p = 0,055$ ). Selbst im *Re-recall*-Test war diese erhöhte Distanz der mit 10 mg/kg MPH behandelten nicht-transgenen 5xFAD-Mäuse ( $1577,72 \pm 222,59$  cm) im Vergleich zu den mit NaCl behandelten nicht-transgenen Tieren ( $664,18 \pm 204,88$  cm,  $p = 0,011$ ) signifikant und im Vergleich zu den mit 3 mg/kg MPH behandelten nicht-transgenen Tieren noch tendenziell ( $p = 0,052$ ) zu beobachten. Tendenzuell waren im *Re-recall*-Test auch Unterschiede zwischen den transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen beobachtbar, die jeweils 3 mg/kg ( $p = 0,067$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $p = 0,083$ ) erhielten.

Bezüglich des *Rearing* (Abb. 34B) richteten sich die nicht-transgenen Vehikeltiere im *Recall*-Test ( $7,50 \pm 1,00$ ) signifikant weniger auf als die mit 3 mg/kg MPH ( $15,36 \pm 2,11$ ;  $p = 0,012$ ) und die mit 10 mg/kg MPH behandelten nicht-transgenen Tieren ( $31,88 \pm 4,76$ ;  $p = 0,001$ ) sowie im Vergleich zu den transgenen Vehikeltieren ( $19,20 \pm 3,77$ ;  $p = 0,029$ ). Daneben war die Anzahl der *Rearings* der nicht-transgenen 5xFAD-Männchen nach der Injektion von 10 mg/kg im *Recall*-Test signifikant höher als das der nicht-transgenen Tiere, die 3 mg/kg MPH erhielten ( $p = 0,005$ ) und als das der mit 10 mg/kg MPH behandelten transgenen Versuchstiere ( $19,88 \pm 4,72$ ;  $p = 0,017$ ). Im *Re-recall*-Test richteten sich die nicht-transgenen, mit 10 mg/kg MPH gespritzten Mäuse signifikant häufiger auf ( $25,38 \pm 4,31$ ) als nicht-transgene Kontrolltiere ( $10,88 \pm 3,06$ ;  $p = 0,024$ ), als nicht-transgene, mit 3 mg/kg MPH injizierte Tiere ( $9,91 \pm 1,72$ ;  $p = 0,003$ ) sowie als die transgenen Tiere, die ebenso 10 mg/kg MPH erhielten ( $14,38 \pm 2,06$ ;  $p = 0,008$ ).

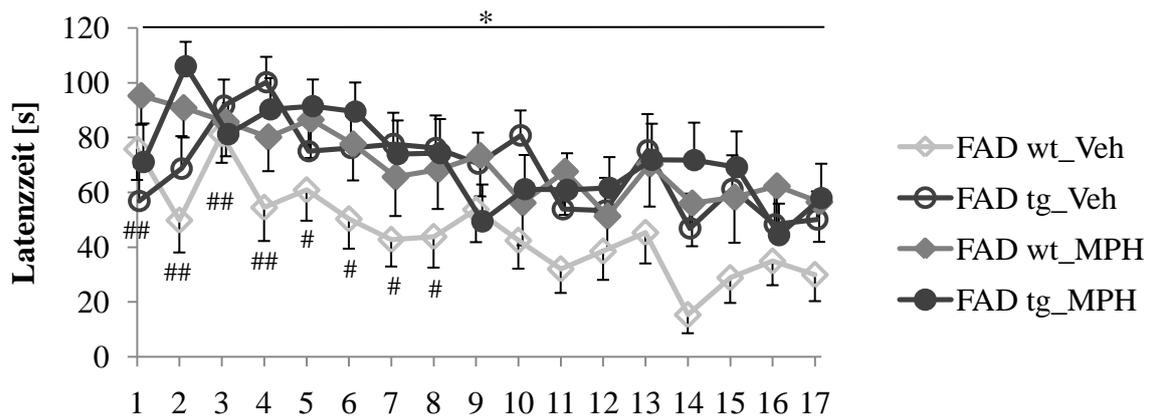


**Abb. 34: Habituation im *Open field*-Test (Trial 2 und 3) 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Einzig bei den nicht-transgenen 5xFAD-Tieren wurde eine Erhöhung der Distanz und der Anzahl der *Rearings* im *Recall*-Test nach der Verabreichung von 3 mg/kg oder 10 mg/kg MPH und im *Re-recall*-Test nach der Injektion von 10 mg/kg MPH beobachtet (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; # $p < 0,05$  = signifikanter Unterschied zu 6 Monate alten Tieren derselben behandelten Gruppe). (A) zurückgelegte Strecke, (B) Anzahl der *Rearings*. Nicht-transgene 5xFAD-Vehikel (FAD wt\_Veh, weiß,  $n = 8$ ), nicht-transgene 5xFAD-MPH 3 mg/kg (FAD wt\_3 mg/kg, grau,  $n = 11$ ), nicht-transgene 5xFAD-MPH 10 mg/kg (FAD wt\_10 mg/kg, schwarz,  $n = 9$ ), transgene 5xFAD-Vehikel (FAD tg\_Veh, kariert,  $n = 8$ ), transgene 5xFAD-MPH 3 mg/kg (FAD tg\_3 mg/kg, diagonal gestreift,  $n = 14$ ), transgene 5xFAD-MPH 10 mg/kg (FAD tg\_10 mg/kg, horizontal gestreift,  $n = 14$ )

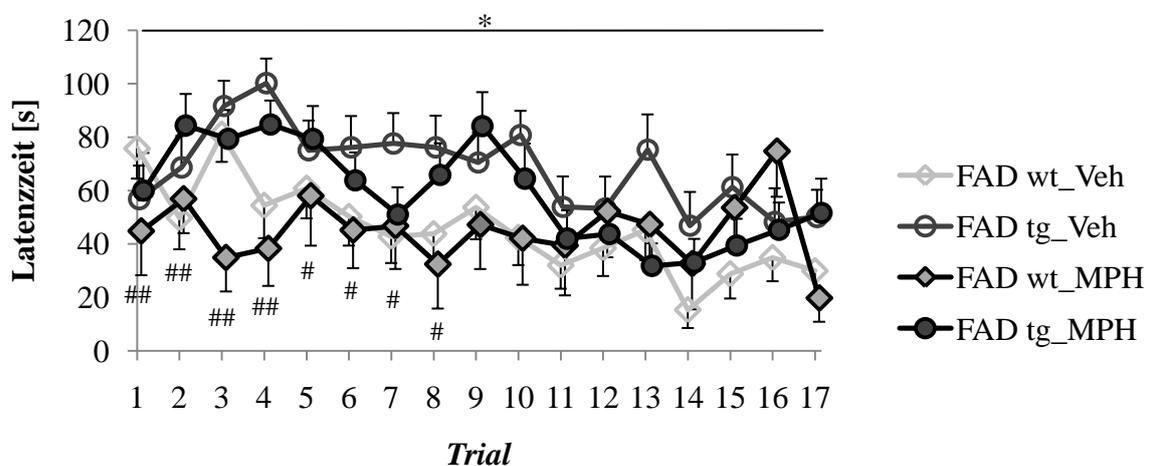
### 3.5.3 Morris water maze 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation

Im *Morris water maze* wurde bei 9-monatigen Mäusen eine signifikante Erhöhung der Latenzzeiten transgener Kontrolltiere im Vergleich zu nicht-transgenen Vehikeltieren beobachtet ( $F(1, 30) = 6,283$ ;  $p = 0,0178$ ; Abb. 35A, B). Der weitere Vergleich der Latenzzeiten in der Akquisitionsphase veranschaulichte einen tendenziellen Unterschied zwischen den nicht-transgenen Tieren mit der NaCl-, 3 mg/kg bzw. 10 mg/kg MPH Injektion ( $p = 0,0966$ ), wobei 3 mg/kg MPH die Latenzzeit erhöhte. Eine detaillierte Analyse der einzelnen *Trials* erbrachte einen signifikanten Unterschied für die *Trials* 1 bis 4 ( $F(2, 33) = 6,514$ ;  $p = 0,0041$ ) bzw. für die *Trials* 1 bis 8 ( $F(2, 33) = 4,054$ ;  $p = 0,0266$ ) der unterschiedlich behandelten nicht-transgenen Versuchstiere. Die transgenen, mit MPH behandelten Versuchsgruppen zeigten keine Unterschiede in der Latenzzeit.

#### (A) 3 mg/kg MPH



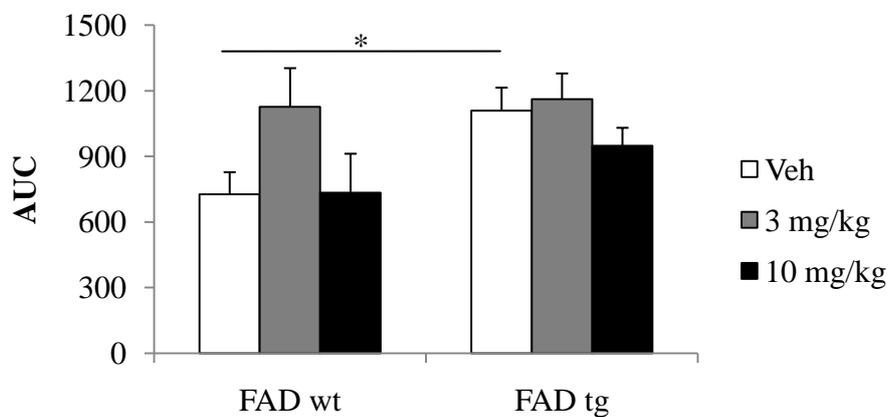
#### (B) 10 mg/kg MPH



**Abb. 35: Latenzzeiten im *Morris water maze*-Test (*Trial 1-17*) 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Die Latenzzeit 9-monatiger transgener Vehikeltiere war signifikant höher als die nicht-transgener Vehikeltiere (\* $p < 0,05$ ). Der Vergleich der einzelnen *Trials* verdeutlichte einen signifikanten Unterschied der *Trials* 1 bis 4 und 1 bis 8 zwischen den unterschiedlich behandelten nicht-transgenen Versuchsgruppen (# $p < 0,05$ ; ## $p < 0,005$ ). (A) MPH 3 mg/kg (gefüllte Symbole), (B) MPH 10 mg/kg (gefüllte Symbole mit schwarzem Rahmen). Kontrollsubstanz (Veh, offene Symbole), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, Rauten;  $n = 17$  (Veh);  $n = 11$  (3 mg/kg);  $n = 8$  (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg, Kreise;  $n = 15$  (Veh);  $n = 14$  (3 mg/kg);  $n = 14$  (10 mg/kg))

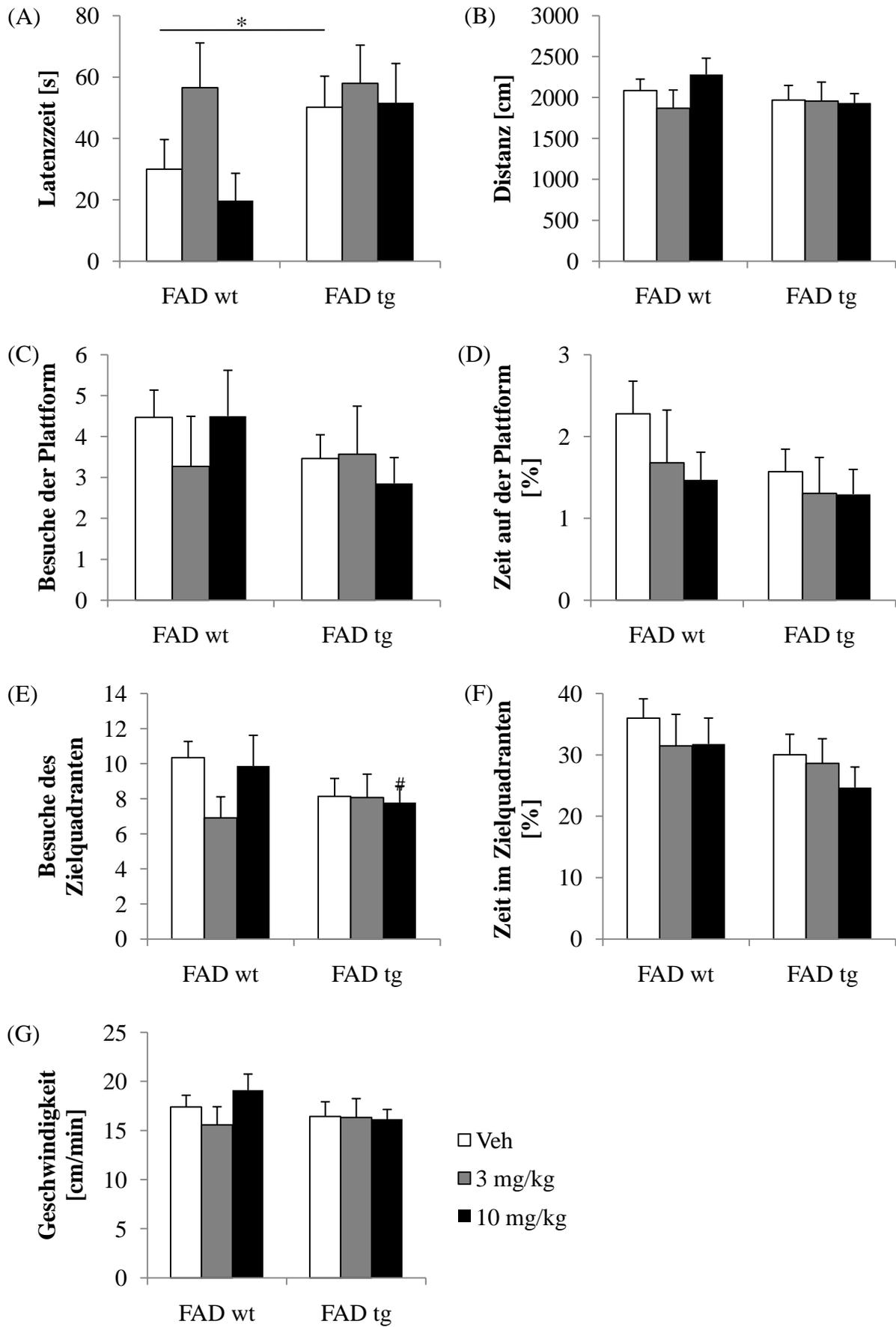
←

Auch die *Area under curve* (AUC) für die Latenzzeit der transgenen Vehikeltiere war im Alter von 9 Monaten signifikant höher ( $1109,64 \pm 104,54$ ) als die der nicht-transgenen Kontrolltiere ( $727,47 \pm 100,45$ ;  $p = 0,019$ ; Abb. 36). Die mit MPH behandelten Tiere zeigten keine Unterschiede in der AUC für die Latenzzeit.



**Abb. 36: Area under curve (AUC) für die Latenzzeit im *Morris water maze* 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Die AUC transgener 5xFAD-Kontrolltiere war signifikant höher als die nicht-transgener Vehikeltiere (\* $p < 0,05$ ). Die mit MPH behandelten Gruppen zeigten keinen Unterschied in der AUC für die Latenzzeit. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt;  $n = 17$  (Veh);  $n = 11$  (3 mg/kg);  $n = 8$  (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg;  $n = 15$  (Veh);  $n = 14$  (3 mg/kg);  $n = 14$  (10 mg/kg))

Im *Trial 17* wurde bei 9 Monate alten Versuchstieren beobachtet, dass die Latenzzeit der transgenen Kontrolltiere ( $50,16 \pm 10,17$  s) signifikant höher war als die nicht-transgener Kontrolltiere ( $29,98 \pm 9,70$  s,  $p = 0,041$ ; Abb. 37A). Bei den nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen wurde zudem ein tendenzieller Unterschied in der Latenzzeit zwischen den verschieden behandelten Gruppen nachgewiesen ( $p = 0,096$ ). Andere Parameter wurden durch die Applikation von MPH in beiden Konzentrationen nicht beeinflusst.



**Abb. 37: Morris water maze-Test (Trial 17) 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Transgene Kontrolltiere zeigten eine signifikant längere Latenzzeit zur Lokalisation der Plattformregion als nicht-transgene Kontrollen. MPH selbst hatte bei transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Tieren keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter im *Water maze* (#p < 0,05 = signifikanter Unterschied zu 6 Monate alten Tieren derselben behandelten Gruppe). (A) Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattformregion, (B) geschwommene Strecke; (C) Besuche der Plattformregion, (D) Zeit in der Plattformregion, (E) Besuche des Zielquadranten, (F) Zeit im Zielquadranten, (G) Schwimmgeschwindigkeit. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 17 (Veh); n = 11 (3 mg/kg); n = 8 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 15 (Veh); n = 14 (3 mg/kg); n = 14 (10 mg/kg))

←

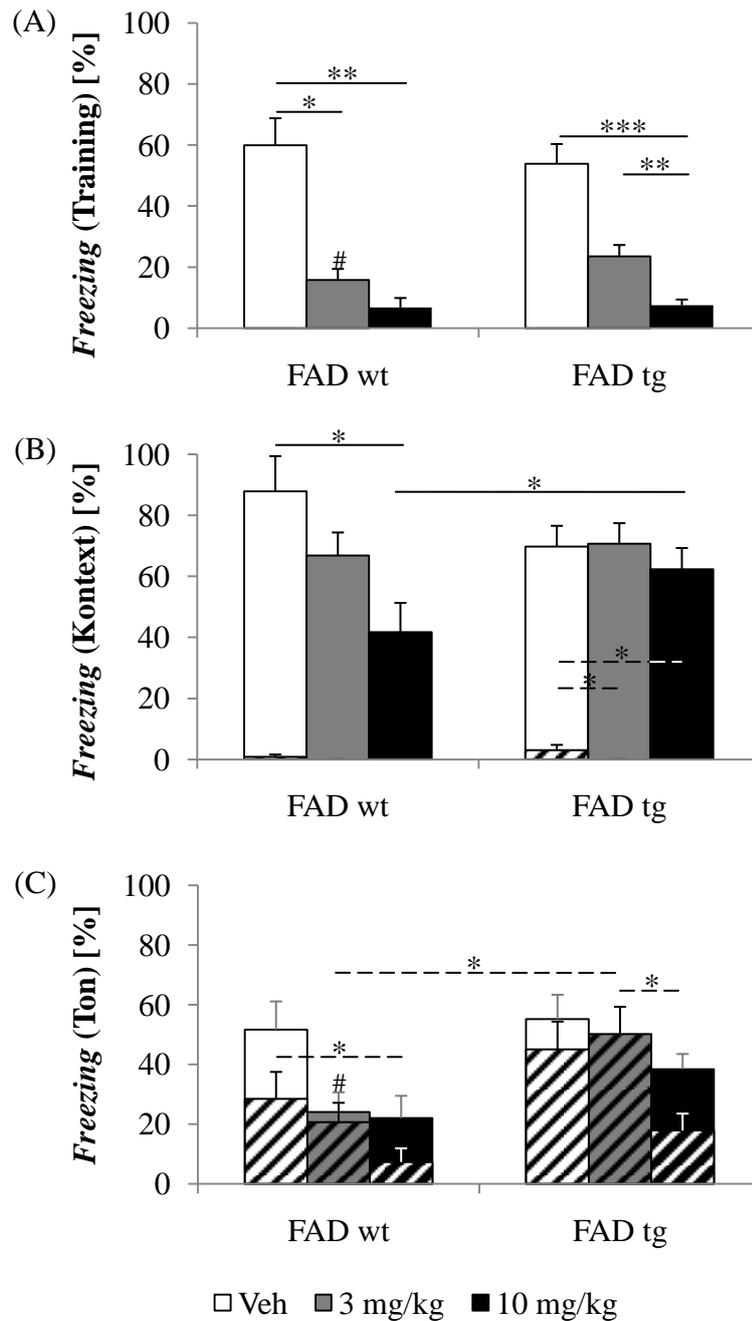
---

### 3.5.4 *Fear conditioning* 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation

Während des Trainings im *Fear conditioning* bei Tieren im Alter von 9 Monaten (Abb. 38A) war das *Freezing* nicht-transgener Versuchstiere nach der Verabreichung von 3 mg/kg ( $15,73 \pm 3,71$  %,  $p = 0,012$ ) bzw. 10 mg/kg MPH ( $6,79 \pm 3,12$  %,  $p = 0,001$ ) im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren ( $59,90 \pm 8,93$  %) signifikant reduziert. Gleichzeitig war das *Freezing* bei den transgenen Tieren nach der Injektion von 10 mg/kg MPH ( $7,51 \pm 1,90$  %) im Vergleich zu den transgenen Kontrolltieren ( $53,89 \pm 6,50$  %,  $p < 0,001$ ) und zu der 3 mg/kg MPH-Tiergruppe ( $23,51 \pm 3,77$  %,  $p = 0,003$ ) signifikant gesenkt.

In der ersten Habituationsphase (Abb. 38B, diagonal gestreift) wurde bei den transgenen 5xFAD-Mäusen eine signifikante Minderung des *Freezing* nach der Gabe von 3 mg/kg ( $0 \pm 0$  %,  $p = 0,013$ ; unterbrochene Linie) bzw. 10 mg/kg MPH ( $0 \pm 0$  %,  $p = 0,011$ ; unterbrochene Linie) im Vergleich zu den transgenen Vehikeltieren ( $2,96 \pm 1,78$  %) beobachtet. Im entscheidenden Test des kontextabhängigen *Fear conditioning* (Abb. 38B) wurde ein signifikant geringeres *Freezing* bei den nicht-transgenen, mit 10 mg/kg MPH behandelten Tieren gezeigt ( $41,74 \pm 9,55$  %), verglichen mit den Kontrolltieren ( $87,91 \pm 11,47$  %,  $p = 0,031$ ) und mit den transgenen 5xFAD-Mäusen, die 10 mg/kg MPH erhielten ( $62,31 \pm 6,95$  %,  $p = 0,031$ ).

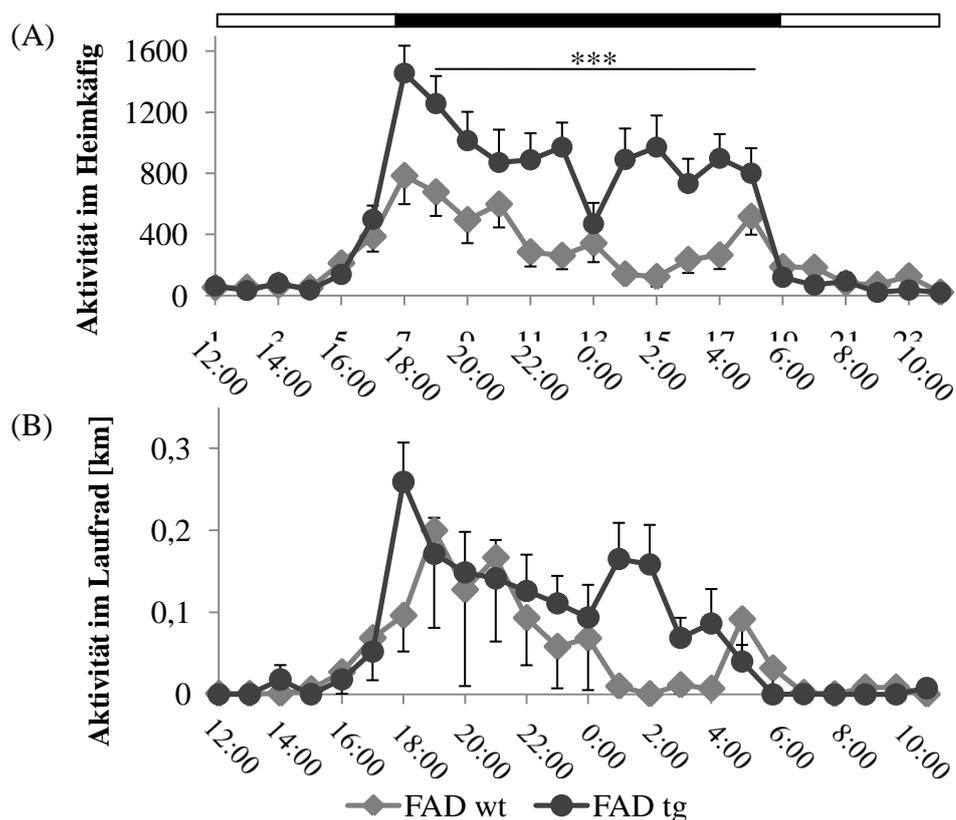
Während der zweiten Habituationsphase vor dem tonabhängigen Test (Abb. 38C, diagonal gestreift) war das *Freezing* nicht-transgener Mäuse nach der Injektion von 10 mg/kg MPH ( $7,29 \pm 4,59$  %) signifikant niedriger als das der nicht-transgenen Vehikeltiere ( $28,45 \pm 9,04$  %,  $p = 0,044$ , unterbrochene Linie). Gleichzeitig war das *Freezing* transgener, mit 10 mg/kg MPH behandelte Tiere während der Habituation signifikant geringer ( $17,82 \pm 5,70$  %) als das transgener, mit 3 mg/kg MPH behandelte Mäuse ( $50,21 \pm 9,09$  %,  $p = 0,006$ ; unterbrochene Linie). Zuletzt wurde ein signifikant höheres *Freezing* bei den transgenen, mit 3 mg/kg MPH behandelten Versuchstieren im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen, die 3 mg/kg MPH erhielten ( $20,61 \pm 6,53$  %), beobachtet ( $p = 0,045$ ; unterbrochene Linie). Im tonabhängigen Test wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen (Abb. 38C).



**Abb. 38: Fear conditioning-Test 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation.** Während des kontextabhängigen *Fear conditioning* war das *Freezing* nicht-transgener 5xFAD-Tiere nach der Injektion von 10 mg/kg MPH im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrolltieren signifikant reduziert. Im tonabhängigen *Fear conditioning* war kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlich behandelten Versuchstieren beobachtbar (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Signifikanz in der Habituationsphase: unterbrochene Linie; # $p < 0,05$  = signifikanter Unterschied zu 6 Monate alten Tieren derselben behandelten Gruppe (FAD wt\_3 mg/kg: Training und tonabhängiges *Fear conditioning*)). (A) *Freezing* während des Trainings, (B) *Freezing* in Abhängigkeit der Umgebung (*contextual fear conditioning*) mit dazugehöriger *Freezing*-Zeit während der Habituationsphase (diagonal gestreift), (C) *Freezing* in Abhängigkeit vom gelernten Ton (*cued fear conditioning*) mit dazugehöriger *Freezing*-Zeit während der Habituationsphase (diagonal gestreift); Fußschock I = 500  $\mu$ A, Ton = 1-2 kHz. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 3 mg/kg (grau), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 12 (Veh); n = 11 (3 mg/kg); n = 8 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 15(Veh); n = 13 (3 mg/kg); n = 13 (10 mg/kg))

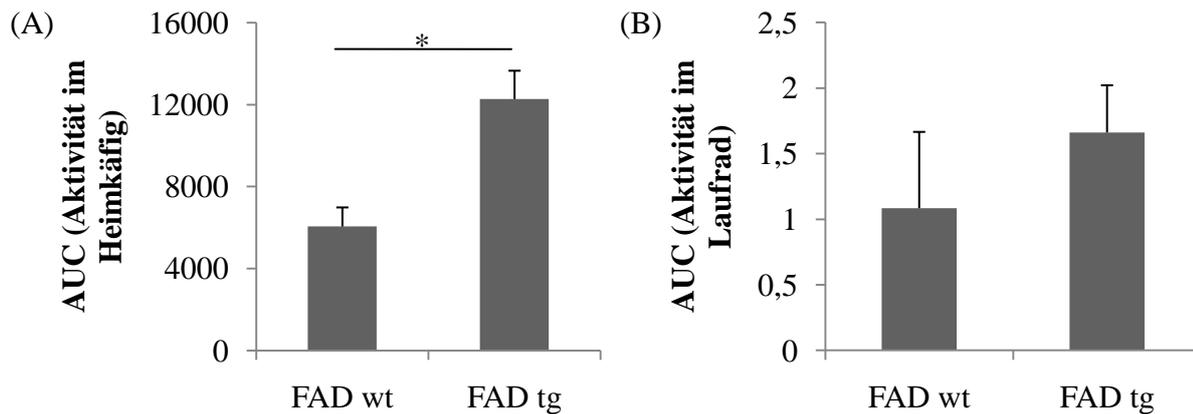
### 3.5.5 Aktivität im Heimkäfig und im Laufrad 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Stimulation

Der Aktivitätsverlauf über 24 Stunden der (noch unbehandelten) transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Tiere im Alter von 9 Monaten am 3. Habituationstag verdeutlichte eine sehr geringe bis keine Aktivität beider Versuchsgruppen zwischen 6:00 und 18:00 Uhr (Ruhephase, weißer Balken) sowohl im Heimkäfig (Abb. 39A) als auch im Laufrad (Abb. 39B). Bereits eine Stunde vor Ausschalten des Lichtes, d.h. gegen 17:00 Uhr, begann die Aktivität der transgenen und nicht-transgenen Mäuse anzusteigen. Während der Dunkelphase (18:00 bis 6:00 Uhr, schwarzer Balken) waren die transgenen Versuchstiere im Heimkäfig von 19:00 bis 5:00 Uhr signifikant aktiver als nicht-transgene Tiere ( $p = 0,0006$ ). Im Laufrad wurde in diesem Zeitraum kein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen beobachtet ( $p = 0,3404$ ).



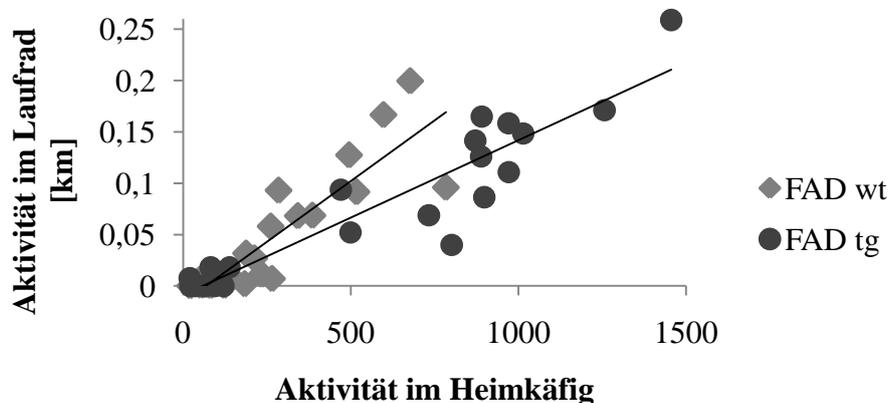
**Abb. 39: Aktivität über 24 Stunden im Heimkäfig und im Laufrad 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse am 3. Habituationstag.** Die (noch unbehandelten) transgenen und nicht-transgenen Versuchstiere zeigten (A) im Heimkäfig und (B) im Laufrad eine sehr geringe bis keine Aktivität während der Ruhephase (6:00 bis 18:00 Uhr, weißer Balken). In der Dunkelphase (18:00 bis 06:00 Uhr, schwarzer Balken) stieg die Aktivität beider Genotypen an, wobei transgene 5xFAD-Mäuse im Heimkäfig signifikant aktiver waren als nicht-transgene Mäuse (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ). Nicht-transgene, noch unbehandelte 5xFAD (FAD wt, Rauten, Heimkäfig:  $n = 11$ , Laufrad:  $n = 4$ ), transgene, noch unbehandelte 5xFAD (FAD tg, Kreise, Heimkäfig  $n = 11$ , Laufrad:  $n = 10$ )

Die Berechnung der *Area under curve* (AUC) für die Aktivität im Heimkäfig (Abb. 40A) bestätigte die signifikant höhere Aktivität der transgenen 5xFAD-Mäuse ( $12274,45 \pm 1386,35$ ) im Vergleich zu den nicht-transgenen Tieren ( $6054,95 \pm 930,83$ ;  $p = 0,005$ ), welche insbesondere in der Dunkelphase zu beobachten war. Die AUC für die Aktivität im Laufrad (Abb. 40B) waren zwischen transgenen und nicht-transgenen Versuchstieren nicht signifikant verschieden zueinander ( $p = 0,358$ ).



**Abb. 40: Area under curve (AUC) für die Aktivität über 24 Stunden im Heimkäfig und im Laufrad 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse am 3. Habituationstag.** Die AUC für die Aktivität im (A) Heimkäfig, nicht jedoch im (B) Laufrad war bei transgenen 5xFAD-Tieren im Vergleich zu nicht-transgenen Mäusen signifikant höher (\* $p < 0,05$ ). Nicht-transgene, noch unbehandelte 5xFAD (FAD wt; Heimkäfig:  $n = 11$ , Laufrad:  $n = 4$ ), transgene, noch unbehandelte 5xFAD (FAD tg; Heimkäfig  $n = 11$ , Laufrad:  $n = 10$ )

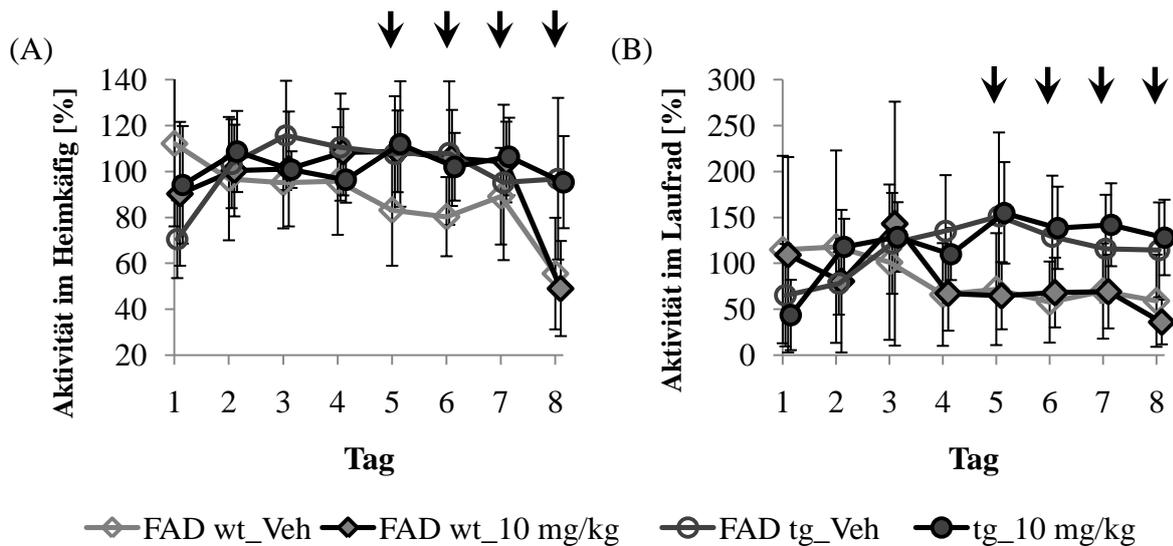
Trotz des signifikanten Unterschiedes in der Aktivität im Heimkäfig zwischen transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Versuchstieren bestand eine positive Korrelation zwischen der Aktivität im Heimkäfig und der Aktivität im Laufrad sowohl bei den transgenen ( $r = 0,8501$ ;  $p < 0,001$ ) als auch nicht-transgenen Mäusen ( $r = 0,8850$ ;  $p < 0,001$ ; Abb. 41). Das bedeutet, je aktiver die Mäuse im Heimkäfig waren, desto mehr liefen sie auch im Laufrad.



**Abb. 41: Korrelation der Aktivität im Heimkäfig und der Aktivität im Laufrad transgener und nicht-transgener (noch unbehandelter) 5xFAD-Mäuse über 24 Stunden des 3. Habituationstages.** Bei beiden Genotypen bestand ein positiver Zusammenhang zwischen der Aktivität im Heimkäfig und im Laufrad. Nicht-transgene, noch unbehandelte 5xFAD (FAD wt, Rauten; n = 24), transgene, noch unbehandelte 5xFAD (FAD tg, Kreise; n = 24)

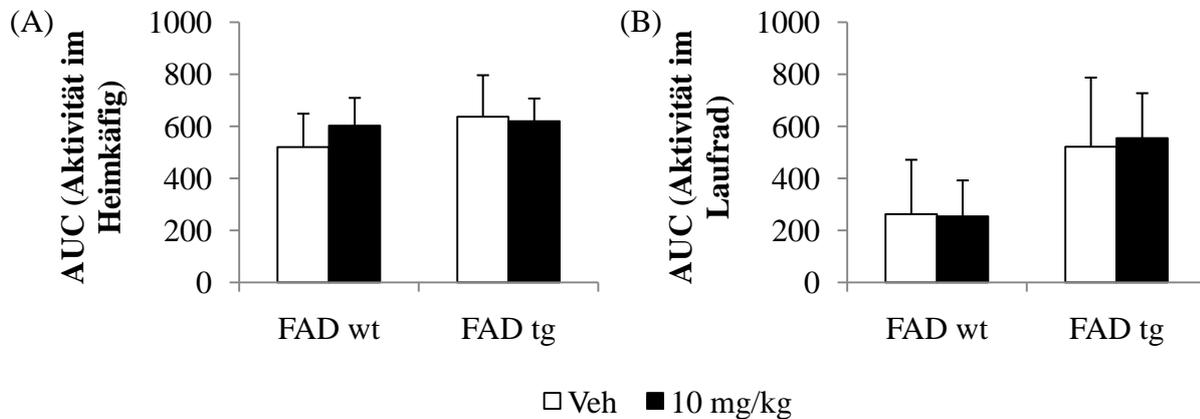
←

Für die Analyse zur Wirkung von MPH wurden die transgenen und nicht-transgenen Versuchstiere nach der Habituationsphase jeweils in zwei Gruppen geteilt. Die erste Gruppe erhielt als Kontrollsubstanz NaCl, die zweite 10 mg/kg MPH. Die Injektion erfolgte stets in der Ruhephase der Mäuse, wenn die Aktivität bei beiden Genotypen gleich niedrig war. Der Vergleich der unbehandelten und mit MPH behandelten transgenen und nicht-transgenen Gruppen verdeutlichte, dass sich die tägliche Gesamtaktivität im Heimkäfig (Abb. 42A) und im Laufrad (Abb. 42B) weder vor der Applikation von MPH (Tag 1 bis 4), noch während der Tage der Applikation (Tag 5 bis 8, schwarze Pfeile) signifikant unterschied.



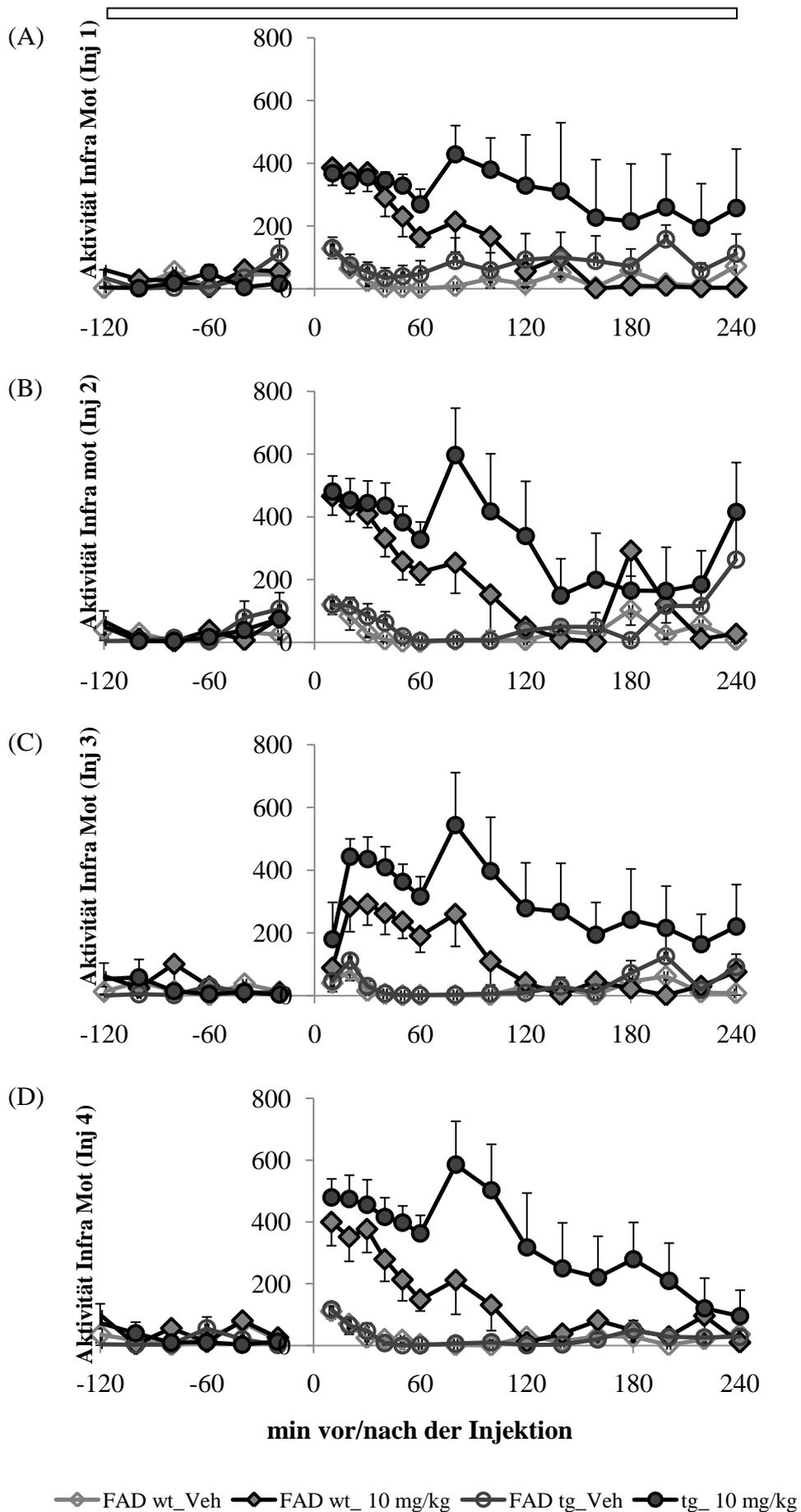
**Abb. 42: Tägliche Aktivität [%] im Heimkäfig und im Laufrad 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse vor und nach der pharmakologischen Stimulation.** Zwischen den unterschiedlichen Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der Gesamtaktivität nach der MPH-Behandlung. Die Injektion erfolgte einmal täglich von Tag 5 bis Tag 8 (schwarze Pfeile). (A) Aktivität im Heimkäfig [%], (B) Aktivität im Laufrad [%]. Kontrollsubstanz (Veh, offene Symbole), MPH 10 mg/kg (gefüllte Symbole mit schwarzem Rahmen), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, Rauten; n = 5 (Veh); n = 6 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg, Kreise; n = 5 (Veh); n = 6 (10 mg/kg))

Mit Hilfe der Berechnung der *Area under curve* (AUC) für die Aktivität im Heimkäfig (Abb. 43A) und im Laufrad (Abb. 43B) wurde bestätigt, dass sich die Gesamtaktivität zwischen den Genotypen und verschiedenen behandelten transgenen und nicht-transgenen Mäusen nicht signifikant voneinander unterschied.



**Abb. 43: Area under curve (AUC) für die Gesamtaktivitäten im Heimkäfig und Laufrad.** Die AUC für die gesamte Aktivität im (A) Heimkäfig und (B) Laufrad unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Genotypen und den verschiedenen behandelten Gruppen. Die Berechnung der AUC erfolgte für die Aktivität im Heimkäfig von *Trial* 2 bis 8 und für die Aktivität im Laufrad von *Trial* 4 bis 8. Kontrollsubstanz (Veh, weiß), MPH 10 mg/kg (schwarz), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 5 (Veh); n = 6 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 5 (Veh); n = 6 (10 mg/kg))

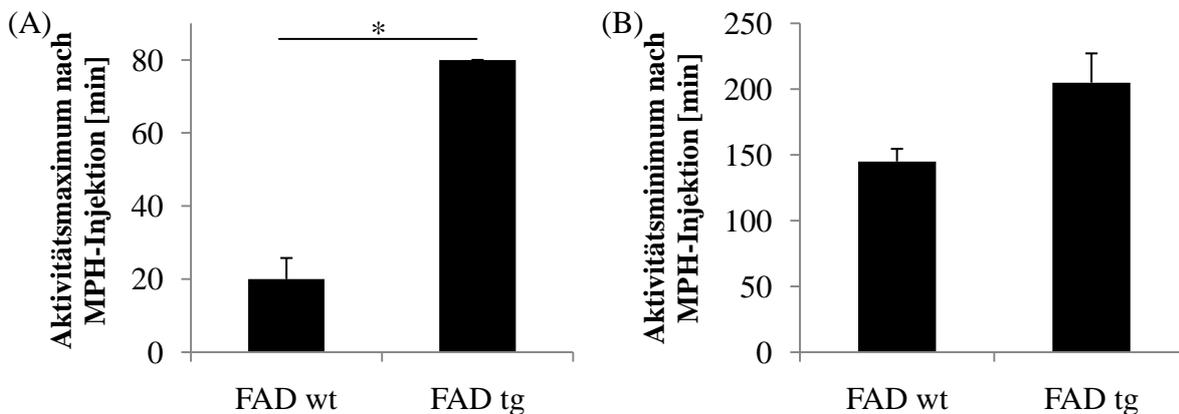
Zur detaillierten Untersuchung der Wirkung von MPH wurde die Aktivität im Heimkäfig für die vier aufeinanderfolgenden Tage der jeweils einmaligen Injektion einzeln dargestellt (Abb. 44A-D). Die Injektion erfolgte zum Zeitpunkt Null. Unmittelbar nach der Injektion von MPH erhöhte sich die Aktivität der transgenen und nicht-transgenen Versuchstiere im Heimkäfig im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das Aktivitätsmaximum war bei den transgenen Mäusen an allen vier Tagen etwa 80 min nach der Injektion erreicht. Das Aktivitätsmaximum der nicht-transgenen Mäuse belief sich auf etwa 30 min nach der ersten und dritten MPH-Injektion (Abb. 44A und C) und auf 10 min nach der zweiten und vierten Injektion (Abb. 44B und D). Anhand der Dauer der gesteigerten Aktivität nach der Injektion wurde auf die Wirkungsdauer von MPH geschlossen. Während die Aktivität bei transgenen 5xFAD-Tieren ihren ersten Minimalwert nach etwa 220 bis 240 min (ausgenommen Injektion 2: t = 140 min) erreichte, benötigen nicht-transgene Versuchstiere 120 bis 160 min bis die Aktivität wieder auf das Minimum gesenkt war.



**Abb. 44: Aktivität im Heimkäfig 9 Monate alter 5xFAD-Mäuse nach pharmakologischer Behandlung.** Unmittelbar nach der Injektion (Zeitpunkt Null) war die Aktivität bei transgenen und nicht-transgenen Versuchstieren erhöht. Das Aktivitätsmaximum der transgenen 5xFAD-Tiere war nach 80 min (1. bis 4. Tag), das der nicht-transgenen 5xFAD-Mäuse nach 30 min (1. und 3. Tag) bzw. nach 10 min (2. und 4. Tag) erreicht. Die Wirkungsdauer der Substanz war bei transgenen Tieren länger als bei nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen. (A) erster, (B) zweiter, (C) dritter, (D) vierter Injektions-Tag. Kontrollsubstanz (Veh, offene Symbole), MPH 10 mg/kg (gefüllte Symbole mit schwarzem Rahmen), nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 5 (Veh); n = 6 (10 mg/kg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 5 (Veh); n = 6 (10 mg/kg))

←

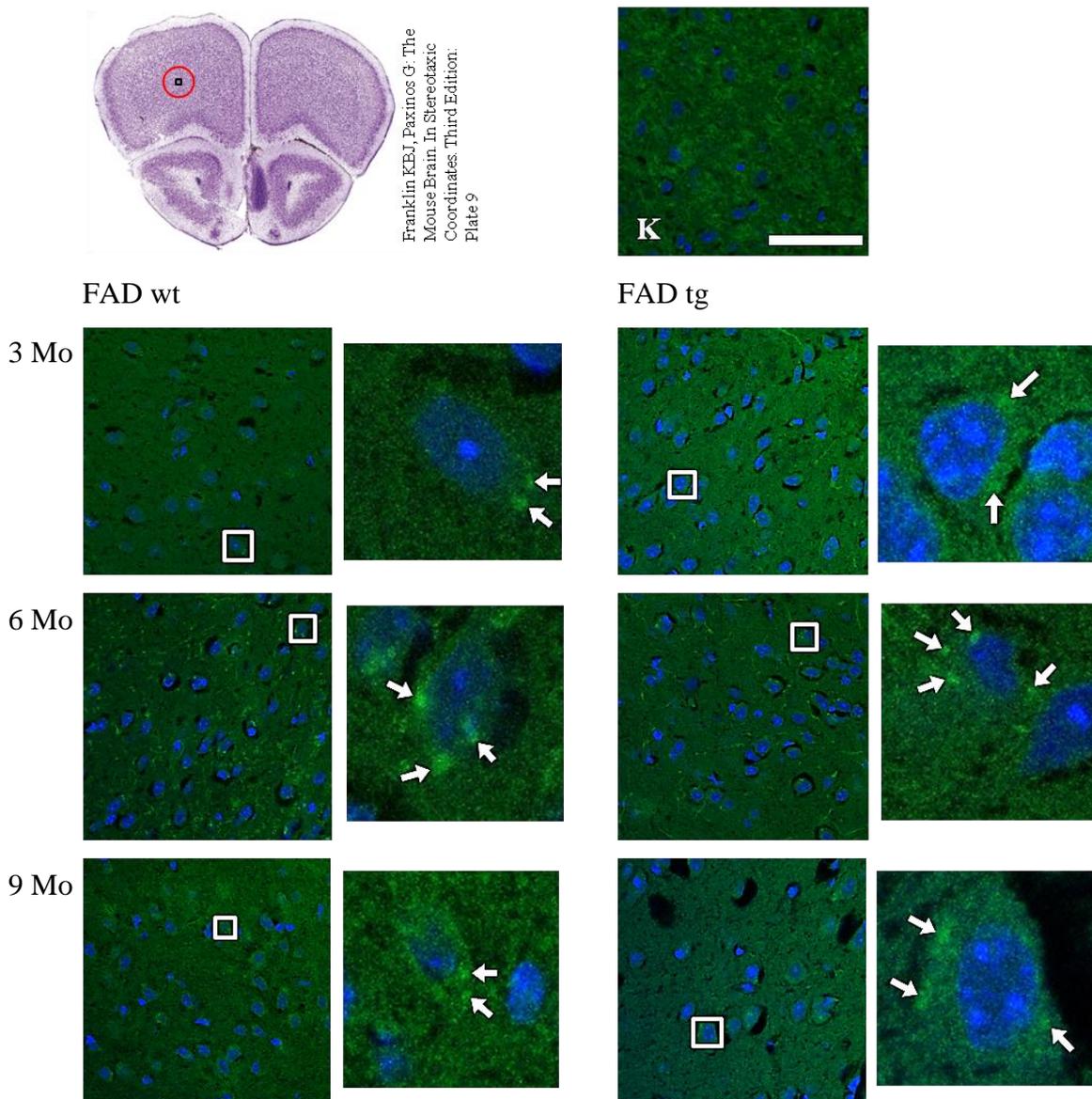
Der zusammenfassende Vergleich der maximalen Aktivität der 5xFAD-Maus im Heimkäfig nach der MPH-Injektion (Abb. 45A) verdeutlichte, dass das Aktivitätsmaximum der transgenen 5xFAD-Tiere ( $t = 80,00 \pm 0$  min) signifikant später war als das nicht-transgener Tiere ( $t = 20,00 \pm 5,80$  min,  $p = 0,029$ ). Die zusammenfassende Darstellung zum anschließend wieder erreichten Aktivitätsminimum (Abb. 45B) veranschaulichte, dass das Aktivitätsminimum nach  $205 \pm 22,17$  min bei den transgenen 5xFAD-Mäusen und nach  $145 \pm 9,57$  min bei den nicht-transgenen Tieren erreicht war. Demnach benötigten die transgenen Tiere tendenziell länger, um MPH abzubauen ( $p = 0,114$ ).



**Abb. 45: Wirkungszeitpunkt und -dauer von MPH.** (A) Das Aktivitätsmaximum transgener 5xFAD-Tiere war signifikant später als das nicht-transgener Tiere ( $*p < 0,05$ ). (B) Es bestand kein signifikanter Unterschied bis zum Erreichen des Aktivitätsminimums nach der Injektion von MPH. Nicht-transgene 5xFAD (FAD wt; n = 4 (Veh); n = 4 (10 mg)), transgene 5xFAD (FAD tg; n = 4 (Veh); n = 4 (10 mg))

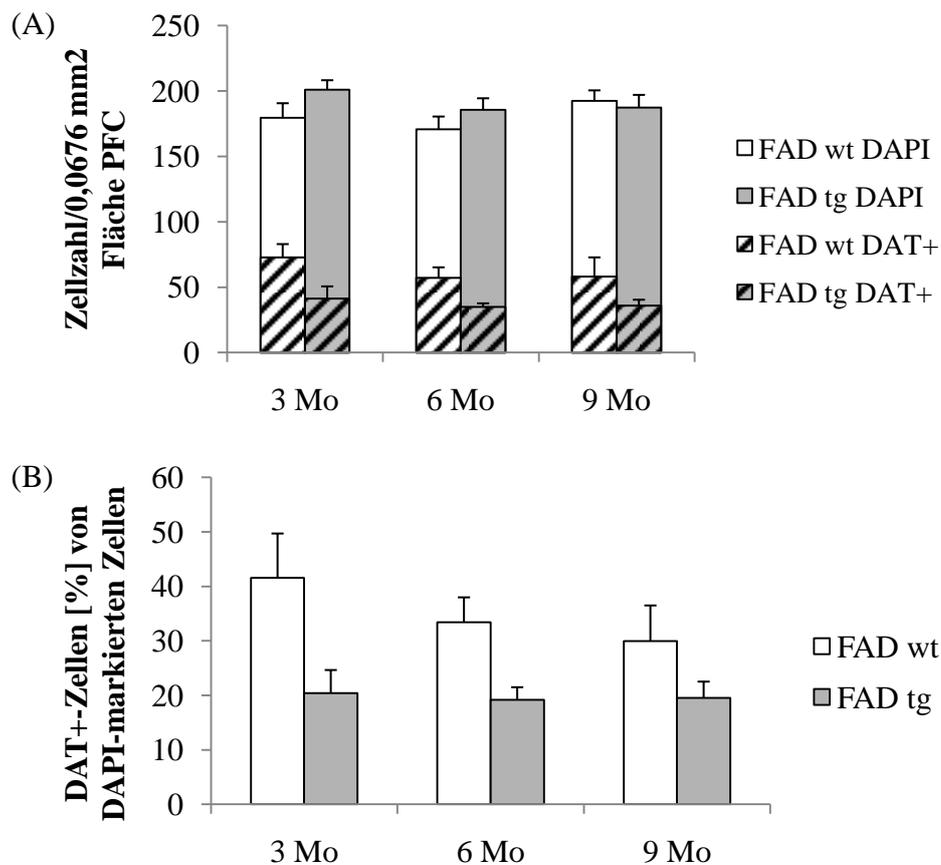
### 3.6 Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung des Dopamin-Transporters (DAT)

Der DAT wurde hinsichtlich seiner Anzahl im PFC untersucht. Sowohl im Alter von 3, 6 als auch 9 Monaten wurden DAT-positive Zellen (weiße Pfeile) im PFC transgener und nicht-transgener Tiere ausgemacht (Abb. 46). Ob jedoch Abweichungen in der Anzahl des Transporters existierten, sollte mittels der Quantifizierung des DAT (Abb. 47) bestimmt werden.



**Abb. 46: Färbung des Dopamin-Transporters im präfrontalen Cortex.** DAT-positive Zellen (weiße Pfeile) waren bis ins Alter von 9 Monaten bei der 5xFAD-Maus bei nicht-transgenen und transgenen Tieren identifizierbar. 1. Zeile links: Lokalisation des PFC mit Hilfe des Maus-Atlas (FRANKLIN UND PAXINOS 2007), rechts: Antikörperkontrollfärbung (K), ab 2. Zeile oben: 3 Monate, Mitte: 6 Monate, unten: 9 Monate; links: nicht-transgene 5xFAD (FAD wt), rechts: transgene Tiere (FAD tg). **Dopamin-Transporter, DAPI** (Maßstab 50 µm)

Die Auszählung der Neurone im PFC per se (DAPI, Abb. 47A) ergab keinen Unterschied zwischen den transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen im Alter von 3, 6 oder 9 Monaten. Ferner wiesen nicht alle positiv gefärbten Zellen im PFC eine positive DAT-Färbung auf (diagonal gestreift). Mit Hilfe der Quantifizierung der DAT-positiven Zellen (Abb. 47B) wurde nachgewiesen, dass der prozentuale Anteil der DAT-positiven Zellen zwischen transgenen und nicht-transgenen Mäusen im Alter von 3, 6 und 9 Monaten tendenziell verschieden war. Es wurde dabei lediglich ein Trend beobachtet, da die Anzahl der Strichprobengröße zu gering war.



**Abb. 47: Quantifizierung des DAT-positiver Zellen im PFC (0,0676 mm<sup>2</sup> Fläche).** Die Anzahl DAT-positiver Zellen im PFC war ab dem Alter von 3 Monaten bei transgenen 5xFAD-Mäusen tendenziell niedriger als bei nicht-transgenen Tieren. **(A)** absolute Anzahl der Neurone im PFC (DAPI, gefüllte Balken) und DAT-positiver Zellen (DAT+, diagonal gestreift), **(B)** prozentualer Anteil DAT-positiver Zellen bezüglich der positiv markierten Neurone im PFC, nicht-transgene 5xFAD (FAD wt, weiß; n = 3 (3 Mo); n = 4 (6 Mo); n = 4 (9 Mo)), transgene 5xFAD (FAD tg, hellgrau; n = 4 (3 Mo); n = 3 (6 Mo); n = 5 (9 Mo))

## 4 Diskussion

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen zum Einfluss von MPH auf das Verhalten bei der Alzheimer-Krankheit. Am Patienten konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine Verabreichung von MPH vor allem eine Senkung der Apathie, daneben ein verbessertes Schlafverhalten sowie eine gesteigerte Lust und "Antriebskraft" bewirkt (GALYNKER *ET AL.* 1997, KITTUR UND HAUSER 1999, PADALA *ET AL.* 2010, 2012). Die Einzelfallstudien und offenen Studien zeigten zwar eine positive Wirkung von MPH auf die Apathie, dennoch haben sie Einschränkungen. Keines der publizierten Darstellungen beurteilten die Apathie per se und alle Untersuchungen sind von einer geringen Stichprobengröße sowie von verschiedenen Komorbiditäten gekennzeichnet, was die Generalisierung der Ergebnisse erschwert (PADALA *ET AL.* 2010). Berichte zum Einfluss von MPH auf die Lern- und Gedächtnisleistung bei Alzheimer-Patienten gibt es bisher keine. Auch in Hinblick auf die präklinische Forschung an Mausmodellen können keine Befunde ausgemacht werden. Hinsichtlich dieses Sachverhaltes wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals eine systematische Studie zum pharmakologischen Einfluss des häufig therapeutisch verwendeten Psychostimulans MPH auf die Lern- und Gedächtnisleistung *in vivo* am Beispiel der 5xFAD-Alzheimermaus durchgeführt. Die Verhaltensdefizite transgener Mäuse sollten reduziert und bestenfalls auf ein Niveau der nicht-transgenen Wildtypiere gehoben werden. Um dies zu eruieren, wurden transgene und nicht-transgene 5xFAD-Mäuse unterschiedlichen Alters zunächst einer intensiven phänotypischen Beschreibung und einer immunhistochemischen Charakterisierung unterzogen. Anschließend wurden 5xFAD-Männchen in verschiedenen Verhaltenstests analysiert, da bislang insbesondere Weibchen der Linie untersucht wurden (HILLMANN *ET AL.* 2010, JAWHAR *ET AL.* 2012, TOHDA *ET AL.* 2012, AYTAN *ET AL.* 2013, ZHANG *ET AL.* 2013). Im Anschluss wurde sich denselben Verhaltensuntersuchungen bedient, um einen pharmakologischen Einfluss von 3 und 10 mg/kg MPH bei sechs- und neunmonatigen 5xFAD-Männchen zu überprüfen. So wurde einerseits ermittelt, inwiefern beginnende Verhaltensbeeinträchtigungen beeinflusst werden können, andererseits wurde der Einfluss auf signifikant bestehende Defizite analysiert. Folglich wurden mittels dieser Arbeit zwei grundsätzliche Aspekte abgeklärt. Die Charakterisierung der Versuchstiere diente der präziseren Beschreibung der sich entwickelnden Verhaltensbeeinträchtigungen bei 5xFAD-Männchen, die pharmakologische Stimulation gab Aufschluss darüber, ob der Einsatz von MPH für eine medikamentöse Therapie zur Aufbesserung der Lern- und/oder Gedächtnisbeeinträchtigungen bei der Alzheimer-Krankheit denkbar ist.

## 4.1 Die Entwicklung der Alzheimer-Pathologie bei der 5xFAD-Maus

### 4.1.1 Immunhistochemische Beschreibung

#### *Plaqueeentwicklung*

Aus den durchgeführten immunhistochemischen Analysen geht hervor, dass die 5xFAD-Maus mit nur zwei Monaten sehr zeitig A $\beta$ -Plaques entwickelt. Beginnend im PFC, Subiculum sowie in der Cortex-Schicht 5 und Amygdala breiten sich die Plaques recht schnell in andere Hirnregionen aus (eigene Beobachtungen), wenn auch geringer in der Zahl (OAKLEY *ET AL.* 2006). Im Gegensatz zu OAKLEY *ET AL.* (2006) wurden in den hier durchgeführten Analysen auch Plaques im Cerebellum ausgemacht. Die Ursache für die rasante Bildung der Plaques ist die drastisch beschleunigte A $\beta$ 42-Generierung bei jungen Mäusen (OHNO 2009, DEVI UND OHNO 2010A, TOHDA *ET AL.* 2012). Andere Modelle weisen die ersten Plaques ab frühestens drei Monaten auf, so z.B. die APP/PS1-Alzheimermaus (WANG *ET AL.* 2012) oder die TgCRND8-Maus (KOBAYASHI UND CHEN 2005, LALONDE *ET AL.* 2012). Allerdings haben transgene TgCRND8-Mäuse den erheblichen Nachteil einer hohen postnatalen Mortalitätsrate sowie einer niedrigeren Überlebensrate im Vergleich zu nicht-transgenen Geschwistertieren (KOBAYASHI UND CHEN 2005). Die 5xFAD-Maus hingegen zeigte eine ausgezeichnete Fertilität mit einer hohen Anzahl Nachkommen beider Genotypen (zwölf Jungen/Wurf), die zu 90 % überlebten (eigene Beobachtungen). Bei weiteren Alzheimer-Mausmodellen lagern sich Plaques in späteren Altersstadien ab: J20-Maus: fünf bis sieben Monate (KOBAYASHI UND CHEN 2005), 3xTg-AD-Maus: sechs Monate (STERNICZUK *ET AL.* 2010), APP23-Maus: sechs Monate, PS/APP-Maus: sieben Monate (KOBAYASHI UND CHEN 2005), Tg2576-Maus: neun Monate (LEE UND HAN 2013), ADAM10 APP-Maus: zwölf-19 Monate (KOBAYASHI UND CHEN 2005). Demnach ist die 5xFAD-Maus mit ihrer schnellen Pathologieentwicklung eines der geeignetsten Modelle, um biochemische Aspekte des APP-Metabolismus und der Plaque-Entwicklung zu untersuchen (LEE UND HAN 2013).

Ein weiterer Aspekt, der im Zusammenhang mit der Plaque-Entwicklung beobachtet wurde, war die zeitigere Ablagerung bei Weibchen im Vergleich zu Männchen. Auch OAKLEY *ET AL.* (2006) beschrieben bereits, dass junge 5xFAD-Weibchen einen höheren A $\beta$ 42-Gehalt als gleichaltrige Männchen aufweisen, wobei sich dieser Unterschied mit zunehmendem Alter angleicht. Auch DEVI *ET AL.* (2010) wiesen nach, dass die ersten A $\beta$ -Ablagerungen geschlechtsspezifisch (bei Weibchen) und in Abhängigkeit der Hirnregion (im Hippocampus) auftreten.

Eine spezifische Region, die im Rahmen der Plaque-Ablagerungen immunhistochemisch analysiert wurde, war der Nucleus basalis (Nbas). Der Nbas mit der höchsten Dichte cholinergere Nuclei im Vorderhirn (BERMAN *ET AL.* 2007) und als ein Ursprungsort cholinergere Bahnen projiziert vor allem in den cerebralen Cortex und Hippocampus (REINIKAINEN *ET AL.* 1990). Im Nbas konnten mittels der eigenen immunhistochemischen Untersuchungen keine Plaques identifiziert werden. Dennoch korreliert eine frühe Degeneration von Neuronen im Nbas mit einer kognitiven Abnahme bei der Alzheimer-Krankheit (WINKLER *ET AL.* 1998). Zudem wird ein Rückgang cholinergere Nervenendigungen in Gehirnregionen beschrieben, in welchen sich vermutlich Plaques entwickeln (GERMAN UND EISCH 2004). Weiterhin wird eine Veränderung des cholinergere Transmittersystems mit der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang gebracht (MARCHBANKS 1982, SELKOE 1991, POTTER *ET AL.* 2011). So ist der ChAT-Gehalt, ein Marker cholinergere Neurone, in hippocampalen Homogenaten, bereits ab sechs Monaten bei der 5xFAD-Maus reduziert (DEVI UND OHNO 2010B). Regionale Änderungen der ChAT-Aktivität sind mehr im temporalen Cortex, hippocampalen Cortex und Hippocampus, weniger im frontalen Cortex und parietalen Cortex ausgeprägt. Dies deckt sich mit der bekannten Ausprägung neuropathologischer Änderungen und induziert, dass das cholinergere System bei der Alzheimer-Krankheit nicht universell involviert ist (REINIKAINEN *ET AL.* 1990).

### *Neuroinflammation*

Neben der Plaque-Entwicklung wurden mittels der immunhistochemischen Untersuchungen ab drei Monaten auch Mikroglia bei der 5xFAD-Maus nachgewiesen, was auf eine Neuroinflammation schließen lässt. Die Neuroinflammation stellt neben den A $\beta$ -Plaques ein weiteres, wesentliches Merkmal von Alzheimer betroffenen Gehirnen dar (MORRISSETTE *ET AL.* 2009). Im Cerebellum waren in den hier untersuchten Altersstadien keine Mikroglia nachweisbar, wobei postuliert ist, dass sie unabhängig von der Hirnregion vorkommen (WOJTERA *ET AL.* 2012). Bei der 5xFAD-Maus wurde bereits mehrfach eine Astro- und Mikrogliose beobachtet (OAKLEY *ET AL.* 2006, OHNO *ET AL.* 2007, KIMURA UND OHNO 2009, KATSOURI UND GEORGOPOULOS 2011, HILLMANN *ET AL.* 2012). Andere Modelle, wie beispielsweise die TgCRND8- (KOBAYASHI UND CHEN 2005), APP/PS1- (KRABBE *ET AL.* 2013, FAIVRE UND HÖLSCHER 2013), 3xTgAD- (GHOSH *ET AL.* 2013) oder Tg2576-Maus (SIVILIA *ET AL.* 2013) weisen auch Gliosen in unmittelbarer Nachbarschaft der Plaques auf. Ferner konnte auch in humanen Hirnen nachgewiesen werden, dass A $\beta$ -Plaques von aktivierten Mikroglia und Astrocyten umgeben werden (MORRISSETTE *ET AL.* 2009). Die Frage

jedoch, ob angesiedelte Mikroglia das Wachstum von A $\beta$ -Plaques bei der Alzheimer-Krankheit beschränken, bleibt kontrovers diskutiert, so wie die Rekrutierung von Mikroglia wahrscheinlich nicht dem Plaque-Abbau dient. Die temporäre Entfernung von Mikroglia hat beispielsweise keinen Einfluss auf die Plaquebildung und -erhaltung (KRABBE *ET AL.* 2013). Interessanterweise ist die Expression von Rezeptoren und Enzymen, welche in die mikrogliale A $\beta$ -Aufnahme und -Verminderung involviert sind, bei transgenen Mausmodellen mit zunehmendem Alter schrittweise herunter reguliert. Somit ist denkbar, dass Mikrogliazellen möglicherweise bei der Entfernung oder beim Abbau von A $\beta$  in späteren Stadien der Alzheimer-Krankheit weniger effizient sind und funktionell gestört werden (KRABBE *ET AL.* 2013). Ein postulierter Grund für diesen Sachverhalt ist der negative Einfluss der nach den Mikroglia auftretenden Aktivierung von Astrocyten (WOJTERA *ET AL.* 2012). In *in vivo*-Studien konnte nachgewiesen werden, dass Mikroglia durch die Koexistenz von Astrocyten ihre Fähigkeit verlieren, Plaques und A $\beta$  abzubauen. *In vitro* kultivierte Astrocyten sekretierten Moleküle, die sensitiv für Glykosaminoglykane waren und die die mikrogliale A $\beta$ -Spaltung hemmten. Daneben konnte von Astrocyten stammendes Interleukin-4 die Mikroglia-Aktivierung *in vitro* inhibieren. Daher ist eine Inflammation weniger in den späten und vielmehr in den frühen Stadien der Alzheimer-Krankheit präsent (WOJTERA *ET AL.* 2012).

#### 4.1.2 Charakterisierung der 5xFAD-Maus

##### *Phänotyp*

Nachdem sich die Plaque-Beladung bis ins hohe Alter in das nahezu komplette Gehirn ausgebreitet hat, sind die mit der Alzheimer-Krankheit einhergehenden Defizite auch phänotypisch ersichtlich. Mit den hier durchgeführten Beobachtungen wurde belegt, dass transgene 5xFAD-Mäuse auffällige motorische Defizite, fehlende Reflexe und eine Rigidität der Vorder- und Hinterpfoten aufwiesen, beginnend ab einem Alter von 8,5 Monaten und verstärkt ausgeprägt mit spätestens zwölf Monaten. Normale Reflexe äußern sich in der Regel in dem Abspreizen aller vier Pfoten, sobald das Tier auf eine horizontale Fläche herabgelassen wird (LALONDE *ET AL.* 2012). Stattdessen ballten alte transgene 5xFAD-Mäuse ihre Vorder- und Hinterpfoten zusammen (*Clasping*). Die Krümmung der Pfoten wird auf parenchymale A $\beta$ -Plaques sowie auf eine axonale Neuropathologie im Gehirn und Rückenmark und auch auf fehlende 5-HT-Transporter zurückgeführt. Eine daraus resultierende erhöhte 5-HT-Konzentration an der Synapse könnte verantwortlich sein, das

Verhalten zu triggern (LALONDE *ET AL.* 2012). Diese Beobachtungen zum äußeren Erscheinungsbild der transgenen 5xFAD-Männchen decken sich mit der Arbeit von JAWHAR *ET AL.* (2012), die exakt denselben altersabhängigen Phänotyp bei transgenen 5xFAD-Weibchen nachweisen konnten. Auch bei anderen transgenen Alzheimer-Mäusen konnte dieses unnormale Verhalten beobachtet werden, beispielsweise pathologische Reflexe bei Tg2576-Mäusen (C57B6/SJL-Hintergrund) oder das *Clasping*-Verhalten bei APP23-Mäusen. Allerdings wird dieser veränderte Phänotyp nicht bei allen Plaque-bildenden Modellen beschrieben (LALONDE *ET AL.* 2012). So weisen dreifach-transgene A $\beta$ - und tau-Pathologie bildende 3xTg-AD-Weibchen keine Koordinationsprobleme bis ins hohe Alter auf (STERNICZUK *ET AL.* 2010). Somit scheint die Amyloid-Plaque-Pathologie nicht zwangsläufig zu diesem Phänotyp zu führen, wobei jedoch die Anzahl der Pfotenkrümmungen und der fehlenden Reflexe bei Mutanten höher ist als bei Wildtypen. Dagegen konnte eine Krümmung und ein Zusammenballen der Hinterpfoten auch bei Wildtyp-C57B6/SJL-Mäusen nachgewiesen werden, vermutlich als Konsequenz anormaler, nicht identifizierter Gene auf dem SJL-Hintergrund (LALONDE *ET AL.* 2012).

### *Nestbau*

Die zunehmenden Beeinträchtigungen der Motorik und/oder die verstärkten apathischen Zustände (siehe 4.1.3, *Nicht-kognitive Verhaltensbeeinträchtigungen – Ängstlichkeit, Lokomotion, Exploration*) scheinen die Fähigkeit des hier untersuchten Nestbaus transgener 5xFAD-Mäuse im hohen Alter zu beeinflussen. Transgene Männchen waren im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypieren vermutlich nicht mehr in der Lage oder weniger motiviert, ein Nest zu bauen, was sich insofern zeigte, dass sie ihr Nestbaumaterial sehr viel schlechter verarbeiteten oder nicht mehr anrührten. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei transgenen APP/PS1-Männchen im hohen Alter nachgewiesen (FILALI *ET AL.* 2011B). Bei alten 5xFAD-Männchen waren vielmehr vom Genotyp unabhängige Stereotypen im Heimkäfig, wie ein Auf-und-Ab-Springen, das Laufen von Kreisen und sehr ruckartiges Umherlaufen sowie das Vollführen von Saltosprüngen beobachtbar. Ein permanentes Hüpfen gegen die Käfigwand wurde auch bei transgenen APP23-Mäusen beschrieben, was als Spezies-spezifisches myoklonischen Springen definiert wurde (LALONDE *ET AL.* 2012). Normalerweise zeichnet sich ein Myoklonus durch unfreiwillige und ruckartige Bewegungen mit großer Amplitude aus, die jedoch klar von Muskelticks zu unterscheiden sind. Es treten rhythmische, aber kurz andauernde Bewegungen auf, die als Teil präepileptischer Bewegungen betrachtet werden können. Myoklonische Bewegungen können auf einer abnormen neuronalen Aktivität in

mehreren Hirnregionen basieren, vor allem im Hirnstamm und im Cerebellum. Es wurde aber auch von einer potenzierten 5-HT-Neurotransmission berichtet. Ein derartiger Myoklonus wird vor allem in späten Stadien der Alzheimer-Krankheit beobachtet (LALONDE *ET AL.* 2012).

### *Sensomotorik und Sensorik*

Neben den phänotypischen Beeinträchtigungen zeigten neun Monate alte transgene Männchen sensomotorische Defizite, indiziert durch die reduzierte Fähigkeit, sich das Klebeband von den Vorderpfoten zu entfernen. Dieser Unterschied basiert jedoch vor allem auf der abnehmenden Zeit bei den neunmonatigen nicht-transgenen Tieren. Während nicht-transgene 5xFAD-Männchen im Alter von drei Monaten eine vergleichsweise höhere Exploration aufwiesen und daher erst später auf das Klebeband an den Vorderpfoten reagierten, waren die Tiere mit neun Monaten ruhiger und widmeten sich so umgehend der Entfernung des Klebebandes. Transgene Tiere zeigten in diesem Test kein verändertes Verhalten mit zunehmendem Alter. Prinzipiell scheinen sensomotorische Fähigkeiten eine wichtige Bedeutung bei Störungen der motorischen Kontrolle zu haben, die typischerweise bei autistischen Erkrankungen, Schizophrenie und auch Alzheimer auftreten (VELASQUES *ET AL.* 2011). Bei weiblichen APP/PS1-Alzheimermäusen wurden ebenso sensomotorische Defizite ab sieben Monaten dokumentiert (WANG *ET AL.* 2012), wohingegen 24-monatige APP23-Alzheimerweibchen keine Beeinträchtigungen der sensomotorischen Fähigkeiten zeigten (LALONDE *ET AL.* 2005).

Weiterhin wiesen 5xFAD-Männchen sensorische Defizite auf. Transgene und auch nicht-transgene Männchen benötigten in einem Alter von sechs Monaten eine eindeutig höhere Stromstärke zur Perzeption des nozizeptiven Stimulus als gleichaltrige, „normale“ C57BL/6J-Männchen. Vermutlich ist die sensorische Beeinträchtigung der 5xFAD-Tiere auf die Hintergrundlinie selbst zurückzuführen. In einer Studie von PAMPLONA *ET AL.* (2010) war der Schwellenwert bezüglich der Schmerztoleranz (gemessen an den Sprungreaktionen) nach der intracerebroventrikuläre Verabreichung von A $\beta$ (1-40) bei drei Monate alten SWISS-Männchen erhöht, während die Injektion keine veränderte Schmerzsensitivität verursachte, die üblicherweise durch das erste Zusammenzucken indiziert wird (PAMPLONA *ET AL.* 2010). Bei weiblichen 3xTg-AD-Mäusen ist die Nozizeption selbst im hohen Alter von zwölf bis 14 Monaten nicht beeinträchtigt, was mittels des *Hot plate*-Tests untersucht wurde, bei dem transgene Mäuse im Vergleich zu nicht-transgenen Geschwistertieren jedoch keine Reaktion auf die zunehmende Temperatur zeigten (FILALI *ET AL.* 2012). Demnach entwickeln Alzheimermäuse keine zwingenden Beeinträchtigungen der Sensorik.

### 4.1.3 Verhaltensbiologische Beeinträchtigungen bei 5xFAD-Männchen

#### *Nicht-kognitive Verhaltensbeeinträchtigungen – Ängstlichkeit, Lokomotion, Exploration*

Die durchgeführten Verhaltensuntersuchungen bei den 5xFAD-Männchen erbrachten eine reduzierte Ängstlichkeit und wesentliche lokomotorische und explorative Beeinträchtigungen bei neunmonatigen transgenen 5xFAD-Männchen im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-transgenen Geschwistertieren. Bei Weibchen der 5xFAD-Maus hingegen war eine reduzierte Ängstlichkeit bereits ab sechs Monaten sichtbar, die lokomotorischen und explorativen Defizite konnten allerdings weder im Alter von neun noch von zwölf Monaten nachgewiesen werden (JAWHAR *ET AL.* 2012). Verhaltensbiologische Beeinträchtigungen in Abhängigkeit vom Alter scheinen bei transgenen 5xFAD-Mäusen folglich geschlechtsspezifisch zu sein, wobei auch die Durchführung in verschiedenen Laboratorien eine Rolle spielen kann. In der Literatur variieren die Beschreibungen zum nicht-kognitiven Verhalten anderer Alzheimer-Mäuse. So ist die Ängstlichkeit im *Elevated plus maze* auch bei Tg2576-Männchen ab 15 bis 20 Monaten (LALONDE *ET AL.* 2003) und bei APP23-Weibchen ab 24 Monaten (DUMONT *ET AL.* 2004) reduziert, während sie bei weiblichen 3xTg-AD-Mäusen ab einem Alter von 7,5 bis elf Monaten erhöht (STERNICZUK *ET AL.* 2010), bei transgenen APP/PS1-Männchen bis einschließlich zwölf bis 14 Monaten jedoch nicht verändert ist (KNAFO *ET AL.* 2009). Zugleich wird ebenso von einer gesenkten Lokomotion bei transgenen APP23-Mäusen ab drei Monaten (KOBAYASHI UND CHEN 2005) und bei transgenen APP/PS1-Männchen ab 14 Monaten (FILALI *ET AL.* 2011A) berichtet, wohingegen eine erhöhte Lokomotion bei 24-monatigen APP23-Weibchen (DUMONT *ET AL.* 2004), bei sechs Monate alten APP/PS1-Männchen (FILALI *ET AL.* 2011A) und bei 15- bis 20-monatigen männlichen Tg2576-Mäusen (LALONDE *ET AL.* 2003) sowie eine gesteigerte Unruhe bei 3xTg-AD-Weibchen ab 7,5 bis 11 Monaten (STERNICZUK *ET AL.* 2010) beschrieben ist. Dahingegen ist die Lokomotion bei TgCRND8-Weibchen sowohl im jungen als auch im hohen Alter gesteigert (WALKER *ET AL.* 2011). Obwohl die Lokomotion und Exploration bei transgenen 5xFAD-Männchen ab neun Monaten abnahm, konnte eine verstärkte Aktivität im Heimkäfig in den eigenen Untersuchungen beobachtet werden, welche insbesondere in der Dunkelphase ausgeprägt war. In dieser Phase sind Mäuse natürlicherweise auch aktiver als in der Hellphase (ADAMAH-BIASSI *ET AL.* 2013). Zudem wurde eine positive Korrelation zwischen der Aktivität im Heimkäfig und im Laufrad bei beiden Genotypen der 5xFAD-Männchen beobachtet, was auch bei anderen Mausstämmen beschrieben ist (ADAMAH-BIASSI *ET AL.* 2013). Somit scheint die gesteigerte Aktivität der transgenen 5xFAD-Männchen im Heimkäfig erst einmal im Gegensatz zu den

Ergebnissen zur Lokomotion im *Open field* zu stehen. Doch ergeben sich mitunter kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Lokomotion ein und desselben Modells. Die Testbedingungen sowie die Illumination und andere Parameter, wie verschiedene Gene spielen dabei eine entscheidende Rolle (YUK *ET AL.* 2009, WALKER *ET AL.* 2011). Bei anderen Alzheimer-Mausmodellen konnte auch eine erhöhte Aktivität im Heimkäfig beobachtet werden, beispielsweise bei Tg2576-Männchen ab zehn Monaten (KISHIMOTO *ET AL.* 2013) oder bei TgCRND8-Mäusen ab vier Monaten (RICHTER *ET AL.* 2008). Bei diesen Mäusen ist die Aktivität allerdings im *Open field*-Test und im Heimkäfig gesteigert. Allgemein kann eine erhöhte Aktivität bei transgenen Alzheimermäusen als Rastlosigkeit und Unruhe gedeutet werden, wohingegen eine gesenkte Aktivität mit anderen nicht-kognitiven Symptomen wie einer Apathie und Depression in Zusammenhang gebracht werden kann (WALKER *ET AL.* 2011). Demnach weisen 5xFAD-Alzheimermännchen im hohen Alter Zustände der Unruhe in einer vertrauten Umgebung, aber auch der Apathie auf. Die mit der Alzheimer-Krankheit einhergehenden apathischen Zustände werden sowohl mit einem reduzierten Dopamingehalt als auch mit einer gesenkten Dopamin-D2-Rezeptor-Expression verknüpft, was bereits in post-mortem untersuchten Gehirnen von Alzheimer-Betroffenen nachgewiesen wurde (LANCTÔT *ET AL.* 2013). Auch bei den transgenen 5xFAD-Männchen konnte im Rahmen der hier durchgeführten Analysen eine Veränderung im Dopamin-System festgestellt werden, welche sich in einer tendenziellen Reduktion des DAT im PFC widerspiegelte. Zwar kann hinsichtlich der DAT-Anzahl nur Bezug auf den PFC genommen werden, doch ist es durchaus denkbar, dass dies auch auf andere Gehirnstrukturen bei der 5xFAD-Maus, wie beispielsweise dem Striatum oder Nacc übertragen werden kann. Schon LANCTÔT *ET AL.* (2013) wiesen eine reduzierte Aufnahmeaktivität des DAT nach, der ebenso in engem Zusammenhang mit den apathischen Zuständen von Demenzpatienten gebracht wird.

#### *Kognitive Verhaltensbeeinträchtigungen – räumliches Lernen und Gedächtnis*

Neben den nicht-kognitiven Symptomen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das mit der Alzheimer-Krankheit einhergehende Kardinalsymptom der Lern- und Gedächtnisabnahme untersucht. Dabei zeigten die hier durchgeführten Analysen im *Morris water maze* erstmals, dass transgene 5xFAD-Männchen im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-transgenen Geschwistertieren signifikante Lerndefizite aufwiesen. Mögliche Rückschlüsse der erhöhten Latenzzeit auf eine beeinträchtigte Motorik können ausgeschlossen werden, weil transgene 5xFAD-Männchen keine Defizite der geschwommenen Strecke und Geschwindigkeit zeigten. URANO UND TOHDA (2010) konnten bei weiblichen 5xFAD-Mäusen ebenso

Beeinträchtigungen in der Akquise im *Morris water maze* im Alter von sieben bis neun Monaten nachweisen. In einer anderen Studie von OHNO ET AL. (2006) wurden die ersten räumlichen Lerndefizite im *Morris water maze* ab vier bis sechs Monate beobachtet, allerdings wurde in dieser Arbeit keine Angabe über das Geschlecht der Tiere gemacht. Zudem beobachteten sie lediglich, dass sich die Wildtypiere während des Gedächtnistests länger im Zielquadranten aufhielten als im gegenüberliegenden Quadranten, d.h. wo die Plattform während des Trainings lokalisiert war. Sie wiesen aber keine Verschlechterung der Lernkurve während der Akquisitionsphase per se nach. Außerdem erfolgten die Versuche unter anderen Testbedingungen (OHNO ET AL. 2006). Andere Alzheimer-Modelle entwickeln Lern- und Gedächtnisdefizite in sehr unterschiedlichen Altersstadien. Während sehr frühe Defizite bei der PDAPP-Maus ab drei bis vier Monate (KOBAYASHI UND CHEN 2005) bzw. bei weiblichen APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup>-Alzheimermäusen ab 3,5 Monate (ZHANG ET AL. 2012) beobachtet wurden, treten die ersten Beeinträchtigungen bei männlichen TgCRND8-Mäusen ab 4,5 bis fünf Monaten (HYDE ET AL. 2005), bei PS1KO-Mäusen ab fünf bis acht Monaten (KOBAYASHI UND CHEN 2005) und bei 3xTg-Alzheimermäusen ab sechs Monaten auf (BILLINGS ET AL. 2005). Bei Tg2576-Männchen zeichnen sich altersbedingte Defizite ab zehn (KISHIMOTO ET AL. 2013), bei APP/PS1-Männchen ab zwölf Monaten (FILALI ET AL. 2011B) und bei APP23-Weibchen ab 24 Monaten ab (DUMONT ET AL. 2004). Ein direkter Vergleich der verschiedenen Arbeiten gestaltet sich als schwierig, da die Resultate neben den abweichenden Testeinstellungen maßgeblich durch unkontrollierbare Auswirkungen beeinflusst werden, die durch den Experimentator und zahlreiche mit den klassischen, kognitiven Verhaltenstests einhergehende Stimuli und Situationen verursacht werden (MECHAN ET AL. 2009). Bei der Interpretation der Daten ist zudem zu berücksichtigen, dass die Leistung im *Morris water maze* vom Alter, Geschlecht und von Stammesunterschieden abhängt. Alte Mäuse zeigen eine schlechtere Leistung als junge Mäuse, während Männchen besser sind als Weibchen (BROMLEY-BRITS ET AL. 2011). Daneben schwimmen Mäuse weniger gut als Ratten (SHARMA ET AL. 2010) und neigen vermehrt zum Gleiten im Wasser. Ferner zeigen gestresste Tiere eine schlechtere Lernleistung im *Morris water maze* (BROMLEY-BRITS ET AL. 2011). Daher wurden stressverursachende Umweltfaktoren, wie beispielsweise die Temperatur, Licht und Lärm über die Dauer der Experimente überwacht und konstant gehalten. Dennoch verursacht der Versuch sicherlich Stress bei Mäusen, weil sie prinzipiell keine natürlichen Schwimmer sind (SHARMA ET AL. 2010). Doch nach der subjektiven Einschätzung und Messung des Schwimmverhaltens der 5xFAD-Männchen war der Großteil der Tiere bis auf vereinzelte Ausnahmen weder schwimmmotorisch

beeinträchtigt, noch fehlte ihnen die Motivation für das Schwimmen. Ferner wird die Wahrscheinlichkeit einer Verhaltensantwort durch die Entfernung bzw. Vermeidung eines negativen Ereignisses erhöht (negative Verstärkung, OLESON UND CHEER 2012). Somit heißt schnelles Lernen eine zügige Meidung der Stresssituation, was der Lernmotivation der Mäuse zuträglich sein könnte. Demnach ist das *Morris water maze* auch für Mäuse ein geeigneter Test, um Lernen zu indizieren. Darüber hinaus bietet es die Vorteile, olfaktorische Reize zu überdecken und die Adaption der Bedingungen einfach zu handhaben (SHARMA ET AL. 2010).

#### *Kognitive Verhaltensbeeinträchtigung – konditionierte Angst*

Der zweite sehr gut beschriebene Test zur Untersuchung des Lernverhaltens bei Alzheimermäusen stellt das *Fear conditioning* dar. Sehr ausführliche Analysen zur kontextabhängigen Angstkonditionierung der 5xFAD-Maus wurden von KIMURA UND OHNO (2009), OHNO (2009) und KIMURA ET AL. (2010) durchgeführt. Sie konnten die ersten Defizite bei transgenen Mäusen bereits mit sechs Monaten feststellen. Die publizierten Daten zu den beginnenden Lernbeeinträchtigungen bei der 5xFAD-Maus konnten in den relevanten Tests des *Fear conditioning* durch die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse nicht gestützt werden. Selbst neun Monate alte transgene Tiere zeigten keine Beeinträchtigungen. Ein Aspekt, der hier einen entscheidenden Einfluss verüben könnte, war die verwendete Stromstärke von 500  $\mu\text{A}$ , die möglicherweise zu niedrig war. In den publizierten Studien zum *Fear conditioning* bei der 5xFAD-Maus wurden 700  $\mu\text{A}$  und mehr angewandt (KIMURA UND OHNO 2009, KACZOROWSKI ET AL. 2011, KIM ET AL. 2013). Wahrscheinlich sind tatsächlich 1000  $\mu\text{A}$  nötig, um eine bessere Erinnerungsfestigung bei der 5xFAD-Maus zu gewährleisten. Überdies erfolgten die eigenen Messungen organisationsbedingt in verschiedenen Laborräumen, womit die Versuchsbedingungen nicht konstant waren. Dass vor allem unterschiedliche Labore einen erheblichen Einfluss auf das Verhalten gleicher Mausstämme haben können, konnten schon CRABBE ET AL. (1999) nachweisen. Sie verglichen exakt dieselben Mausstämme in identischen Apparaturen, unter Anwendung standardisierter Testprotokolle und konstanten Umweltfaktoren, doch das Verhalten der Mäuse war in allen Tests verschieden (CRABBE ET AL. 1999). Zudem haben der Experimentator sowie die Tages- und Jahreszeit einen prominenten Einfluss auf die Ergebnisse. Dennoch werden auch bei anderen Alzheimer-Mausmodellen Veränderungen in der Angstkonditionierung beschrieben, wie z.B. bei APP23- (VLOEBERGHES ET AL. 2007), APP/PS1- (KNAFO ET AL. 2009) und 3xTg-AD-Männchen (ESPAÑA ET AL. 2010) sowie bei Tg2576-Weibchen (RUSTAY ET AL. 2010) oder

CRND8-Mäusen (HANNA *ET AL.* 2012). Somit ist dieser Test prinzipiell gut geeignet, um Verhaltensdefizite bei Alzheimer-Mausmodellen zu indizieren.

#### **4.1.4 5xFAD-Männchen als Verhaltensmodell zur Untersuchung der Alzheimer-Krankheit**

Für die humane Alzheimer-Krankheit gibt es bisher keine vollkommenen Tiermodelle. Vielmehr können mit derzeitigen Mausmodellen lediglich Schwerpunkte der Krankheit dargestellt werden (ITTNER UND GÖTZ 2011). Prinzipiell ist der Vergleich von Tests zwischen Maus und Mensch strittig. Mäuse sind nicht befähigt, sich zu artikulieren, können also nicht direkt interviewt werden und Versuche, bei denen Patienten in einem Labyrinth oder Wasserbassin lernen, wurden bisher nicht umgesetzt. Dennoch ist die Grundlagenforschung an Tiermodellen zum Verständnis der Krankheitsmechanismen durchaus sinnvoll. In Hinblick auf die Literatur wird offensichtlich, dass das 5xFAD-Mausmodell für immunhistochemische oder molekulare Untersuchungen präferiert wird (ANTONIOS *ET AL.* 2013, BOBKOVA *ET AL.* 2013, BROWER *ET AL.* 2013, BUSKILA *ET AL.* 2013, CROUZIN *ET AL.* 2013, CROWE UND ELLIS-DAVIES 2013, EIMER UND VASSAR 2013, HU *ET AL.* 2013, OU-YANG *ET AL.* 2013, REINHARDT *ET AL.* 2013). Die sehr schnelle Entwicklung der Plaque-Pathologie und damit verbundenen Neuroinflammation sind der Grund für die bevorzugten Untersuchungen. Zu Verhaltensstudien an diesem Modell wurden in jüngster Zeit nur wenige Daten zur Exploration und zum Gedächtnis im *Y-maze* (HÉRAUD *ET AL.* 2013), zum räumlichen Lernen und Gedächtnis im *Radial arm maze* (AYTAN *ET AL.* 2013, FIOL-DEROQUE *ET AL.* 2013) und im *Morris water maze* (ZHANG *ET AL.* 2013) sowie zum kontextabhängigen *Fear conditioning* (DEVI UND OHNO 2013A, B, KIM *ET AL.* 2013) ergänzend zu anderen Analysen publiziert. Dennoch sind Verhaltensuntersuchungen, die auf Genotyp-spezifischen Unterschieden basieren, bei der 5xFAD-Maus möglich, sobald Beeinträchtigungen ab sechs Monaten bei transgenen Weibchen (JAWHAR *ET AL.* 2012) bzw. neun Monaten bei transgenen Männchen (eigene Beobachtungen) zuverlässig auftreten (Tab. 3 und 4).

Obwohl sich die meisten Verhaltensstudien bei Alzheimer-Tiermodellen maßgeblich auf die kognitiven Beeinträchtigungen beziehen, beschäftigten sich einige wenige Studien mit dem nicht-kognitiven Verhalten, wie beispielsweise der Ängstlichkeit, eine allgemein neuropsychiatrische Eigenschaft der Alzheimer-Krankheit (YUK *ET AL.* 2009). Auch bei transgenen 5xFAD-Männchen konnten mit den durchgeführten Untersuchungen nicht-kognitive Beeinträchtigungen, wie eine reduzierte Ängstlichkeit, motorische Defizite, eine

Rigidität der Pfoten, fehlende Reflexe und/oder eine Beeinträchtigung des Nestbaus ab neun Monaten festgestellt werden. Dieses Verhalten der Mäuse kann durchaus auf das Verhalten von Patienten übertragen werden. Denn mit zunehmender Progression der Alzheimer-Krankheit können auch am Patienten vermehrt körperliche Gebrechen und emotionale Störungen beobachtet werden. Emotionale Änderungen äußern sich vor allem in Form von Depressionen und Apathie sowie im Gegensatz dazu in unruhigem Verhalten. Oftmals überlappen sich sowohl die Apathie und Unruhe bei ein und demselben Patienten (FILALI *ET AL.* 2011A). Mit steigendem Alter konnten auch bei 5xFAD-Männchen apathische und/oder unruhige Verhaltensweisen dokumentiert werden. Prinzipiell kann eine exzessive lokomotorische Aktivität, ob in Form von Laufradaktivität, Kreislaufen oder Springen ein genereller, phänotypischer Marker für das Voranschreiten der Alzheimer-Pathologie sein. So wurde eine Hyperaktivität auch bei anderen Alzheimer-Modellen beobachtet (WALKER *ET AL.* 2011).

Weiterhin konnten mit der vorliegenden Arbeit sensomotorische und sensorische Beeinträchtigungen bei 5xFAD-Männchen nachgewiesen werden, die mit den für Alzheimer symptomatischen motorischen Störungen einhergehen (VELASQUES *ET AL.* 2011). Jedoch waren die sensorischen Defizite auch bei den nicht-transgenen Geschwistertieren zu verzeichnen. Dieser Befund war wichtig für die Durchführung der *Fear conditioning*-Versuche. Im *Fear conditioning*-Test selbst konnten die in der Literatur beschriebenen, etablierten Beeinträchtigungen der transgenen 5xFAD-Mäuse nicht bestätigt werden. Indessen konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals mit Hilfe der altersabhängigen *Water maze*-Untersuchungen belegt werden, dass räumliche Lernbeeinträchtigungen bei 5xFAD-Männchen mit neun Monaten evident waren. In diesem Alter ist eine Maus zwar fortgeschritten gealtert, dennoch existieren andere Alzheimer-Modelle, die die ersten nachweisbaren räumlichen Defizite weitaus später ab zwölf und mehr Monaten ausbilden.

Ein zusätzlicher Vorteil der 5xFAD-Maus ist die sehr gute Fruchtbarkeit (eigene Beobachtungen). Während andere Alzheimer-Modelle mitunter zu einer erhöhten postnatalen Mortalität neigen können, stellt dieser Sachverhalt bei der 5xFAD-Maus kein Problem dar. Ein letzter, bedeutungsvoller Punkt, der für die 5xFAD-Maus spricht, ist die nachgewiesene Vergleichbarkeit der nicht-transgenen 5xFAD-Wildtypiere mit dem gesunden nicht-manipulierten Hintergrundstamm B6SJLF1/J. Somit unterscheidet sich die 5xFAD-Mauslinie klar in kranke transgene Tiere und gesunde nicht-transgene Wildtypiere. Angesichts der aufgeführten Aspekte stellen 5xFAD-Männchen ab neun Monaten somit ein erprobtes Modell zur Untersuchung der mit der Alzheimer-Krankheit einhergehenden Verhaltensdefizite dar.

**Tab. 3: Übersicht zu den Verhaltensdefiziten transgener 5xFAD-Männchen (tg) im Vergleich zu nicht-transgenen Geschwistertieren (n-tg).** Während nicht-transgene 5xFAD-Mäuse in ihrem Verhalten dem B6SJLF1/J-Hintergrund entsprechen, weisen transgene 5xFAD-Mäuse eine reduzierte Ängstlichkeit, eine verminderte Lokomotion und Exploration und Beeinträchtigungen im räumlichen Lernen ab neun Monaten auf. Das räumliche Gedächtnis und die Angstkonditionierung waren bis einschließlich neun Monate nicht verändert. „↓“... Abnahme bzw. Verschlechterung, „0“... keine Veränderung

Verhalten von 5xFAD-♂♂				
Ängstlichkeit <i>(Elevated plus maze)</i>	Lokomotion & Exploration <i>(Open field)</i>	räumliches Lernen <i>(Morris water maze)</i>	räumliches Gedächtnis	Angst-konditionierung <i>(Fear conditioning)</i>
entspricht dem Hintergrundstamm B6SJLF1/J				
n-tg				
tg	↓ (9 Mo)	↓ (9 Mo)	↓ (9 Mo)	0
	nicht-kognitiv		kognitiv	

**Tab. 4: Charakterisierung und Verhalten männlicher 5xFAD-Mäuse im Vergleich zu anderen repräsentativen transgenen Alzheimer-Mausmodellen. ▼...Verminderung/Verschlechterung, ▲...Erhöhung**

Test	5xFAD-♂♂	APP/PS1	3xTg-AD	APP23	Tg2576	TgCRND8
<b>Plaques</b>	ab 2 Mo	ab 3 Mo	ab 6 Mo	ab 6 Mo	ab 9 Mo	ab 3-5 Mo
Referenz		WANG <i>ET AL.</i> 2012	STERNICZUK <i>ET AL.</i> 2010	KOBAYASHI UND CHEN 2005	LEE UND HAN 2013	KOBAYASHI UND CHEN 2005
<b>Mikroglia</b>	ab 3 Mo	vorhanden	vorhanden		vorhanden	vorhanden
Referenz		KRABBE <i>ET AL.</i> 2013, FAIVRE UND HÖLSCHER 2013	GHOSH <i>ET AL.</i> 2013		SIVILIA <i>ET AL.</i> 2013	KOBAYASHI UND CHEN 2005
<b>Phänotyp</b>	ab 9 Mo			späte Stadien		
<b>Motorik</b>	▼		normal (♀♀/7,5-11 Mo)	▼	▼	
<b>Reflexe</b>	fehlen					
<b>Pfoten</b>	rigide/ <i>Clasping</i>			<i>Clasping</i>	<i>Clasping</i>	
<b>Stereotypien</b>	Springen, Laufen, Saltos			myoklonisches Springen		
Referenz			STERNICZUK <i>ET AL.</i> 2010	LALONDE <i>ET AL.</i> 2012		
<b>Aktivität im Heimkäfig</b>	▲ ab 9 Mo				▲ ab 10 Mo	▲ ab 4 Mo
Referenz					KISHIMOTO <i>ET AL.</i> 2013	RICHTER <i>ET AL.</i> 2008
<b>Nestbau</b>	▼ ab 9 Mo	▼ (♂♂)				
Referenz		FILALI <i>ET AL.</i> 2011B				
<b>Sensomotorik</b>	▼ ab 3 Mo	▼ ab 7 Mo (♀♀)		keine ▼ (♀♀)		
<b>Sensorik</b>	▼ Schmerz-sensitivität ab 6 Mo		keine ▼ (♀♀/12-14 Mo)			
Referenz		WANG <i>ET AL.</i> 2012	FILALI <i>ET AL.</i> 2012	LALONDE <i>ET AL.</i> 2005		
<b>Elevated plus maze</b>	▼ Ängstlichkeit ab 9 Mo	keine Änderung bis 12-14 Mo (♂♂)	▲ Ängstlichkeit ab 7,5-11 Mo (♀♀)	▼ Ängstlichkeit ab 24 Mo (♀♀)	▼ Ängstlichkeit ab 15-20 Mo (♂♂)	
<b>Open field</b>	▼ Lokomotion und Exploration ab 9 Mo	▲ Aktivität mit 6 Mo (♂♂), ▼ Aktivität mit 14 Mo (♂♂)	▲ Unruhe ab 7,5-11 Mo (♀♀)	▼ Aktivität mit 3 Mo, ▲ Aktivität ab 24 Mo (♀♀)	▲ Aktivität ab 15-20 Mo (♂♂)	▲ Lokomotion (♀♀)
Referenz		KNAFO <i>ET AL.</i> 2009 FILALI <i>ET AL.</i> 2011A	STERNICZUK <i>ET AL.</i> 2010	DUMONT <i>ET AL.</i> 2004 KOBAYASHI UND CHEN 2005	LALONDE <i>ET AL.</i> 2003	WALKER <i>ET AL.</i> 2011
<b>Morris water maze</b>	▼ des räumlichen Lernens ab 9 Mo	▼ Lernen ab 12 Mo (♂♂)	▼ des Gedächtnisses ab 6 Mo	Defizite in der Akquise ab 24 Mo (♀♀)	Defizite ab 10 Mo (♂♂)	Lerndefizite ab 4,5-5 Mo (♂♂)
Referenz		FILALI <i>ET AL.</i> 2011B	BILLINGS <i>ET AL.</i> 2005	DUMONT <i>ET AL.</i> 2004	KISHIMOTO <i>ET AL.</i> 2013	HYDE <i>ET AL.</i> 2005
<b>Fear conditioning</b>	keine Beeinträchtigungen	▼ <i>Freezing</i> ab 12 Mo (♂♂)	▲ <i>Freezing</i> ab 6 Mo (♂♂)	▲ <i>Freezing</i> ab 6 Mo (♂♂)	▼ <i>Freezing</i> ab 6 Mo (♀♀)	▼ <i>Freezing</i> ab 12 Mo
Referenz		KNAFO <i>ET AL.</i> 2009	ESPAÑA <i>ET AL.</i> 2010	VLOEBERGHES <i>ET AL.</i> 2007	RUSTAY <i>ET AL.</i> 2010	HANNA <i>ET AL.</i> 2012

## 4.2 Pharmakologische Stimulation männlicher 5xFAD-Alzheimermäuse

Die 5xFAD-Maus diente betreffs der aussagekräftigen Voruntersuchungen als zuverlässiges Alzheimer-Modell für die nachfolgenden pharmakologischen Untersuchungen. Die pharmakologische Behandlung erfolgte bei der 5xFAD-Maus zunächst in dem Alter, in welchem die Lern- und Gedächtnisdefizite bei transgenen Tieren anfangen aufzutreten. Bezugnehmend auf die Literatur und aufgrund erster empirischer Beobachtungen war klar zu definieren, dass die 5xFAD-Maus mit sechs Monaten die ersten Verhaltensdefizite aufweist (KIMURA UND OHNO 2009, OHNO 2009, DEVI UND OHNO 2010A, KIMURA *ET AL.* 2010, DEVI UND OHNO 2012A, B, JAWHAR *ET AL.* 2012). Allerdings konnten die Unterschiede in einem Alter von sechs Monaten bei Männchen der 5xFAD-Maus im Rahmen der hier angewendeten Verhaltenstests statistisch nicht abgesichert werden. Daher wurde für die pharmakologische Behandlung zusätzlich das Alter von neun Monaten gewählt, in welchem die Beeinträchtigungen bei transgenen 5xFAD-Männchen signifikant auftraten.

### *Voraussetzung für die pharmakologische Stimulation*

Zu Beginn der Untersuchungen wurde geprüft, ob eine pharmakologische Stimulation des dopaminergen Systems im Alter von neun Monaten sinnvoll ist, wenn die verhaltensbiologischen Beeinträchtigungen zuverlässig auftreten. Dazu wurden die funktionellen Dopamin-Neurone analysiert, indem die TH- und AADC-positiven Neurone in der VTA quantifiziert wurden. Diese Doppelmarkierung wurde vorgenommen, da nach BJÖRKLUND UND DUNNETT (2007) der immunhistochemische Nachweis von TH-Enzymen allein kein zuverlässiger Beweis zur Identifizierung von Dopamin-Neuronen ist, auch wenn er der sensitivste und zugänglichste Marker ist. So existieren TH-positive Zellen, die keine detektierbaren Catecholamine enthalten und denen auch das decarboxylierende Enzym (AADC) sowie der vesikuläre Monoamintransporter VMAT-2 fehlen. Das bedeutet, um TH-positive Neurone zuverlässig als funktionstüchtige Dopamin-produzierende Neurone zu identifizieren (BJÖRKLUND UND DUNNETT 2007), mussten sie zugleich eine positive Färbung der AADC aufweisen. Die Untersuchung zeigte, dass keine quantitativen Änderungen in der Anzahl TH- und AADC-positiver Neurone bei 5xFAD-Männchen bis zu einem Alter von neun Monaten vorlagen. Es waren somit ausreichend Neurone vorhanden, die auf eine Stimulation ansprechen könnten. Eine Untersuchung von KALININ *ET AL.* (2011) zeigte ebenso, dass sich die Anzahl TH-positiver Neurone in der VTA und auch in der SN zwischen

transgenen 5xFAD-Männchen und nicht-transgenen Geschwistertieren in einem Alter von sechs Monaten nicht unterscheidet. Indessen können TH-positive Neurone in der SN altersabhängig abgebaut werden, was auf einer Herabregulation der TH-Enzyme basiert (BJÖRKLUND UND DUNNETT 2007). Möglicherweise tritt dieser Abbau der Enzyme in der VTA bei der 5xFAD-Maus erst zu einem späteren Zeitpunkt auf. De facto war die Stimulation mit MPH bei 5xFAD-Männchen im vorgesehenen Alter von sechs und neun Monaten möglich, da eine ausreichende Anzahl funktioneller Neurone vorhanden war.

### *Methylphenidat-Applikation*

Für die Art der Applikation war zu beachten, dass die Wirkung von MPH von der Applikationsform abhängig ist, d.h. peroral vs. intraperitoneal (i.p.) vs. subcutan (s.c, BALCIOGLU *ET AL.* 2009, MARCO *ET AL.* 2011). Patienten nehmen MPH meist oral ein, die intranasale Einnahme ist jedoch nicht unüblich. Es wird aber auch von einer intravenösen Applikation berichtet (YANO UND STEINER 2007). An Tierstudien konnte gezeigt werden, dass eine i.p.- oder s.c.-Administration zu größeren molekularen Effekten führt als eine Gabe über den Mund (YANO UND STEINER 2007). Zudem hat eine i.p.-Verabreichung von MPH generell eine stärkere und schnellere Wirkung als eine orale Administration (YANG *ET AL.* 2007). Infolgedessen fiel die Wahl auf die i.p.-Injektion. Außerdem wurde so die Handhabung möglichst einfach gehalten und die Durchführung des Spritzens erfolgte recht zügig, sodass die Tiere weniger Stress ausgesetzt waren.

Die Applikationsform ist entscheidend für die zu verwendende Dosis des Medikamentes. Beim Menschen beträgt die therapeutische Konzentration von MPH zwischen 5-20 ng/ml und die orale Dosis zwischen 0,2 und 0,8 mg/kg (YANO UND STEINER 2007). Ungeachtet der unterschiedlichen Stoffwechselrate zwischen Mensch und Ratte (Mensch < Ratte) beträgt die intragastrische Dosis bei Ratten 5 mg/kg und macht sie somit vergleichbar mit humanen Konzentrationen (YANO UND STEINER 2007). Die i.p.-Dosis sollte weniger als 5 mg/kg betragen. Studien mit 5 mg/kg (i.p. oder s.c.) und höher zeigten bei adulten Ratten und Mäusen molekulare Änderungen. Heranwachsende sprachen bereits auf 2 mg/kg an (YANO UND STEINER 2007). Um eine geeignete Konzentration für die pharmakologische Stimulation zu manifestieren, wurde sich an der Arbeit von KODA *ET AL.* (2010) orientiert. Sie konnten nachweisen, dass eine MPH-Konzentration von 3 mg/kg bei der Maus erste steigernde Effekte auf den Dopamingehalt im PFC hat (KODA *ET AL.* 2010). Davon ausgehend wurde sich zuerst auf 3 mg/kg konzentriert. Niedrige MPH-Dosen erhöhen zudem die Kognition durch den selektiven Anstieg der Neurotransmitter im PFC, ohne die lokomotorische Aktivität zu

beeinflussen (URBAN UND GAO 2013). Allerdings verursachte die hier angewendete Dosis von 3 mg/kg MPH eine Erhöhung der Lokomotion bei 5xFAD-Männchen (siehe 4.2.1, *Beeinflussung der Lokomotion und Exploration durch Methylphenidat*). Später wurden aber auch 10 mg/kg getestet, welche eine sehr hohe Dosis für MPH darstellen. Doch die eigenen empirischen Daten zeigten auf, dass die 5xFAD-Maus oftmals höhere Reize benötigte, um eine Verhaltensreaktion hervorzurufen. Daneben reagieren Mäuse im Vergleich zu Ratten weniger sensitiv auf Psychostimulanzien (KODA ET AL. 2010), d.h., bei Mäusen sind wahrscheinlich höhere Dosen nötig, um eine Reaktion in der Physiologie zu erreichen. Prinzipiell gestaltet es sich aber als sehr schwierig, die optimale Konzentration für eine Stimulation zu eruieren, denn eine bestmögliche Medikation ist von den individuellen Symptomen und Bedürfnissen abhängig (ARNSTEN 2011).

#### **4.2.1 Einfluss von Methylphenidat auf das Verhalten von 5xFAD-Männchen**

Trotz allem verursacht MPH eine Vielzahl von Verhaltensänderungen, die denen von Kokain und Amphetaminen ähneln (YANO UND STEINER 2007, DOW-EDWARDS ET AL. 2008). Unter Berücksichtigung der Inkubationszeit von MPH bei der Maus (KODA ET AL. 2010) wurden die Verhaltensversuche etwa 45 Minuten nach der Injektion durchgeführt. Grundsätzlich konnte zuerst beobachtet werden, dass die Lokomotion im *Open field* zwischen transgenen und nicht-transgenen mit NaCl-behandelten Kontrolltieren im Alter von neun Monaten nicht mehr signifikant verschieden zueinander war. Die Lokomotion der Vehikeltiere wich im Vergleich zu den unbeeinflussten 5xFAD-Tieren desselben Genotyps aus den vorausgehenden Untersuchungen minimal ab. In diesem Kontext ist zu bedenken, dass die Vehikeltiere vermehrtem Stress ausgesetzt waren, da sie zusätzlich gespritzt wurden. Ein Stressor (in dem Fall die Injektion) ist mit einem hohen Maß emotionaler Erregung sowie mit stereotypen Mustern physiologischer Antworten verbunden, wie ein erhöhter Ausstrom des Corticotropin-releasing Hormons, des Adrenocorticotropen Hormons und von Corticosteronen/Cortisol. Diese haben profunde Effekte auf das periphere System und unterstützen den Organismus in stressigen Situationen (CABIB ET AL. 2012), was durch eine veränderte Lokomotion indiziert werden könnte. Zudem kann Stress gewohnte Reaktionen beeinflussen (CABIB ET AL. 2012). Studien haben gezeigt, dass Tiere in Experimenten unterschiedliche Strategien nutzen, um mit kontrollierbaren und nicht-kontrollierbaren Stressoren umzugehen. Kontrollierbare Stressoren verursachen die Entwicklung und Konsolidierung spezifischer, defensiver Antworten, wie z.B. ein *Freezing*-, Flucht- und Vermeidungsverhalten. Dagegen implizieren unkontrollierbare Stressoren eine gewisse Hilflosigkeit, die dadurch charakterisiert ist, dass die Stressquelle

nicht entfernt oder vermieden wird (CABIB *ET AL.* 2012). Das bedeutet, dass das Verhalten der Tiere, die eine Injektion erhielten, aufgrund der zusätzlichen Handhabung der Applikation mit einer nicht-wirksamen Substanz durchaus Abweichungen vom Verhalten unbehandelter Tiere aufweisen kann und erlaubt.

#### *Beeinflussung der Lokomotion und Exploration durch Methylphenidat*

Dennoch konnte das Verhalten bei der 5xFAD-Maus durch die Applikation von MPH beeinflusst werden. Während 3 und 10 mg/kg MPH die Lokomotion der transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Männchen in beiden Altersstufen steigerten, war die Exploration nur bei den sechs Monate alten transgenen und nicht-transgenen Männchen durch beide Dosen MPH erhöht. Lediglich 10 mg/kg MPH erhöhten die Exploration bei neun Monate alten transgenen Mäusen. Durch die Administration von MPH wird der DAT blockiert, womit ein Anstieg des extrazellulären Dopamins verursacht wird. Dieser Anstieg könnte postsynaptische Dopamin-Rezeptoren in motorischen Nuclei aktivieren und somit aktivierende Effekte der Motorik fördern (YANG *ET AL.* 2006). Es besteht ein breiter Konsens, dass MPH die lokomotorische Aktivität (IZENWASSER *ET AL.* 1999, RHODES UND GARLAND 2003, NICULESCU *ET AL.* 2005, CARMACK *ET AL.* 2014B) und Exploration (CARREY *ET AL.* 2000, MCFADYEN-LEUSSIS *ET AL.* 2004, MIORANZZA *ET AL.* 2010, NIIMI *ET AL.* 2011) maßgeblich erhöht. GOMES *ET AL.* (2009) postulieren, dass MPH als entscheidender Modulator im *Open field* fungieren kann. Neben der Lokomotionssteigerung im *Open field* konnte mit den durchgeführten Untersuchungen auch eine Erhöhung der Aktivität im Heimkäfig, nicht jedoch im Laufrad, bei 5xFAD-Männchen im Alter von neun Monaten nach der Applikation der hohen Dosis von 10 mg/kg MPH beobachtet werden. Allerdings war der wesentliche Effekte der Substanz bei transgenen Tieren später zu verzeichnen als bei nicht-transgenen Geschwistertieren. Möglicherweise ist die tendenziell reduzierte Anzahl des DAT bei transgenen 5xFAD-Männchen für die unterschiedlichen Aktivitätsmaxima von Bedeutung. Aufgrund der gesenkten Anzahl der Transporter verbleibt Dopamin länger im synaptischen Spalt, infolgedessen es ein erhöhtes Signalvorkommen am Rezeptor und somit eine längere Wirkungsdauer hat. Wenn zudem vielleicht noch Beeinträchtigungen im Dopamin-Rezeptorsystem auftreten, könnten diese Umstände zu einem späteren Aktivitätsmaximum von MPH bei transgenen Mäusen führen.

*Beeinflussung des nicht-assoziativen Lernens und Gedächtnisses durch Methylphenidat*

Weiterhin wurden die Lokomotion und Exploration im *Open field* über mehr als vier Stunden ausschließlich bei nicht-transgenen 5xFAD-Tieren beider Altersstufen beeinflusst. Dabei hielt der Effekt der erhöhten Lokomotion und Exploration von 3 mg/kg bis zu vier Stunden und der von 10 mg/kg bis 24 Stunden nach der Injektion an. Normalerweise weisen unbeeinflusste, gesunde junge und alte Mäuse in wiederholten Messungen eine geringere Lokomotion und Exploration in einer bekannten *Open field*-Umgebung auf (AMMASSARI-TEULE *ET AL.* 1994). Diese Habituation kann als Gedächtnis gewertet werden (PLATEL UND PORSOLT 1982). Während bei unbeeinflussten nicht-transgenen und transgenen 5xFAD-Männchen demnach keine Beeinträchtigungen des Erinnerungsvermögens im *Open field* zu beobachten waren, könnte die vergleichsweise einmalige Injektion von MPH auf eine Hemmung des nicht-assoziativen Lernens und somit des Gedächtnisses bei nicht-transgenen Männchen hinweisen, die sich in der Konzentration von 3 mg/kg auf das Kurzzeitgedächtnis und in der hohen Konzentration von 10 mg/kg sogar auf das Langzeitgedächtnis auswirkte. Dass die physiologische Wirkung von MPH bereits nach drei bis vier Stunden vorüber war, wurde durch die eigenen Aktivitätsbeobachtungen im Heimkäfig nachgewiesen. Die Aktivität war nach dieser Zeit wieder auf ihr Minimum gesenkt, womit ein Einfluss von MPH auf die Lokomotion und Exploration per se ausgeschlossen werden kann. KODA *ET AL.* konnten schon 2010 mittels Mikrodialysemessungen nachweisen, dass der durch MPH erhöhte Dopamingehalt im PFC und Nacc drei Stunden später wieder auf dem Ausgangsniveau war, was auf einen Abbau der Substanz innerhalb dieses Zeitraumes hindeuten könnte. Daneben scheint MPH in Abhängigkeit des Genotyps eine unterschiedliche Wirkung bei 5xFAD-Männchen zu haben. Auch in einer aktuellen Studie von HEYSER *ET AL.* (2013) am DARPP-32-knockout-Mausmodell war die Gedächtnisleistung bei den Wildtypgeschwistertieren im *Recognition memory*-Test nach der Verabreichung von MPH verschlechtert. Dagegen wurden die Gedächtnisdefizite der Knockout-Mäuse durch die Vorbehandlung mit MPH aufgehoben (HEYSER *ET AL.* 2013). Um die Ergebnisse zum Einfluss von MPH auf das Lernen und Gedächtnis bei 5xFAD-Männchen weiter zu erhärten, wurden die Befunde der eigenen *Morris water maze*- und *Fear conditioning*-Untersuchungen herangezogen.

*Beeinflussung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses durch Methylphenidat*

In den durchgeführten Untersuchungen zur pharmakologischen Stimulation im *Morris water maze* konnten signifikante Beeinträchtigungen des räumlichen Lernens und Gedächtnisses bei den transgenen 5xFAD-Kontrolltieren im Alter von neun Monaten nachgewiesen werden. Vermutlich trug die stressverursachende Injektion dazu bei, dass die bereits tendenziell dokumentierten Gedächtnisdefizite der transgenen Mäuse aus den Voruntersuchungen bei den gespritzten, transgenen Kontrolltieren jetzt spezifisch auftraten. Es ist bekannt, dass stressinduzierte Glucocorticoide, die räumlich orientierte, kognitive Leistungsfähigkeit, die Gedächtniskonsolidierung und das Abrufen von Erinnerungen beeinflussen (MECHAN ET AL. 2009). Zudem waren die Lerndefizite der alten, transgenen 5xFAD-Mäuse während der Akquise im *Morris water maze* abermals evident. Wiederholt zeigte sich auch, dass die Schwimmmotorik bei alten Mäusen in diesem Test nicht beeinträchtigt war, sodass die Beeinträchtigungen wesentlich auf das abnehmende Gedächtnis zurückzuführen sind. MPH selbst bewirkte lediglich bei den transgenen Tieren im Alter von sechs Monaten eine Verkürzung der Latenzzeit zur Lokalisation der Plattformregion im Test-Trial 17, was auf eine positive Beeinflussung des Gedächtnisses zurückzuführen ist. Somit konnten beginnende räumliche Gedächtnisdefizite durch MPH in hohen Dosen aufgehoben werden. Bei alten, transgenen Tieren waren allerdings keine Besserungen der bestehenden Beeinträchtigungen eruierbar. Indes wurde das räumliche Lernen nicht-transgener 5xFAD-Männchen durch MPH in der Konzentration von 3 mg/kg zum Teil verschlechtert. Demzufolge könnte auf altersabhängige und wiederholt auf Genotyp-spezifische Veränderungen im Dopamin-System bei 5xFAD-Männchen geschlossen werden. Als Ursache dafür könnte neben der vermuteten Reduktion der DAT transgener Mäuse auch das Dopamin-Rezeptorsystem verändert sein, was letztlich mit zu den Beeinträchtigungen des Lernens und Gedächtnisses führen könnte. Womöglich könnte eine reduzierte Expression oder eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit der D1-Typ-Rezeptoren in Abhängigkeit des Alters eine Rolle einnehmen, sodass nicht mehr ausreichend Dopamin an die Rezeptoren binden kann, um so seine lernunterstützende Funktion zu erfüllen. Bezüglich des Einflusses von MPH auf die Lernleistung im *Morris water maze* bei der Maus oder auch bei der Ratte werden recht gegensätzliche Postulate aufgestellt. Einerseits wird gleichermaßen berichtet, dass MPH keinen Einfluss auf die Lernleistung bei Mäusen im *Morris water maze* hat (CARREY ET AL. 2000, MCFADYEN ET AL. 2002), andererseits soll MPH das Arbeitsgedächtnis (SPENCER ET AL. 2012) sowie die Akquise des Lernens verbessern (CARMACK ET AL. 2014A). GUO ET AL. (2012) postulierten, dass zwar die Lernleistung während des Trainings bei der SHR-Ratte durch die

wiederholte Gabe von MPH nicht beeinflusst werden konnte, doch war das Gedächtnis verbessert. Dieser Befund kann durch HUANG UND HUANG (2012) bestätigt werden, die eine Verbesserung des Gedächtnisses im *Morris water maze* und auch im kontextabhängigen *Fear conditioning* nach einer MPH-Applikation bei Neurogranin-knockout-Mäusen beobachten konnten. Dennoch wurden Defizite bei mutierten Mäusen nicht vollständig aufgehoben, bei nicht-transgenen Geschwistertieren war nur ein minimaler Effekt auszumachen (HUANG UND HUANG 2012). Dagegen gibt es sogar Studien, die eine Verschlechterung des räumlichen Referenz- und Arbeitsgedächtnisses im *Morris water maze* nachweisen, was mit einer Senkung der BDNF-Expression (BDNF: *brain derived neurotrophic factor*) und einer Erhöhung der Acetylcholinesterase-Aktivität im PFC einhergeht (SCHERER ET AL. 2010). Ein Vergleich der Arbeiten erweist sich jedoch als schwierig, da keine einheitliche Versuchsdurchführung besteht. Zudem wurden unterschiedliche Tiergattungen (d.h. Maus und Ratte) getestet. Dessen ungeachtet könnte die Dauer der Applikation eine mögliche Ursache für die fehlende Wirkung von MPH auf die Lern- und Gedächtnisdefizite im *Morris water maze* im späten Stadium von neun Monaten bei 5xFAD-Männchen sein. Eine akute MPH-Administration bewirkte lediglich einen temporären Anstieg der Dopaminkonzentration im PFC (KODA ET AL. 2010). Ferner wirkt MPH weniger spezifisch als beispielsweise selektive D1-Agonisten, da es neben dem dopaminergen auch das noradrenerge System beeinflusst (FERREIRA ET AL. 2010). Das noradrenerge System ist bei vielen Hirnfunktionen von Bedeutung, Arousal, Aufmerksamkeit, Stimmung, Lernen und Gedächtnis sowie Stressreaktionen inbegriffen. Eine Stimulation des Belohnungssystems erhöht zwar vor allem den Dopamingehalt, doch können die belohnenden Effekte nicht allein durch eine Stimulation von Dopamin erklärt werden. So konnte in klinischen Studien bereits nachgewiesen werden, dass adrenerge Blocker zur vielversprechenden Behandlung von Kokainmissbrauch und -abhängigkeit genutzt wurden (SOFUOGLU UND SEWELL 2009). Weiterhin ist die Tageszeit der Behandlung für die Ergebnisse von Bedeutung. Da die Versuchstiere tagsüber stimuliert wurden, Mäuse jedoch nachtaktiv sind, fielen die Versuchsserien in die Schlafphase der Tiere. Dies könnte sich auch auf die Lernleistung auswirken. Eine Inversion der Lichtverhältnisse und damit des circadianen Rhythmus hätte wahrscheinlich einen Einfluss auf die Verhaltensergebnisse. Nachteilig wäre hier aber gewesen, dass die Versuche dennoch bei Licht erfolgt wären. Das wiederum hätte zusätzlichen Stress auf die circadiane Rhythmik der Mäuse induziert. Daneben sind die Resultate unter den definierten Umständen (d.h. tagsüber Licht an) mit den Literaturdaten vergleichbarer, da die meisten Verhaltensversuche in der Hellphase erfolgen.

*Beeinflussung der Angst und Ängstlichkeit durch Methylphenidat*

Der ursprüngliche Gedanke, dass *Fear conditioning* in den Fokus der Untersuchungen zu stellen, konnte durch die negativen Voruntersuchungen zu den altersabhängigen Effekten der Angstkonditionierung schnell revidiert werden. Doch konnten einzelne Effekte von MPH im *Fear conditioning*-Test nachgewiesen werden. Bereits während des Trainings verursachten 10 mg/kg MPH eine Reduktion des *Freezing* bei sechs und neun Monate alten transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Männchen. Vermutlich substituierte die durch die Substanz verursachte Hyperaktivität das *Freezing*-Verhalten. Es ist bekannt, dass der Umfang des beobachteten Verhaltens sinkt, wenn die Dosis des Psychostimulans erhöht wird. Sehr hohe Konzentrationen können unter Umständen sogar Stereotypien verursachen. Dazu gehören ständige Wiederholungen motorischer Aktivitäten, wie Schnüffeln oder Beißen (BERKE UND HYMAN 2000). Höhere Dosen MPH (5-10 mg/kg) aktivieren willkürlich andere Regionen, was zu einem so hohem Dopamin- und Noradrenalinegehalt führt, dass dadurch neuronale Funktionen im PFC unterdrückt und eine Hyperaktivität und Stereotypien induziert werden können (URBAN UND GAO 2013). Weiterhin war die konditionierte Angst im kontextabhängigen Test durch die sehr hohe Dosis von 10 mg/kg MPH bei nicht-transgenen 5xFAD-Mäusen im Alter von sechs und neun Monaten reduziert. Dieser Effekt war auch im tonabhängigen Test bei transgenen Tieren im Alter von sechs Monaten eruiert. Infolgedessen ist es denkbar, dass MPH entweder die Ängstlichkeit per se beeinflusst oder aber das Angstgedächtnis beeinträchtigt. Da im *Elevated plus maze* jedoch keine Änderungen der Ängstlichkeit nach der Verabreichung von MPH beobachtbar waren, kann daraus gefolgert werden, dass MPH bei 5xFAD-Männchen keinen Einfluss auf die natürliche Ängstlichkeit hat, wohl aber in hohen Dosen eine Verminderung des kontextabhängigen Angstgedächtnisses bei gesunden 5xFAD-Geschwistertieren und des tonabhängigen Angstgedächtnisses bei transgenen 5xFAD-Mäusen bewirkt. Auch CARMACK ET AL. (2014B) dokumentierten eine Hemmung des Angstgedächtnisses nach der Verabreichung von 10 mg/kg MPH, während sie eine Verbesserung bei der Dosis von 1 mg/kg MPH beobachteten. Eine kurzzeitige Steigerung der Angst (und damit positiven Beeinflussung des Angstgedächtnisses) konnten von BETHANCOURT ET AL. (2009, 2011) durch 5 mg/kg MPH nachgewiesen werden. Die Beobachtungen zum Einfluss von MPH auf die natürliche Ängstlichkeit im *Elevated plus maze* sind diskrepant. Einerseits hat MPH keinen Einfluss auf die Ängstlichkeit (CARMACK ET AL. 2014B), demgegenüber soll MPH zu einer Erhöhung der Ängstlichkeit (BRITTON ET AL. 2007, FERREIRA ET AL. 2010, CRAWFORD ET AL. 2013) bzw. zu einer Minderung bis Auflösung der Ängstlichkeit führen (CARREY ET AL. 2000, MCFADYEN-

LEUSSIS *ET AL.* 2004, KOIKE *ET AL.* 2009, MIORANZZA *ET AL.* 2010). Für die Interpretation der Beeinflussung der Ängstlichkeit könnte noch die reduzierte Aufenthaltsdauer der alten, transgenen 5xFAD-Männchen im Zentrum des Feldes im *Open field*-Test nach der Injektion von 3 und 10 mg/kg MPH sprechen. Bereits sechs Monate alte transgene und nicht-transgene 5xFAD-Männchen hielten sich nach dem Erhalt von 10 mg/kg MPH weniger im Zentrum des *Open field* auf. Dies könnte letztlich als steigender Einfluss auf die Ängstlichkeit interpretiert werden. Dieser Effekt kann aber mit der verstärkten Lokomotion und Exploration nach der MPH-Verabreichung erklärt werden, zumal es in Ecken und an Wänden weitaus mehr zu untersuchen gibt als auf einer offenen Fläche.

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum Einfluss von MPH auf die Lernleistung am Tier bieten Studien am Menschen keine hinreichenden Beweise für die Verbesserung der akademischen Lernleistung gesunder Personen durch MPH. Es gibt keine Belege, dass die Erinnerung oder das assoziative Lernen gesteigert wird (FINGER *ET AL.* 2013). WOOD *ET AL.* (2013) definieren „akademisches Doping“ allgemein lediglich als „die Nutzung von Stimulanzien zur Besserung der Lernleistung, indem die Aufmerksamkeit erhöht und die Notwendigkeit von Schlaf gesenkt wird“. Dies trifft auch auf MPH zu, doch die Erwartungen zur Effizienz dieses Medikamentes übersteigern die tatsächliche Beeinflussung (FINGER *ET AL.* 2013). Die Meinung der College-Studenten zum positiven Effekt von MPH auf die akademische Leistung basiert nach FINGER *ET AL.* (2013) auf Informationen der Medien und auf der Meinung von Freunden. Andererseits ist man sich einig, dass MPH ein kognitiver Verstärker ist und es auf dem Schwarzmarkt an Schulen und Universitäten häufig verkauft wird. MPH wird neben Studenten auch von militärischem Personal, Ärzten und Anwälten genutzt (URBAN UND GAO 2013). Eine Studie von LINSSEN *ET AL.* (2013) zeigte, dass zwar das räumliche Arbeitsgedächtnis bei gesunden, freiwilligen Teilnehmern nicht beeinflusst wurde, wohl aber andere Gedächtnisleistungen, wie die Sternberg-Gedächtnisaufgabe, ein Test zur Messung des Arbeitsgedächtnisses. Bei Nagern hingegen wird die ganze Bandbreite vom positiven über gar keinen bis hin zum negativen Effekt von MPH auf das Lernen berichtet. Unter Umständen liegen die unterschiedlichen Postulate darin begründet, dass MPH den humanen Dopamin-Transporter vier Mal potenter zu inhibieren vermag als den murinen Transporter (HAN UND GU 2006). Das bedeutet, mögliche resultierende Verhaltenseffekte können bei vergleichbaren Dosen bei Mäusen weniger sensitiv ausgeprägt sein als beim Menschen. Dies wiederum trägt dazu bei, dass die typisch beim Menschen beobachteten Effekte ausschließlich auch dort zu verzeichnen sind. Dem gegenüber könnte die große

Bedeutung von Dopamin beim Lernen und Gedächtnis für Tiere spezifisch sein, weil die Motivation eine bedeutende Rolle während der Verhaltenstests spielt (MYHRER 2003).

#### **4.2.2 Aufhebung Alzheimer-symptomatischer Defizite durch Methylphenidat**

Bisher existieren keine systematischen Studien zum Einfluss von MPH auf das Lernverhalten bei Alzheimer-Patienten oder -Tiermodellen. Der Schwerpunkt der Arbeit stellte erstmals die Untersuchung zum Einfluss von MPH auf Lern- und Gedächtnisdefizite bei einem Alzheimer-Mausmodell dar. MPH hatte sehr unterschiedliche Effekte bei nicht-transgenen und transgenen 5xFAD-Mäusen (Tab. 5). Bei nicht-transgenen 5xFAD-Männchen wurde ein negativer Einfluss von 3 mg/kg MPH auf das Kurzzeit- und von 10 mg/kg MPH sogar auf das Langzeiterinnerungsvermögen im *Open field*-Test im Alter von sechs und neun Monaten und von 3mg/kg MPH auf das räumliche Lernen im Alter von neun Monaten nachgewiesen (Tab. 5, 9 Mo). Zudem wurde auch das konditionierte Angstgedächtnis in Abhängigkeit des Kontextes bei gesunden Geschwistertieren im Alter von sechs und neun Monaten und in Abhängigkeit des Tons bei transgenen 5xFAD-Männchen im Alter von sechs Monaten durch 10 mg/kg MPH reduziert. Da gleichzeitig die natürliche Ängstlichkeit nicht beeinflusst wurde, impliziert dies eine Beeinträchtigung des Angstgedächtnisses durch hohe Dosen MPH. Weiterhin wurden bestehende Beeinträchtigungen des räumlichen Lernens und Gedächtnisses bei transgenen 5xFAD-Männchen durch MPH nicht verbessert (nicht aufgeführt). Dagegen wurde ein positiver Einfluss von 10 mg/kg MPH auf das räumliche Gedächtnis bei ausschließlich beginnenden Defiziten transgener 5xFAD-Männchen nachgewiesen (Tab. 5, 6 Mo). Daneben konnte ein eindeutig steigender Effekt von MPH auf die Lokomotion und Exploration bei transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Männchen beobachtet werden. Dieser Effekt war bereits in dem Alter beobachtbar, in welchem die Defizite bei transgenen Mäusen begannen aufzutreten. Demzufolge können nicht-kognitive Defizite, wie die mit der Alzheimer-Krankheit einhergehenden apathischen Zustände durch MPH aufgehoben werden. Über die Senkung der Apathie durch MPH bei Demenzpatienten wird bereits berichtet, obwohl das Ausmaß und die Dauer eines Effektes noch nicht geklärt sind (DOLDER *ET AL.* 2010, PADALA *ET AL.* 2010, LANCTÔT *ET AL.* 2013).

**Tab. 5: Übersicht zum Einfluss von MPH auf das Verhalten transgener (tg) und nicht-transgener (n-tg) 5xFAD-Männchen.** Bei nicht-transgenen 5xFAD-Männchen verschlechterte MPH die Habituation im *Open field*-Test sechs- und neunmonatiger Tiere sowie das räumliche Lernen im *Morris water maze* neunmonatiger Männchen (9 Mo) und das kontextabhängige Angstgedächtnis im *Fear conditioning* sechs- und neunmonatiger Versuchstiere. Auch bei transgenen 5xFAD-Männchen wurde das Angstgedächtnis im Alter beginnender Defizite (sechs Monate) verschlechtert. Die Ängstlichkeit im *Elevated plus maze* wurde bei beiden Genotypen nicht beeinflusst. Auf bestehende räumliche Gedächtnisdefizite im Alter von neun Monaten hatte MPH keinen Einfluss (nicht aufgeführt). Jedoch wurde das räumliche Lernen positiv beeinflusst, als die kognitiven Defizite bei transgenen 5xFAD-Männchen mit sechs Monaten anfangen aufzutreten (6 Mo). Zudem erhöhte MPH die Lokomotion und Exploration beider Altersstufen und senkte so die apathischen Zustände transgener 5xFAD-Männchen. „+“... Steigerung bzw. Verbesserung, „-“... Abnahme bzw. Verschlechterung, „0“... kein Einfluss

		5xFAD-♂♂ + MPH				
	Lokomotion & Exploration ( <i>Open field</i> )	Habituation ( <i>Open field</i> )	räumliches Lernen ( <i>Morris water maze</i> )	Angst- konditionierung ( <i>Fear conditioning</i> )	Ängstlichkeit ( <i>Elevated plus maze</i> )	
n-tg	+	-	-(9 Mo)	0	-	0
tg	+	0	0	+(6 Mo)	-	0
		nicht-assoziatives Lernen	räumliches Lernen / Gedächtnis	Angstgedächtnis		
	nicht-kognitiv	kognitiv			nicht-kognitiv	

Aus den durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen ergeben sich somit vier wesentliche Folgerungen:

- (1) Transgene und nicht-transgene 5xFAD-Männchen haben verschiedene Sensitivitäten auf MPH, was möglicherweise auf die tendenziellen Veränderungen im DAT-System der transgenen 5xFAD-Männchen zurückzuführen ist. Unterschiedliche Sensitivitäten auf MPH wurden auch in Abhängigkeit vom Alter beobachtet.
- (2) Bei nicht-transgenen 5xFAD-Männchen hat MPH hauptsächlich einen negativen Einfluss auf Lernen und Gedächtnis.
- (3) Bei transgenen 5xFAD-Männchen konnten beginnende räumliche Gedächtnisdefizite durch MPH reduziert werden und
- (4) MPH verringert die apathischen Zustände, die mit der Alzheimer-Krankheit einhergehen können.

### 4.3 Ausblick

Ein Punkt, der sich aber mit der Fortführung der vorliegenden Arbeit befassen könnte, ist die Untersuchung von Fehlfunktionen in den Schaltkreisen, die dem nicht-assoziativen Lernen und dem räumlichen Lernen und Gedächtnis zugrunde liegen. Da MPH bei transgenen Mäusen zwar keinen Effekt auf die Habituation, wohl aber auf das räumliche Gedächtnis hatte, kann eine unterschiedliche Verschaltung dieser Lern- und Gedächtnisformen geschlussfolgert werden. Alzheimer-abhängige Beeinträchtigungen in diesen Systemen könnten eingehender untersucht werden. Andere Studien zu MPH könnten sich zudem auf molekulare Untersuchungen konzentrieren, denn MPH verursacht zahlreiche molekulare Effekte auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren, Neuropeptide, zellulären Signalmoleküle oder auch der Genregulation (YANO UND STEINER 2007). Solche Untersuchungen könnten zweifellos zum weiteren Verständnis des Einflusses von MPH und von molekularen Fehlfunktionen bei der Alzheimer-Krankheit beitragen. Daneben bedürfen Langzeitstudien mit chronischer MPH-Applikation ebenso großer Aufmerksamkeit. Stichworte wie eine „Sensibilisierung“ und „Toleranz“ nach einer wiederholten MPH-Applikation sollten nicht gänzlich missachtet werden (YANG *ET AL.* 2007). Auch müssten bei einer chronischen Behandlung Nebeneffekte abgeklärt werden, wie beispielsweise Wachstumshemmung, Übelkeit, Schlafstörungen, Ängstlichkeit, Ticks und kardiovaskuläre Risiken (CARMACK *ET AL.* 2014B). Denkbare, weiterführende Arbeiten, die sich allgemein mit der Anregung des Lernens über das Dopamin-System bei Alzheimer befassen, könnten sich auch auf den Einsatz von Dopamin-Agonisten beziehen. Beispielsweise findet Piribedil als relativ selektiver D2/D3-Dopamin-Agonist bereits Anwendung bei der Parkinson-Krankheit (THOBOIS *ET AL.* 2013) und wies in klinischen Studien eine Verbesserung der Kognition bei älteren Patienten mit leichter kognitiver Beeinträchtigung (MCI) auf (MARIGHETTO *ET AL.* 2008, COOPER *ET AL.* 2013). Oder Bromocriptin, als primärer Stimulator der D2- und D3-Rezeptoren, verbesserte die Spannweite des Arbeitsgedächtnisses bei C57BL/6N-Mäusen (TARANTINO *ET AL.* 2011). In einer anderen Studie wurde der Einfluss von Levodopa (Arzneistoff von L-DOPA) auf die kognitiven Defizite bei der CRND8-Alzheimermaus untersucht. Mit Levodopa behandelte, transgene Tiere zeigten ein deutlich besseres Gedächtnis als Kontrolltiere (AMBRÉE *ET AL.* 2009).

#### 4.4 Schlussfolgerung

Ein Aspekt, der bei Studien am Patienten berücksichtigt werden muss, ist die Schwierigkeit, von systematischen Studien auf den einzelnen Patienten zu schließen. Es ist wichtig, die individuellen Symptome und Bedürfnisse des Patienten zu berücksichtigen. Darüber hinaus ist die Alzheimer-Krankheit eine Erkrankung, welche hinsichtlich ihrer Kausalität als auch Symptome sehr vielseitig ist. Doch wurde hier zunächst die Beeinflussung der Leitsymptome der Lern- und Gedächtnisabnahme eingehender untersucht. Zuerst sollte festgehalten werden, dass MPH in vor allem hohen Dosen zu einer Verschlechterung des Lernens und Gedächtnisses bei gesunden 5xFAD-Geschwistertieren führte. Bei transgenen 5xFAD-Männchen konnten die Gedächtnisdefizite nur ausgebessert werden, als die Beeinträchtigungen mit sechs Monaten gerade anfangen aufzutreten. Gesehen den Fall, die Ergebnisse zu den Untersuchungen an der 5xFAD-Maus lassen sich auf den Patienten übertragen, dann ist es fraglich, ob mit der Diagnose der Alzheimer-Krankheit per se nicht bereits der Zeitpunkt überschritten ist, um gegebenenfalls rechtzeitig therapeutisch einzugreifen. Ein späterer Therapieansatz, d.h. wenn der oder die Betroffene als Demenzpatient/in mit fortgeschrittenen Alzheimer-Symptomen deklariert ist, würde möglicherweise keine Besserung erbringen. Bereits DOLDER *ET AL.* (2010) berichteten, dass Psychostimulanzien nur einen geringen bis gar keinen Einfluss auf die Kognition bei Demenzpatienten haben und sie somit keine weitläufig effektive Behandlungsmethode für kognitive Symptome zu sein scheinen. Insofern ist MPH zwar nicht geeignet, um Alzheimer-typische Lern- und Gedächtnisdefizite im fortgeschrittenen Stadium aufzuheben, doch könnte eine Behandlung mit MPH unter Umständen im frühen Stadium der Krankheit begonnen werden, um kognitive Beeinträchtigungen temporär zu therapieren. Zudem kann das mit Alzheimer einhergehende nicht-kognitive Verhalten der Apathie positiv beeinflusst werden, sodass allein dadurch für die Patienten und deren Angehörige ein Stück Lebensqualität zurückgewonnen werden könnte. Wenn eines Tages die Auslösemechanismen der Alzheimer-Demenz therapierbar werden, würde eine symptomatische Behandlung an Bedeutung gewinnen. Sollte schließlich eine MPH-Behandlung als therapeutischer Ansatz Anwendung finden, so muss unbedingt der Einfluss einer chronischen Behandlung untersucht werden, um erdenkliche negative Einflüsse auf das Gehirn zuverlässig auszuschließen.

## 5 Zusammenfassung

Untersuchungen zum Einfluss von Psychostimulanzien auf die Symptome der Alzheimer-Krankheit gibt es bisher nur in Form von Einzelfallstudien. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den pharmakologischen Einfluss von Methylphenidat (MPH) auf die Alzheimer-typischen Lern- und Gedächtnisdefizite bei männlichen 5xFAD-Alzheimermäusen zu untersuchen.

Zunächst wurden die Männchen der 5xFAD-Linie in Voruntersuchungen charakterisiert, da in den bisherigen Studien vornehmlich Weibchen untersucht wurden. Es wurde bestätigt, dass 5xFAD-Mäuse eine sehr schnelle und ausgeprägte Plaque-Pathologie und Neuroinflammation entwickelten, erstmals auftretend mit zwei Monaten. Ab neun Monaten wiesen transgene Männchen Beeinträchtigungen im räumlichen Lernen auf sowie nicht-kognitive Defizite, wie eine Reduktion der natürlichen Ängstlichkeit, des Lokomotions- und Explorationsverhaltens. Eine mögliche Ursache für das reduzierte Lokomotions- und Explorationsverhalten transgener Mäuse könnte die nachgewiesene tendenziell reduzierte Anzahl der Dopamin-Transporter sein, wie sie bereits im jungen Alter der Männchen zu beobachten war. Weiterhin konnten bei männlichen transgenen 5xFAD-Mäusen Beeinträchtigungen der sensomotorischen Fähigkeiten ab neun Monaten nachgewiesen werden sowie phänotypische Veränderungen ab neun bis zwölf Monaten, welche sich durch apathische und/oder unruhige Verhaltensweisen sowie Defizite der Motorik und des reflexiven Verhaltens manifestierten.

Diese Ergebnisse waren die Grundlage zur Untersuchung des Einflusses von MPH auf die mit der Alzheimer-Krankheit einhergehenden Verhaltensdefizite. Die Untersuchungen stellten die erste systematische Studie zum pharmakologischen Einfluss des Psychostimulans MPH auf die Lern- und Gedächtnisleistung *in vivo* bei einem Alzheimer-Mausmodell dar. Die notwendige Voraussetzung der hinreichenden Anzahl funktionstüchtiger, dopaminerger Neurone für die pharmakologische Stimulation bei 5xFAD-Tieren war bis ins Alter von neun Monaten erfüllt. MPH hatte unterschiedliche Effekte auf das nicht-kognitive und kognitive Verhalten bei transgenen und nicht-transgenen 5xFAD-Männchen. Bei nicht-transgenen 5xFAD-Männchen verursachte MPH eine Hemmung des Erinnerungsvermögens im *Open field*-Test im Alter von sechs und neun Monaten, des räumlichen Lernens im Alter von neun Monaten und des kontextabhängigen Angstlernens im Alter von sechs und neun Monaten. Auch bei sechs Monate alten transgenen 5xFAD-Männchen wurde das tonabhängige Angstlernen gehemmt. MPH hatte hingegen keinen Einfluss auf die Ängstlichkeit beider Genotypen oder auf bestehende räumliche Lern- und Gedächtnisdefizite mit neun Monaten im *Morris water maze*. Jedoch konnten beginnende räumliche Gedächtnisdefizite sechs Monate

alter transgener Mäuse durch MPH verringert werden. Auch die Lokomotion wurde bei transgenen und nicht-transgenen Mäusen im Alter von sechs und neun Monaten durch MPH gesteigert. Dagegen wurde die Exploration bei transgenen Tieren im Alter von sechs und neun Monaten und bei nicht-transgenen Mäusen nur im Alter von sechs Monaten erhöht.

Obwohl MPH nur zu einer Verminderung beginnender Gedächtnisdefizite bei transgenen 5xFAD-Männchen führte, jedoch ein positiver Einfluss des Medikamentes auf nicht-kognitive Beeinträchtigungen wie die Apathie als weitverbreitete Störung der Alzheimer-Krankheit nachgewiesen wurde, ist es möglicherweise nicht völlig abwegig, dieses Psychostimulans als temporäres Therapeutikum zur Behandlung von Verhaltensbeeinträchtigungen einzusetzen, die noch mit der Alzheimer-Krankheit einhergehen. Denn selbst wenn die Alzheimer-Krankheit in ihrem Fortschreiten nicht aufgehalten werden kann, so kann den Patienten zumindest ein kleines Stück Lebensqualität zurückgegeben werden, indem apathische Zustände vermindert werden können.

## Summary

Up to now only single case studies of the influence of psychostimulants on symptoms of Alzheimer's disease are known. The aim of the present study was to examine the pharmacological influence of methylphenidate (MPH) on Alzheimer's typical learning and memory deficits in male 5xFAD mice.

First of all the behavioral pre-analyses of 5xFAD males was done, since in most studies only females of this strain were characterized. The very rapid and pronounced plaque pathology and neuroinflammation starting at two months of age were confirmed in transgenic 5xFAD mice. At nine months transgenic mice showed impairments in spatial learning and non-cognitive deficits like a decreased anxiety and a reduced locomotion and explorative behavior. A possible reason for this reduced locomotion and exploration in transgenic mice might be the reduced number of DAT by trend which was already found in young males. Further transgenic 5xFAD mice had disturbances of sensorimotor abilities at nine months of age and they revealed changes in their phenotype at nine to twelve months of age which included apathetic and/or agitated behavior as well as impairments in the motor abilities and in their reflexes.

These results were the basis for investigations of the influence of MPH on behavioral deficits which accompany with Alzheimer's disease. This was the first systematic study to investigate the effect of MPH on learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. The precondition of a sufficient number of functioning dopaminergic neurons for the pharmacological stimulation of 5xFAD mice was fulfilled until the age of nine months. MPH itself had different effects on cognitive and non-cognitive behavior in transgenic and non-transgenic 5xFAD males. In non-transgenic 5xFAD males, MPH inhibits the memory in the open field at six and nine months, the spatial learning in the Morris water maze at nine months as well as context dependent fear memory in the fear conditioning test at six and nine months of age. In transgenic males, tone dependent fear memory was impaired at six months of age. However, MPH had no influence on anxiety in both genotypes. Sustained spatial learning and memory deficits in the Morris water maze at nine months were also not influenced by MPH, whereas beginning memory deficits in six months old males were reduced. Further, MPH induced an increase of locomotion in transgenic and non-transgenic mice at six and nine months of age. In contrast the exploration was elevated in transgenic animals at six and nine months of age and in non-transgenic mice at six months of age.

---

Although MPH only reduced beginning memory deficits in transgenic 5xFAD mice and it had a positive influence on non-cognitive behavioral impairments like apathy as the most common behavioral problem in Alzheimer's disease, it might be a possible temporary therapeutic to treat symptoms of this disease. Even if it is not possible to impede the progress of the disease, at least patients could get back a little bit of quality of life by a reduction of apathy.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
AADC	Aromatische Aminosäuredecarboxylase
A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Protein
Abb.	Abbildung
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
AMPH	Amphetamine
Amy	Amygdala
Apo	Apolipoprotein
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AUC	<i>Area under curve</i>
B6	C57BL/6J-Kontrolltier
B6SJL	B6SJLF1/J-Hintergrundstamm
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
b.i.d.	zwei Mal pro Tag (lat.: bis in die)
C83/C99	C-terminale Fragment bestehend aus 83 bzw. 99 Aminosäuren
Cer	Cerebellum
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
CPS	Kryoprotektionslösung
CR	konditionierte Reaktion
CS	konditionierter Stimulus
C-Terminus	Terminus eines Proteins oder Polypeptids mit freier Carboxygruppe (COOH)
Ctx L5	Cortex Schicht 5

---

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol, dihydrochlorid
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-reguliertes Phosphoprotein (32 kDa)
DAT	Dopamin-Transporter
DNS	Eselserum
DPX	Mountant (Einbettmedium)
FAD	familiäre Alzheimer-Krankheit
FAD tg	transgene 5xFAD-Mäuse
FAD wt	nicht-transgene 5xFAD-Mäuse
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
Hpc	Hippocampus
Inj	Injektion
i.p.	intraperitoneal
K	Antikörperkontrollfärbung
LAS	Learning Analysis System
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LRP	low density lipoproteine receptor-related proteine
LTP	Langzeitpotenzierung
MAO	Monoaminoxidase
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i>
Mo	Monate
MPH	Methylphenidat (Hydrochlorid)
mVb	mediales Vorderhirnbündel
Nacc	Nucleus accumbens
NaCl	Natriumchlorid
Nbas	Nucleus basalis (Meynert)

---

NFTs	intrazelluläre Neurofibrillen
N-Terminus	Terminus eines Proteins oder Polypeptids mit freier Aminogruppe (NH <sub>2</sub> )
n-tg	nicht-transgen
OB	Riechkolben
PFA	Paraformaldehyd
PFC	Präfrontaler Cortex
PS1/PS2	Präsenilin 1/Präsenilin 2
Put	Putamen
s.c.	subcutan
SNc	Substantia nigra pars compacta
Sub	Subiculum
Tab.	Tabelle
tg	transgen
TH	Tyrosinhydroxylase
UR	unkonditionierte Reaktion
US	unkonditionierter Stimulus
Veh	Vehikel (0,9 % NaCl)
VMAT-2	vesikulärer Monoamintransporter 2
VTA	ventrales Tegmentum

## 7 Literaturverzeichnis

**Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y** (2007) Impairment in Consolidation of Learned Place Preference Following Dopaminergic Neurotoxicity in Mice is Ameliorated by N-acetylcysteine but not D1 and D2 Dopamine Receptor Agonists. *Neuropsychopharmacology*. 32 (3): 531-541

**Adamah-Biassi EB, Stepien I, Hudson RL, Dubocovich ML** (2013) Automated video analysis system reveals distinct diurnal behaviors in C57BL/6 and C3H/HeN mice. *Behav Brain Res*. 243: 306-312

**Aggarwal M, Hyland BI, Wickens JR** (2012) Neural control of dopamine neurotransmission: implications for reinforcement learning. *Eur J Neurosci*. 35 (7): 1115-1123

**Alcaro A, Huber R, Panksepp J** (2007) Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: An affective neuroethological perspective. *Brain Res Rev*. 56 (2): 283-321

**Ambrée O, Richter H, Sachser N, Lewejohann L, Dere E, de Souza Silva MA, Herring A, Keyvani K, Paulus W, Schäbitz WR** (2009) Levodopa ameliorates learning and memory deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 30 (8): 1192-1204

**Ammassari-Teule M, Fagioli S, Rossi-Arnaud C** (1994) Radial maze performance and open-field behaviours in aged C57BL/6 mice: further evidence for preserved cognitive abilities during senescence. *Physiol Behav*. 55 (2): 341-345

**Antonios G, Saiepour N, Bouter Y, Richard BC, Paetau A, Verkkoniemi-Ahola A, Lannfelt L, Ingelsson M, Kovacs GG, Pillot T, Wirths O, Bayer TA** (2013) N-truncated Aβ starting with position four: early intraneuronal accumulation and rescue of toxicity using NT4x-167, a novel monoclonal antibody. *Acta Neuropathol Commun*. 1 (1): 56

**Arnsten AFT** (2011) Catecholamine Influences on Dorsolateral Prefrontal Cortical Networks. *Biol Psychiatry*. 69 (12): e89-e99

**Aytan N, Choi JK, Carreras I, Kowall NW, Jenkins BG, Debeoglu A** (2013) Combination therapy in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 250: 228-238

**Balcioglu A, Ren JQ, McCarthy D, Spencer TJ, Biederman J, Bhide PG** (2009) Plasma and brain concentrations of oral therapeutic doses of methylphenidate and their impact on brain monoamine content in mice. *Neuropharmacology*. 57 (7-8): 687-693

**Beaulieu JM, Gainetdinov RR** (2011) The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev*. 63 (1): 182-217

**Benoit-Marand M, Ballion B, Borrelli E, Boraud T, Gonon F** (2011) Inhibition of dopamine uptake by D<sub>2</sub> antagonists: an *in vivo* study. *J Neurochemistry*. 116 (3): 449-458

- Berke JD, Hyman SE** (2000) Addiction, Dopamine, and the Molecular Mechanisms of Memory. *Neuron*. 25 (3): 515-532
- Berman JA, Talmage DA, Role LW** (2007) Cholinergic circuits and signaling in the pathophysiology of schizophrenia. *Int Rev Neurobiol*. 78: 193-223
- Bethancourt JA, Camarena ZZ, Britton GB** (2009) Exposure to oral methylphenidate from adolescence through young adulthood produces transient effects on hippocampal-sensitive memory in rats. *Behav Brain Res*. 202 (1): 50-57
- Bethancourt JA, Vásquez CE, Britton GB** (2011) Sex-dependent effects of long-term oral methylphenidate treatment on spontaneous and learned fear behaviors. *Neurosci Lett*. 496 (1): 30-34
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM** (2005) Intraneuronal A $\beta$  Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice. *Neuron*. 45 (5): 675-688
- Björklund A, Dunnett SB** (2007) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*. 30 (5): 194-202
- Blennow K, de Leon M, Zetterberg H** (2006) Alzheimer's disease. *Lancet*. 368 (9533): 387-403
- Bobkova NV, Garbuz DG, Nesterova I, Medvinskaya N, Samokhin A, Alexandrova I, Yashin V, Karpov V, Kukharsky MS, Ninkina NN, Smirnov AA, Nudler E, Evgen'ev M** (2013) Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 38 (2): 425-435
- Britton GB, Segan AT, Sejour J, Mancebo SE** (2007) Early Exposure to Methylphenidate Increases Fear Responses in an Aversive Context in Adult Rats. *Dev Psychobiol*. 49 (3): 265-275
- Bromley-Brits K, Deng Y, Song W** (2011) Morris Water Maze Test for Learning and memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. *J Vis Exp*. 53: e2920
- Brower CS, Piatkov KI, Vashavsky A** (2013) Neurodegeneration-Associated Protein Fragments as Short-Lived Substrates of the N-End Rule Pathway. *Mol Cell*. 50 (2): 161-171
- Burns A, Iliffe S** (2009) Alzheimer's disease. *BMJ*. 338: 467-471
- Buskila Y, Crowe SE, Ellis-Davis GC** (2013) Synaptic deficits in layer 5 neurons precede overt structural decay in 5xFAD mice. *Neuroscience*. 254: 152-159
- Cabib S, Campus P, Colelli V** (2012) Learning to cope with stress: psychobiological mechanisms of stress resilience. *Rev Neurosci*. 23 (5-6): 659-672
- Callier S, Snappyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, Vernier P** (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell*. 95 (7): 489-502

- Cannon CM, Bseikri MR** (2004) Is dopamine required for natural reward? *Physiol Behav.* 81 (5): 741-748
- Carmack SA, Block CL, Howell KK, Anagnostaras SG** (2014a) Methylphenidate enhances acquisition and retention of spatial memory. *Neurosci Lett.* 567: 45-50
- Carmack SA, Howell KK, Rasaei K, Reas ET, Anagnostaras SG** (2014b) Animal model of methylphenidate's long-term memory-enhancing effects. *Learn Mem.* 21 (2): 82-89
- Carrey N, McFadyen MP, Brown RE** (2000) Effects of subchronic methylphenidate hydrochloride administration on the locomotor and exploratory behavior of prepubertal mice. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 10 (4): 277-286
- Clark JJ, Hollon NG, Phillips PE** (2012) Pavlovian valuation systems in learning and decision making. *Curr Opin Neurobiol.* 22 (6): 1054-1061
- Cooper C, Li R, Lyketsos C, Livingston G** (2013) Treatment for mild cognitive impairment: a systematic review. *Br J Psychiatry.* 203: 255-264
- Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC** (1999) Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science.* 284 (5420): 1670-1672
- Crawford CA, Der-Ghazarian T, Britt CE, Varela FA, Kozanian OO** (2013) Novelty-induced conditioned place preference, sucrose preference, and elevated plus maze behavior in adult rats after repeated exposure to methylphenidate during the preweanling period. *Behav Brain Res.* 246: 29-35
- Crouzin N, Baranger K, Cavalier M, Marchalant Y, Cohen-Solal C, Roman FS, Khrestchatisky M, Rivera S, Féron F, Vignes M** (2013) Area-specific alterations of synaptic plasticity in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease: dissociation between somatosensory cortex and hippocampus. *PLoS ONE.* 8 (9): e74667
- Crowe SE, Ellis-Davies GC** (2013) Spine pruning in 5xFAD mice starts on basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons. *Brain Struct Funct.* 219 (2): 571-580
- Devi L, Alldred MJ, Ginsberg SD, Ohno M** (2010) Sex- and brain region-specific acceleration of  $\beta$ -amyloidogenesis following behavioral stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 3: 34
- Devi L, Ohno M** (2010a) Genetic reductions of  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and amyloid- $\beta$  ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *Eur J Neurosci.* 31 (1): 110-118

- Devi L, Ohno M** (2010b) Phospho-eIF2 $\alpha$  Level is Important for Determining Abilities of BACE1 Reduction to Rescue Cholinergic Neurodegeneration and Memory Defects in 5XFAD Mice. *PLoS One*. 5 (9): e12974
- Devi L, Ohno M** (2012a) 7,8-Dihydroxyflavone, a Small-Molecule TrkB Agonist, Reverses Memory Deficits and BACE I Elevation in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology*. 37 (2): 434-444
- Devi L, Ohno M** (2012b) Mitochondrial dysfunction and accumulation of the  $\beta$ -secretase-cleaved C-terminal fragment of APP in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 45 (1): 417-424
- Devi L, Ohno M** (2013a) Deletion of the eIF2 $\alpha$  Kinase GCN2 Fails to Rescue the Memory Decline Associated with Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 8 (10): e77335
- Devi L, Ohno M** (2013b) Effects of levetiracetam, an antiepileptic drug, on memory impairments associated with aging and Alzheimer's disease in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 102: 7-11
- Di Chiara G, Bassareo V** (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol*. 7 (1): 69-76
- Dickinson A** (1981) Conditioning and Associative Learning. *Br Med Bull* 37 (2): 165-168
- Dolder CR, Davis LN, McKinsey J** (2010) Use of psychostimulants in patients with dementia. *Ann Pharmacother*. 44 (10): 1624-1632
- Dow-Edwards DL, Weedon JC, Hellmann E** (2008) Methylphenidate improves performance on the radial arm maze in periadolescent rats. *Neurotoxicol Teratol*. 30 (5): 419-427
- Dumont M, Strazielle C, Staufenbiel M, Lalonde R** (2004) Spatial learning and exploration of environmental stimuli in 24-month-old female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res*. 1024 (1-2): 113-121
- Dziedzicka-Wasylewska M** (2004) Brain Dopamine Receptors-Research Perspectives and Potential Sites of Regulation. *Pol J Pharmacol*. 56 (6): 659-671
- Eimer WA, Vassar R** (2013) Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal A $\beta$ <sub>42</sub> accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener*. 8: 2
- España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Alvarez J, LaFerla FM, Saura CA** (2010) Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdale enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry*. 67 (6): 513-521
- Faivre E, Hölscher C** (2013) Neuroprotective effects of D-Ala2GIP on Alzheimer's disease biomarkers in an APP/PS1 mouse model. *Alzheimers Res Ther*. 5 (2): 20

- Fanselow MS, Poulos AM** (2005) The Neuroscience of Mammalian Associative Learning. *Annu Rev Psycho.* 56: 207-234
- Ferreira R, Bassi GS, Cabral A, Nobre MJ** (2010) Withdrawal from methylphenidate increases neural reactivity of dorsal midbrain. *Neurosci Res.* 68 (4): 290-300
- Filali M, Lalonde R, Rivest S** (2011a) Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APP<sup>swe</sup>/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav.* 104 (5): 880-885
- Filali M, Lalonde R, Rivest S** (2011b) Subchronic memantine administration on spatial learning, exploratory activity, and nest-building in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 60 (6): 930-936
- Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E** (2012) Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated *APP*, *PS1*, and *Mapt* (3xTg-AD). *Behav Brain Res.* 234 (2): 334-342
- Finger G, Da Silva E, R, Falavigna A** (2013) Use of methylphenidate among medical students: a systematic review. *Rev Assoc med Bras.* 59 (3): 285-289
- Fiol-Deroque MA, Gutierrez-Lanza R, Terés S, Torres M, Barceló P, Rial RV, Verkhatsky A, Escribá PV, Busquets X, Rodríguez JJ** (2013) Cognitive recovery and restoration of cell proliferation in the dentate gyrus in the 5XFAD transgenic mice model of Alzheimer's disease following 2-hydroxy-DHA treatment. *Biogerontology.* 14 (6): 763-775
- Franklin KBJ, Paxinos G:** The Mouse Brain. In Stereotaxic Coordinates. Third Edition Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg. 2007
- Freret T, Bouet V, Leconte C, Roussel S, Chazalviel L, Divoux D, Schumann-Bard P, Boulouard M** (2009) Behavioral Deficits After Distal Focal Cerebral Ischemia in Mice: Usefulness of Adhesive Removal Test. *Behav Neurosci.* 123 (1): 224-230
- Frey U, Hartmann S, Matthies H** (1989) Domperidone, an inhibitor of the D2-receptor, blocks a late phase of an electrically induced long-term potentiation in the CA1-region in rats. *Biomed Biochim Acta.* 48 (7): 473-476
- Frey U, Matthies H, Reymann KG, Matthies H** (1991) The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neurosci Lett.* 129 (1): 111-114
- Frey U, Schroeder H, Matthies H** (1990) Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 522 (1): 69-75

- Galynger I, Ieronimo C, Miner C, Rosenblum J, Vilkas N, Rosenthal R** (1997) Methylphenidate Treatment of Negative Symptoms in Patients With Dementia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 9 (2): 231-239
- German DC, Eisch A** (2004) Mouse Models of Alzheimer's Disease: Insights into Treatment. *Rev Neurosci.* 15 (5): 353-369
- Ghosh S, Wu MD, Shaftel SS, Kyrkanides S, LaFerla FM, Olschowka JA, O'Banion KM** (2013) Sustained Interleukin-1 $\beta$  Overexpression Exacerbated Tau Pathology Despite Reduced Amyloid Burden in an Alzheimer's Mouse Model. *J Neurosci.* 33 (11): 5053-5064
- Girault J-A, Greengard P** (2004) The Neurobiology of Dopamine Signaling. *Arch Neurol.* 61 (5): 641-644
- Götz J, Ittner LM, Schonrock N, Cappai R** (2008) An update on the toxicity of A $\beta$  in Alzheimer's. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 4 (6): 1033-1042
- Gomes KM, Souza RP, Valvassori SS, Réus GZ, Inácio CG, Martins MR, Comim CM, Quevedo J** (2009) Chronic Methylphenidate-Effects Over Circadian Cycle of Young and Adult Rats Submitted to Open-Field and Object Recognition Tests. *Curr Neurovasc Res.* 6 (4): 259-266
- Guo T, Yang C, Guo L, Liu K** (2012) A comparative study of the effects of ABT-418 and methylphenidate on spatial memory in an animal model of ADHD. *Neurosci Lett.* 528 (1): 11-15
- Han DD, Gu HH** (2006) Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol.* 6: 6
- Hanna A, Iremonger K, Das P, Dickson D, Golde T, Janus C** (2012) Age-related increase in amyloid plaque burden is associated with impairment in conditioned fear memory in CRND8 mouse model of amyloidosis. *Alzheimers Res Ther.* 4 (3): 21
- Hardy J, Selkoe J** (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science.* 297 (5580): 353-356
- Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, Adams KW, Takeda S, Banerji AO, Mitani A, Joyner D, Thyssen DH, Bacskai BJ, Frosch MP, Spires-Jones TL, Finn MB, Holtzman DM, Hyman BT** (2012) Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid  $\beta$  Peptide. *J Neurosci* 32 (43): 15181-15192
- Hauber W** (2010) Dopamine Release in the Prefrontal Cortex and Striatum: Temporal and Behavioural Aspects. *Pharmacopsychiatry.* 43 Suppl 1: S32-41
- Hazy TE, Frank MJ, O'Reilly RC** (2010) Neural Mechanisms Supporting Acquired Phasic Dopamine Responses in Learning: An Integrative Synthesis. *Neurosci Biobehav Rev.* 34 (5): 701-720

- Heise GA** (1984) Behavioral Methods for Measuring Effects of Drug on Learning and Memory in Animals. *Med Res Rev* 4 (4): 535-558
- Héraud C, Goufak D, Ando K, Leroy K, Suain V, Yilmaz Z, De Decker R, Authelet M, Laporte V, Octave JN, Brion JP** (2013) Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice. *Neurobiol Dis.* 27 (62C): 100-112
- Heyser CJ, McNaughton CH, Vishnevetsky D, Fienberg AA** (2013) Methylphenidate restores novel object recognition in DARPP-32 knockout mice. *Behav Brain Res.* 253: 266-273
- Hillmann A, Hahn S, Schilling S, Hoffmann T, Demuth HU, Bulic B, Schneider-Axmann T, Bayer TA, Weggen S, Wirths O** (2012) No improvement after chronic ibuprofen treatment in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 33 (4): 833.e39-50
- Holmes NM, Fam J** (2013) How Does Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Core Relate to Encoding of a Pavlovian Incentive Stimulus? *J Neurosci.* 33 (25): 10191-10192
- Holmes NM, Marchand AR, Coutureau E** (2010) Pavlovian to instrumental transfer: A neurobehavioural perspective. *Neurosci Biobehav Rev.* 34 (8): 1277-1295
- Houghton PJ, Howes MJ** (2005) Natural Products and Derivatives Affecting Neurotransmission Relevant to Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Neurosignals.* 14 (1-2): 6-22
- Hruska RE, Nowak MW** (1988): Estrogen treatment Increases the density of D<sub>1</sub> dopamine receptors in the rat striatum. *Brain Res.* 442 (2): 349-350
- Hu ZI, Kotarba AM, Van Nostrand WE** (2013) Absence of Nitric Oxide Synthase 3 Increases Amyloid  $\beta$ -Protein Pathology in Tg-5xFAD Mice. *Neurosci Med.* 4 (2): 84-91
- Huang FL, Huang KP** (2012) Methylphenidate improves the behavioral and cognitive deficits of neurogranin knockout mice. *Genes Brain Behav.* 11 (7): 794-805
- Hyde LA, Kazdoba TM, Grilli M, Lozza G, Brussa R, Zhang Q, Wong GT, McCool MF, Zhang L, Parker EM, Higgins GA** (2005) Age-progressing cognitive impairments and neuropathology in transgenic CRND8 mice. *Behav Brain Res.* 160 (2): 344-355
- Ilango A, Shumake J, Wetzel W, Scheich H, Ohl FW** (2012) The role of dopamine in the context of aversive stimuli with particular reference to acoustically signaled avoidance learning. *Front Neurosci.* 6: 132
- Ittner LM, Götz J** (2011) Amyloid- $\beta$  and tau – a toxic *pas de deux* in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 12 (2): 65-72
- Ivanova T, Beyer C** (2003) Estrogen Regulates Tyrosine Hydroxylase Expression in the Neonate Mouse Midbrain. *J Neurobiol.* 54 (4): 638-647

- Izenwasser S, Coy AE, Ladenheim B, Loeloff RJ, Cadet JL, French D** (1999) Chronic methylphenidate alters locomotor activity and dopamine transporters differently from cocaine. *Eur J Pharmacol.* 373 (2-3): 187-193
- Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O** (2012) Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A $\beta$  aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 33 (1): 196.e29-196.e40
- Jeziarski G, Zehle S, Bock J, Braun K, Gruss M** (2007) Early stress and chronic methylphenidate cross-sensitize dopaminergic responses in the adolescent medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *J Neurochem.* 103 (6): 2234-2244
- Johnson ML, Ho CC, Day AE, Walker QD, Francis R, Kuhn CM** (2010) Oestrogen Receptors Enhance Dopamine Neurone Survival in Rat Midbrain. *J Neuroendocrinol.* 22 (4): 226-237
- Kaczorowski CC, Sametsky E, Shah S, Vassar R, Disterhoft JF** (2011) mechanisms underlying basal and learning-related intrinsic excitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 32 (8): 1452-1465
- Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Sakharkar AJ, Pandey SC, Feinstein DL** (2011) The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 33 (8): 1651-1663
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM:** Neurowissenschaften. Eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg Berlin Oxford, 1996, S. 309
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM:** Principles of Neural Science. 4th Edition. Mc Graw Hill Companies: New York, 2000, S. 282-283, 892-893, 1009-1010
- Katsouri L, Georgopoulos S** (2011) Lack of LDL Receptor Enhances Amyloid Deposition and Decreases and Decreases Glial Responses in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *PLoS ONE* 6 (7): e21880
- Kim C, Nam DW, Park SY, Song H, Hong HS, Boo JH, Jung ES, Kim Y, Beak JY, Kim KS, Cho JW, Mook-Jung I** (2013) O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase inhibitor attenuates  $\beta$ -amyloid plaque and rescues memory impairments. *Neurobiol Aging.* 34 (1): 275-285
- Kimura R, Devi L, Ohno M** (2010) Partial reduction of BACE1 improves synaptic plasticity, recent and remote memories in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurochem.* 113 (1): 248-261
- Kimura R, Ohno M** (2009) Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol Dis.* 33 (2): 229-235

- Kirsch I, Lynn SJ, Vigorito M, Miller RR** (2004) The Role of Cognition in Classical and Operant Conditioning. *J Clin Psychol.* 60 (4): 369-392
- Kishimoto Y, Higashihara E, Fukuta A, Nagao A, Kirino Y** (2013) Early impairment in a water-finding test in a longitudinal study of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1491: 117-126
- Kittur S, Hauser P** (1999) Improvement of Sleep and Behavior by Methylphenidate in Alzheimer's Disease. *Am J Psychiatry.* 156 (7): 1116-1117
- Kleine B, Rossmannith WG:** Hormone und Hormonsystem. Eine Endokrinologie für Biowissenschaftler. 1. Auflage. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2007, S. 88-90
- Knab AM, Lightfoot JT** (2010) Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine system? *Int J Biol Sci.* 6 (2): 133-150
- Knafo S, Venero C, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Gonzalez-Soriano J, Ferrer I, Santpere G, DeFelipe J** (2009) Morphological alterations to neurons of the amygdale and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pathol.* 219 (1): 41-51
- Kobayashi K** (2001) Role of Catecholamine Signaling in Brain and Nervous System Functions: New Insights from Mouse Molecular Genetic Study. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 6 (1): 115-121
- Kobayashi DT, Chen S** (2005) Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.* 4 (3): 173-196
- Koda K, Ago Y, Cong Y, Kita Y, Takuma K, Matsuda T** (2010) Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice. *J Neurochem.* 114 (1): 259-270
- Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K** (2009) Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav Brain Res.* 202 (1): 114-121
- Krabbe G, Halle A, Matyash V, Rinnenthal JL, Eom GD, Bernhardt U, Miller KR, Proskop S, Kettenmann H, Heppner FL** (2013) Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLoS ONE.* 8 (4): e60921
- Kuczenski R, Segal DS** (1997) Effects of Methylphenidate on Extracellular Dopamine, Serotonin, and Norepinephrine: Comparison with Amphetamine. *J Neurochem.* 68 (5): 2032-2037
- Küppers E, Ivanova T, Karolczak M, Beyer C** (2000) Estrogen: A multifunctional messenger to nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurocytol.* 29 (5-6): 375-385

- LaFerla FM, Green KN, Oddo S** (2007) Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 8 (7): 499-509
- Lalonde R, Dumont M, Staufenbiel M, Strazielle C** (2005) Neurobehavioral characterization of APP23 transgenic mice with the SHIRPA primary screen. *Behav Brain Res.* 157 (1): 91-98
- Lalonde R, Fukuchi K, Strazielle C** (2012) Neurologic and motor dysfunctions in *APP* transgenic mice. *Rev Neurosci.* 23 (4): 363-379
- Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K** (2003) Transgenic mice expressing the  $\beta$ APP<sub>695</sub>SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res.* 977 (1): 38-45
- Lanctôt KL, Chau SA, Herrmann N, Drye LT, Rosenberg PB, Scherer RW, Black SE, Vaidya V, Bachman DL, Mintzer JE** (2013) Effect of methylphenidate on attention in apathetic AD patients in a randomized, placebo-controlled trial. *Int Psychogeriatr.* 26 (2): 239-246
- Lee JE, Han PL** (2013) An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque deposition. *Exp Neurol.* 22 (2): 84-95
- Lee JS, Im DS, An Y-S, Hong JM, Gwag BJ, Joo IS** (2011) Chronic cerebral hypoperfusion in a mouse model of Alzheimer's disease: An additional contributing factor of cognitive impairment. *Neurosci Lett.* 489 (2): 84-88
- Lévesque D, Di Paolo T** (1989) Chronic Estradiol Treatment Increases Ovariectomized Rat Striatal D-1 Dopamine Receptors. *Life Sci.* 45 (19): 1813-1820
- Lex A, Hauber W** (2008) Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer. *Learn mem.* 15 (7): 483-491
- Li L, Ding J, Marshall C, Gao J, Hu G, Xiao M** (2011) Pretraining affects Morris water maze performance with different patterns between control and ovariectomized plus D-galactose-injected mice. *Behav Brain Res.* 217 (1): 244-247
- Linsen AMW, Sambeth A, Vuurman EFPM, Riedel WJ** (2013) Cognitive effects of methylphenidate and levodopa in healthy volunteers. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24 (2): 200-206
- Lison H, Happel MFK, Schneider F, Baldauf K, Kerbstat S, Seelbinder B, Schneeberg J, Zappe M, Goldschmidt J, Buddinger E, Schröder UH, Ohl FW, Schilling S, Demuth HU, Scheich H, Reymann KG, Rönicke R** (2014) Disrupted cross-laminar cortical processing in  $\beta$  amyloid pathology precedes cell death. *Neurobiol Dis.* 63: 62-73
- Löffler G:** Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 6. Auflage. Springer Medizin Verlag: Heidelberg, 2005. S. 709

- Marchbanks RM** (1982) Biochemistry of Alzheimer's Dementia. *J Neurochem.* 39 (1): 9-15
- Marco EM, Adriani W, Ruocco LA, Sadile AG, Laviola G** (2011) Neurobehavioral adaptations to methylphenidate: The issue of early adolescent exposure. *Neurosci Biobehav Rev.* 35 (8): 1722-1739
- Marien MR, Colpaert FC, Rosenquist AC** (2004) Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative disease: a theory. *Brain Res Rev.* 45 (1): 38-78
- Marighetto A, Valerio S, Philippin JN, BertainaAnglade V, Drieu la Rochelle C, Jaffard R, Morain P** (2008) Comparative effects of the dopaminergic agonists piribedil and bromocriptine in three different memory paradigms in rodents. *J Psychopharmacol.* 22 (5): 511-521
- Matthies H** (1989) In search of cellular mechanisms of memory. *Prog Neurobiol.* 32 (4): 277-349
- Mattson M** (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430 (7000): 631-639
- McFadyen MP, Brown RE, Carrey N** (2002) Subchronic Methylphenidate Administration Has No Effect on Locomotion, Emotional Behavior, or Water Maze Learning in Prepubertal Mice. *Dev Psychobiol.* 41 (2): 123-132
- McFadyen-Leussis MP, Lewis SP, Bond TLY, Carrey N, Brown RE** (2004) Prenatal exposure to methylphenidate hydrochloride decreases anxiety and increases exploration in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 77 (3): 491-500
- Mechan AO, Wyss A, Rieger H, Mohajeri MH** (2009) A comparison of learning and memory characteristics of young and middle-aged wild-type mice in the IntelliCage. *J Neurosci Methods.* 180 (1): 43-51
- Mioranza S, Botton PHS, Costa MS, Espinosa J, Kazlauckas V, Ardais AP, Souza DO, Porciúncula LO** (2010) Adenosine A<sub>1</sub> receptors are modified by acute treatment with methylphenidate in adult mice. *Brain Res.* 1357: 62-69
- Möller HJ, Graeber MB** (1998) The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 248 (3): 111-122
- Molinoff PB, Axelrod J** (1971) Biochemistry of Catecholamines. *Annu Rev Biochem.* 40: 465-500
- Morris R** (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11 (1): 47-60
- Morrisette DA, Parachikov A, Green KN, LaFerla FM** (2009) Relevance of Transgenic Mouse Models to Human Alzheimer Disease. *J Biol Chem.* 284 (10): 6033-6037

- Myhrer T** (2003) Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev.* 41 (2-3): 268-287
- Nichol K, Deeny SP, Seif J, Camaclang K, Cotman CW** (2009) Exercise improves cognition and hippocampal plasticity in *APOE ε4* mice. *Alzheimers Dement.* 5 (4): 287-294
- Niculescu M, Ehrlich ME, Unterwald EM** (2005) Age-specific behavioral responses to psychostimulants in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 82 (2): 280-288
- Niimi K, Nishioka C, Miyamoto T, Takahashi E, Miyoshi I, Chitoshi I, Yamashita T** (2011) Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 406 (4): 524-528
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disteroft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R** (2006) Intraneuronal  $\beta$ -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J Neurosci.* 26 (40): 10129-10140
- O'Connor T, Sadleir KR, Maus E, Velliquette RA, Zhao J, Cole SL, Eimer WA, Hitt B, Bembinster LA, Lammich S, Lichtenthaler SF, Hébert SS, De Strooper B, Haass C, Bennett DA, Vassar R** (2008) Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 $\alpha$  Increases BACE1 Levels and Promotes Amyloidogenesis. *Neuron.* 60 (6): 988-1009
- Ohno M** (2009) Failures to reconsolidate memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem.* 92 (3): 455-459
- Ohno M, Chang L, Tseng W, Oakley H, Citron M, Klein WL, Vassar R, Disterhoft JF** (2006) Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *Eur J Neurosci.* 23 (1): 251-260
- Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R** (2007) BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 26 (1): 134-145
- Oleson EB, Cheer JF** (2012) A Brain on Cannabinoids: The Role of Dopamine Release in Reward Seeking. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 (8)
- Ou-Yang MH, Van Nostrand WE** (2013) The absence of myelin basic protein promotes neuroinflammation and reduces amyloid beta-protein accumulation in Tg-5xFAD mice. *J Neuroinflammation.* 10 (1): 134
- Padala PR, Burke WJ, Shostrom VK, Bhatia SC, Wengel SP, Potter JF, Petty F** (2010) Methylphenidate for Apathy and Functional Status in Dementia of the Alzheimer Type. *Am J Geriatr Psychiatry.* 18 (4): 371-374

- Padala PR, Padala KP, Sullivan DH, Desouza CV, Potter JF, Burke WJ** (2012) Improvement of Glycemic Control Using Methylphenidate Treatment of Apathy: A Preliminary Report. *J Am Geriatr Soc.* 60 (7): 1383-1384
- Pamplona FA, Pandolfo P, Duarte FS, Takahashi RN, Prediger RDS** (2010) Altered emotionality leads to increased pain tolerance in amyloid  $\beta$  (A $\beta$ 1-40) peptide-treated mice. *Behav Brain Res.* 212 (1): 96-102
- Pezze MA, Feldon J** (2004) Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog Neurobiol.* 74 (5): 301-320
- Pierce RC, Kumaresan V** (2006) The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev.* 30 (2): 215-238
- Platel A, Porsolt RD** (1982) Habituation of exploratory activity in mice: a screening test for memory enhancing drugs. *Psychopharmacology (Berl).* 78 (4): 346-352
- Potter PE, Rauschkolb PK, Pandya Y, Sue LI, Sabbagh MN, Walker DG, Beach TG** (2011) Pre- and Post-Synaptic Cortical Cholinergic Deficits Are Proportional to Amyloid Plaque Presence and Density at Preclinical Stages of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol.* 122 (1): 49-60
- Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E** (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci.* 11 (2): 111-128
- Reese JP, Hessmann P, Seeberg G, Henkel D, Hirzmann P, Rieke J, Baum E, Dannhoff F, Müller MJ, Jessen F, Geldsetzer MB, Dodel R** (2011) Cost and care of patients with Alzheimer's disease: clinical predictors in German health care settings. *J Alzheimers Dis.* 27 (4): 723-736
- Reinhardt S, Schuck F, Grösgen S, Riemenschneider M, Hartmann T, Postina R, Grimm M, Endres K** (2013) Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB.* 28 (2): 978-997
- Reinikainen KJ, Soininen H, Riekkinen PJ** (1990) Neurotransmitter Changes in Alzheimer's Disease: Implications to Diagnostics and Therapy. *J Neurosci Res.* 27 (4): 576-586
- Reymann KG, Frey JU** (2007) The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology.* 52 (1): 24.40
- Rhodes JS, Garland T** (2003) Differential sensitivity to acute administration of Ritalin, apomorphine, SCH 23390, but not raclopride in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology (Berl).* 167 (3): 242-250

- Richter H, Ambrée O, Lewejohann L, Herring A, Deyvani K, Paulus W, Palme R, Touma C, Schäbitz WR, Sachser N** (2008) Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: protection or symptom? *Behav Brain Res.* 190 (1): 74-84
- Rothe T, Deliano M, Scheich H, Stark H** (2009) Segregation of task-relevant conditioned stimuli from background stimuli by associative learning. *Brain Res.* 1297: 143-159
- Rustay NR, Cronin EA, Curzon P, Markosyan S, Bitner RS, Ellis TA, Waring JF, Decker MW, Rueter LE, Browman KE** (2010) Mice expressing the Swedish APP mutation on a 129 genetic background demonstrate consistent behavioral deficits and pathological markers of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1311: 136-147
- Sadasivan S, Pond BB, Pani AK, Qu C, Jiao Y, Smeyne RJ** (2012) Methylphenidate Exposure Induces Dopamine Neuron Loss and Activation of Microglia in the Basal Ganglia of Mice. *PLoS ONE.* 7 (3): e33693
- Scheich H, Stark H, Zuschratter W, Ohl FW, Simonis CE** (1997) Some functions of primary auditory cortex in learning and memory formation. *Adv Neurol.* 73: 179-193
- Scherer EBS, da Cunha MJ, Matté C, Schmitz F, Netto CA, Wyse ATS** (2010) Methylphenidate affects memory, brain-derived neurotrophic factor immunoccontent and brain acetylcholinesterase activity in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 94 (2): 247-253
- Schicknick H, Reichenbach N, Smalla KH, Scheich H, Gundelfinger ED, Tischmeyer W** (2012) Dopamine modulates memory consolidation of discrimination learning in the auditory cortex. *Eur J Neurosci.* 35 (5): 763-774
- Schultz W** (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 7 (2): 191-197
- Selkoe DJ** (1991) The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease. *Neuron.* 6 (4): 487-498
- Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H** (2010) Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 87 (17-18): 521-536
- Shumake J, Ilango A, Scheich H, Wetzel W, Ohl FW** (2010) Differential neuromodulation of acquisition and retrieval of avoidance learning by the lateral habenula and ventral tegmental area. *J Neurosci.* 30 (17): 5876-5883
- Sivilia S, Lorenzini L, Giuliani A, Gusciglio M, Fernandez M, Baldassarro VA, Mangano C, Ferraro L, Pietrini V, Baroc MF, Viscomi AR, Ottonello S, Villetti G, Imbimbo BP, Calzà L, Giardino L** (2013) Multi-target action of the novel anti-Alzheimer compound CHF5074:in vivo study of long term treatment in Tg2576 mice. *BMC Neurosci.* 14: 44

- Sofuoglu M, Sewell RA** (2009) Norepinephrine and Stimulant Addiction. *Addict Biol.* 14 (2): 119-129
- Spencer RC, Klein RM, Berridge CW** (2012) Psychostimulants Act Within the Prefrontal Cortex to Improve Cognitive Function. *Biol Psychiatry.* 72 (3): 221-227
- Stark H, Bischof A, Scheich H** (1999) Increase of extracellular dopamine in prefrontal cortex of gerbils during acquisition of the avoidance strategy in the shuttle box. *Neurosci Lett.* 264 (1-3): 77-80
- Stark H, Bischof A, Wagner T, Scheich H** (2000) Stages of avoidance strategy formation in gerbils are correlated with dopaminergic transmission activity. *Eur J Pharmacol.* 405 (1-3): 263-275
- Stark H, Rothe T, Wagner T, Scheich H** (2004) Learning a new behavioral strategy in the shuttle-box increases prefrontal dopamine. *Neuroscience.* 126 (1): 21-29
- Sterniczuk R, Antle MC, LaFerla FM, Dyck RH** (2010) Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Res.* 1348: 149-155
- Tarantino IS, Sharo RF, Geyer MA, Meves JM, Young JW** (2011) Working memory span capacity improved by a D2 but not D1 receptor family agonist. *Behav Brain Res.* 219 (2): 181-188
- Thobois S, Lhommée E, Klinger H, Ardouin C, Schmitt E, Bichon A, Kistner A, Castrioto A, Xie J, Fraix V, Pelissier P, Chabardes S, Mertens P, Quesada JL, Bosson JL, Pollak P, Broussolle E, Krack P** (2013) Parkinsonian apathy responds to dopaminergic stimulation of D2/D3 receptors with piribedil. *Brain.* 136 (Pt 5): 1568-1577
- Thompson RF:** Das Gehirn. Von der Nervenzelle zur Verhaltenssteuerung. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg Berlin Oxford, 1994, S.149-158
- Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T** (2012) Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D<sub>3</sub>-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep.* 2: 535
- Tomie A, Griimes KL, Pohorecky LA** (2008) Behavioral Characteristics and Neurobiological Substrates Shared by Pavlovian Sign. Tracking and Drug Abuse. *Brain Res Rev.* 58 (1): 121-135
- Urano T, Tohda C** (2010) Icariin Improves Memory Impairment in Alzheimer's Disease Model Mice (5xFAD) and Attenuates Amyloid  $\beta$ -induced Neurite Atrophy. *Phytother Res.* 24 (11): 1658-1663
- Urban KR, Gao WJ** (2013) Methylphenidate and the juvenile brain: Enhancement of attention at the expense of cortical plasticity? *Med Hypotheses.* 81 (6): 988-994
- Van den Heuvel DMA, Pasterkamp RJ** (2008) Getting connected in the dopamine system. *Prog Neurobiol.* 85 (1): 75-93

- Velasques B, Machado S, Paes F, Cunha M, Sanfim A, Budde H, Cagy M, Anghinah R, Basile LF, Piedade R, Ribeiro P** (2011) Sensorimotor integration and psychopathology: motor control abnormalities related to psychiatric disorders. *World J Biol Psychiatry*. 12 (8): 560-573
- Viggiano D, Ruocco LA, Sadile AG** (2003) Dopamine phenotype and behaviour in animal models in relation to attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev*. 27 (7): 623-637
- Vloeberghs E, Van Dam D, Franck F, Staufenbiel M, De Deyn PP** (2007) Mood and male sexual behavior in the APP23 model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 180 (2): 146-151
- Waldau B, Shetty A K** (2008) Behavior of neural stem cells in the Alzheimer brain. *Cell Mol Life Sci*. 65 (15): 2372-2384
- Walker JM, Fowler SW, Miller DK, Sun AY, Weisman GA, Wood WG, Sun GY, Simonyi A, Schachtman TR** (2011) Spatial learning and memory impairment and increased locomotion in a transgenic amyloid precursor protein mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 222 (1): 169-175
- Wall VZ, Parker JG, Fadok JP, Davas M, Zweifel L, Palmiter RD** (2011) A behavioral genetics approach to understanding D1 receptor involvement in phasic dopamine signaling. *Mol Cell Neurosci*. 46 (1): 21-31
- Wang H, He J, Zhang R, Zhu S, Wang J, Kong L, Tan Q, Li XM** (2012) Sensorimotor gating and memory deficits in an APP/PS1 double transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 233: 237-243
- Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO** (2008) Perivascular Drainage of Amyloid- $\beta$  Peptides from the Brain and Its Failure I Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease. *Brain Pathol*. 18 (2): 253-266
- Wimo A, Jönsson L, McDaid D, Ersek K, Georges J, Gulácsi L, Karpati K, Kenigsberg P, Valtonen H** (2010) The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from Eurocode project. *Int J Geriatr Psychiatry*. 26 (8): 825-832
- Winger G, Woods JH, Galuska CM, Wade-Galuska T** (2005) Behavioral Perspectives on the Neuroscience of Drug Addiction. *J Exp Anal Behav*. 84 (3): 667-681
- Winkler J, Thal LJ, Gage FH, Fisher LJ** (1998) Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J Mol Med (Berl)*. 76 (8): 555-567
- Wise RA** (2004) Dopamine, Learning and Motivation. *Nat Rev Neurosci*. 5 (6): 483-494

- Wojtera M, Sobów T, Kloszewska I, Liberski PP, Brown DR, Sikorska B** (2012) Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease: morphometric study and review of the literature. *Folia Neuropathol.* 50 (1): 74-84
- Wood S, Sage JR, Shuman T, Anagnostaras SG** (2013) Psychostimulants and cognition: a continuum of behavioral and cognitive activation. *Pharmacol Rev.* 66 (1): 193-221
- Yang PB, Swann AC, Dafny N** (2006) Chronic methylphenidate modulates locomotor activity and sensory evoked responses in the VTA and NAc of freely behaving rats. *Neuropharmacology.* 51 (3): 546-556
- Yang PB, Swann AC, Dafny N** (2007) Methylphenidate treated at the test cage-dose-dependent sensitization or tolerance depend on the behavioral assay used. *Crit Rev Neurobiol.* 19 (1): 59-77
- Yano M, Steiner H** (2007) Methylphenidate and cocaine: the same effects on gene regulation? *Trends Pharmacol Sci.* 28 (11): 588-596
- Yuk DY, Lee YK, Nam SY, Yun YW, Hwang DY, Choi DY, Oh KW, Hong JT** (2009) Reduced Anxiety in the Mice Expressing mutant (N141I) Presenilin 2. *J Neurosci Res.* 87 (2): 522-531
- Zeiss CJ** (2005) Neuroanatomical Phenotyping in the Mouse: The Dopaminergic System. *Vet Pathol.* 42 (6): 753-773
- Zellner MR, Ranaldi R** (2010) How conditioned stimuli acquire the ability to activate VTA dopamine cells: A proposed neurobiological component of reward-related learning. *Neurosci Biobehav Rev.* 34 (5): 769-780
- Zhang W, Bai M, Xi Y, Hao J, Liu L, Mao N, Su C, Miao J, Li Z** (2012) Early memory deficits precedes plaque deposition in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice: Involvement of oxidative stress and cholinergic dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 52 (8): 1443-1452
- Zhang Z, Liu X, Schroder JP, Chan CB, Song M, Yu SP, Weinschenker D, Ye K** (2013) 7,8-dihydroxyflavone Prevents Synaptic Loss and Memory Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology.* 39 (3): 638-650
- Zhao J, Fu Y, Yasvoina M, Shao P, Hit B, O'Connor T, Logan S, Maus E, Citron M, Berry R, Binder L, Vassar R** (2007)  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Levels Become Elevated in neurons around Amyloid Plaques: Implications for Alzheimer's Disease Pathogenesis. *J Neurosci.* 27 (14): 3639-3649

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei all jenen Personen bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. K. G. Reymann danke ich für die Überlassung des Themas und den Freiraum, es vollends auszuschöpfen, für die zahlreichen Anregungen und Hinweise sowie für die kritischen, aber auch ermutigenden Worte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. K. Baldauf für ihre andauernde Diskussionsbereitschaft, ihre immerwährende Bereitwilligkeit zur Behebung von Problemen und Schwierigkeiten, ihre Hilfestellung bei der statistischen Auswertung und für ihr kritisches Auge beim Begutachten der (Arbeits-) Berichte und Manuskripte sowie für die abwechslungsreiche und sehr unterhaltsame Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank geht an Frau A. Günther-Kern für ihre geduldige und methodische Unterstützung bei der Verwirklichung neuer Ideen, für ihre ständige Einsatzbereitschaft, tatkräftige Hilfe sowie für ihre Ratschläge und Erklärungen und vor allem für die gemeinsame Zeit.

Ein aufrichtiger Dank gebührt Herrn PD Dr. Wolfram Wetzel für seine konstruktive Kritik, die motivierenden Diskussionen und anregenden Gespräche sowie für seine Unterstützung beim Finden passender Literatur. Ebenso möchte ich Frau U. Lerke für die Unterstützung bei der Einführung in die Verhaltensmethoden und für die gemeinschaftliche Zeit danken.

Ich danke auch Frau St. Schreyer für ihre Praktikumszeit bei uns im Team, für ihre wenn auch nur temporäre, aber unglaubliche Motivation und für die amüsanten Wochen, die wir zusammen verbrachten.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern sowie meinem Bruder Frank und meiner Oma Gertrud für ihren beständigen Glauben an mich, ihre positiven Zusprüche sowie für die Geduld und Unterstützung, die sie für meinen Lebensweg aufgebracht haben. Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunden, die mir stets eine seelische Stütze waren. Abschließend möchte ich meinem Partner Daniel ein herzliches Dankeschön aussprechen für seinen unendlichen Optimismus, sein Vertrauen in mich und sein stets offenes Ohr für meine kleinen und großen Probleme.

## 9 Lebenslauf

### ANGABEN ZUR PERSON

Name	Schneider, Franziska
Adresse	Beesener Straße 20, 06110 Halle (Saale)
Geburtsdatum	17.08.1983
Geburtsort	Halle (Saale)
Geschlecht	weiblich
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

### SCHULBILDUNG

1990 bis 1994	Grundschule Kröllwitz, Halle (Saale)
1994 bis 2003	Thomas Müntzer-Gymnasium, Halle (Saale) Abschluss: <b>Abitur</b>

### BERUFSAUSBILDUNG

2003 bis 2009	Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität, Halle (Saale) Schwerpunkt: Tierphysiologie, Verhaltensbiologie Abschluss: <b>Diplom-Biologin</b> , Note: 1,8
2009 bis Okt. 2011	Promotionsarbeit bei Prof. Dr. K. G. Reymann am Leibniz Institut für Neurobiologie, Magdeburg, Zentrum für Lern- und Gedächtnisforschung <b>Thema:</b> „Beeinflussung kognitiver Defizite bei der 5xFAD-Maus durch elektrische Stimulation des dopaminergen Systems“
seit Nov. 2011	Fortsetzung der Promotionsarbeit bei Prof. Dr. K. G. Reymann am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Magdeburg Fachgebiet: Neurobiologie <b>Thema:</b> „Verhaltensdefizite und deren pharmakologische Beeinflussung durch Methylphenidat bei männlichen 5xFAD-Alzheimermäusen“

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema **„Verhaltensdefizite und deren pharmakologische Beeinflussung durch Methylphenidat bei männlichen 5xFAD-Alzheimermäusen“** selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 26.05.2014

Franziska Schneider