

Einfluss der chronischen Reduktion des endogenen Neurotrophins BDNF auf kognitive Prozesse im APP/PS1 Alzheimer-Mausmodell

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 Diplom-Biologin Laura Psotta

geboren am 20. Oktober 1984 in Offenbach am Main

Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Leßmann, Universität Magdeburg

Prof. Dr. Rainer Schwarting, Universität Marburg

eingereicht am 26. Juni 2014

verteidigt am 26. Januar 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Die Alzheimer Krankheit und dessen pathologische Hauptmerkmale	7
1.2 Das Neurotrophin Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)	9
1.3 Die Rolle von BDNF in der Alzheimer Krankheit	11
1.4 Einfluss von reduziertem BDNF im APP/PS1-Alzheimer-Mausmodell	16
1.5 Untersuchungen der kognitiven Leistungen der verwendeten Mausmodelle	18
1.5.1 Der Einfluss von chronisch reduziertem BDNF auf das Extinktionslernen konditionierter Furcht im Mausmodell	19
1.5.2 Der Objektwiedererkennungstest zur Überprüfung des Kurzzeitgedächtnisses	21
1.5.3 Das Schwimmlabyrinth nach Morris als Lernparadigma zur Untersuchung des räumlichen Gedächtnisses	22
1.6 Der Einfluss von BDNF und der Alzheimer Krankheit auf die Funktion neuronaler Mitochondrien	24
1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Versuchstiere	28
2.2 Haltungsbedingungen des Enriched Environments	28
2.3 Verhaltensexperimente	29
2.3.1 Extinktion von konditionierter Furcht im BDNF ^{+/-} -Mausmodell	29
2.3.2 Objektwiedererkennungstest	31
2.3.3 Das Schwimmlabyrinth - Morris Water Maze	32
2.4 Proteinquantifizierung mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	34
2.4.1 Präparation zur Probengewinnung für die BDNF- und A β -ELISA-Messungen	34
2.4.2 A β ₄₂ - und BDNF-ELISA-Messungen	34
2.5 Respirometrie zur Überprüfung der Mitochondrienfunktion	35
2.5.1 Probengewinnung für die Respirometrie	35
2.5.2 Prinzip und Durchführung der Oxygraphenmessung	36
2.5.3 Mitochondriale Atmungsrate und respiratorischer Kontrollindex	38
2.6 Datenanalyse und statistische Datenauswertung	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Extinktion von konditionierter Furcht im BDNF ^{+/-} -Mausmodell	39
3.1.1 BDNF-Proteingehalt in extinktionsrelevanten Gehirnregionen von zwei und sieben Monate alten Wildtyp- und BDNF ^{+/-} -Mäusen	42
3.2 Überprüfung des Kurzzeitgedächtnisses mit Hilfe des Objektwiedererkennungstests	44
3.2.1 Aktivität und Angstverhalten im Objektwiedererkennungstest	45
3.2.2 Objektwiedererkennungstest	48
3.3 Überprüfung des räumlichen Lernens mit Hilfe des Schwimmlabyrinths nach Morris	49
3.3.1 Schwimmgeschwindigkeit während der Trainingsphase im Schwimmlabyrinth nach Morris	50

3.3.2	Latenz zum Erreichen der Plattform und Aufenthaltszeit in den Quadranten als Indikator für die räumliche Lernleistung im Schwimmlabyrinth.....	51
3.3.3	Einfluss des Schwimmlabyrinthversuchs auf den BDNF-Gehalt im Hippocampus ...	58
3.3.4	Räumliches Lernverhalten im Schwimmlabyrinth von fünf Monate alten APP/PS1-Mäusen aus EE-Haltung.....	60
3.3.5	BDNF-Proteinquantifizierung bei Tieren aus EE-Haltung	61
3.4	BDNF-Proteinquantifizierung mittels ELISA-Messungen	63
3.5	A β -Pathologie der verwendeten Mausmodelle	64
3.5.1	A β_{42} -ELISA-Messungen der verwendeten Tiermodelle	64
3.5.2	β -Amyloid-Plauefärbungen der verwendeten Tiermodelle.....	66
3.6	Messung der Mitochondrienfunktion mittels Respirometrie.....	67
4	Diskussion	73
4.1	Einfluss des endogenen Mangels an BDNF auf das Extinktionslernen	73
4.2	Untersuchung von Parametern des basalen Aktivitäts- und Angstverhaltens	76
4.3	Der Objektwiedererkennungstest zur Erfassung des Kurzzeitgedächtnisses	79
4.4	Das Schwimmlabyrinth zur Untersuchung des räumlichen Lernens	82
4.4.1	Das räumliche Lernen von APP/PS1-Mäusen im Schwimmlabyrinth.....	82
4.4.2	Das räumliche Lernen von BDNF ^{+/-} -Mäusen im Schwimmlabyrinth	87
4.4.3	Das räumliche Lernen von APP/PS1-BDNF ^{+/-} -Mäusen im Schwimmlabyrinth.....	90
4.5	BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus der verwendeten Mausmodelle.....	93
4.6	Schwimmlabyrinthversuch von APP/PS1-Tieren aus EE-Haltung.....	95
4.7	Mitochondrienfunktion der verwendeten Mausmodelle	98
4.8	Vergleichende Diskussion.....	104
4.9	Abschließende Schlussfolgerung	106
	Zusammenfassung	108
	Abstract	109
	Literaturangaben	111
	Anhang	132
	Lebenslauf	134
	Publikationsliste	135
	Danksagung	136
	Selbständigkeitserklärung	137

Abkürzungsverzeichnis

7,8-DHF	7,8-Dihydroxyflavon
ACSF	Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Alzheimer Krankheit
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APP/PS1	Alzheimer-Mausmodell
APP/PS1-BDNF ^{+/-}	Kreuzung aus APP/PS1- und BDNF ^{+/-} -Mausmodell
A β	Amyloid-Beta-Peptid
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BDNF ^{+/-}	Heterozygote BDNF <i>knockout</i> Maus
BIM 0	Brain Incubation Medium ohne EGTA
BIM 1000	Brain Incubation Medium mit 1 mM EGTA
BLA	Basolaterale Amygdala
bp	Basenpaare
CA	<i>Cornu ammonis</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CRE	Zyklisches AMP-responsive element
CREB	Response element-binding protein
CS	Konditionierter Stimulus
dB	Dezibel
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EE	Enriched Environment
EGTA	Ethylenglycol-bisaminoethylethertetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Extracellular-signal regulated Kinase
G3P	Glycerin-3-phosphat
Glu	Glutamat
GSK3B	Glykogensyntasekinase-3-beta
IL	Infralimbisch
ITC	Interkalierte Zellen der Amygdala
LTP	Langzeitpotenzierung
lx	Lux
Mal	Malat
Met	Methionin
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mPFC	Medialer Präfrontalkortex
NF- κ B	Nukleärer Factor Kappa B
NP40	Nonoxynol
PFC	Präfrontalkortex
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PL	Prälimbisch
PLC γ	Phospholipase-C-gamma
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PS1	Präsenilin-1

PS2	Präsenilin-2
Pyr	Pyruvat
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SH	Standardhaltung
SPL	Schalldruckpegel
Suc	Succinat
TNF	Tumornekrosefaktor
TrkB	Tyrosinkinase-B-Rezeptor
tTrkB	Verkürzter Tyrosinkinase-B-Rezeptor
US	Unkonditionierter Stimulus
Val	Valin
WT	Wildtyp-Maus

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer Krankheit und dessen pathologische Hauptmerkmale

Die Alzheimer Krankheit (AK) ist die verbreitetste Form der altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen, welche etwa 50 bis 60 % der Demenzerkrankungen ausmacht. Weltweit leiden etwa 29 Millionen Menschen unter der AK, wobei mit einem Anstieg auf etwa 206 Millionen Fälle im Jahr 2050 gerechnet wird (Brookmeyer et al., 2007). Hierbei ist der größte Risikofaktor das Altern selbst, denn es sind fast ausschließlich ältere Menschen von dieser Krankheit betroffen (Blennow et al., 2006). Die meist verbreitetste Art der AK ist die sogenannte sporadische Form, die in etwa 90 % der Fälle auftritt, und deren Symptomatik etwa im Mittel ab einem Lebensalter von 65 Jahren beginnt. Die familiäre Form, für die genetische Faktoren ursächlich sind, tritt in etwa 10 % der Alzheimererkrankung auf, wobei die Symptomatik der Erkrankung in der Regel bereits vor dem 65. Lebensjahr beginnt (Brookmeyer et al., 2007; Blennow et al., 2006). Alzheimerpatienten leiden unter einem immer weiter fortschreitenden Verfall der kognitiven Leistungen, wobei das episodische Gedächtnis zuerst betroffen ist (Artero et al., 2003). Im weiteren Verlauf der Krankheit verschlechtern sich kognitive Fähigkeiten wie Aufmerksamkeit, Sprachvermögen, das Ausführen von Tätigkeiten, das semantische Gedächtnis und die räumliche Orientierung immer weiter (Ralph et al., 2003). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die molekularen, zellulären und pathologischen Prozesse, die dieser Krankheit zugrunde liegen nur unzureichend verstanden (zusammengefasst in Newman et al., 2007).

Zwei der neuropathologischen Hauptkennzeichen der AK sind die senilen Plaques, eine Anreicherung des Amyloid-Beta-Peptids (A β) und die Neurofibrillenbündel, welche aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen bestehen. Diese Merkmale sind hauptsächlich im Hippocampus und temporalem Neokortex zu finden (Selkoe, 1991; Taguchi et al., 2005). Beide Kennzeichen der Krankheit resultieren aus einer abnormalen Prozessierung ihrer Ursprungproteine, was zu funktionellen Störungen der Zelle und einem Absterben von Neuronen im erkrankten Gehirn führt (Cotman und Su, 1996). Der genaue Mechanismus dieser zellschädigenden Prozesse ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch ungeklärt. Als eine wahrscheinliche Ursache wird oxidativer Stress vermutet. Oxidativer Stress führt zu einer Störung des

Gleichgewichts von Antioxidantien und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Es entsteht ein Überschuss an ROS, was zur Störung der normalen Zellfunktionen durch Zellmembranzerstörung und Spaltung der DNS führt (Chong et al., 2005). Ob oxidativer Stress für die Auslösung der AK verantwortlich ist, ist bis jetzt noch nicht geklärt. Er spielt aber bei der Entwicklung der Alzheimerpathologie eine bedeutende Rolle, hauptsächlich bei der Zell- und Gewebszerstörung, welche für die AK charakteristisch ist. Zahlreiche Studien zeigen, dass A β -Peptide oxidativen Stress sowohl direkt als auch indirekt verursachen. Hierbei kann das A β -Peptid selbst als Enzym wirken und sowohl Wasserstoffperoxid als auch freie Sauerstoffradikale generieren (Opazo et al., 2002; Huang et al., 1999b; Huang et al., 1999a; Lustbader et al., 2004), was wiederum zu Neuroinflammation und einem Absterben von Neuronen führt (Wyss-Coray et al., 2003; Tuppo und Arias, 2005; Weldon et al., 1998).

Das Ausgangsprotein für die Entstehung des toxischen A β -Peptids ist das Amyloid-Vorläuferprotein (APP). Dieses Typ I-Membranintegralprotein wird in allen Körpergeweben exprimiert, wobei die Funktion dieses Proteins bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt ist. Es wird angenommen, dass es u.a. eine Rolle bei der Bildung von Synapsen spielt (Priller et al., 2006). Die Verarbeitung von APP wird über den Sekretase-Komplex vermittelt. Hierbei gibt es den amyloidären und den nicht-amyloidären Pfad der Prozessierung. Innerhalb des nicht-amyloiden Prozessierungspfads wird lösliches APP mittels α -Sekretase zu α APP prozessiert und in die extrazelluläre Matrix entlassen. Diese über die α -Sekretase gebildeten und wasserlöslichen sAPPs besitzen neuroprotektive Eigenschaften (Thornton et al., 2006). Innerhalb des amyloidären Pfads wird das APP über die β - und γ -Sekretase zu toxischem A β -Peptid (Zhang et al., 2011) prozessiert. Die Prozessierung über die γ -Sekretase ist ein heterogener Prozess, bei dem A β -Peptide verschiedener Längen entstehen. Die häufigsten Formen sind A β_{40} und A β_{42} und weisen eine hohe Neurotoxizität auf. Hierbei ist A β_{42} wasserunlöslich und besitzt eine höhere Affinität zur Aggregation (Zhang et al., 2011; Nunan und Small, 2000). Auch die A β -Oligomere und Protofibrillen sind neurotoxisch. Es wurde gezeigt, dass diese eine höhere Toxizität aufweisen, als Amyloidfibrillen und Amyloidplaques (Dahlgren et al., 2002).

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind drei Genloci identifiziert worden, die bei der Pathologie der familiären Form der AK eine Rolle spielen. Mutationen im Präsenilin 1 (PS1), Präsenilin 2 (PS2) und APP-Gen-Lokus wurden hierbei identifiziert (Bird, 2005). Die Präseniline zählen

zu der Familie der Transmembranproteine und bilden zusammen mit anderen Proteinen den γ -Sekretase-Komplex. Mutationen in den Gensequenzen des γ -Sekretase-Komplexes führen zu einer massiven Erhöhung der Produktion von $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$, wobei Mutationen der APP-Gensequenz ebenfalls in einer höheren Produktion des $A\beta$ -Peptids führen (Theuns et al., 2006; Walker et al., 2005; Chen und Schubert, 2002). Die Doppelmutation zweier Aminosäuren der APP-Gensequenz, auch als die „Schwedische“ APP-Mutation bekannt, verursacht eine höhere Spaltungsrate der β -Sekretase was zu steigender Produktion der toxischen $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ Peptide führt (Selkoe, 2001). Da die Pathologie der familiären und der sporadischen Form der AK nahezu identisch sind, wird vermutet, dass auch bei der sporadischen Form Veränderungen in den genannten Genen für die Pathologie verantwortlich sind.

1.2 Das Neurotrophin Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Die Entwicklung und das Überleben von Nervenzellen und deren synaptischen Verbindungen im gesamten Nervensystem sind abhängig von neurotrophen Faktoren. Diese sind Signalstoffe, welche von Neuronen synthetisiert und sekretiert werden und in Zielzellen Prozesse auslösen, die zu Proteinsynthese führen und somit essentielle Prozesse der Zelle induzieren, wie zum Beispiel die Synaptogenese (Levi-Montalcini, 1987; Heumann, 1994). Das Neurotrophin Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) wird sowohl im humanen als auch im zentralen Nervensystem anderer Wirbeltiere vor allem im Hippocampus, dem zerebralen Kortex und der Amygdala in einem hohen Maße exprimiert (Phillips et al., 1991; Phillips et al., 1990; Quartu et al., 1999). BDNF vermittelt Prozesse der neuronalen Differenzierung und das Modulieren neuronaler Vorgänge während der Entwicklung im Nervensystem, wie z.B. das Überleben und Wachstum von Neuronen (Binder und Scharfman, 2004; Huang und Reichardt, 2003). Hierbei bindet BDNF mit einer hohen Affinität an den TrkB-Rezeptor (tropomyosin-related kinase B) und löst Signalkaskaden aus, die zur neuronalen Differenzierung und zum Überleben der Zelle führen (Barbacid, 1995; Gottmann et al., 2009). Wie alle Neurotrophine bindet BDNF mit einer geringen Affinität ebenfalls an den $p75^{NTR}$ -Rezeptor. Der $p75^{NTR}$ -Rezeptor gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren (Tumornekrosefaktor-Rezeptoren) und besitzt eine glykosylierte extrazelluläre Region, welche an der Liganden-

bindung beteiligt ist und eine kurze intrazelluläre Sequenz die keine katalytische Funktion hat. Das Binden von Neurotrophinen an diesen Rezeptor führt zu einer Reihe intrazellulärer Signalkaskaden, welche u.a. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, Jun-Kinasen (JNK) und Sphingomyelinasen führen. Der p75^{NTR}-Rezeptor reguliert somit biologische Prozesse, welche sich von denen des TrkB-Rezeptors deutlich unterscheiden, hauptsächlich durch die Initiierung des programmierten Zelltods (zusammengefasst in z.B. Binder und Scharfman, 2004).

BDNF wird in glutamatergen Neuronen synthetisiert, gespeichert und ausgeschüttet (zusammengefasst in z.B. Gottmann, 2009). Hierbei führt die aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF zu zellulären Veränderungen, die für die Expression der Langzeitpotenzierung (LTP) erforderlich sind. Durch die Erkenntnisse der aktivitätsabhängigen Veränderungen der synaptischen Plastizität und der daraus resultierenden Gedächtnisbildung und -speicherung (Kandel, 2001), wurde BDNF als wichtiger Mediator der Gedächtnisbildung identifiziert (zusammengefasst in z.B. Bekinschtein et al., 2008). BDNF abhängige Prozesse der Lern- und Gedächtnisbildung werden über die Signalkaskaden des TrkB-Rezeptors vermittelt. Pharmakologische oder genetische Manipulation dieses BDNF-TrkB-Signalwegs, die zu einer Störung des TrkB-Signalwegs führten, resultierte in einer Störung der Gedächtnisbildung (Choi et al., 2010; Ou et al., 2010; Bekinschtein et al., 2007b; Heldt et al., 2007). Der Prozess der Gedächtnisbildung gliedert sich in verschiedene Phasen, welche die Akquisition (Assoziation), die Konsolidierung (Formierung) und das Abrufen von Erinnerungen beinhalten (Dudai und Eisenberg, 2004). Hierbei gliedert sich das Gedächtnis bei Säugetieren in zwei Phasen: die Protein- und mRNA-Synthese unabhängige Phase, welche von Minuten bis zu drei Stunden dauern kann und dem Kurzzeitgedächtnis zuzuschreiben ist, und die Protein und mRNA-Synthese abhängige Phase, welche von mehreren Stunden bis hin zu Wochen, Monaten und Jahren dauern kann und das Langzeitgedächtnis repräsentiert. Studien zeigten, dass BDNF einen Kurzzeiteffekt auf die Synapsenbildung hat (Bramham und Messaoudi, 2005; Murer et al., 2001) und dass BDNF über die Aktivierung der ERK1/2-Kaskade im Hippocampus für die Bildung des Kurzzeitgedächtnisses in einem Hippocampus abhängigen Lernparadigma verantwortlich ist. Weiterhin wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass BDNF auch in der Akquisitions- und Konsolidierungsphase eine entscheidende Rolle spielt, wie zum Beispiel bei der Akquisition eines räumlichen Gedächtnisses (Bollen et al., 2013),

Vermeidungslernen (Johnston und Rose, 2001; Alonso et al., 2002) und kontextabhängigem Furchtlernen (Ou et al., 2010). Andere Studien belegten, dass BDNF auch bei der Speicherung des Langzeitgedächtnisses eine essentielle Rolle spielt (Bekinschtein et al., 2007a). Zusammenfassend kann man festhalten, dass BDNF ein essentieller Faktor für synaptische Plastizität ist und eine wesentliche Rolle bei der Gedächtnisbildung spielt.

1.3 Die Rolle von BDNF in der Alzheimer Krankheit

Da bis zum heutigen Zeitpunkt noch kein Heilmittel gegen die AK gefunden wurde, ist eines der Hauptziele der Alzheimerforschung Therapieansätze zu finden, welche die voranschreitende Symptomatik aufhalten oder diese zumindest mildern. Zielgerichtete Stimulierung neurotropher Signalwege zeigten bislang erste vorteilhafte Auswirkungen auf gewisse Aspekte der Alzheimerpathologie. Da BDNF ein essentieller Faktor von Überleben, Differenzierung und synaptischer Plastizität bei Säugetierneuronen ist, könnte vor allem die Stimulierung des BDNF-TrkB-Signalwegs ein vielversprechender Ansatzpunkt für eine Verminderung der Alzheimerpathologie sein. Arbeiten zeigten, dass BDNF die Prozessierung des APPs reguliert (Rohe et al., 2009). Dies kann einerseits zu einer Reduktion der Produktion des A β -Peptids und andererseits zu einer vermehrten Ausschüttung von α APPs, welche neuroprotektive Eigenschaften besitzen, führen (Fu et al., 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass ein Mangel an BDNF amyloidäre Prozesse in der Zelle auslösen kann, was die Rolle von BDNF als Regulationsfaktor von A β unterstützt (Matrone et al., 2008). Das Vorbehandeln von neuronalen Zellkulturen mit BDNF schützte die Zellen vor der Neurotoxizität des A β_{42} -Peptids (Arancibia et al., 2008). Eine Behandlung von kultivierten kortikalen Neuronen mit BDNF war weiterhin in der Lage, Schäden die durch A β_{42} verursacht wurden, rückgängig zu machen (Aliaga et al., 2010). Weiterhin führt A β_{42} zu einer Herunterregulierung der BDNF-Expression und behindert den intrazellulären Transport von BDNF (Poon et al., 2011). Studien, die Tiermodelle für die AK verwenden, unterstützen die Erkenntnisse die aus den Versuchen auf zellulärer Ebene gewonnen wurden. In einem Alzheimer-Mausmodell wurde eine Korrelation zwischen einer verringerten BDNF-Versorgung und der zerebralen Amyloidbelastung gezeigt (Peng et al., 2009). Die exogene Applikation von A β_{42} verursachte neurode-

generative Veränderungen, hauptsächlich im Hippocampus, welche durch die exogene Applikation von BDNF aufgehoben wurden (Nagahara et al., 2009). In Astrozyten eines Alzheimer-Mausmodells wurde eine Hochregulation von BDNF-mRNA und Protein in unmittelbarer Nähe von Amyloidplaques in Mikroglia und Astrozyten beobachtet (Burbach et al., 2004). Diese Erkenntnisse führen zu der Annahme, dass die Hochregulation von BDNF ein Kompensationsmechanismus sein könnte, der durch die Toxizität des A β -Peptids ausgelöst wird. In einem Alzheimer-Mausmodell in dem der endogene BDNF-Gehalt durch eine genetische Herunterregulierung vermindert wurde, zeigte sich eine verschlechterte Lernfähigkeit in einem räumlichen Orientierungsparadigma, wobei die Amyloidplaqueformation unverändert blieb. Es konnte eine altersabhängige Hochregulation von BDNF festgestellt und eine erhöhte BDNF-Immunoreaktivität in unmittelbarer Nähe zu den Amyloidplaques gezeigt werden (Rantamaki et al., 2013). Ein anderes Alzheimer-Mausmodell mit einer zusätzlichen Herunterregulierung des endogenen BDNF-Levels zeigte keinerlei Veränderung der A β -Pathologie (Castello et al., 2012). Im Tiermodell zeigte eine aktuelle Arbeit, dass A β den proteolytischen Reifungsprozess von proBDNF zu BDNF verhinderte. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit eine verminderte BDNF-Proteinexpression nach einer klassischen Furchtkonditionierung und eine verminderte Phosphorylierung aktivitätsabhängiger Signalkaskaden aufgrund der Behandlung mit A β beobachtet (Zheng et al., 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass BDNF die Zytotoxizität des A β -Peptids protektiv beeinflusst und dass A β wiederum einen negativen Einfluss auf die BDNF-Prozessierung und -Expression hat.

Die AK ist eine Erkrankung deren Ursachen von mehreren Faktoren beeinflusst wird. So wurden im Laufe der Alzheimer-Forschung verschiedene Ansätze zur Ergründung der Ursachen, die dieser Krankheit zu Grunde liegen, untersucht. Eine Ursache, welche in der Diskussion steht, ebenfalls ein Risikofaktor für das Auftreten der AK zu sein, ist der Polymorphismus im BDNF Genlokus an Codon 66 (Val66Met). Dieser Polymorphismus steht im Verdacht zu einer gestörten Ausschüttung von BDNF zu führen (Pattwell et al., 2012). Mehrere Studien zeigten ein erhöhtes Risiko für Met66-Allel-Träger an der AK zu erkranken (Kunugi et al., 2001; Tsai et al., 2004; Tsai et al., 2006), wobei ebenso viele Studien keinen Zusammenhang zeigten (Akatsu et al., 2006; Vepsäläinen et al., 2005; Bodner et al., 2005). Eine kürzlich erschienene Metaanalyse zeigte keinen generellen Zusammenhang des Polymorphismus und einem erhöhten Risiko an der AK zu erkranken (Fukumoto et al., 2010).

Diese Studie ergab eine geschlechtsspezifische Abhängigkeit des Polymorphismus zum Erkrankungsrisiko. So scheinen Frauen mit dem Met66-Allel ein signifikant größeres Erkrankungsrisiko zu haben als männliche Met66-Träger. Neben den oben genannten kontroversen Resultaten zu den genetischen Risikofaktoren, steht eine verringerte Versorgung mit BDNF im Verdacht mit kognitiven Verfall und einem höheren Risiko an der AK zu erkranken, in Verbindung zu stehen. In gesunden Senioren wurde eine Korrelation der BDNF-Menge mit kognitiven Leistung untersucht, in der sich zeigte, dass eine schlechte kognitive Leistung mit einer geringen BDNF-Serumkonzentration korrelierte (Gunstad et al., 2008). Eine verringerte BDNF-Serumkonzentration wurde auch in Alzheimerpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen beschrieben (Laske et al., 2006a; Forlenza et al., 2009; Forlenza et al., 2010). In *post mortem* Gehirngewebe von Alzheimerpatienten wurde eine Verminderung von TrkB-Rezeptor-positiven Neuronen gefunden, was auf den Verlust von Neuronen oder auf eine Herunterregulierung von TrkB-Rezeptoren zurückgeführt werden könnte (Salehi et al., 1996). Studien zeigten einen verminderten BDNF-Gehalt im Gehirn von Alzheimerpatienten, vor allem im Hippocampus, im entorhinalen und zerebralen Kortex (zusammengefasst in z.B. Murer et al., 2001). Weiterhin konnte bei Alzheimerpatienten ebenfalls eine reduzierte Konzentration von BDNF im Liquor nachgewiesen werden. Dieser verminderte BDNF-Gehalt gilt als Prädiktor für eine Verschlechterung der kognitiven Leistungen, welche bis hin zur AK führen kann (Laske et al., 2007; Li et al., 2009). Im Gegensatz hierzu haben andere Studien eine Hochregulation von BDNF-Serumkonzentrationen in Alzheimerpatienten gefunden (Laske et al., 2006b; Angelucci et al., 2010). Diese Erkenntnisse passen zu der Hypothese, dass ein erhöhter BDNF-Gehalt auf einen Kompensationsmechanismus zurückzuführen ist. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der BDNF-Gehalt in Alzheimerpatienten Schwankungen unterliegt, deren Ursache höchstwahrscheinlich durch die Alzheimerpathologie verursacht wird. Die gegensätzlichen Befunde zur BDNF-Konzentration in Alzheimerpatienten könnten auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Es bedarf weiterer Untersuchungen um zu klären, welche Mechanismen die Schwankungen im BDNF-Gehalt verursachen.

Die oben genannten neurotrophen Eigenschaften von BDNF führten zu der Annahme, dass das Neurotrophin und dessen Wirkungsweise für therapeutische Zwecke bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der AK ein vielversprechender Ansatzpunkt sein könnte. Erste Be-

funde im Tiermodell bestätigen dies: So zeigte eine Applikation von BDNF in den entorhinalen Kortex von Alzheimer-Tiermodellen vielversprechende Ergebnisse (Nagahara et al., 2013). Eine Überexpression von BDNF nach Beginn der Alzheimerpathologie im entorhinalen Kortex eines A β -überexprimierenden Mausmodells, führte zu einem Rückgang des Verlusts von Synapsen, Verbesserung der BDNF-abhängigen Zellsignale und einer Verbesserung, sowohl in einem räumlichen Orientierungstest, als auch im kontextabhängigen Furchtkonditionierungsparadigma (Nagahara et al., 2009). Auch in zwei Jahre alten Ratten führte eine bilaterale Applikation von BDNF zu einer Verbesserung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses und zu wiederhergestellten Zellsignalwegen. Außerdem zeigten auch gealterte Primaten eine deutliche Verbesserung der altersbedingten Verschlechterung der kognitiven Leistung und einen Rückgang der neuronalen Atrophie nach künstlich erhöhter BDNF-Expression (Nagahara et al., 2009). Bei der Suche nach einem geeigneten und effektiven TrkB-Rezeptoragonisten, welcher systemisch appliziert werden und die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, wurde 7,8-Dihydroxyflavon (7,8-DHF) kürzlich identifiziert (Liu et al., 2013; Jang et al., 2010). 7,8-DHF aktiviert bei systemischer Verabreichung TrkB-Rezeptoren im Gehirn, was in einigen Studien über den Nachweis der Phosphorylierung des TrkB-Rezeptors gezeigt wurde (Jang et al., 2010; Liu et al., 2010b; Andero et al., 2012; Andero et al., 2011). Weiterhin wurde beschrieben, dass 7,8-DHF einen protektiven Effekt gegenüber der Alzheimerpathologie hat: Anhand eines Alzheimer-Mausmodells wurde gezeigt, dass die systemische Applikation von 7,8-DHF die TrkB-Signalkaskade verbesserte, das Level an β -Sekretase und A β verringerte und das Lernverhalten in einem T-Labyrinth-Versuch verbesserte (Devi und Ohno, 2012). Eine weitere Studie in der ein Alzheimer-Mausmodell mit 7,8-DHF behandelt wurde zeigte, dass die A β -Ablagerung und Defizite des räumlichen Lernens vermindert wurden. Weiterhin zeigte diese Arbeit, dass 7,8-DHF primäre kortikale Rattenneurone vor der A β -Toxizität schützte und dendritisches Wachstum sowie die Synaptogenese förderte (Zhang et al., 2013). Diese Erkenntnisse demonstrieren, dass 7,8-DHF das Potential besitzt als therapeutische Substanz bei der AK zu fungieren. Passend zu den Ergebnissen der Arbeiten mit 7,8-DHF, werden auch andere Methoden zur Erhöhung des BDNF-Levels im Organismus als mögliche Verbesserung der Alzheimerpathologie in Betracht gezogen. Es wurden eine signifikante Erhöhung des BDNF-Gehalts durch körperliche Aktivität beobachtet (Coelho et al., 2013) und eine damit einhergehende Verbesserung der kognitiven Leistungen (Erickson et al., 2011; Ruscheweyh et al., 2011). Um kognitive

Leistungen im Tiermodell zu verbessern wird die Haltungsform des „Enriched Environment“ (EE) verwendet. Als EE bezeichnet man eine Haltungsform für Versuchstiere, die sich grundlegend von der Standardhaltungsform (SH) unterscheidet. Hier werden die Tiere in größeren Gruppen in einer für die Tiere abwechslungsreichen Umgebung gehalten. Dazu werden den Tieren zahlreiche Beschäftigungsmöglichkeiten geboten, welche zur Erhöhung der physischen Aktivität, der kognitiven und sensorischen Stimulation und zu einer höheren sozialen Interaktion führen sollen. Eine Reihe von Studien zeigten einen signifikanten Effekt der EE-Haltung auf Lernleistung, strukturelle Veränderungen des ZNS und erhöhte Biosynthese verschiedener Neurotransmitter und deren Rezeptoren (zusammengefasst in Redolat und Mesa-Gresa, 2012). Durch die Haltungsform des EEs war eine signifikante Erhöhung des BDNF-Gehalts im Gehirn der Versuchstiere zu erkennen (Vazquez-Sanroman et al., 2013; Ickes et al., 2000; Angelucci et al., 2009). Auch in Alzheimer-Mausmodellen wurden Verbesserungen von kognitiven Beeinträchtigungen, nach der Haltung im EE beobachtet. Hierbei waren Verbesserungen in Bezug auf die A β -Pathologie der Alzheimer-Mausmodelle zu erkennen. So konnte die Haltung im EE eine signifikante Reduktion der A β -Belastung hervorrufen (Herring et al., 2011; Lazarov et al., 2005; Costa et al., 2007). Weitere Arbeiten zeigten eine Verbesserung von kognitiven Leistungen der jeweiligen Alzheimer-Mausmodelle, wie zum Beispiel das räumliche Lern- und Gedächtnis im Schwimmlabyrinth (Arendash et al., 2004; Hu et al., 2010; Jankowsky et al., 2005; Liu et al., 2010a). Diese Ergebnisse lassen auf eine vielversprechende Wirkungsweise der BDNF-TrkB-Signalkaskade bei der Verminderung der Alzheimerpathologie schließen, deren Wirkmechanismus noch weitestgehend unbekannt ist.

Neben den hier beschriebenen Änderungen des BDNF-Gehalts und den genetischen Veränderungen, die zu einem erhöhten Risiko an der AK zu erkranken führen, müssen zusätzliche Signalkaskaden, welche zur Entwicklung neurodegenerativer Krankheiten führen, berücksichtigt werden. Eine Erhöhung von proinflammatorischer Aktivität (Sastre et al., 2006), abnormaler oxidativer Stress (zusammengefasst in z.B. Zhu et al., 2004) und mitochondriale Dysfunktion (zusammengefasst in z.B. Swerdlow et al., 2010), sind ebenfalls mit der AK einhergehende neurodegenerative Mechanismen, die auf verminderte neurotrophe Versorgung zurückgehen. Signalkaskaden, welche den genannten Prozessen unterliegen, beeinflussen den Signalweg von BDNF, werden von BDNF beeinflusst und/oder teilen einen spezifi-

schen Signalweg. Daher können Änderungen oder Störungen eines Signalwegs eine signifikante Veränderung in einem anderen auslösen und somit zu schädlichen Effekten führen, welche im schlimmsten Fall zur Entwicklung von neurodegenerativen Kaskaden und der AK führen können. Daher ist es wahrscheinlich, dass bei komplexen neurodegenerativen Krankheiten wie der AK, schützende und kontrollierende Prozesse, die eine Homöostase aufrecht erhalten sollen, gestört sind und es somit durch verschiedene Störungsprozesse im Organismus zur Entwicklung der AK kommt (Swerdlow, 2007). Ob Schwankungen im BDNF-Gehalt Ursache oder Konsequenz der AK ist, kann bis zum heutigen Zeitpunkt nicht gesagt werden. Dass es zu noch ungeklärten Unregelmäßigkeiten im BDNF-Haushalt in der AK kommt, ist unbestritten und unterliegt weiteren Untersuchungen.

1.4 Einfluss von reduziertem BDNF im APP/PS1-Alzheimer-Mausmodell

Um verschiedene Aspekte der AK zu untersuchen wurden in den vergangenen Jahren im Rahmen der Alzheimer-Forschung zahlreiche Mausmodelle entwickelt. Diese tragen vor allem die bekannten familiären Genmutationen in verschiedenen Kombinationen der AK und modellieren somit einzelne Aspekte der AK. In der vorliegenden Arbeit wurde ein APP/PS1-Mausmodell verwendet. Dieses Mausmodell koexprimiert heterozygot den humanen APP-Genlocus mit der Schwedischen Doppelmutation KM670/671NL und der PS1 L166P-Mutation unter dem Thy1-Promotor, so dass die Expression dieser beiden Mutationen postnatal erfolgt (Radde et al., 2006). Die Schwedische APP KM670/671NL Mutation ist eine familiäre Alzheimermutation und bewirkt eine erhöhte Expression des APPs. Die Mutation im PS1-Gen, in der Leucin durch Prolin an Position 166 ausgetauscht ist (L166P), bewirkt eine Verschiebung der γ -Sekretase, bei der es zu einer massiven Erhöhung des toxischen A β -Peptids A β ₄₂ kommt (Moehlmann et al., 2002). Diese Mutation ist als eine der aggressivsten familiären Alzheimermutationen identifiziert worden und führt im Menschen zu einem sehr frühen Beginn der Alzheimerpathologie (Moehlmann et al., 2002). In dem hier vorliegenden APP/PS1-Mausmodell führt die erhöhte APP-Produktion zu einer dreimal höheren Konzentration des humanen APPs im Vergleich zum endogenen Maus-APP. Hierbei zeigt sich eine erhöhte Expression hauptsächlich in Neuronen des Neokortex, des Hippocampus und des

Hirnstamms. Die Konzentration an A β -Oligomeren steigt ab einem Alter von einem Monat rapide und kontinuierlich an, bis bei einem Alter von acht Monaten ein Plateau der A β -Konzentration erreicht ist. Erste Amyloidplaques sind ab einem Alter von sechs Wochen nachweisbar, welche sich in Anzahl und Größe mit Voranschreiten des Alters erhöhen. Im Hippocampus zeigen sich diese Plaques zuerst im Gyrus dentatus ab einem Alter von zwei bis drei Monaten. In der CA1-Region des Hippocampus sind die ersten senilen Plaques ab vier bis fünf Monaten erkennbar, wobei eine massive Erhöhung der Amyloidplaques in dieser Hippocampusregion ab acht Monaten zu sehen ist (Radde et al., 2006; Gengler et al., 2010). Ab einem Alter von acht Monaten ist der gesamte Bereich des Vorderhirns mit Amyloidplaques angereichert. Untersuchungen im Offenfeldversuch haben gezeigt, dass die spontanmotorische und explorative Aktivität der APP/PS1-Mäuse sich nicht von der der nicht-transgenen Geschwistertiere unterscheidet. Ein Vier-Arm-Labyrinth-Versuch zeigte bei fünf Monate alten APP/PS1-Tieren noch keine Beeinträchtigung im räumlichen Orientierungslernen. Testete man Tiere mit acht Monaten ein weiteres Mal in dieser Versuchsanordnung, zeigte sich ein Defizit im Umkehrlernen bei den APP/PS1-Mäusen im Vergleich zu den gleich alten nicht-transgenen Kontrolltieren (Radde et al., 2006). Weiterhin besitzt das APP/PS1-Mausmodell im Alter von acht Monaten eine eingeschränkte induzierbare Langzeitpotenzierung (LTP) in der CA1-Region des Hippocampus (Gengler et al., 2010). *In vitro* Untersuchungen in hippocampalen Kulturen der APP/PS1-Maus ergaben eine eingeschränkte exzitatorische synaptische Transmission und eine reduzierte Anzahl an Synapsen in diesen Neuronen (Priller et al., 2009). Andere Studien beschreiben einen Neuronenverlust im Körnerzellband des Gyrus dentatus bei 17 Monate alten Tieren (Rupp et al., 2010) und eine verminderte Neurogenese hippocampaler Stammzellen acht Monate alter APP/PS1-Mäuse (Ermini et al., 2008). Außerdem zeigten diese Tiere eine verminderte Netzwerkaktivität im Neokortex und Gyrus dentatus im Alter von acht bis neun Monaten (Wegenast-Braun et al., 2009). Diese vorangegangenen Arbeiten zu diesem Mausmodell zeigten robuste, jedoch nicht zu radikale Alzheimersymptome, welche sich über das Alter der Tiere potenzieren. Somit ist die hier verwendete APP/PS1-Maus ein geeignetes Modell, um die Veränderungen der Alzheimerpathologie in Verhaltensversuchen näher zu betrachten und in Verbindung mit einer chronischen BDNF-Verminderung zu untersuchen. Um einen endogenen Mangel an BDNF zu erzeugen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein heterozygoten BDNF *knockout* Mausmodell verwendet, welches einen chronischen Mangel an BDNF aufweist (Korte et al., 1995).

In diesem Mausmodell wurde ein 560 bp Fragment des BDNF-Genlokus durch ein Neomycin-Resistenzgen, welches mit einem Glyceratkinasegenpromotor und einer Polyadenylierungssequenz flankiert ist, ersetzt. Somit ist die für BDNF codierende Gensequenz fast vollständig gelöscht. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Tiere verwendet, bei denen diese Genveränderung heterozygot vorhanden war ($BDNF^{+/-}$), da Tiere, die diese Genmutation homozygot besitzen, spätestens zwei bis vier Wochen nach der Geburt sterben (Korte et al., 1995). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass dieses Mausmodell etwa die Hälfte des endogenen BDNF-Gehalts in Gehirnstrukturen wie der Amygdala, dem Hippocampus und des Präfrontalkortex aufweist (z.B. Endres und Lessmann, 2012; Psotta et al., 2013). Weiterhin besitzt dieses Mausmodell eine Beeinträchtigung in der Induzierbarkeit der Langzeitpotenzierung im Hippocampus (Korte et al., 1995). Eine vorangegangene Arbeit konnte ein altersabhängiges Defizit im räumlichen Lernen der $BDNF^{+/-}$ -Mäuse beobachten. Hierbei zeigte sich das Defizit im räumlichen Orientierungslernen ab einem Alter von sieben Monaten (Petzold et al., in Begutachtung). Weiterhin zeigten die in der vorliegenden Arbeit verwendeten $BDNF^{+/-}$ -Mäuse ein altersabhängiges Defizit im Furchtlernen. Hierbei basierte dieses Lerndefizit höchstwahrscheinlich auf einer Beeinträchtigung in der Konsolidierung der Gedächtnisbildung. Weiterhin korrelierte die individuelle Lernleistung mit dem BDNF-Gehalt in der Amygdala (Endres und Lessmann, 2012). Um die Auswirkungen eines chronischen Mangels an endogenem BDNF auf die Alzheimerpathologie zu untersuchen, wurde die oben beschriebene APP/PS1-Maus mit der heterozygoten $BDNF^{+/-}$ -Maus gekreuzt (APP/PS1- $BDNF^{+/-}$ -Maus).

1.5 Untersuchungen der kognitiven Leistungen der verwendeten Mausmodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden Verhaltensexperimente verwendet, um die kognitiven Fähigkeiten der verschiedenen Mauslinien zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten zu untersuchen. Hierbei wurden Lernparadigmen verwendet, die das emotionale und räumliche Lernen und Gedächtnis, sowie das Kurz- und Langzeitgedächtnis überprüfen.

1.5.1 Der Einfluss von chronisch reduziertem BDNF auf das Extinktionslernen konditionierter Furcht im Mausmodell

Als Extinktion wird ein Lernprozess bezeichnet, der stattfindet wenn eine vorherige Gedächtnisspur von einem neu erlernten Gedächtnis inhibiert wird. Bei der Furchtkonditionierung wird ein neutraler Stimulus (CS, konditionierter Stimulus), hier ein Ton, mit einem aversiven Stimulus (US, unkonditionierter Stimulus), hier ein kurzer aversiver Elektroschock, wiederholt zeitgleich präsentiert. Der aversive Stimulus ruft eine Furchtreaktion hervor. Diese Furchtreaktion ist anhand verschiedener Parameter quantifizierbar, wie z.B. dem Erstarren der Tiere. Das heißt, das Tier verharrt völlig bewegungslos in einer gedrunghenen Körperhaltung, auch Schreckstarre genannt. Diese Schreckstarre wird im Folgenden als „Freezing“ bezeichnet und als Indikator für das Furchtverhalten verwendet (Blanchard und Blanchard, 1969). Durch diesen Vorgang der klassischen Konditionierung wird der neutrale Stimulus mit dem aversiven Stimulus verknüpft, so dass auch ohne Präsentation des aversiven Stimulus eine Furchtreaktion hervorgerufen wird. Da der neutrale Stimulus als Prädiktor für den aversiven Stimulus erlernt wurde, kommt es nur durch die alleinige Präsentation des vorher neutralen Stimulus zu einer Furchtreaktion, d.h. der neutrale Stimulus wurde zum konditionierten Stimulus (CS). Wird der CS wiederholt alleine präsentiert, findet eine zusätzliche Verknüpfung statt, die den vorher erlernten Furchtpfad inhibiert. Das heißt, es findet ein neuer Lernvorgang statt, der bewirkt, dass die Furchtreaktion nachlässt, bis man schließlich keine konditionierte Furchtreaktion mehr erkennen kann. Dass dieser Vorgang der Extinktion das ursprüngliche Furchtgedächtnis nur inhibiert und nicht löscht, zeigt der Umstand, dass die erlernte Furchtreaktion auch nach erfolgreichem Extinktionslernen wieder auftreten kann (Spontanerholung). Da das Extinktionslernen kontextabhängig ist, kann die Präsentation des CS, in einem anderen Kontext dargeboten, die ursprüngliche Furchtreaktion auch nach erfolgreicher Extinktion wieder auslösen („renewal“). Extinktionslernen und die Expression des Extinktionsgedächtnisses basieren hauptsächlich auf drei Strukturen im Gehirn. Die Amygdala kann vereinfacht als der zentrale Ort für die Verarbeitung und Speicherung für konditionierte Furcht angesehen werden. Neben der Amygdala gelangt die CS-Information in den Hippocampus und den medialen Präfrontalkortex (mPFC) und wird dort verarbeitet. Hierbei wirkt der mPFC als Schaltstation in welche die CS-Informationen von sensorischen Assoziationsgebieten eintreffen und in die Kontextinformationen vom Hippo-

campus eingehen. Innerhalb des Extinktionskontexts inhibiert der IL mPFC (infralimbischer medialer Präfrontalkortex) den Furchtpfad, der von der Amygdala ausgeht, indem die Interkalierten Zellen (ITC) der Amygdala vom mPFC aktiviert werden. Außerhalb des Extinktionskontexts wird dieser Pfad nicht gehemmt und es kommt zur konditionierten Furchtreaktion (siehe zusammenfassend z.B. Quirk und Mueller, 2008; Maren, 2011).

Da BDNF, wie oben erwähnt, ein entscheidender Faktor bei der Induktion und Expression aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität ist, und somit neuronale Prozesse regelt, die zu Lernen und der Bildung von Gedächtnis führen (siehe zum Beispiel Bekinschtein et al., 2008; Cowansage et al., 2010; Gottmann et al., 2009), wurde die Rolle von BDNF auch in emotionalen Lern- und Gedächtnisparadigmen untersucht. BDNF spielt eine kritische Rolle in der Akquisition und Konsolidierung von konditionierter Furcht (Endres und Lessmann, 2012; Ou et al., 2010; Rattiner et al., 2004; Rattiner et al., 2005; Schulz-Klaus et al., 2013). Auch bei der Extinktion von konditioniertem Furchtgedächtnis wurde die Beteiligung von BDNF gezeigt. Hierbei verursacht das Furchtextinktionstraining einen massiven Anstieg von BDNF-mRNA im IL mPFC (Bredy et al., 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Infusion von BDNF in den IL mPFC ein Extinktionsgedächtnis auch ohne Extinktionstraining induziert (Peters et al., 2010) und dass eine spezifische genetische Herunterregulierung von BDNF im Hippocampus das Extinktionslernen beeinträchtigt (Heldt et al., 2007). Extinktionstraining führt in der basolateralen Amygdala (BLA) zu einem Anstieg der BDNF-mRNA Expression. Eine Störung des BDNF-Signalwegs durch die Expression eines nicht-funktionierenden, verkürzten TrkB-Rezeptors (tTrkB) in der Amygdala, verhinderte die Bildung eines Extinktionsgedächtnisses, ließ aber die Kurzzeit-Extinktion während des Trainings intakt (Chhatwal et al., 2006). Dies deutet auf eine bedeutende Rolle von BDNF bei der Konsolidierung des Extinktionsgedächtnisses hin. Ist die BDNF-Sekretion zum Beispiel aufgrund des Val66Met-Polymorphismus gestört (Egan et al., 2003), kommt es ebenfalls zu einem gestörten Extinktionslernen in Mäusen und Menschen (Soliman et al., 2010). Es wurde außerdem gezeigt, dass der TrkB-Agonist 7,8-DHF durch systemische Applikation zu einer Förderung des Extinktionslernens bei Mäusen führte (Andero et al., 2010). Eine vorausgegangene Arbeit zeigte ein Defizit der BDNF^{+/-}-Mäuse im konditionierten Furchtlernen, wenn die Tiere älter als drei Monate alt waren (Endres und Lessmann, 2012). Da einige Studien den Einfluss von BDNF auf das Amygdala abhängige Extinktionslernen (Chhatwal

et al., 2006; Andero et al. 2010) und einen altersabhängigen Rückgang der BDNF-Proteinmenge zeigten (Boger et al., 2011; Carreton et al., 2012; Silhol et al., 2005), wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des chronischen Mangels an BDNF das Extinktionslernen anhand der BDNF^{+/-}-Maus untersucht und gleichzeitig der BDNF-Proteingehalt in furcht- und extinktionsrelevanten Hirnarealen bestimmt.

1.5.2 Der Objektwiedererkennungstest zur Überprüfung des Kurzzeitgedächtnisses

Der Objektwiedererkennungstest ist ein Verhaltensversuch mit dem geprüft wird, ob sich ein Versuchstier an ein Objekt erinnern kann. Dieser Verhaltenstest ist ein weit verbreitetes Experiment, das zur Untersuchung von Gedächtnis- und Kognitionsleistung bei Versuchstieren verwendet wird. In der vorliegenden Arbeit wurde das Paradigma zur Überprüfung des Kurzzeitgedächtnisses verwendet. Da bei diesem Test keine positiven oder negativen Verstärker (z.B. Nahrung oder Nahrungsentzug, Elektroschocks) involviert sind, ist dieses Experiment vergleichbar mit Tests, die in humanen Studien verwendet werden (Moscardo et al., 2012). Hierbei wird die natürliche Tendenz von Nagern genutzt, ein nicht bekanntes Objekt intensiv zu explorieren (Berlyne, 1950). Im ersten Durchgang des Versuchs werden dem zu testenden Tier zwei identische Objekte zur Exploration präsentiert. Nach einer definierten Pause wird eines der bekannten Objekte durch ein dem Tier unbekanntes Objekt ausgetauscht und zur Exploration dargeboten. Hierbei müssen kognitive Prozesse aktiv werden, um das neue Objekt zu detektieren und zu erfassen, währenddessen das bekannte Objekt wiedererkannt und die Erinnerung daran abgerufen werden muss. Wenn das Tier sich an das bekannte Objekt erinnert, wird es mehr Zeit damit verbringen das unbekannte Objekt zu explorieren (zusammengefasst in Ennaceur, 2010). Studien zeigten, dass der Objektwiedererkennungstest von Läsionen des Hippocampus und des perirhinalen Kortex von Ratten und Primaten beeinflusst wird (Buckmaster et al., 2004; Clark et al., 2000; Winters et al., 2004). Das heißt, es sind sowohl hippocampale als auch kortikale Strukturen involviert. Es wird vermutet, dass der Hippocampus eine wichtige Rolle bei der Integration der räumlichen und kontextspezifischen Informationen mit der spezifischen Objektinformation des perirhinalen

Kortex spielt (Eichenbaum et al., 2007; Eacott und Gaffan, 2005; Bussey und Aggleton, 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die verwendeten Mausmodelle altersabhängig eine Veränderung bzw. eine Einschränkung in diesen Kurzzeit-Kognitionsleistungen aufweisen. Es gibt Hinweise darauf, dass BDNF auch bei der Bildung des Objektwiedererkennungsgedächtnisses im Hippocampus und im perirhinalen Kortex eine zentrale Rolle spielt. Die Bildung eines Objektwiedererkennungsgedächtnisses bei Ratten war mit einer Erhöhung der BDNF-Ausschüttung im Gyrus dentatus und im perirhinalen Kortex begleitet. Dieses Gedächtnis konnte durch eine Applikation von TrkB-Rezeptor-Blockern im Hippocampus inhibiert werden (Callaghan und Kelly, 2012; Furini et al., 2010). Weiterhin konnte eine positive Korrelation von BDNF-Expression im perirhinalen Kortex und der Leistung in einem Objektwiedererkennungstest beobachtet werden (Munoz et al., 2010). Ein Aspekt der diversen Symptomatik der AK ist der progressive Verlust des Kurzzeitgedächtnisses. Auch bei verschiedenen Alzheimer-Mausmodellen konnte ein Defizit im Kurzzeitgedächtnis anhand des Objektwiedererkennungstest beobachtet werden (Farr et al., 2014; Feld et al., 2013; Webster et al., 2013). Weiterhin deutet eine weitere Arbeit darauf hin, dass bei diesem Gedächtnisprozess der BDNF-TrkB-Signalweg von Bedeutung ist, da der selektive TrkB-Agonist 7,8-DHF, die Objektwiedererkennung bei Ratten und Wildtypmäusen verbessert, wobei im Alzheimer-Mausmodell eine Verbesserung des räumlichen Gedächtnisses im Objektwiedererkennungstest beobachtet werden konnte (Bollen et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test verwendet, um das Kurzzeitgedächtnis der in dieser Arbeit verwendeten Genotypen und Altersgruppen zu untersuchen.

1.5.3 Das Schwimmlabyrinth nach Morris als Lernparadigma zur Untersuchung des räumlichen Gedächtnisses

Das Schwimmlabyrinth nach Morris (Morris Water Maze) ist ein Hippocampus abhängiges Verhaltensexperiment, welches dazu dient das räumliche Lernen und Gedächtnis bei Mäusen und Ratten zu untersuchen (Morris, 1984). Hierbei müssen die Tiere lernen, sich anhand distaler Orientierungspunkte (Landmarken) in einem Schwimmlabyrinth zu orientieren, um den Ausweg aus der aversiven Umgebung zu finden. Als Ausweg aus dem Schwimmlaby-

rinth dient eine sich etwa ein Zentimeter unter der Wasseroberfläche befindliche Plattform, die für die Tiere nicht sichtbar ist. Der Ausweg ist also nur über räumliches Orientieren möglich, wobei die Position der Plattform im Labyrinth gelernt und im Gedächtnis gespeichert werden muss. Mehrere Studien zeigten eine starke Beteiligung des Hippocampus in diesem Verhaltenstest. Studien in denen der Hippocampus durch Läsionen geschädigt wurde, zeigten bei Ratten und Mäusen eine Beeinträchtigung der räumlichen Orientierung und des Lernens der Position der Plattform im Schwimmlabyrinth (Morris et al., 1982; Cho et al., 1999). Läsionen im Bereich des dorsalen Hippocampus zeigten hierbei eine größere Beeinträchtigung im räumlichen Lernen, als Läsionen im ventralen Bereich (Moser et al., 1993; Moser et al., 1995). Das Training im Schwimmlabyrinth erfordert ebenfalls kortikale Strukturen, welche zur Planung und Ausführung der Aufgabe benötigt werden. Hierbei ist der Hippocampus während des räumlichen Lernens von reziproken Verbindungen zu ento- und perirhinalen Kortexarealen abhängig. Läsionen dieser kortikalen Bereiche verursachten eine Beeinträchtigung in der Akquisition des räumlichen Lernens (Liu und Bilkey, 1998; Roof et al., 1993). Der Val66Met-Polymorphismus im humanen BDNF-Genlocus resultierte sowohl in einem verminderten Hippocampusvolumen als auch in einer Beeinträchtigung im räumlichen Orientierungslernen und -gedächtnis (Erickson et al., 2010; Kambeitz et al., 2012; Molendijk et al., 2012). BDNF scheint somit auch im Hippocampus eine wichtige Rolle zu spielen. Mehrere Arbeiten zeigten den Zusammenhang von BDNF und Lernen im Schwimmlabyrinth, wobei die Expression der BDNF-mRNA und der Proteinmenge im Hippocampus zunahm (Harvey et al., 2008; Park et al., 2011; Silhol et al., 2007). Weiterhin führte eine leichte Überexpression von BDNF und die Applikation von BDNF in den Hippocampus zu einer Verbesserung des räumlichen Lernens im Schwimmlabyrinth (Cirulli et al., 2004; Nakajo et al., 2008; Pietropaolo et al., 2007). Passend zu diesen Erkenntnissen wurde beobachtet, dass Behandlungen zur Erhöhung des BDNF-Gehalts in Kortex, Thalamostriatum, Hippocampus und im gesamten Vorderhirn von Mäusen zu einer Verbesserung im Schwimmlabyrinth führte (Yanamoto et al., 2008). Eine Störung des BDNF-TrkB-Signalwegs durch Applikation von BDNF-Antikörpern bei Ratten, resultierte in einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernens und Gedächtnis (Mu et al., 1999). Wurden die TrkB-Rezeptoren mit Hilfe des BDNF-Agonisten 7,8-DHF aktiviert, kam es zu einer Verbesserung der altersbedingten Verschlechterung von Ratten im Schwimmlabyrinth (Zeng et al., 2012). Das Schwimmlabyrinth nach Morris ist ein Standardparadigma zur Untersuchung von

kognitiven Leistungen wie das räumliche Orientierungslernen in Alzheimer-Mausmodellen. Hierbei wird die Beeinträchtigung der Leistung im Schwimmlabyrinth der Tiere mit der Abnahme der intellektuellen Leistungen von Alzheimerpatienten verglichen (z.B. Terry 2009). Einige Arbeiten zeigten eine Beeinträchtigung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses in Alzheimermodellen. So führt die Infusion von A β -Peptiden in den Hippocampus oder die zerebralen Ventrikel von Ratten zu einer Störung der Lernens und des Gedächtnisses im Schwimmlabyrinth (Nitta et al., 1994; Nabeshima und Nitta, 1994; Chen et al., 1996). Weiterhin zeigten Alzheimer-Mausmodelle, die Genveränderungen im APP- und PS1-Genlocus tragen, im Schwimmlabyrinth eine altersabhängige Verschlechterung (Lok et al., 2013a; Lo et al., 2013b). In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Lernexperiment verwendet, um das Hippocampus abhängige Lernen bei den unterschiedlichen Genotypen der verschiedenen Altersgruppen zu testen.

1.6 Der Einfluss von BDNF und der Alzheimer Krankheit auf die Funktion neuronaler Mitochondrien

Die Hauptursache der Alzheimerpathologie wird der massiven Erhöhung des neurotoxischen A β -Peptids zugeschrieben. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass auch die Funktion neuronaler Mitochondrien in Alzheimerpatienten von der A β -Pathologie betroffen ist (zusammengefasst in z.B. Pinho et al. 2014). Hierbei wurde gezeigt, dass die abnormale Prozessierung von APP zum zelltoxischen A β auch innerhalb der Mitochondrien stattfindet und zu mitochondrialen Dysfunktion führen kann. Dies ist wiederum eine zusätzliche Symptomatik der Alzheimerpathologie, die zur Initiierung der AK führen könnte (zusammengefasst z.B. in Swerdlow et al., 2010). Wie in allen eukaryotischen Zellen sind Mitochondrien auch in Neuronen die Hauptproduzenten der benötigten Energie, um die normalen Funktionen der Zelle aufrecht zu erhalten. Innerhalb der Mitochondrien wird über die oxidative Phosphorylierung ATP generiert. Während der oxidativen Phosphorylierung werden Elektronen über fünf Proteinkomplexe transferiert an dessen Ende die Bildung von ATP steht. Es gibt Hinweise, dass Fluktuationen des Energiemetabolismus erste Anzeichen der AK sein könnten (Muller et al., 2010; Galindo et al., 2010). APP und A β reichern sich in Mitochondrienmembranen an und

können somit strukturelle Schäden der Mitochondrien verursachen und den normalen Energiemetabolismus von Neuronen stören (Chen und Yan, 2010; Tillement et al., 2011). So konnte gezeigt werden, dass der Energiemetabolismus in den Mitochondrien eines Alzheimer-Mausmodells durch die Expression von APP und A β beeinträchtigt war (Reddy et al., 2004). Der Prozess des axonalen Transports ist ein essentieller Vorgang innerhalb von Neuronen, um die Funktionen, wie zum Beispiel den Transport von Neurotrophinen, auszuführen. Für die Vorgänge die einen normalen axonalen Transport möglich machen, wird Energie benötigt, die von den Mitochondrien bereitgestellt wird (Hollenbeck und Saxton, 2005; Hollenbeck, 1996). Einige Arbeiten zeigten, dass ein defekter axonaler Transport ein Symptom der AK sein kann (De Vos et al., 2008; Stokin und Goldstein, 2006). Da der axonale Transport die Basis der Funktion von Neurotrophinen ist, kann eine Verbindung zu defektem BDNF-Transport und der Alzheimerpathologie hergestellt werden (Schindowski et al., 2008). Der Transport von BDNF in Neuronen von Alzheimer-Mausmodellen kann beeinträchtigt sein und A β -Oligomere können den retrograden Transport von BDNF stören (Poon et al., 2011). Somit deuten einige Ergebnisse darauf hin, dass A β sekundär den BDNF-Signalweg durch Störung des mitochondrialen Metabolismus beeinträchtigen könnte. In der vorliegenden Arbeit sollten die respiratorische Aktivität der Mitochondrien der APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren untersucht werden. Da es einen Zusammenhang zwischen der Alzheimerpathologie und eingeschränkter Mitochondrienfunktion zu geben scheint, ist eine verminderte Mitochondrienaktivität von APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren zu erwarten. Inwieweit eine chronische Verringerung des BDNF-Spiegels einen Einfluss auf die Mitochondrienfunktion hat, sollte ebenfalls untersucht werden. Zwei Arbeiten zeigten eine Verbesserung der Komplex-I abhängigen Atmung der Atmungskette durch BDNF, sowohl der Mitochondrien von Kleinhirnneuronen von Ratten, als auch in neuronalen Mitochondrien von Mäusen (Markham et al., 2004; Markham et al., 2012). Ob ein Mangel an BDNF zu einer verminderten Mitochondrienaktivität führt, ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht geklärt.

1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Da BDNF ein essentieller Mediator, sowohl für Lern- und Gedächtnisprozesse, als auch für das Überleben von Neuronen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Neurotrophins auf verschiedene Lernformen untersucht. Es sollte der Einfluss eines chronischen Mangels an endogenem BDNF, sowohl auf das emotionale und räumliche Lernen und Gedächtnis, als auch auf das Kurzzeitgedächtnis mit Hilfe verschiedener Verhaltensparadigmen überprüft werden. Hierbei wurde die Extinktion von konditionierter Furcht altersabhängig betrachtet. Anhand eines neu entwickelten Mausmodells wurde untersucht, inwieweit die endogene Verringerung um etwa 50 % des BDNF-Gehalts, eine Auswirkung auf das Hippocampus und Kortex abhängige Lernverhalten in verschiedenen Altersstufen hat. Dazu wurden das Alzheimer-Mausmodell APP/PS1, das heterozygote BDNF *knockout* Mausmodell (BDNF^{+/-}) und das Mausmodell, welches aus der Kreuzung dieser beiden Modelle kreiert wurde (APP/PS1-BDNF^{+/-}), in verschiedenen Altersstufen im Schwimmlabyrinth und im Objektwiedererkennungstest untersucht. Weiterhin wurde der BDNF-Gehalt in lernrelevanten Gehirnregionen der verwendeten Mauslinien, in den verschiedenen Altersgruppen bestimmt. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Hippocampus abhängige Lernen und Gedächtnis im Schwimmlabyrinth und das endogene BDNF-Level in verschiedenen Gehirnregionen über die erweiterte Haltungsform des „Enriched Environment“ verändert wird. Desweiteren wurde untersucht, inwieweit die Alzheimerpathologie, der Mangel an BDNF und beide Faktoren zusammen, einen Einfluss auf die Atmungskette in hippocampalen und kortikalen Mitochondrien haben. Es sollte geklärt werden, ob sich die Lernleistung und das BDNF-Level während des Alterungsprozesses in den verschiedenen Genotypen verändert und ob sich eine altersabhängige Veränderung der Lernleistung auf einen Mangel an BDNF und/oder auf die Alzheimerpathologie zurückführen lässt.

Da BDNF und dessen Signalweg eng mit den pathologischen Prozessen der AK verknüpft sind, könnte der endogene Mangel an BDNF zu einer Beschleunigung der Alzheimerpathologie führen. Dies bedeutet, dass der zusätzliche Mangel an BDNF im Alzheimer-Mausmodell zu einem früheren Beginn der potentiell auftretenden Lernbeeinträchtigungen führen könnte. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Mausmodell APP/PS1-BDNF^{+/-}

sollte somit zu einem früheren Zeitpunkt eine Beeinträchtigung im Lernen zeigen, oder zumindest eine Verschlimmerung der Alzheimerpathologie bzw. –symptomatik aufweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Arbeit wurden Mäuse (*Mus musculus*) vier verschiedener Genotypen (APP/PS1, BDNF^{+/-}, APP/PS1-BDNF^{+/-} und C57/BL6J) aus fünf verschiedenen Altersgruppen (zwei, fünf, sieben, neun und 12 Monate) verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse gehen auf den C57/BL6J-Hintergrundstamm (Charles River, Sulzfeld) zurück. Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, da der weibliche Hormonzyklus Einfluss auf die Versuchsergebnisse, speziell die BDNF-Expression, haben könnte (Zusammengefasst z.B. in Scharfmann und MacLusky, 2006). Die Tiere wurden in Typ II-Käfigen in einer Gruppengröße von zwei bis vier Tieren pro Käfig (Ausnahme Enriched Environment Haltung, siehe unten) in einem 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus (Licht an ab 07:00 Uhr) bei 22 ± 1 °C Raumtemperatur gehalten. Wasser und Futter stand *ad libitum* zur Verfügung. Alle vorliegenden Versuche wurden in der Tag-Phase der Versuchstiere und gemäß der Tierschutzrichtlinien durchgeführt und vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigt und überwacht (IPHY/G/01-1047/11).

2.2 Haltungsbedingungen des Enriched Environments

Für die entsprechenden Versuche der vorliegenden Arbeit wurden Tiere im Enriched Environment (EE) in einer Gruppengröße von vier bis acht Tieren in einem Typ III-Käfig gehalten. Die Tiere kamen direkt nach dem Absetzen von der Mutter aus dem Zuchtkäfig in die EE-Haltung und blieben dort bis zum Beginn des Versuchs. Als EE wurden den Tieren ein Laufrad mit integriertem Häuschen (Innovive Inc., CA, USA), Nistmaterial (Zellstoff) und wöchentlich wechselnde Objekte (Tunnel, Labyrinth, Holzwürfel, Leiter, Seil, Tunnellabyrinth, Kauknochen) zur Verfügung gestellt. Die Komposition der EE-Haltung zeigt Tabelle 1. Abbildung 1 zeigt auszugsweise die Komposition der EE-Haltung der dritten Woche.

Tabelle 1: Tabellarisches Schema zum Wechsel der Gegenstände der EE-Haltung. Nach dem Wechsel der vierten Woche folgt das Arrangement der ersten Woche usw. Gegenstände der ersten Zeile befinden sich dauerhaft im Käfig.

Laufrad mit integriertem Haus und Nistmaterial			
<u>erste Woche:</u>	<u>zweite Woche:</u>	<u>dritte Woche:</u>	<u>vierte Woche:</u>
Tunnellabyrinth	Seil und Tunnel	Holzwürfel und Labyrinth	Kauknochen und Leiter



Abbildung 1: Beispielorganisation der dritten Woche der EE-Haltung

2.3 Verhaltensexperimente

2.3.1 Extinktion von konditionierter Furcht im BDNF^{+/-}-Mausmodell

In der vorliegenden Arbeit wurden BDNF^{+/-}- und Wildtypmäuse im Alter von zwei und sieben Monaten verwendet. Die Tiere wurden am ersten Tag des Experiments furchtkonditioniert. Hierzu wurden die Tiere in eine Kammer mit einem strominduzierbaren Gitter gesetzt. Die Kammer war von äußeren Reizen abgeschirmt und konnte durch flexible Lichtverhältnisse und Umgebungskontexte verändert werden. Um den Kontext zwischen Furchtkonditionierung und Extinktion bzw. Extinktionsgedächtnistest zu variieren, konnten die Lichtverhältnisse von hell (20 lx) nach dunkel (4 lx) verändert werden. Im Extinktionskontext war das Bodengitter mit einer Bodenplatte aus PVC (schwarz oder grau) abgedeckt. Weiterhin wurde der Kontext durch An- oder Ausschalten der Belüftung verändert, um die Geräuschkulisse zu variieren. Um die Erscheinung der Box unterschiedlich zu gestalten, wurden Plas-

tikboxen unterschiedlicher Farbe verwendet (durchsichtig, schwarz). Eine olfaktorische Abänderung des Kontexts wurde durch zwei unterschiedlich riechende Reinigungsmittel erreicht (Descosept AF, 70 % Alkohollösung). Über Infrarotlichtschranken wurden die Bewegungen der Tiere automatisch aufgezeichnet und ausgewertet (TSE Fear Conditioning System, TSE Systems GmbH, Bad Homburg). Die zwei Monate alten Tiere erhielten ein Furchtkonditionierungsprotokoll in dem der unkonditionierte Elektroschock (US, 1 s, 0,7 mA) dreimal mit dem konditionierten Reiz (CS, 30 s, 8 kHz, 75 dB, SPL) gepaart wurde. Für die sieben Monate alten Tiere wurde ein stärkeres Furchtkonditionierungsprotokoll verwendet, da eine vorherige Studie zeigte, dass BDNF^{+/-}-Mäuse, die älter als drei Monate alt sind, ein Defizit im Furchtlernen aufweisen (Endres und Lessmann, 2012). Um dieses Lerndefizit zu kompensieren, wurde für die älteren Tiere ein schwächerer unkonditionierter Reiz von 0,4 mA (1 s) fünfmal mit dem konditionierten Stimulus gepaart. Einen Tag später erhielten die Tiere in veränderten Kontextbedingungen ein Extinktionsprotokoll in dem der konditionierte Stimulus 28-mal mit einer Zwischenintervallzeit (ITI) von 5 s hintereinander präsentiert wurde. Für die Auswertung des Extinktionstrainings wurde das Freezing-Verhalten zu Beginn jeweils der ersten 3 CS Präsentationen gemittelt (CS 1-3) und anschließend im weiteren Verlauf von jeweils 5 CS Präsentationen zusammengefasst. Diese unterschiedlichen Zusammenfassungen des Freezings-Verhaltens auf Reaktion auf den CS wurden zur besseren Vergleichbarkeit zwischen Training und Gedächtnistest (CS 1-3 Training zu CS-Freezing Gedächtnistest), sowie innerhalb des Extinktionstrainings zur besseren Übersicht durchgeführt. Am nächsten Tag wurde das Extinktionsgedächtnis der Tiere getestet. Hierzu wurden die Tiere im Extinktionskontext nach einer Habituationsphase von 120 s dreimal dem konditionierten Stimulus ausgesetzt, um das Furchtverhalten zu überprüfen. Abbildung 2 fasst den Versuchsablauf schematisch zusammen. In diesem Versuch waren die Protokolle des Extinktionstrainings und des Gedächtnistests für beide Altersgruppen identisch. Im gesamten Experiment wurde die Kammer nach jedem Versuchsdurchgang gründlich mit alkoholbasiertem Reinigungsmittel gesäubert, um Geruchsspuren zu vermeiden (70 % Ethanolösung oder Descosept AF).

Tag 1	Tag 2	Tag 3
Furchtkonditionierung Kontext A	Extinktionstraining Kontext B	Extinktionsgedächtnis-Test Kontext B

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Furchtextinktion von zwei und sieben Monate alten BDNF^{+/-}- und Wildtypmäusen

2.3.2 Objektwiedererkennungstest

Für den Objektwiedererkennungstest wurden dem Versuchstier in einer rechteckigen Arena (30 x 45 cm) im ersten Durchgang des Versuchs zwei identische Objekte präsentiert. Das Experiment wurde unter gedimmten Lichtbedingungen (8 lx) durchgeführt und mittels einer an der Decke befestigten Kamera aufgezeichnet und über die Software ANY-maze manuell ausgewertet. Als Objekte dienten farbige Holzklötze verschiedener Formen (Würfel, Zylinder). Hierbei wurden zwei Objekte auf einer Seite der Arena nebeneinander angeordnet. Die Arena wurde virtuell in eine Rand- und eine Zentrumszone unterteilt, wobei sich die Objekte innerhalb der Randzone befanden (7 cm von Arenawand). Die Randzone bestand aus dem 10 cm breiten Rand der Arena und betrug etwa 80 % der Gesamtfläche. Für den Objektwiedererkennungstest wurden Tiere aller Genotypen und Altersgruppen verwendet. Das Versuchstier wurde vom Experimentator in die entgegengesetzte Seite der Arena mit dem Gesicht zur Wand eingesetzt. Der erste Objektpräsentationsdurchgang dauerte 10 Minuten. Danach wurde das Versuchstier vom Experimentator aus der Arena in einen separaten Käfig für 30 Minuten in einen benachbarten Raum gebracht. Nach der Pause wurde eines der beiden bekannten Objekte durch ein dem Versuchstier unbekanntes Objekt ausgetauscht. Im zweiten Durchgang hatte das Tier wieder 10 Minuten Zeit die Arena mit den beiden Objekten zu explorieren. In Abbildung 3 sind der Versuchsablauf und die Versuchsdurchführung schematisch dargestellt. Nach jedem Durchgang wurden Arena und Objekte gründlich mit einem alkoholbasierten Reinigungsmittel (Descosept AF) gesäubert, um das Verhalten der Versuchstiere nicht durch Geruchsspuren zu beeinflussen. Während der beiden Durchgänge wurde die Exploration der Tiere über eine Kamera zeitgleich beobachtet und die Dauer der Exploration vom Experimentator aufgenommen. Hierbei wurden das Schnüffeln am Objekt und/oder das Berühren des Objekts mit der Nase oder den Vorderpfoten als Exploration ge-

wertet. Das Sitzen auf oder neben dem Objekt wurde nicht als Explorationszeit gewertet. Zur Auswertung des Versuchs wurde die absolute Zeit der Exploration des neuen und schon bekannten Objekts durch die gesamte Explorationszeit des zweiten Durchgangs geteilt und somit ein Präferenzindex beider Objekte gebildet. Zeigten die Tiere im ersten Durchgang des Tests eine Exploration von weniger als 10 Sekunden, wurde das Tier aus der Gesamtanalyse ausgeschlossen.

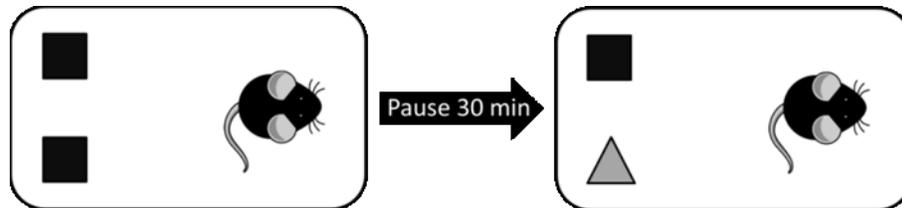


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des Objektwiedererkennungstests

2.3.3 Das Schwimmlabyrinth - Morris Water Maze

Das Schwimmlabyrinth bestand aus einem mit Wasser gefüllten, runden Tank mit einem Durchmesser von 150 cm. Das Wasser hatte eine Temperatur von 22 ± 1 °C und war mit Hilfe von Lebensmittelfarbe (Sensient food colors, Germany GmbH, Geesthacht) undurchsichtig gefärbt, um die Plattform für die Tiere nicht sichtbar zu machen. Das Schwimmlabyrinth wurde virtuell in vier sogenannte Quadranten aufgeteilt, die nach den Himmelsrichtungen benannt wurden. Abbildung 4 und 5 zeigen den schematischen Aufbau und die Organisation des verwendeten Schwimmlabyrinths. Hierbei wurde der Quadrant, in dem sich die Plattform befand, als Zielquadrant bezeichnet. Der Versuch wurde von einer an der Decke angebrachten Kamera aufgezeichnet und mit Hilfe des Video-Tracking-Systems ANY-maze (Anymaze, Stoelting Co., Wood Dale, IL) aufgezeichnet und ausgewertet.

Fünf Tage nach dem Objektwiedererkennungstest wurden die Tiere im Schwimmlabyrinth getestet. Hierzu wurden die Tiere an vier aufeinander folgenden Tagen im Schwimmlabyrinth trainiert. Dazu durchliefen die Tiere pro Trainingstag vier Trainingsdurchgänge. Hierbei wurde das jeweilige Versuchstier mit dem Gesicht zur Tankwand ins Wasser gelassen. Jeder Trainingsdurchgang dauerte 60 s und begann in einer anderen pseudorandomisierten Startposition, so dass das Tier sich in jedem Durchgang räumlich neu orientieren musste und

um zu verhindern, dass die Tiere einen Schwimmpfad lernen, anstatt die Plattform im Raum anhand der gegebenen Landmarken zu lokalisieren. Hat die Maus nicht innerhalb der 60 s die Plattform gefunden, wurde diese vom Experimentator zur Plattform geführt. Dort musste das Tier für ca. 5 s sitzen bleiben, um dem Tier die Gelegenheit zu bieten sich die Position der Plattform im Schwimmlabyrinth einzuprägen. Danach wurde die Maus zurück in den Heimkäfig gebracht. Um zu verhindern, dass die Tiere über den Trainingszeitraum auskühlen, standen die Käfige unter einer Wärmelampe. Innerhalb des Trainingsverlaufs und mit dem damit einhergehenden Lernprozess, verkürzt sich die Zeit, die die Tiere benötigen die Plattform zu erreichen. Diese Zeit wird als Latenz bezeichnet und dient als Indikator für die Lernleistung der Tiere während des Trainings. 24 Stunden nach dem letzten Trainingsdurchgang erfolgte ein Test zur Überprüfung des räumlichen Gedächtnisses der Tiere, der sogenannte „Probe Trial“. In diesem Durchgang wurde die Plattform aus dem Schwimmlabyrinth entfernt, um zu überprüfen in wie weit das Versuchstier die Lokalisation der Plattform verinnerlicht hat. Dies wurde anhand der Aufenthaltsdauer des Versuchstiers im Zielquadranten ermittelt. Unterscheidet sich die Aufenthaltsdauer der Maus im Zielquadranten signifikant von der mittleren Aufenthaltszeit innerhalb der anderen drei Quadranten, geht man davon aus, dass sich das Tier die Lokalisation der Plattform gemerkt hat und deshalb danach an der ursprünglichen Position sucht.



Abbildung 5: Schwimmlabyrinth mit distalen Landmarken zur räumlichen Orientierung. Position der Plattform ist schematisch durch die gestrichelte Linie angedeutet.

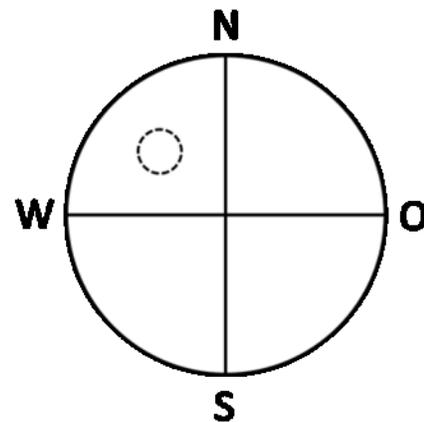


Abbildung 4: Schematische Darstellung der virtuellen Aufteilung des Schwimmlabyrinths. Die Position der Plattform ist mittels gestrichelter Linien angedeutet.

2.4 Proteinquantifizierung mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

2.4.1 Präparation zur Probengewinnung für die BDNF- und A β -ELISA-Messungen

Zur Gewebegewinnung der einzelnen Hirnareale für die BDNF- und A β_{42} -Proteinquantifizierungen mittels ELISA wurden die Tiere mit Isolfuran betäubt und anschließend dekapitiert. Danach wurde das gesamte Gehirn aus dem Schädel heraus präpariert und in eine Gehirnmatrix (AgnTho's AB, Lidingö, Schweden) gelegt. Mit Hilfe dieser Gehirnmatrix war es möglich einen definierten Teil des Gehirns als Schnitt herauszuschneiden. Aus dem so gewonnenen Schnitt wurde mit Hilfe eines Gewebestanzers (Zivic Instruments, Pittsburgh PA, USA) eine kreisrunde Probe aus dem gewünschten Gehirnareal extrahiert. Es wurden Proben des dorsalen Hippocampus, der Amygdala und des medialen Präfrontalkortex (mPFC) entnommen und sofort nach Probenentnahme auf einer Feinwaage gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur Proteinquantifizierung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 A β_{42} - und BDNF-ELISA-Messungen

Zur Quantifizierung von A β_{42} - und BDNF-Protein in Amygdala, Hippocampus und des medialen Präfrontalkortex aller in dieser Arbeit verwendeten Altersgruppen und Genotypen, wurde das Colorimetric BetaMark™ ELISA kit (Covance, Münster) zur Bestimmung von A β_{42} verwendet. Zur Proteinbestimmung von BDNF wurde das Quantikine® ELISA kit (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet. Alle ELISA-kits kamen entsprechend den Herstellerangaben zur Anwendung. Für die Proteinquantifizierungen wurden je nach Experiment Tiere verwendet, welche sowohl die Verhaltensversuche durchlaufen hatten, als auch naive Tiere, die an keinen Verhaltensversuchen teilgenommen hatten. Die extrahierten Gehirnproben wurden wie folgt einen Tag vor den ELISA-Messungen lysiert. Auf 1 mg Probengewicht wurden 200 μ l Lysepuffer pipettiert und auf Eis mit einer Injektionsnadel (27G) tritu-

riert. Danach wurde das Lysat dreimal hintereinander in Stickstoff schockgefroren und aufgetaut um mehr Protein aus den Zellen zu lösen. Anschließend wurde das Lysat bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und am nächsten Tag bei 10000 rpm 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde für die ELISA-Messung verwendet. Das ELISA-Verfahren ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren von Proteinen. Hierbei befindet sich ein monoklonaler Antikörper, an dem spezifisch BDNF bzw. $\text{A}\beta_{42}$ bindet, auf der Oberfläche einer Mikroplatte. Die zu testenden Proben und der Standard werden in die einzelnen Wells der Mikroplatte pipettiert. Dabei bindet das sich in der Probe vorhandene BDNF- bzw. $\text{A}\beta_{42}$ -Protein an den spezifischen Antikörper der Mikroplatte. Durch insgesamt drei Waschschriffe wurden ungebundene Moleküle entfernt. Danach wurde ein ebenfalls für BDNF oder $\text{A}\beta_{42}$ spezifischer enzymgebundener monoklonaler Antikörper hinzugefügt. Auch hier wurden nicht gebundene Antikörper durch einen Waschschriff entfernt und eine Substratlösung in die Wells gegeben, welche zu einer Farbreaktion führte. Die Intensität dieser Färbung wurde mit Hilfe eines Photometers bei 450 nm im Fall des BDNF-ELISAs und bei 570 nm im Fall des $\text{A}\beta_{42}$ -ELISAs gemessen. Hierbei ist die Intensität der Färbung proportional zur Proteinmenge in der Probe und wird mittels einer parallel angefertigten Eichkurve bestimmt. Es wurden Doppelbestimmungen jeder gemessenen Probe durchgeführt.

2.5 Respirometrie zur Überprüfung der Mitochondrienfunktion

Zur respirometrischen Messung der Mitochondrienatmung von Hippocampus- und Präfrontalkortexhomogenaten wurde ein Oxygraph der Firma OROBOROS® verwendet. Für die Versuche wurden Mäuse aller angegebenen Genotypen im Alter von acht Monaten verwendet.

2.5.1 Probengewinnung für die Respirometrie

Für die Probengewinnung zur Durchführung der respirometrischen Messungen wurden die Tiere mittels Kohlendioxid (CO_2) betäubt und dekapitiert. Das Gehirn wurde aus dem Schädel der Tiere heraus präpariert und ein Stück des Präfrontalkortex mit einem Skalpell abge-

schnitten. Danach wurden die beiden Gehirnhemisphären mit dem Skalpell getrennt und die Hippocampihälften extrahiert und gewogen. Pro 10 mg Frischmasse der Proben wurden 50 μl Inkubationsmedium BIM 1000 hinzugefügt (Verdünnung 1:4) und auf Eis gelagert. Die Proben wurden mit Hilfe eines Homogenisierungsstäbchens manuell für ca. zwei Minuten homogenisiert.

2.5.2 Prinzip und Durchführung der Oxygraphenmessung

Der verwendete Oxygraph zur Atmungsmessung von Präfrontalkortex- und Hippocampus-homogenaten war ein Zwei-Kammer-Titrations-Injektionsrespirometer. Beide Kammern wurden zu Beginn mit 2,1 ml BIM 0 oder BIM 1000 Inkubationsmedium gefüllt und 22 μl Malat (2 mM) und 22 μl Glutamat (10mM) hinzu pipettiert. Zu dem Versuchsansatz des BIM 0 Mediums wurden zusätzlich 2 μl CaCl_2 in die entsprechende Kammer pipettiert (Kalziumstressansatz). Anschließend wurden je Kammer 25 μl Homogenat hinzugefügt. Die gesamte Messung wurde bei 30 °C durchgeführt. Jede Kammer wurde mit Hilfe eines Stopfens luftdicht verschlossen. Im Inneren des Stopfens befand sich eine dünne Kapillare, durch welche die Substrate für die Messung in den Versuchsansatz mit Hilfe von Feinpipetten hinzugefügt werden konnten. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Messung des Sauerstoffverbrauchs der sich im Homogenat befindlichen Mitochondrien. Der Sauerstoffverbrauch wurde mit Hilfe von zwei polarographischen Sauerstoffsensoren (POS Elektroden) im Inneren der Kammern gemessen. Durch kontinuierliches Rühren mit Hilfe eines elektromagnetischen Rührers innerhalb der Kammern wurde eine optimale Durchmischung gewährleistet, so dass es zu keiner Sauerstoffverarmung während der Messung kommen konnte.

In den Versuchsansatz wurden nacheinander Substrate zur Anregung der verschiedenen Atmungskomplexe in die Messkammer pipettiert. Zuerst wurde Digitonin (5,7 pM) zum Messansatz hinzugegeben. Digitonin ist ein Glycosid, welches zur Permeabilisierung der Zellmembran verwendet wurde. Anschließend wurden 8 μl ADP (2 mM) zum Messansatz pipettiert, welches zur maximalen Stimulation der Mitochondrienatmung diente (State-3 Atmung). Für die Kalziumstimulation wurden nacheinander erst 4 μl (200 μM) dann 2 μl (100 μM) CaCl_2 in den Messansatz mit dem Inkubationsmedium BIM 1000 hinzugefügt.

Anschließend wurden nacheinander Substrate der Mitochondrienatmung zum Messansatz hinzu pipettiert. Zuerst wurde 20 µl Pyruvat (10 mM), welches als Substrat für den Komplex-I der Atmungskette dient, hinzu pipettiert. Danach wurde 20 µl Succinat (10 mM), das Substrat um die Komplex-II abhängige Atmung zu stimulieren, in die Kammern pipettiert. Durch die Zugabe von 6 µl Rotenon (1,5 µM) wurde die Komplex I-Atmung inhibiert. Anschließend wurde dem Versuchsansatz 20 µl Glycerin-3-phosphat (10 mM), welches als Substrat für den Komplex-III der Atmungskette dient, zugeführt. Als letzte Substanz wurde 6 µl Atraktylat (125 µM) hinzu pipettiert, um die Phosphorylierung gänzlich zu hemmen. Bei der Zugabe der einzelnen Substrate wurde darauf geachtet mit der nächsten Zugabe immer so lange zu warten, bis die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs erneut einen stationären Wert angenommen hatte. Abbildung 6 zeigt eine Beispielmessung, welche mit Hilfe der genannten Analysesoftware aufgezeichnet wurde, mit den Zeitpunkten der Zugabe der einzelnen Substrate und Substanzen.

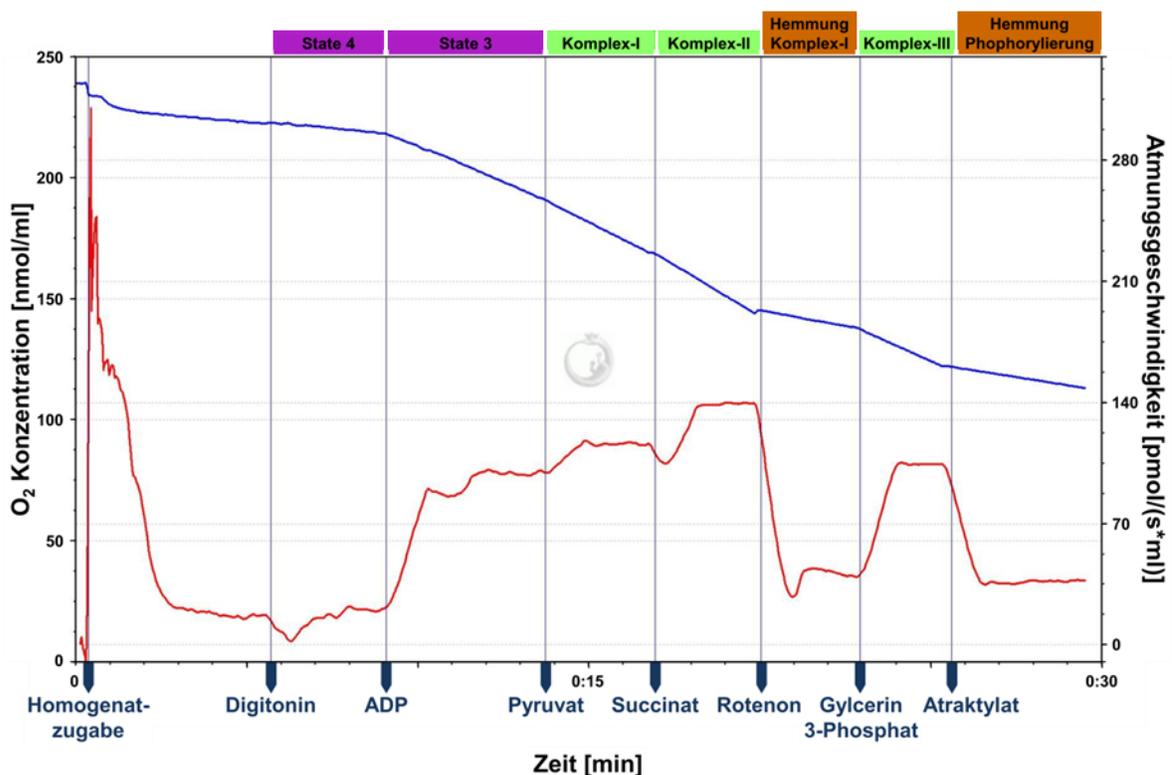


Abbildung 6: Beispielmessung einer Mitochondrienatmungsmessung mit Hilfe des Oxygraphen. Das rote Liniendiagramm zeigt die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs in Pikomol pro Sekunde und Milliliter. Das blaue Liniendiagramm zeigt die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Messkammer in Nanomol pro Milliliter. Die blauen Pfeile markieren die Zeitpunkte der Zugaben der einzelnen Substanzen bzw. der Substrate während der Messung. In grün bzw. orange ist oberhalb der Grafik die Funktion der zuvor hinzu pipettierten Substanzen beschrieben. In violett sind die Funktionszustände der gemessenen Mitochondrien markiert.

2.5.3 Mitochondriale Atmungsrate und respiratorischer Kontrollindex

Der mittels der Sauerstoffsensoren kontinuierlich erfasste Sauerstoffverbrauch wurde mit Hilfe des Programms Oroboros Datgraph Analysis Software (OROBOROS[®], Österreich) aufgezeichnet und ausgewertet. Die Atmungsgeschwindigkeit ergibt sich dabei aus der ersten Ableitung der über das Messsignal errechneten Sauerstoffkonzentration über die Zeit. Der respiratorische Kontrollindex (RCI) quantifiziert die Kopplung zwischen Substratoxidation (hier Glutamat und Malat) und ATP-Bildung und erlaubt somit Rückschlüsse auf eventuelle Schädigungen der Mitochondrieninnenmembran, da durch den entstehenden Protonenrückfluss ohne ATP-Synthese eine erhöhte State-4 Atmung zu erkennen wäre. Der RCI ist das Verhältnis der State 3- zur State 4-Atmung. Als State 4-Atmung wird die Komplex-I abhängige Atmung mit Malat und Glutamat als Substrate ohne die Zugabe von ADP bezeichnet. Durch die Zugabe von ADP in den Messansatz erreicht die Komplex-I abhängige Atmung ein Maximum, welches als State 3-Atmung bezeichnet wird. Die Größe des RCIs gibt die Intaktheit der Mitochondrien an.

2.6 Datenanalyse und statistische Datenauswertung

Die aus den Versuchen erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogramms Excel ausgewertet. Für statistische Analysen wurde das Statistikanalyseprogramm JUMP[®] 8 verwendet. Hierbei wurden die Daten mittels Varianzanalyse (ANOVA) getestet und anschließend ein *post hoc* Tukey-Test angewendet. Die statistische Auswertung der Atmungsmessungen mittels Spirometrie der neuronalen Mitochondrien erfolgte durch t-Tests (gleiche Varianzen) im Vergleich zu Wildtypmäusen (Microsoft Excel[®]). Alle multiplen t-Test-Vergleiche wurden mittels der Bonferroni-Methode entsprechend korrigiert. Um signifikante Ausreißer innerhalb einer Datengruppe zu identifizieren wurde der Ausreißer-Test nach Grubbs verwendet. Alle statistischen Analysen wurden mit einem Signifikanzniveau von > 5 % durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Extinktion von konditionierter Furcht im BDNF^{+/-}-Mausmodell

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von BDNF bei der Furchtextinktion, wurde in der vorliegenden Arbeit das Extinktionslernen von zwei und sieben Monate alten BDNF^{+/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren (Tabelle 2) getestet. Am ersten Tag des Experiments wurden die Tiere, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, furchtkonditioniert. Am darauffolgenden Tag durchliefen die Tiere in einem neuen Kontext ein Furchtextinktionstraining, in dem der CS 28-mal präsentiert wurde. 24 Stunden später wurde das Extinktionsgedächtnis im Extinktionskontext durch Präsentation von jeweils 3 CS abgefragt. Innerhalb der statistischen Analyse gibt der Faktor Phase die Werte des Freezing-Verhaltens während des Trainingsverlaufs der gemittelten CS-Präsentationen wieder.

Tabelle 2: Verwendete Anzahl an Tieren im Furchtextinktionslernen

Genotyp	Alter (Monate)	Anzahl (n)
WT	2	8
BDNF ^{+/-}	2	10
WT	7	11
BDNF ^{+/-}	7	12

Während der ersten drei CS-Präsentationen zu Beginn des Extinktionstrainings zeigten zwei Monate alte Wildtypiere und BDNF^{+/-}-Mäuse zwischen den Genotypen ein vergleichbares Furchtverhalten in Reaktion auf den CS (*post hoc* Tukey Test, CS 1-3 WT vs. CS 1-3 BDNF^{+/-}: $p = 1,0$). Mit fortlaufenden CS-Präsentationen des Extinktionstrainings kam es zu einem signifikanten Absinken des Furchtverhaltens von BDNF^{+/-}- und Wildtypieren (Abbildung 7A, Phase: $F_{5,84} = 5,21$, $p = 0,0003$), wobei es hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen gab (Genotyp: $F_{1,84} = 0,07$, $p = 0,79$, Genotyp x Phase: $F_{5,84} = 0,62$, $p = 0,68$). Diese Daten sprechen für ein erfolgreich und vergleichbar angelegtes Furchtgedächtnis, sowie für eine erfolgreiche Akquisition des Furchtextinktionsgedächtnisses in beiden Genotypen im Alter von zwei Monaten. Im Extinktionsgedächtnistest, 24 Stunden nach dem Extinktionstraining, zeigten sowohl zwei Monate alte Wildtypiere als

auch BDNF^{+/-}-Mäuse ein signifikant reduziertes Furchtverhalten in Antwort auf die Präsentationen des CS im Vergleich zum Furchtverhalten zu Beginn des Extinktionstrainings (Abbildung 7 B, gepaarter t-Test, WT: $p = 0,003$, BDNF^{+/-}: $p = 0,02$). Das Furchtverhalten während des Gedächtnistests unterschied sich hierbei zwischen den beiden Genotypen nicht (ungepaarter t-Test, CS: $p = 0,5$, Habituation: $p = 0,9$). Diese Beobachtungen sprechen für ein erfolgreich angelegtes und vergleichbares Furchtextinktionsgedächtnis in beiden Genotypen im Alter von zwei Monaten.

Im Extinktionstraining der sieben Monate alten Tiere zeigten sowohl die Wildtyp- als auch die BDNF^{+/-}-Tiere eine robuste Furchtreaktion auf die ersten drei Präsentationen des CS (*post hoc* Tukey Test, CS 1-3 WT vs. CS 1-3 BDNF^{+/-}: $p = 1,0$). Dies spricht für ein erfolgreich angelegtes Furchtgedächtnis in beiden Genotypen der sieben Monate alten Tiere. Mit fortlaufenden CS-Präsentationen im Extinktionstraining zeigten sieben Monate alte Wildtyp-tiere eine Abnahme des Freezing-Verhaltens im Gegensatz zu den gleichaltrigen BDNF^{+/-}-Mäusen. Bei den BDNF^{+/-}-Tieren war kein Absinken des Freezing-Verhaltens im Verlauf des Extinktionstrainings erkennbar (Abbildung 7 C). Eine Varianzanalyse zeigte keine signifikanten generellen Veränderungen des Freezing-Verhaltens über den Verlauf des Trainings (Phase: $F_{5,126} = 1,6$, $p = 0,16$), was darauf hinweist, dass die sieben Monate alten Mäuse keine Veränderung des Furchtverhaltens innerhalb des Trainings aufwiesen. Die ANOVA zeigte weiterhin einen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp, was bedeutet, dass es einen generellen Unterschied im Furchtverhalten zwischen Wildtyptieren und BDNF^{+/-}-Mäusen innerhalb des Trainings gab (Genotyp: $F_{1,126} = 18,6$, $p < 0,0001$). Der *post hoc* Tukey Test zeigte, dass sich das Freezing-Verhalten zwischen BDNF^{+/-}- und Wildtyp-tieren während der CS-Präsentationen im Verlauf des Trainings signifikant unterschied (Abbildung 7 C, CS4-8, CS9-13, CS14-18, CS24-28, p 's $< 0,05$). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass BDNF^{+/-}-Mäuse im Alter von sieben Monaten keine Akquisition eines Furchtextinktionsgedächtnisses aufweisen, obwohl keine signifikante Interaktion der beiden Faktoren Phase und Genotyp zu beobachten war ($F_{5,126} = 1,3$, $p = 0,3$). Im Extinktionsgedächtnistest, 24 Stunden nach dem Extinktionstraining, zeigten die Wildtypmäuse ein signifikant reduziertes Freezing-Verhalten im Vergleich zum Beginn des Extinktionstrainings (gepaarter t-Test, $p < 0,05$) in Antwort auf die CS-Präsentationen, was für die erfolgreiche Bildung eines Langzeit-Extinktionsgedächtnisses spricht. Die BDNF^{+/-}-Tiere zeigten im Alter von sieben Monaten

keinen signifikanten Unterschied des Freezing-Verhaltens während der CS-Präsentationen im Vergleich zum Furchtverhalten am Anfang des Extinktionstrainings (gepaarter t-Test, $p = 0,8$) und einen signifikanten Unterschied im Freezing-Verhalten im Gedächtnistest im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtyptieren (ungepaarter t-Test, $p = 0,02$), was auf ein fehlendes Langzeitgedächtnis in Bezug auf das Extinktionslernen hinweist. Um eine Generalisierung der Furchtreaktion der BDNF^{+/-}-Tiere auszuschließen, wurde die Furchtreaktion der Habituationsphasen des Extinktionstrainings mit der des Gedächtnistests verglichen (Tabelle 3). Hierbei zeigte die Varianzanalyse einen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{1,42} = 6,8$, $p = 0,02$), jedoch keine signifikanten Effekte des Faktors Test ($F_{1,42} = 0,8$, $p = 0,4$), sowie keine Interaktion dieser beiden Faktoren ($F_{1,42} = 3,3$, $p = 0,08$). Daraus lässt sich ableiten, dass die erhöhte Furchtreaktion der sieben Monate alten BDNF^{+/-}-Mäuse nicht auf eine Generalisierung des Furchtverhaltens zurückzuführen ist. Das Freezing-Verhalten während der Habituationsphasen lag generell in einem Bereich, der mit dem vorheriger Arbeiten vergleichbar ist und somit als „Baseline-Freezing“ bezeichnet werden kann.

Tabelle 3: Freezing-Verhalten in Prozent von sieben Monate alten Tieren während der Habituationsphasen des Extinktionstrainings und des Gedächtnistests

Genotyp	Training [% Freezing]	Gedächtnis- test [% Freezing]
WT	1,0 ± 0,8	4,0 ± 1,0
BDNF ^{+/-}	6,0 ± 1,5	5,0 ± 1,0

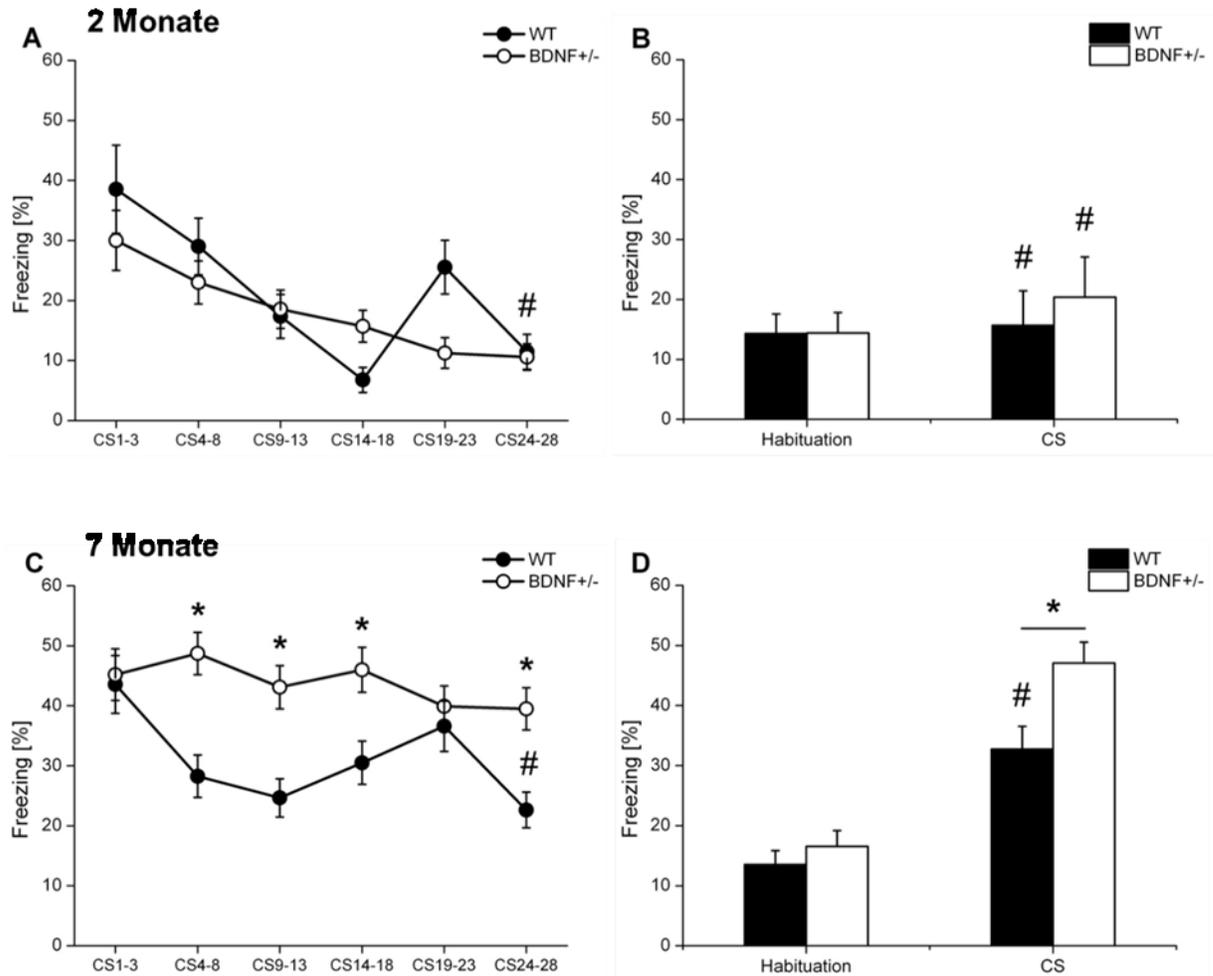


Abbildung 7: Furchtextinktionslernen von zwei und sieben Monate alten BDNF^{+/-}- und Wildtypmäusen. **A** Freezing von zwei Monate alten BDNF^{+/-}-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren während der 28 CS-Präsentationen des Extinktionstrainings. **B** Furchtverhalten von zwei Monate alten Tieren während des Extinktionsgedächtnistests 24 Stunden nach dem Extinktionstraining während der Habituationsphase und den CS-Präsentationen. **C** Freezing sieben Monate alter BDNF^{+/-}- und Wildtypmäuse während der CS-Präsentationen des Extinktionstrainings. **D** Furchtreaktion sieben Monate alter BDNF^{+/-}-Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere im Extinktionsgedächtnistest während der Habituation und CS-Präsentationen. (* signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und BDNF^{+/-}-Mäusen, # signifikanter Unterschied zum Freezing-Verhalten am Anfang des Extinktionstrainings (CS 1-3), MW ± SEM). (Psotta et al., 2013)

3.1.1 BDNF-Proteingehalt in extinktionsrelevanten Gehirnregionen von zwei und sieben Monate alten Wildtyp- und BDNF^{+/-}-Mäusen

Ziel dieses Versuchsteils war es zu überprüfen, ob mit dem Unterschied im Furchtextinktionslernen zwischen Wildtyp- und BDNF^{+/-}-Tieren im Alter von sieben Monaten ein Rückgang im BDNF-Proteingehalt in extinktionsrelevanten Gehirnregionen einhergeht. Hierzu wurden Proben des Hippocampus, der Amygdala und des mPFCs, wie in 2.4.1 beschrieben,

von naiven Wildtyp- und BDNF^{+/-}-Tieren (Tabelle 4) entnommen und mittels ELISA-Messungen, wie in 2.4.2 beschrieben, bestimmt.

Tabelle 4: Anzahl an verwendeten Proben für die BDNF-Proteinbestimmung mittels ELISA-Messung

Genotyp	Alter (Monate)	Region	Anzahl (n)
WT	2	Hippocampus	5
BDNF ^{+/-}		Hippocampus	4
WT		Amygdala	5
BDNF ^{+/-}		Amygdala	5
WT	7	mPFC	5
BDNF ^{+/-}		mPFC	4
WT		Hippocampus	5
BDNF ^{+/-}		Hippocampus	5
WT	7	Amygdala	5
BDNF ^{+/-}		Amygdala	4
WT		mPFC	4
BDNF ^{+/-}		mPFC	4

Die BDNF-Proteinbestimmung zeigte im Vergleich zu Wildtypgeschwistertieren eine generell signifikant verringerte BDNF-Proteinmenge der BDNF^{+/-}-Mäuse in allen getesteten Gehirnregionen (Genotyp: $F_{1,58} = 87,7$, $p < 0,0001$). Eine Varianzanalyse zeigte weiterhin, dass der BDNF-Gehalt in den sieben Monate alten Tieren im Vergleich zu zwei Monate alten Tieren generell signifikant reduziert war (Alter: $F_{1,58} = 26,9$, $p < 0,0001$) und dass es hierbei einen signifikanten Effekt der Gehirnregionen gab (Region: $F_{2,58} = 16,6$, $p < 0,0001$), d.h., dass sich der BDNF-Proteingehalt zwischen den einzelnen Gehirnregionen signifikant voneinander unterschied. Die Varianzanalyse zeigte weiterhin keine signifikante Interaktion zwischen den drei Faktoren Genotyp, Alter und Region ($F_{2,58} = 1,4$, $p = 0,21$), was vermutlich durch die hohe Anzahl an gleichsinnigen Veränderungen in den verschiedenen Gehirnregionen verursacht wird. Der *post hoc* Tukey Test zeigte signifikante Unterschiede innerhalb der Genotypen zwischen sieben und zwei Monate alten Tieren in allen untersuchten Gehirnregionen. Es zeigte sich weiter, dass sieben Monate alte Tiere, unabhängig vom Genotyp, in allen drei untersuchten Gehirnarealen einen signifikant reduzierten BDNF-Proteingehalt im Vergleich zu zwei Monate alten Tieren hatten (Abbildung 8).

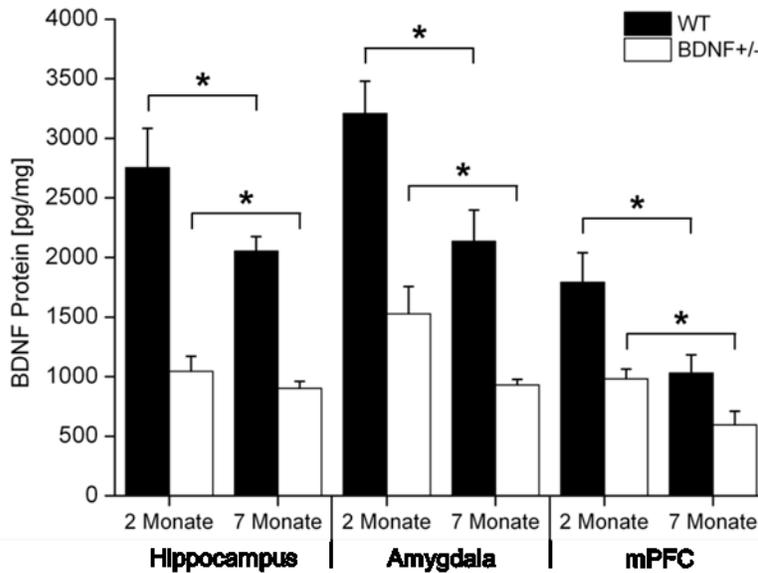


Abbildung 8: BDNF-Proteinkonzentrationen von zwei und sieben Monate alten Wildtyp- und BDNF^{+/-}-Mäusen in Hippocampus, Amygdala und mPFC (* signifikanter Unterschied zwischen zwei und sieben Monate alten Tieren, MW + SEM). (Psotta et al., 2013)

3.2 Überprüfung des Kurzzeitgedächtnisses mit Hilfe des Objektwiedererkennungstests

Der Objektwiedererkennungstest, in der hier verwendeten Form, diente zur Überprüfung des Kurzzeitgedächtnisses, der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tiere. Weitere Parameter, die während dieses Tests aufgenommen wurden, dienten der Überprüfung des Aktivitätslevels und des Angstverhaltens der verschiedenen Genotypen und Altersgruppen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test mit fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen durchgeführt (Tabelle 5). Dieser Verhaltenstest wurde jeweils eine Woche vor dem Schwimmlabyrinthversuch durchgeführt.

Tabelle 5: Anzahl der verwendeten Tiere im Objektwiedererkennungstest

Genotyp	Alter (Monate)	Anzahl (n)
WT	5	12
APP/PS1		12
BDNF ^{+/-}		7
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		8
WT	7	10
APP/PS1		10
BDNF ^{+/-}		9
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		8
WT	9	12
APP/PS1		13
BDNF ^{+/-}		11
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		11
WT	12	14
APP/PS1		11
BDNF ^{+/-}		7
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		8

3.2.1 Aktivität und Angstverhalten im Objektwiedererkennungstest

Für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Genotypen und Altersgruppen wurde während des Objektwiedererkennungstests zusätzlich die von den Tieren zurückgelegte Strecke und die Aufenthaltsdauer in der Zentrums- und Randzone innerhalb der Arena aufgezeichnet und ausgewertet. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass mögliche Unterschiede in der Explorationsdauer der Objekte auf basalen Unterschieden in der Aktivität der Tiere beruhten.

Die Varianzanalyse der zurückgelegten Wegstrecke aller verwendeten Altersgruppen und deren Genotypen im Objektwiedererkennungstest zeigte signifikante Effekte der Faktoren Alter ($F_{3,148} = 3,37$, $p = 0,02$) und Genotyp ($F_{3,148} = 14,46$, $p < 0,0001$), jedoch keine signifikante Interaktion dieser beiden Faktoren ($F_{9,148} = 1,77$, $p = 0,08$). Der anschließend verwendete *post hoc* Tukey Test zeigte signifikante Unterschiede innerhalb der Altersgruppen von fünf und 12 Monate alten Tieren. Hierbei unterschieden sich die zurückgelegten Wegstrecken zwischen APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäusen signifikant voneinander.

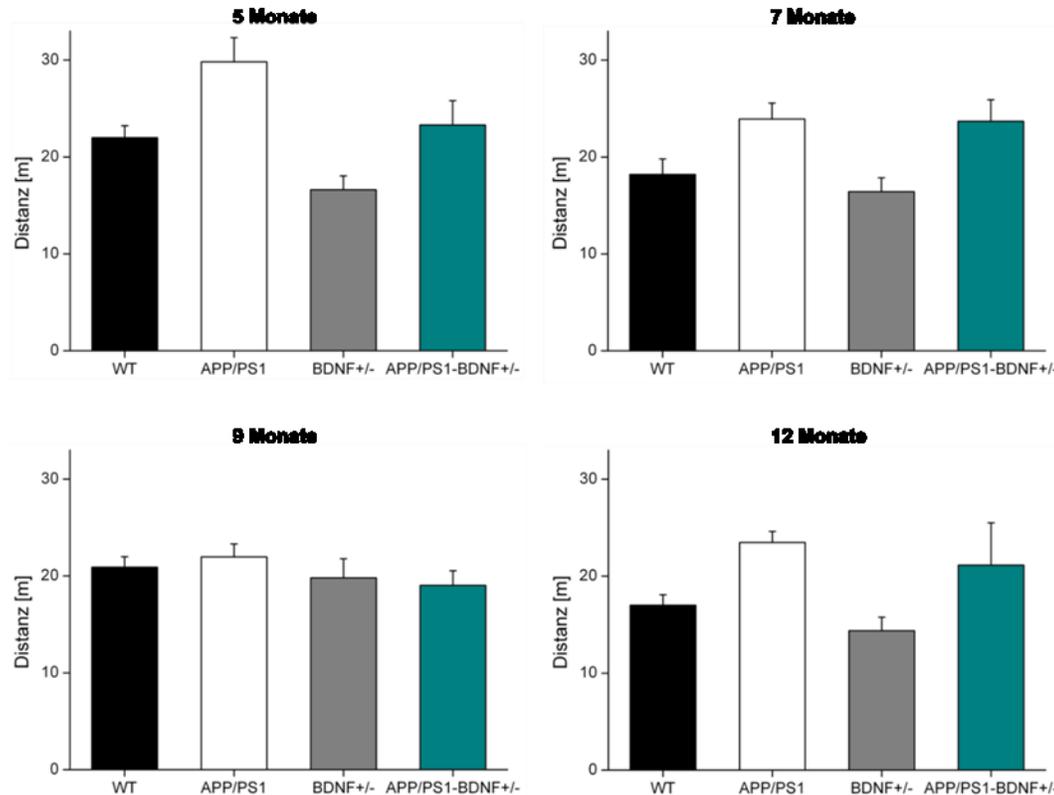


Abbildung 9: Zurückgelegte Wegstrecke von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen während des Objektwiedererkennungstests (MW + SEM).

Die Aufenthaltsdauer der verwendeten Tiere während des ersten Durchgangs im Objektwiedererkennungstest im Zentrum der Arena wurde im Vergleich zur Aufenthaltsdauer in der Randzone aufgetragen (Abbildung 10). Diese Zentrums-Rand-Aufenthaltsdauer ist ein Indikator für das natürliche Angstverhalten von Nagern. Hierbei erwartet man, dass die Tiere signifikant mehr Zeit in der Randzone der Arena als im Zentrum verbringen. Die Objekte befanden sich immer innerhalb der Randzone der Arena.

Die Aufenthaltsdauer in der Randzone und dem Zentrum der Arena im Objektwiedererkennungstest unterschied sich innerhalb der getesteten Altersgruppen und Genotypen nicht. Eine ANOVA zeigte keine signifikanten Effekte der Faktoren Genotyp ($F_{3,309} = 0,00$, $p = 1,00$) und Alter ($F_{3,309} = 0,00$, $p = 1,0$), wobei ein signifikanter Effekt des Faktors Zone ($F_{1,309} = 1800,8$, $p < 0,0001$) auftrat. Weiterhin zeigte die Varianzanalyse eine signifikante Interaktion dieser drei Faktoren ($F_{9,309} = 3,60$, $p = 0,0003$). Der *post hoc* Tukey Test zeigte signifikante Unterschiede der Aufenthaltszeit zwischen der Rand- und Zentrumszone aller

getesteten Genotypen und Altersgruppen, jedoch keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der Aufenthaltszeit der jeweiligen Zone. Dies bedeutet, dass alle Genotypen in allen Altersgruppen sich signifikant länger in der Randzone, als im Zentrum der Arena während des Objektwiedererkennungstests aufgehalten haben; unabhängig von Alter und Genotyp.

Aus den Ergebnissen der Aufenthaltszeit in den Zonen, sowie der zurückgelegten Distanz der Tiere innerhalb des Objektwiedererkennungstests, kann geschlossen werden, dass es keine Unterschiede zwischen den Genotypen der verschiedenen alten Tiere gab und somit basale Parameter wie das Angstverhalten und die Aktivität höchstwahrscheinlich nicht von dem Faktor Genotyp beeinträchtigt waren.

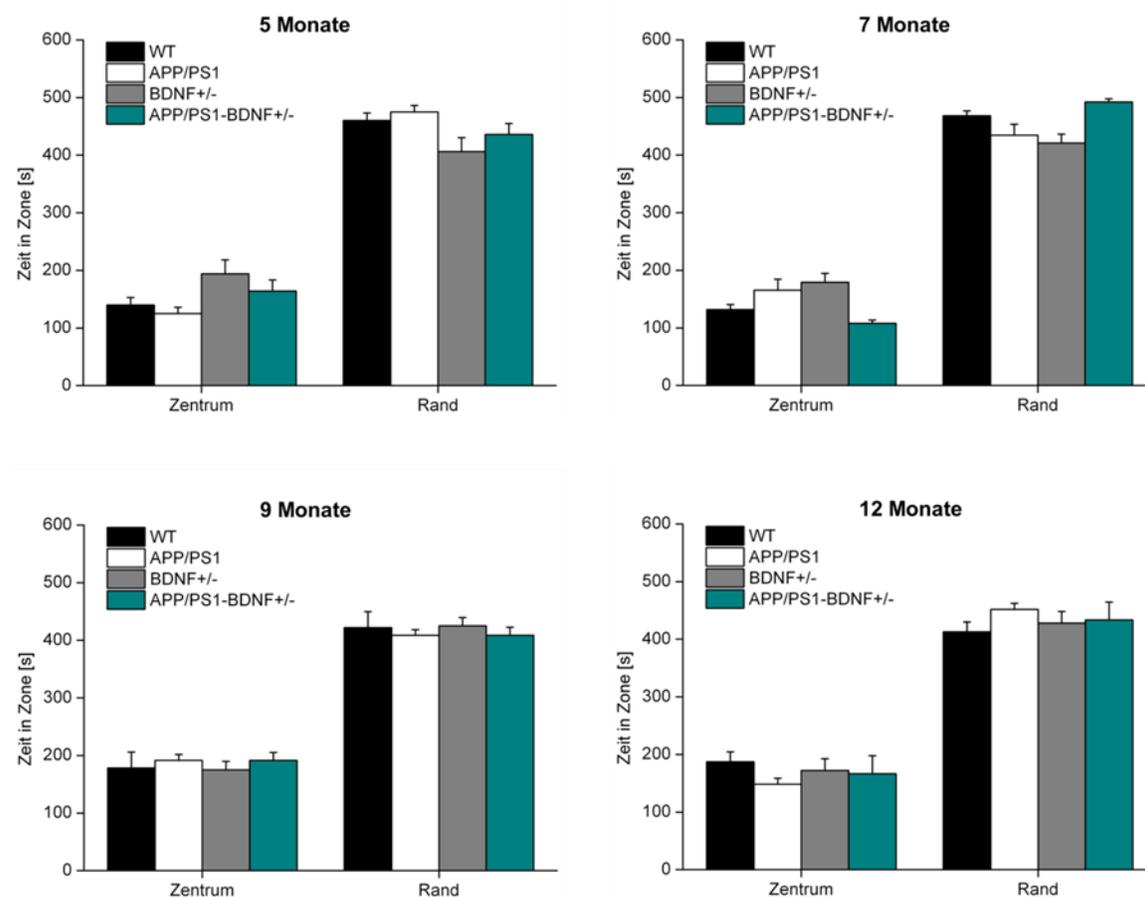


Abbildung 10: Aufenthaltsdauer in Zentrums- und Randzone während des Objektwiedererkennungstests von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen (MW + SEM).

3.2.2 Objektwiedererkennungstest

Da die individuellen Explorationszeiten zwischen den Tieren häufig stark variieren, wird oft der Anteil der Zeit, indem das bekannte bzw. neue Objekt exploriert wird, von der gesamten Explorationszeit betrachtet. Um so das Explorationsverhalten der Tiere, unabhängig von der individuellen Varianz in der Explorationszeit, zu ermitteln, wurde der Explorationsindex berechnet und in Abbildung 11 dargestellt. In allen Altersgruppen und Genotypen zeigte sich, dass das neue Objekt von den Tieren signifikant mehr exploriert wurde, als das schon bekannte Objekt. Eine Varianzanalyse über alle Altersgruppen und Genotypen zeigte keinen signifikanten Effekt der Faktoren Alter ($F_{3,311} = 0,00$, $p = 1,00$) und Genotyp ($F_{3,311} = 0,00$, $p = 1,00$), sowie keine signifikante Interaktion der Faktoren Genotyp, Alter und Objekt ($F_{9,311} = 0,65$, $p = 0,75$). Allerdings zeigte die ANOVA einen signifikanten Effekt des Faktors Objekt ($F_{1,311} = 244,2$, $p < 0,0001$), was darauf hindeutet, dass die Tiere das nicht bekannte Objekt signifikant länger exploriert haben, als das schon bekannte Objekt. Daraus lässt sich schließen, dass die Tiere sich an das bekannte Objekt erinnerten und deswegen das neue Objekt länger explorierten. Der *post hoc* Tukey Test zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Altersgruppen, was bedeutet, dass sich die Genotypen einer Altersgruppe im Verhalten während des Objektwiedererkennungstests nicht signifikant voneinander unterschieden. Weiterhin gab es keinen signifikanten Unterschied über das Alter der Tiere, was bedeutet, dass sich das Verhalten im Objektwiedererkennungstest über die Altersgruppen nicht unterschied.

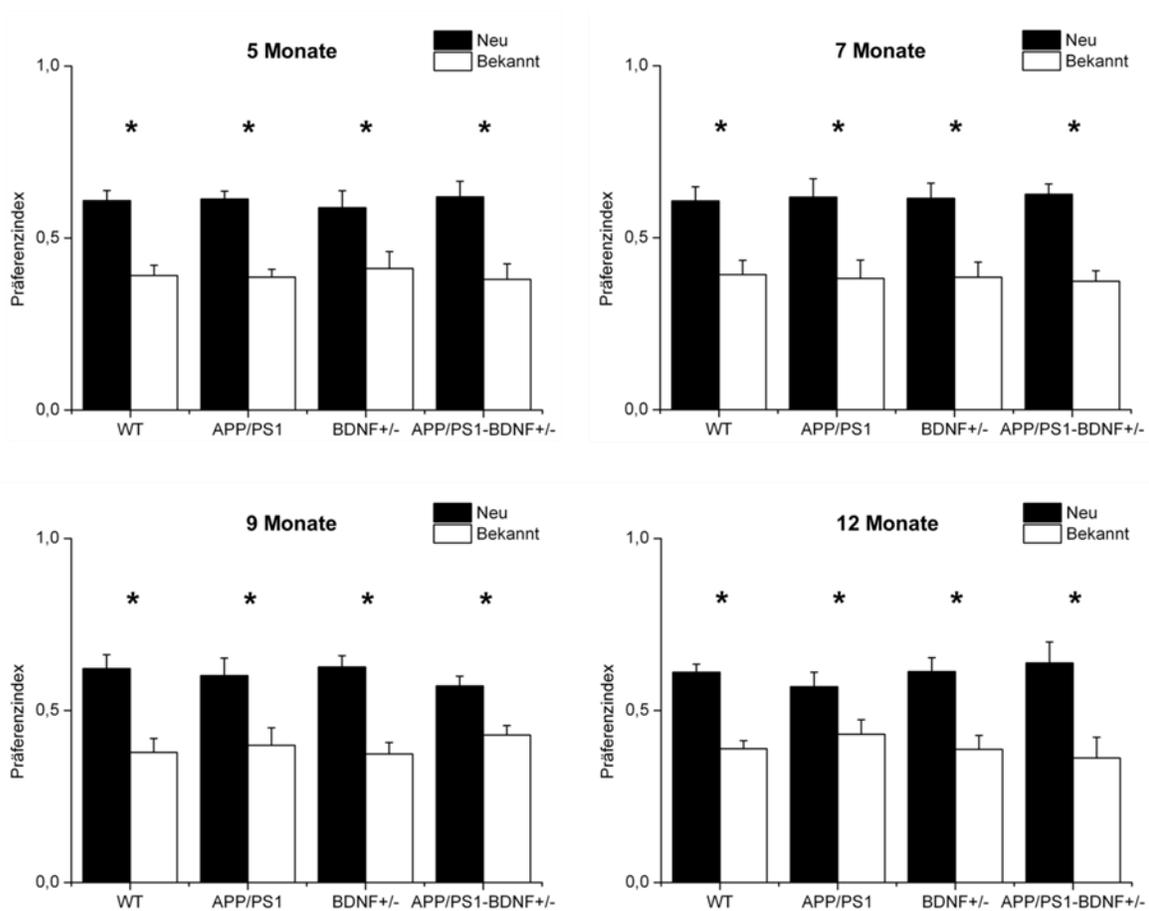


Abbildung 11: Präferenzindizes des neuen und des bekannten Objekts im Objektwiedererkennungstest von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen (* signifikanter Unterschied zwischen den Präferenzindizes für das neue und das bekannte Objekt, MW + SEM).

3.3 Überprüfung des räumlichen Lernens mit Hilfe des Schwimmlabyrinths nach Morris

Um das räumliche Orientierungsverhalten bzw. das räumliche Lernverhalten der verschiedenen Genotypen über verschiedene Altersgruppen zu testen, wurde das Schwimmlabyrinth nach Morris verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Versuch mit fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen durchgeführt (Tabelle 6). Dieser Verhaltenstest wurde als zweites Experiment, jeweils eine Woche nach dem Objektwiedererkennungstest durchgeführt.

Tabelle 6: Anzahl der im Schwimmlabyrinth verwendeten Tiere

Genotyp	Alter (Monate)	Anzahl (n)
WT	5	12
APP/PS1		11
BDNF ^{+/-}		9
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		9
WT	7	11
APP/PS1		12
BDNF ^{+/-}		12
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		9
WT	9	11
APP/PS1		12
BDNF ^{+/-}		11
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		12
WT	12	13
APP/PS1		12
BDNF ^{+/-}		10
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		10

3.3.1 Schwimmgeschwindigkeit während der Trainingsphase im Schwimmlabyrinth nach Morris

Um zu überprüfen, ob mögliche Unterschiede der räumlichen Lernleistung im Schwimmlabyrinth auf die kognitive Leistung der Tiere verschiedenen Alters und Genotyp zurückzuführen waren und nicht auf körperlichen Einschränkungen beruhten, wurde die Schwimmgeschwindigkeit während des gesamten Trainingszeitraums der verschiedenen Genotypen innerhalb der verschiedenen Altersgruppen verglichen (Abbildung 12).

Die Varianzanalyse der Schwimmgeschwindigkeiten während des Trainings im Schwimmlabyrinth zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Alter ($F_{3,165} = 9,87$, $p < 0,0001$), jedoch keinen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{3,165} = 0,50$, $p = 0,68$) sowie keine Interaktion der Faktoren Alter und Genotyp ($F_{9,165} = 1,52$, $p = 0,15$). Der *post hoc* Tukey Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen innerhalb einer Altersgruppe. Zusammenfassend kann aus der Varianzanalyse der Schwimmgeschwindigkeiten während des Trainingszeitraums im Schwimmlabyrinth geschlossen werden, dass der Faktor Genotyp höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Schwimmgeschwindigkeiten innerhalb der Altersgruppen hatte. Mögliche Unterschiede in der Latenzzeit sind daher wahr-

scheinlich nicht auf ein beeinträchtigtetes Schwimmverhalten, wie z.B. eine generell verlangsamte Geschwindigkeit, zurückzuführen.

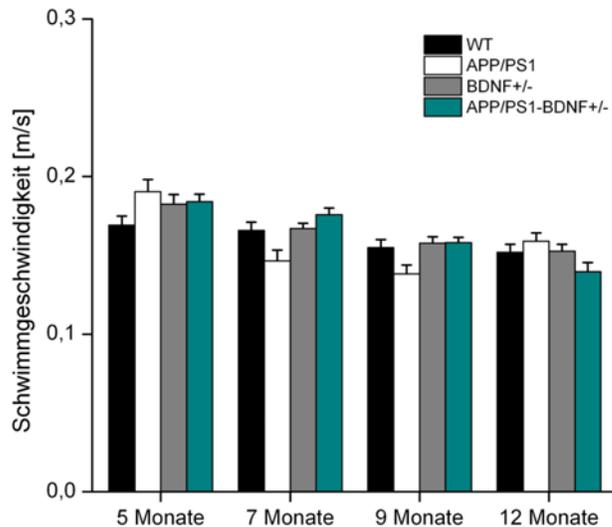


Abbildung 12: Schwimmgeschwindigkeiten von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren während der Trainingsphase im Schwimmlabyrinth (MW+SEM).

3.3.2 Latenz zum Erreichen der Plattform und Aufenthaltszeit in den Quadranten als Indikator für die räumliche Lernleistung im Schwimmlabyrinth

Fünf Monate alte Tiere

Training

Die Varianzanalyse der Latenz fünf Monate alter Tiere während der Trainingsphase im Schwimmlabyrinth zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Phase ($F_{3,148} = 42,0$, $p < 0,0001$). Dies bedeutet, dass sich bei fünf Monate alten Tieren die Latenz generell signifikant über die Trainingszeit verringerte. Weiterhin zeigte die Varianzanalyse keinen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{3,148} = 0,97$, $p = 0,41$) sowie keine Interaktion der beiden Faktoren Genotyp und Phase ($F_{9,148} = 0,51$, $p = 0,87$), was darauf hindeutet, dass sich die Zeit bis zum Erreichen der Plattform während des Trainings aller vier Genotypen nicht voneinander unterschied, d.h., dass die Lernleistung zwischen den Genotypen vergleichbar ist.

Der *post hoc* Tukey Test zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen in der Latenz während des Trainingszeitraums (Abbildung 13).

Gedächtnistest

Die Varianzanalyse des Gedächtnistests fünf Monate alter Tiere im Schwimmlabyrinth zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Quadrant ($F_{1,74} = 31,1$, $p < 0,0001$), keinen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{3,74} = 0,56$, $p = 0,64$) und keine Interaktion dieser beiden Faktoren ($F_{9,74} = 2,26$, $p = 0,08$). Dies deutet generell darauf hin, dass alle Genotypen eine Präferenz für den Zielquadranten im Vergleich zu den anderen Quadranten zeigten und dass dies nicht durch den Faktor Genotyp beeinflusst wurde. Der *post hoc* Tukey Test des Gedächtnistests zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Aufenthaltszeit im Zielquadranten, im Vergleich zu der mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten der APP/PS1-Mäuse im Alter von fünf Monaten (Abbildung 14).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die APP/PS1-Tiere im Gedächtnistest keinen Unterschied zwischen den Aufenthaltszeiten in den Quadranten zeigten. Ferner gab es keinen Unterschied der Lernleistung zwischen den vier Genotypen im Alter von fünf Monaten im Schwimmlabyrinth während des Trainings und im anschließenden Gedächtnistest (Abbildung 15).

Sieben Monate alte Tiere

Training

Für sieben Monate alte Tiere zeigte eine ANOVA während der Trainingsphase im Schwimmlabyrinth einen signifikanten Effekt des Faktors Phase ($F_{3,172} = 38,72$, $p < 0,0001$), keinen signifikanten Effekt des Genotyps ($F_{3,172} = 0,13$, $p = 0,94$) und keine signifikante Interaktion dieser beiden Faktoren ($F_{9,172} = 1,07$, $p = 0,39$). Dies bedeutet, dass alle Genotypen eine signifikante Verringerung der Latenz während des Trainings zeigten. Der *post hoc* Tukey Test zeigte einen signifikanten Unterschied der Latenz an Trainingstag zwei und drei zwischen Wildtyp- und APP/PS1-Mäusen, was auf eine verminderte Lernleistung während des Trainings der APP/PS1-Tiere hindeuten könnte (Abbildung 13).

Gedächtnistest

Die ANOVA des Gedächtnistests im Schwimmlabyrinth zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Quadrant ($F_{1,90} = 51,78$, $p < 0,0001$), keinen signifikanten Effekt des Genotyps ($F_{3,90} = 0,66$, $p = 0,58$) und ebenfalls keine signifikante Interaktion dieser beiden Faktoren ($F_{3,90} = 2,60$, $p = 0,05$), was darauf hindeutet, dass sich alle Genotypen im Alter von sieben Monaten länger im Zielquadranten, im Vergleich zu den anderen Quadranten aufgehalten haben, was wiederum für ein verlässlich gebildetes Langzeitgedächtnis für die Plattformposition spricht. Auch der *post hoc* Test zeigte für alle Genotypen eine signifikant höhere Aufenthaltszeit im Zielquadranten im Vergleich zu der mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten (Abbildung 14).

Festzuhalten bleibt, dass APP/PS1-Tiere im Alter von sieben Monaten eine leicht verzögerte Lernleistung während des Trainings zeigten. Im anschließenden Gedächtnistest zeigten alle vier Genotypen ein Gedächtnis für die vorherige Plattformposition (Abbildung 15).

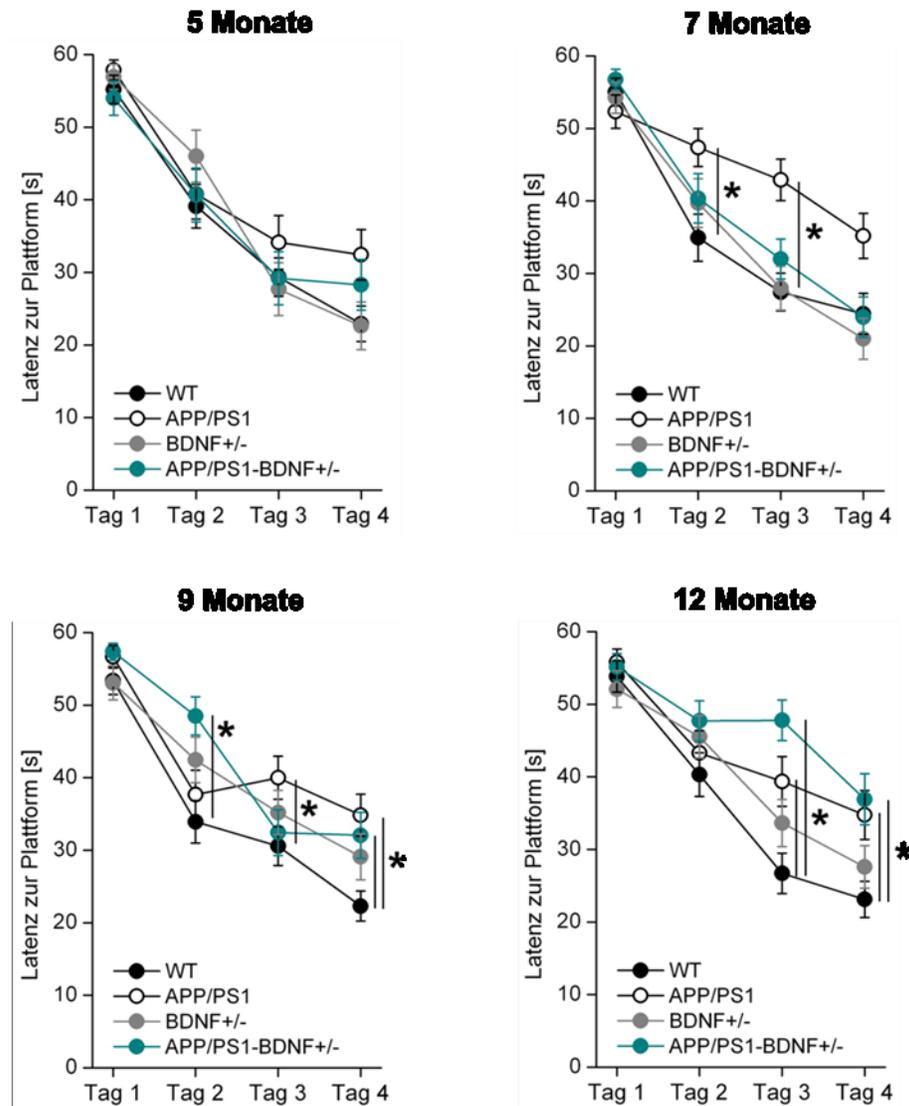


Abbildung 13: Latenz zum Erreichen der Plattform während der Trainingsphase im Schwimmlabyrinthversuch von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen. (* signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren, MW ± SEM).

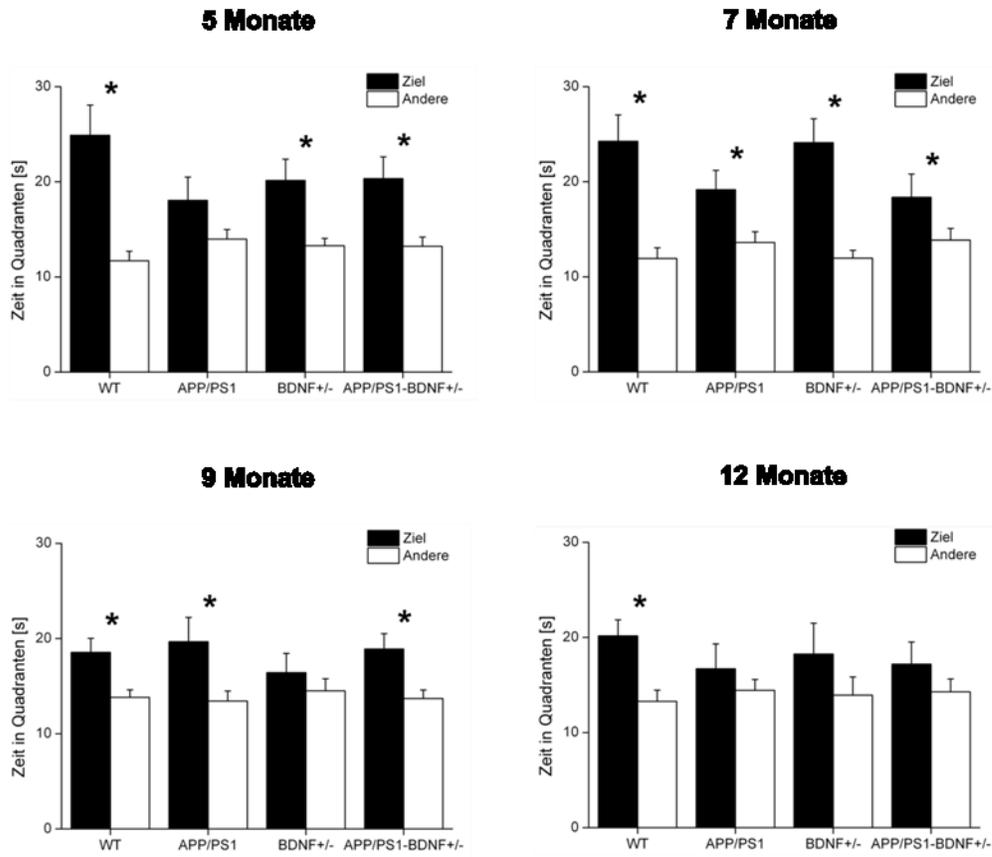


Abbildung 14: Aufenthaltsdauer im Zielquadranten im Vergleich zur mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten während des Probe Trials des Schwimmlabyrinthversuchs von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen. (* signifikanter Unterschied zwischen der Aufenthaltszeit im Zielquadranten im Vergleich zur mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten, MW + SEM).

Neun Monate alte Tiere

Training

Die Varianzanalyse der Lernleistung neun Monate alter Tiere der Trainingsphase im Schwimmlabyrinth zeigte ebenfalls einen signifikanten Effekt des Faktors Phase ($F_{3,180} = 40,65$, $p < 0,0001$), was auf ein Lernen während des Trainings hindeutet. Es zeigte sich weiterhin kein Effekt des Faktors Genotyp ($F_{3,180} = 0,41$, $p = 0,75$) und keine signifikante Interaktion der beiden Faktoren ($F_{9,180} = 1,16$, $p = 0,33$), was darauf hindeuten könnte, dass es keinen Unterschied in der Lernleistung während des Trainings zwischen den vier Genotypen gab. Aufgrund ähnlicher Veränderungen über die Zeit während des Trainings kommt es wahrscheinlich zu keiner statistisch signifikanten Interaktion zwischen den Fakto-

ren Phase und Genotyp. Der *post hoc* Tukey Test zeigte hingegen einen signifikanten Unterschied der Latenz an Tag drei und vier zwischen Wildtyptieren und APP/PS1-Mäusen sowie an Trainingstag zwei und vier zwischen Wildtyp- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren, was auf eine verminderte Lernleistung der APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere hindeutet (Abbildung 13).

Gedächtnistest

Die Varianzanalyse der Gedächtnisleistung, einen Tag nach dem letzten Training von neun Monate alten Tieren, zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Quadrant ($F_{1,92} = 20,08$, $p < 0,0001$). Dieser Effekt beruht auf einer höheren Aufenthaltszeit im Zielquadranten, im Vergleich zur mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten der Tiere. Weiterhin zeigte die statistische Analyse weder einen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{3,92} = 0,18$, $p = 0,91$) noch eine Interaktion dieser beiden Faktoren ($F_{3,92} = 0,72$, $p = 0,54$), was darauf hindeutet, dass es keinen Unterschied in der Lernleistung zwischen den Genotypen gab. Der *post hoc* Test zeigte bei Wildtyp-, APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren einen signifikanten Unterschied der Aufenthaltszeit im Zielquadranten, im Vergleich zu der mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten, was zeigt, dass diese Genotypen ein Langzeitgedächtnis für die Plattformposition gebildet haben. BDNF^{+/-}-Tiere im Alter von neun Monaten zeigten, im Gegensatz zu den anderen Genotypen, keinen signifikanten Unterschied in der Aufenthaltszeit während des Gedächtnistests, was auf ein Defizit in der räumlichen Gedächtnisbildung schließen lässt (Abbildung 14).

Bei neun Monate alten Tieren war zu erkennen, dass APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse ein Defizit während des Trainings im Schwimmlabyrinth zeigten. Im Gedächtnistest zeigten BDNF^{+/-}-Tiere keinen Hinweis für ein gebildetes Langzeitgedächtnis für die Plattformposition (Abbildung 15).

12 Monate alte Tiere

Training

Zwölf Monate alte Tiere zeigten während der Trainingsphase im Schwimmlabyrinth einen signifikanten Effekt des Faktors Phase ($F_{3,160} = 26,6$, $p < 0,0001$) und sowohl keinen signifikanten Effekt des Genotyps ($F_{3,160} = 0,18$, $p = 0,91$), als auch keine signifikante Interaktion der beiden Faktoren Phase und Genotyp ($F_{9,160} = 1,15$, $p = 0,33$). Der *post hoc* Tukey Test zeigte jedoch signifikante Unterschiede der Latenz zwischen Wildtyptieren und APP/PS1-Tieren sowie zwischen Wildtypmäusen und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren an den Trainingstagen drei und vier. Hierbei war zu beobachten, dass die Latenzen der APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse an Tag drei und vier signifikant höher lagen, im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrolltieren. Dies deutet darauf hin, dass 12 Monate alte APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse eine Beeinträchtigung bei der Ausbildung des räumlichen Gedächtnisses aufweisen (Abbildung 13).

Gedächtnistest

Die Varianzanalyse des Gedächtnistests zwölf Monate alter Mäuse der verschiedenen Genotypen zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Quadrant ($F_{1,80} = 10,0$, $p = 0,002$), jedoch keinen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{3,80} = 0,17$, $p = 0,91$) sowie keine signifikante Interaktion der beiden Faktoren Genotyp und Quadrant ($F_{3,80} = 0,69$, $p = 0,56$). Dies deutet darauf hin, dass sich alle Genotypen vergleichbar verhielten. Der *post hoc* Test zeigte nur bei den Wildtypmäusen einen signifikanten Unterschied in der Aufenthaltszeit im Zielquadranten gegenüber der mittleren Aufenthaltszeit der anderen Quadranten. Dies deutet darauf hin, dass nur die Wildtyptiere ein nachweisbares Langzeitgedächtnis der früheren Plattformposition gebildet haben (Abbildung 14).

Die Analyse des Schwimmlabyrinthversuchs 12 Monate alter Tiere zeigte eine verminderte Lernleistung der APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere während des Trainings. Im Gedächtnistest zeigten zudem alle transgenen Tiere ein vermindertes Gedächtnis für die Plattformposition (Abbildung 15).

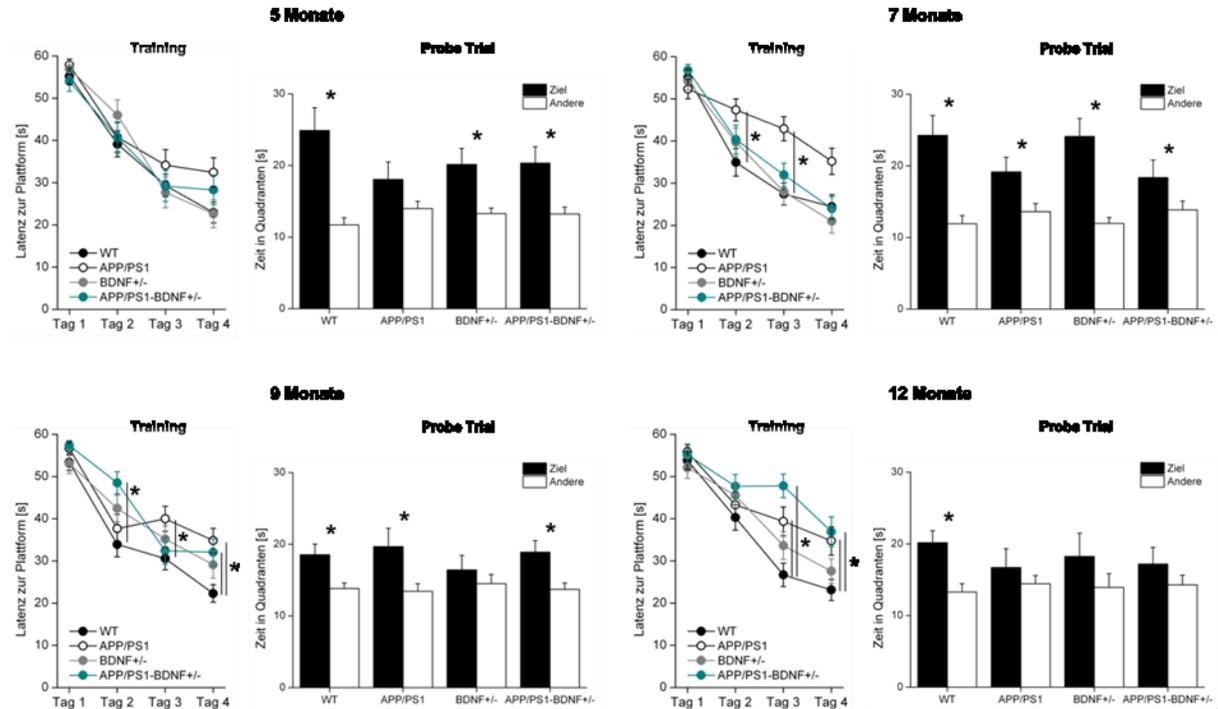


Abbildung 15: Zusammenfassende Abbildung zum Schwimmlabyrinthversuch: Latenz zum Erreichen der Plattform während der Trainingsphase und Aufenthaltsdauer im Zielquadranten im Vergleich zur mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten während des Probe Trials von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen. (* signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und transgenen Tieren in der Trainingsphase und signifikanter Unterschied im Probe Trial zwischen der Aufenthaltszeit im Zielquadranten im Vergleich zur mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten, MW ± SEM).

3.3.3 Einfluss des Schwimmlabyrinthversuchs auf den BDNF-Gehalt im Hippocampus

Um zu beurteilen, ob der Versuch des Schwimmlabyrinths längerfristige Auswirkungen auf die BDNF-Proteinmenge im Hippocampus haben könnte, die mit der späteren BDNF-Bestimmung trainierter Tiere interferiert, wurde ein entsprechendes Kontrollexperiment durchgeführt. Hierbei wurden drei Monate alte unbehandelte Wildtypiere, Wildtypiere direkt nach dem Schwimmlabyrinthversuch und Wildtypiere eine Woche nach dem Experiment, wie in 2.4.1 beschrieben, präpariert und der BDNF-Proteingehalt mittels ELISA gemessen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Probenanzahl der BDNF-Proteinbestimmung mittels ELISA-Messung von naiven und im Schwimmlabyrinth getesteten Wildtypieren

Region Genotyp	Hippocampus Anzahl (n)
Naiv WT	4
Getestet WT	4
Getestet (1 Woche später präpariert) WT	4

Die Varianzanalyse des BDNF-Proteingehalts im Hippocampus von im Schwimmlabyrinth getesteten Tieren im Vergleich zu naiven Wildtypieren, zeigte keinen signifikanten Effekt des Faktors Behandlung ($F_{2,9} = 2,5$, $p = 0,14$), was darauf hindeutet, dass es keinen signifikanten Unterschied des BDNF-Proteingehalts im Hippocampus zwischen naiven, den im Schwimmlabyrinth getesteten Wildtypieren und den Tieren die eine Woche nach dem Schwimmlabyrinthversuch präpariert wurden, bestand. Auch der *post hoc* Tukey Test zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Das bedeutet, dass der Versuch des Schwimmlabyrinths höchstwahrscheinlich keinen starken Einfluss auf die BDNF-Menge im Hippocampus zu haben scheint; unabhängig von dem Zeitpunkt der Probenentnahme nach dem Test im Schwimmlabyrinth.

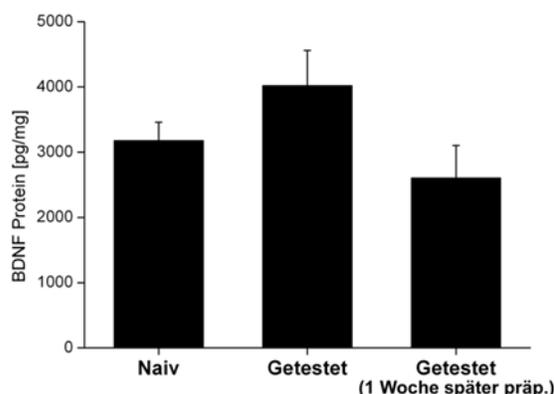


Abbildung 16: BDNF-Proteinmenge im Hippocampus von naiven Tieren im Vergleich zu im Schwimmlabyrinth getesteten Tieren in Pikogramm Protein pro Milligramm Probengewicht (MW+SEM).

3.3.4 Räumliches Lernverhalten im Schwimmlabyrinth von fünf Monate alten APP/PS1-Mäusen aus EE-Haltung

Um zu überprüfen, ob die Haltung im EE einen Einfluss auf das Lernverhalten der APP/PS1-Mäuse hat, wurden fünf Monate alte APP/PS1-Mäuse im Schwimmlabyrinth im Vergleich zu Wildtyptieren getestet (Tabelle 8). In Abbildung 17 ist die Latenz bis zum Erreichen der Plattform in der Trainingsphase und die Aufenthaltszeit im Zielquadranten im Vergleich zur mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten während des Probe Trials von Wildtyptieren und APP/PS1-Tieren aus EE und Standardhaltungsbedingungen dargestellt.

Tabelle 8: Anzahl aus der EE-Haltung stammenden und im Schwimmlabyrinth getesteten Tiere

Genotyp	Alter (Monate)	Anzahl (n)
WT	5	9
APP/PS1	5	9

Die Varianzanalyse zum Vergleich der Leistung im Training des Schwimmlabyrinthversuchs zwischen den Haltungsbedingungen Standardhaltung und EE-Haltung ergab einen signifikanten Effekt des Faktors Phase ($F_{3,155} = 33,4$, $p < 0,0001$), was auf ein Lernen über die Trainingszeit hindeutet und einen signifikanten Effekt des Faktors Haltung ($F_{1,155} = 5,0$, $p = 0,03$), was auf einen generellen Unterschied in der Lernleistung bedingt durch die Haltungsbedingungen hinweisen könnte. Die ANOVA zeigte weiterhin keinen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{1,155} = 0,8$, $p = 0,4$) und keine Interaktion der drei Faktoren (Phase x Haltung x Genotyp: $F_{3,155} = 0,6$, $p = 0,6$), was darauf hindeuten könnte, dass es keinen Unterschied der Trainingsleistung zwischen den Genotypen und den Haltungsbedingungen gab. Auch der *post hoc* Tukey Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Genotypen und den Haltungsbedingungen. Die Varianzanalyse des Gedächtnistests des Schwimmlabyrinths zwischen den beiden Haltungsbedingungen zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ($F_{1,77} = 1,9$, $p = 0,2$) und der Haltungsbedingung ($F_{1,77} = 0,02$, $p = 0,9$). Die ANOVA zeigte weiterhin einen signifikanten Effekt des Faktors Quadrant ($F_{1,77} = 33,3$, $p < 0,0001$), was bedeutet, dass sich die Aufenthaltszeiten zwischen dem Zielquadranten und die der anderen Quadranten signifikant voneinander un-

terschieden. Daraus lässt sich schließen, dass beide Genotypen unabhängig von der Hal- tungsbedingung die Position der Plattform gelernt haben (Genotyp x Quadrant x Haltung: $F_{1,77} = 0,7$, $p = 0,4$). Der *post hoc* Tukey Test zeigte einen signifikanten Unterschied der Aufenthaltszeiten im Zielquadranten im Vergleich zur den mittleren Aufenthaltszeiten in den anderen Quadranten bei allen Genotypen der beiden Hal- tungsbedingungen. Zusammenfas- send lässt sich festhalten, dass die Hal- tungsbedingung möglicherweise einen Einfluss auf die Leistung im Schwimmlabyrinthversuch von fünf Monate alten Wildtyp- und APP/PS1- Tieren hatte, dies sich jedoch nicht durch signifikant unterschiedliche Latenzzeiten zeigte.

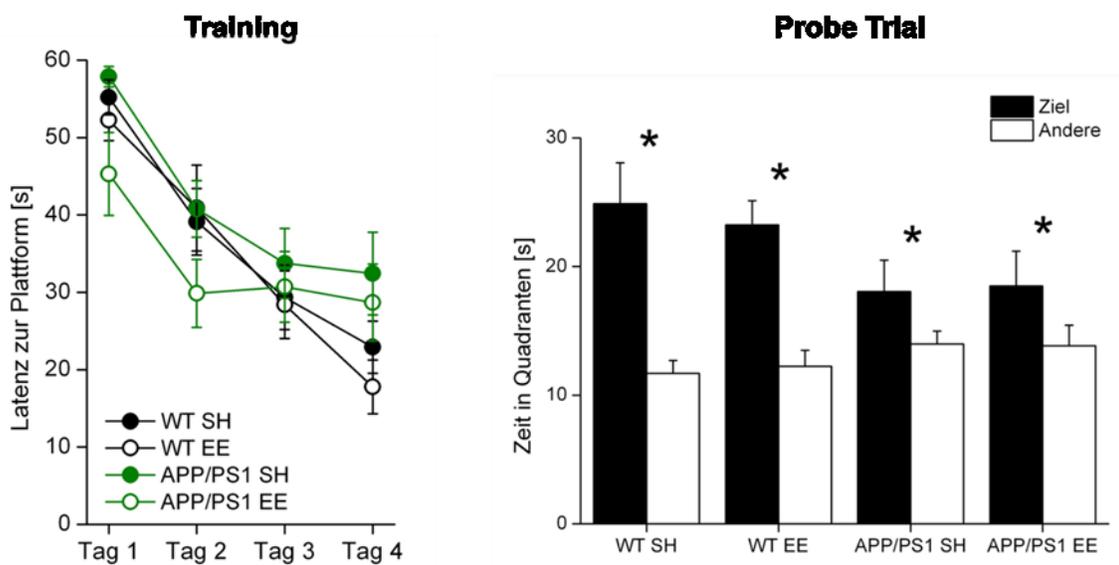


Abbildung 17: Latenz zum Erreichen der Plattform während des Trainings und Aufenthaltszeit während des Probe Trials im Schwimmlabyrinth von fünf Monate alten Wildtyp- und APP/PS1-Mäusen aus EE- und SH-Haltungsbedingungen (MW \pm SEM).

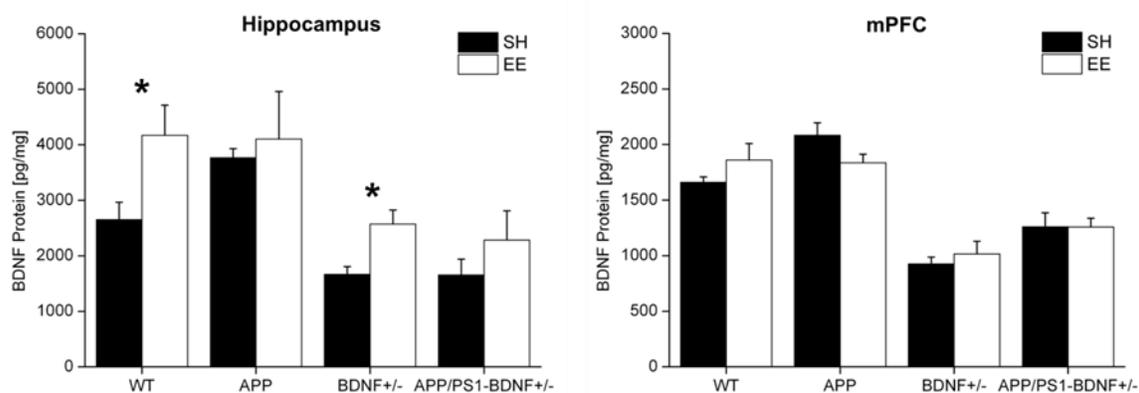
3.3.5 BDNF-Proteinquantifizierung bei Tieren aus EE-Haltung

Um die Auswirkungen der EE-Haltung auf den BDNF-Proteingehalt zu untersuchen, wurde der BDNF-Proteingehalt des Hippocampus und des mPFCs von Tieren aus Standardhaltung und EE-Haltung im Alter von fünf Monaten mittels ELISA-Messungen bestimmt und miteinander verglichen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Anzahl der mittels BDNF-ELISA gemessenen Hippocampus- und mPFC-Proben von Tieren im Alter von fünf Monaten aus Standard- und EE-Haltung

Region	Hippocampus	mPFC
Genotyp	Anzahl (n)	Anzahl (n)
Standardhaltung		
WT	4	3
APP/PS1	5	3
BDNF ^{+/-}	4	3
APP/PS1-BDNF ^{+/-}	4	4
EE		
WT	4	4
APP/PS1	4	4
BDNF ^{+/-}	4	4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}	4	3

Die Bestimmung und die statistische Analyse der BDNF-Proteinmenge von Wildtyp-Tieren, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren im Hippocampus zeigte einen signifikanten Unterschied bei Wildtyp-Tieren und BDNF^{+/-}-Mäusen zwischen der Standard- und EE-Haltung (t-Test, WT: $p = 0,04$, BDNF^{+/-}: $p = 0,03$). Bei APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen war kein Unterschied des BDNF-Gehalts zwischen den Haltungsbedingungen zu erkennen (t-Test, APP/PS1: $p = 0,5$, APP/PS1-BDNF^{+/-}: $p = 0,3$). Im mPFC zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Haltungsbedingungen in den einzelnen Genotypen (t-Test, WT: $p = 0,4$, APP/PS1: $p = 1,0$, BDNF^{+/-}: $p = 0,4$, APP/PS1-BDNF^{+/-}: $p = 1,0$).

Abbildung 18: BDNF-Proteinquantifizierung mittels ELISA-Messungen von Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}-, APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren aus Standardhaltung (SH) und EE-Haltung in Pikogramm Protein pro Milligramm Probengewicht aus Hippocampus und mPFC (* Signifikanter Unterschied im BDNF-Gehalt zwischen den Haltungsbedingungen, MW + SEM).

3.4 BDNF-Proteinquantifizierung mittels ELISA-Messungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Menge des Neurotrophins BDNF im dorsalen Hippocampus von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen mit Hilfe von ELISA-Messungen bestimmt, die zuvor das Schwimmlabyrinth durchlaufen haben (Tabelle 10).

Tabelle 10: Anzahl der Proben für die BDNF-Proteinbestimmung im Hippocampus

Genotyp	Alter (Monate)	Anzahl (n)
WT	5	5
APP/PS1		5
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		4
WT	7	4
APP/PS1		4
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		4
WT	9	6
APP/PS1		4
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		3
WT	12	5
APP/PS1		6
BDNF ^{+/-}		5
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		4

Die BDNF-Proteinquantifizierung des Hippocampus zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{3,55} = 14,9$, $p < 0,0001$). Dies weist auf einen generellen Unterschied in der Proteinmenge im Hippocampus zwischen den Genotypen hin. Die Varianzanalyse zeigte weiterhin keinen Effekt des Faktors Alter ($F_{3,55} = 0,80$, $p = 0,50$) und keine signifikante Interaktion der beiden Faktoren (Genotyp x Alter: $F_{9,55} = 1,02$, $p = 0,44$). Hier zeigte der *post hoc* Tukey Test einen signifikanten Unterschied der Proteinmenge zwischen Wildtyp- und BDNF^{+/-}-Tieren sowie zwischen Wildtyp- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren in allen getesteten Altersgruppen. Aus Abbildung 19 ist erkennbar, dass BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere etwa die Hälfte des Proteingehalts der Wildtypiere besaßen. Der *post hoc* Tukey Test zeigte weiterhin keine signifikanten Unterschiede im BDNF-Proteingehalt des Hippocampus innerhalb der Genotypen zwischen den verschiedenen Altersgruppen. Innerhalb der sieben Mona-

te alten Tiere unterschied sich der BDNF-Proteingehalt zwischen APP/PS1-Mäusen und BDNF^{+/-}-Tieren, sowie zwischen APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren. Daraus lässt sich schließen, dass es keine unterschiedlichen Veränderungen des BDNF-Proteingehalts im Hippocampus in keinen der getesteten Genotypen über das Alter gab, dass jedoch zwischen den Genotypen unterschiedliche BDNF-Expressionslevel vorlagen.

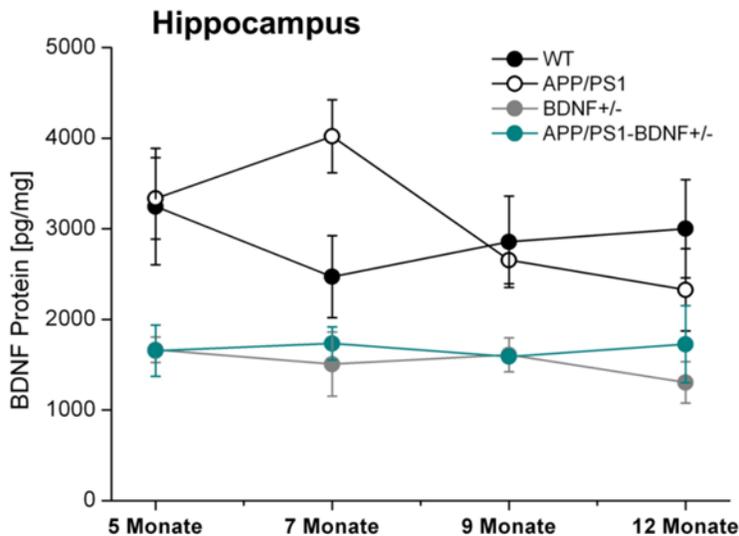


Abbildung 19: BDNF-Proteingehalt in Pikogramm Protein pro Milligramm Probengewicht im Hippocampus von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen (MW ± SEM).

3.5 A β -Pathologie der verwendeten Mausmodelle

3.5.1 A β ₄₂-ELISA-Messungen der verwendeten Tiermodelle

In der vorliegenden Arbeit wurde die Menge des A β ₄₂-Peptids in Proben des dorsalen Hippocampus von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen, die zuvor das Schwimmlabyrinth durchlaufen haben, mit Hilfe von ELISA-Messungen bestimmt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Anzahl der Proben für die A β ₄₂-Proteinbestimmung im Hippocampus

Genotyp	Alter (Monate)	Anzahl (n)
WT	5	4
APP/PS1		3
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		4
WT	7	4
APP/PS1		4
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		4
WT	9	4
APP/PS1		4
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		4
WT	12	4
APP/PS1		4
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		4

Die Varianzanalyse der A β ₄₂-Proteinbestimmung ergab einen signifikanten Effekt des Alters ($F_{3,48} = 6,2$, $p = 0,001$), einen signifikanten Effekt des Faktors Genotyp ($F_{3,48} = 27,4$, $p < 0,0001$) und eine signifikante Interaktion dieser beiden Faktoren (Alter x Genotyp: $F_{9,48} = 2,4$, $p = 0,02$). Der *post hoc* Tukey Test zeigte in allen Altersgruppen keinen signifikanten Unterschied zwischen APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen. Bei fünf, neun und 12 Monate alten Tieren zeigte der *post hoc* Test, dass sich der A β ₄₂-Gehalt von APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen signifikant von Wildtyp- und BDNF^{+/-}-Tieren unterschied.

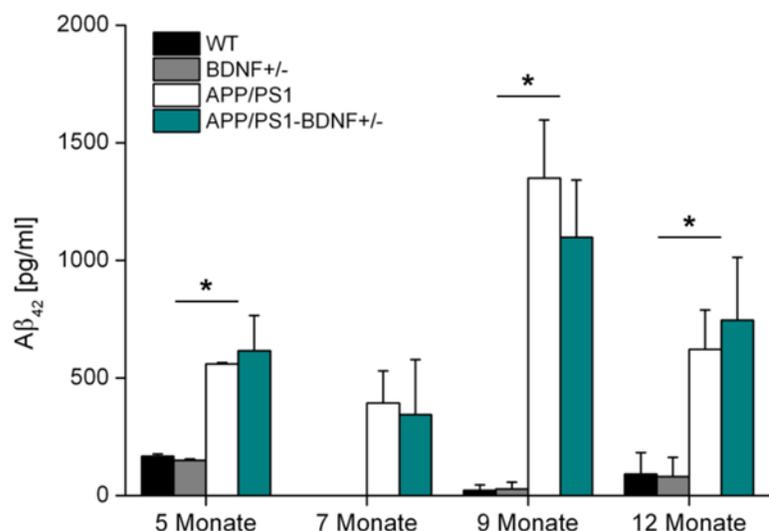


Abbildung 20: ELISA-Messung der A β_{42} -Bestimmung im Hippocampus von fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren.

3.5.2 β -Amyloid-Plauefärbungen der verwendeten Tiermodelle

In Kooperation mit dem Institut für Biologie der Otto-von-Guericke Universität im Rahmen eines Verbund-Projektes wurden β -Amyloid-Plauefärbungen von neun Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen des Hippocampus durchgeführt (Tabelle 12). Insgesamt zeigten nur APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere eine positive β -Amyloid-Plauepathologie. Daher konnte nur die β -Amyloid-Plaueedichte der APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse quantifiziert und statistisch analysiert werden.

Tabelle 12: Anzahl der für die β -Amyloid-Plauefärbungen verwendeten neun Monate alten APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere im Hippocampus

Genotyp	Anzahl (n)
WT	7
APP/PS1	7
BDNF ^{+/-}	7
APP/PS1-BDNF ^{+/-}	4

Die statistische Auswertung der Quantifizierung der β -Amyloid-Plaueedichte von APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren des Hippocampus zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen (t-Test, $p = 0,7$).

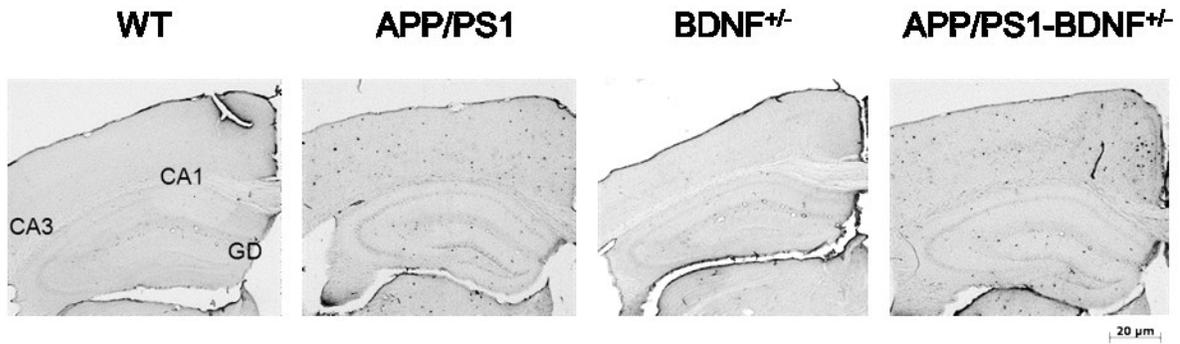


Abbildung 21: β -Amyloid-Plaquetfärbungen des Hippocampus von neun Monate alten Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen (CA: *Cornu ammonis* GD: Gyrus dentatus).

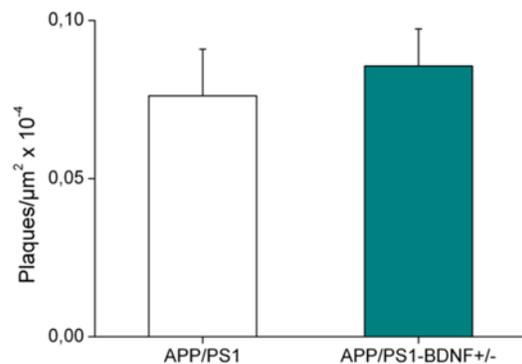


Abbildung 22: Quantifizierung der β -Amyloid-Plaquedichte von neun Monate alten APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen im Hippocampus.

3.6 Messung der Mitochondrienfunktion mittels Respirometrie

Die Funktion der Mitochondrien der in der vorliegenden Arbeit verwendeten APP/PS1-, BDNF^{+/-}-, APP/PS1-BDNF^{+/-}- und Wildtypiere im Alter von acht Monaten wurde mittels Respirometrie in Hippocampus- und Kortexhomogenaten gemessen (Tabelle 13). Zur Analyse der Messdaten wurden die Atmungsraten und der Respiratorische Kontrollindex (RCI) berechnet und aufgetragen. Der RCI ist der Quotient aus der State 3- und State 4-Atmung und erlaubt Rückschlüsse auf die Intaktheit der untersuchten neuronalen und glialen Mitochondrien. Die Atmungsraten und die RCI wurden aus zwei verschiedenen Bedingungen berechnet. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse unter Standardbedingungen mit zusätzlicher Kalziumstimulation, bei der nach ADP-Zugabe zweimal hintereinander mittels Kalzi-

umapplikation (Ca200 und Ca100) die Atmungsraten stimuliert werden sollten. Abbildung 24 zeigt die Atmungsratenmessung unter dauerhaft erhöhter Kalziumkonzentration des Messmediums, was folgend als Kalziumstressbedingung bezeichnet wird. Die Messungen unter erhöhter Kalziumkonzentration sollten Aufschluss über die Funktionalität der Mitochondrien unter Stressbedingungen geben.

Tabelle 13: Anzahl der verwendeten acht Monate alten Tiere zur Spirometrie

Genotyp	Region	Anzahl (n)
WT	Hippocampus	4
APP/PS1		4
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		5
WT	Kortex	4
APP/PS1		4
BDNF ^{+/-}		4
APP/PS1-BDNF ^{+/-}		5

Die Messungen der Atmungsraten erfolgten in Gegenwart der Substrate Glutamat und Malat. Der erste Wert (Glu/Mal) der Atmungsratenmesskurve zeigt den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien in Abhängigkeit dieser beiden Substrate (State 4-Atmung). Im Hippocampusgewebe zeigten die Mitochondrien der APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäuse eine signifikant geringere basale Atmungsrate im Vergleich zu Wildtyptieren (t-Test, a: $p = 0,009$, b: $p = 0,002$) bei Standardmessbedingungen. Die durch ADP-Zugabe maximal stimulierte Atmungsrate (ADP, State 3-Atmung) unterschied sich in allen Genotypen im Vergleich zu den Wildtyptieren nicht. Die erste Stimulation der Atmungsraten durch Kalziumzugabe (Ca200) führte zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs der Mitochondrien, wobei die Atmungsrate der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant höher war (t-Test, c: $p = 0,04$). Nach der zweiten Stimulation durch Kalzium (Ca100) erhöhten sich die Atmungsraten der Mitochondrien von BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren signifikant im Vergleich zu Wildtyptieren (t-Test, b: $p = 0,03$, c: $p = 0,02$). Über die Zugabe von Pyruvat (Pyr) wurde die Komplex-I abhängige Atmung maximal stimuliert und zeigte bei allen Genotypen eine Erhöhung der Atmungsraten, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyptieren zu erkennen war. Die Atmungsraten stiegen maximal durch die Zugabe des Substrates Succinat (Suc), dessen Elektronen direkt in den Komplex-II der Atmungskette eingespeist werden können.

Somit zeigte die Atmungsrate zum Zeitpunkt nach der Succinat-Zugabe die Komplex-I und -II abhängige Atmung. Die Atmungsraten der Mitochondrien zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich zwischen den transgenen Tieren und den Wildtyptieren nicht. Die Komplex-I abhängige Atmung wurde mittels Zugabe von Rotenon blockiert. Die durch diese Hemmung verursachte, verminderte Atmungsrate unterschied sich nicht signifikant zwischen den transgenen Tieren und Wildtyptieren. Durch die Zugabe des Substrats Glycerin-3-phosphat (G3P) wurde die Komplex-III abhängige Atmung stimuliert. Hierbei erhöhten sich die Atmungsraten aller Genotypen, welche sich nicht signifikant zu Wildtyptieren unterschieden. Als letzte Substanz wurde Atraktolat in den Messansatz hinzugefügt, um den Transport von ADP in die Mitochondrienmatrix zu hemmen und somit die Mitochondrienatmung auf ein Minimum zu reduzieren. Der Sauerstoffverbrauch nach Atraktolat-Zugabe war zwischen den Mitochondrien von transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren nicht signifikant unterschiedlich. Die RCIs der Mitochondrien von APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäusen aus dem Hippocampus im Standardmessansatz waren signifikant höher im Vergleich zum RCI der Wildtypmäuse (t-Test, APP/PS1: $p = 0,008$, BDNF^{+/-}: $p = 0,005$).

Die Atmungsraten der Mitochondrien des Kortex im Standardmessansatz zeigten eine signifikant verminderte Atmungsrate der Mitochondrien der Wildtyptiere nach Zugabe von ADP im Vergleich zu BDNF^{+/-}-Mäusen (t-Test, b: $p = 0,049$), somit eine geringere State 3-Atmung. Nach der ersten Kalziumstimulation stiegen die Atmungsraten der APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Tiere signifikant höher im Vergleich zu den Wildtyptieren (t-Test, b: $p = 0,03$, c: $p = 0,01$). Nach der zweiten Kalziumstimulation waren die Atmungsraten der Mitochondrien aller transgenen Tiere signifikant höher als die der Wildtypmäuse (t-Test, a: $p = 0,03$, b: $p = 0,009$, c: $p = 0,004$). Im weiteren Verlauf der Messung des Sauerstoffverbrauchs der Mitochondrien des Kortex waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu beobachten. Nach der Zugabe des Komplex-I-Hemmers Rotenon zeigten die Mitochondrien der Wildtyptiere eine signifikant verminderte Atmungsrate im Vergleich zu den BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren (t-Test, b: $p = 0,01$, c: $p = 0,01$). Der RCI der neuronalen Mitochondrien des Kortex unterschied sich zwischen Wildtypmäusen und BDNF^{+/-}-Tieren signifikant (t-Test, $p = 0,02$).

Bei den Atmungsmessungen des Hippocampushomogenats im Standardmessansatz zeigten die Mitochondrien der APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Tiere im Alter von acht Monaten eine gerin-

gere State 4-Atmung im Vergleich zu Wildtypmitochondrien. Im weiteren Verlauf zeigten Wildtypmitochondrien eine geringere Atmungsrate nach Kalziumstimulation im Vergleich zu APP/PS1-BDNF^{+/-}- und BDNF^{+/-}-Tieren sowie einen geringeren RCI im Vergleich zu APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Tieren. Im Kortexgewebe zeigten Wildtypmitochondrien eine geringere State 3-Atmung im Vergleich zu denen der BDNF^{+/-}-Mäuse. Auch im Kortexgewebe zeigten die Mitochondrien der Wildtypiere eine geringere Atmungsrate nach Kalziumstimulation im Vergleich zu denen der APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse.

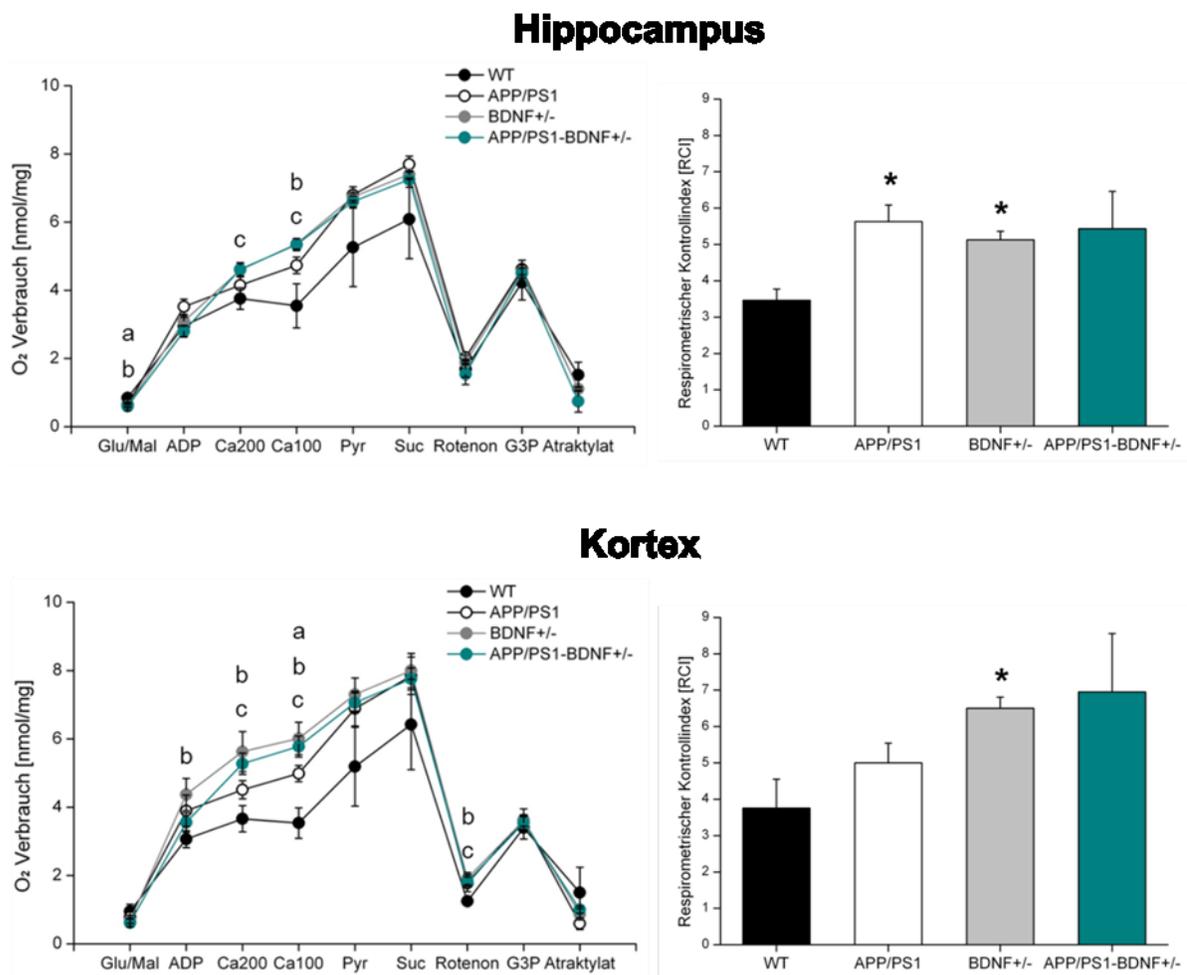


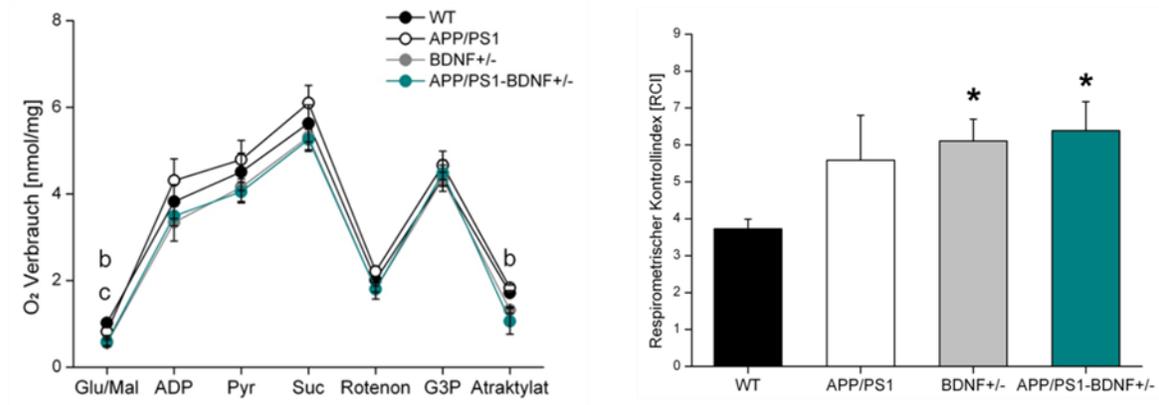
Abbildung 23: Atmungsraten (links) und RCIs (rechts) von Hippocampus- und Kortexgewebe aus Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen im Alter von acht Monaten mit Kalziumstimulation im Standardmessansatz. Der RCI berechnet sich aus dem Verhältnis der Atmungsraten nach ADP-Zugabe und Glu/Mal-Zugabe. (MW ± SEM, a = signifikanter Unterschied zwischen WT und APP/PS1, b = signifikanter Unterschied zwischen WT und BDNF^{+/-}, c = signifikanter Unterschied zwischen WT und APP/PS1-BDNF^{+/-}, * signifikanter Unterschied zu Wildtypieren).

Die Atmungsraten der Mitochondrien im Hippocampus, gemessen im Kalziumstressansatz, zeigten eine verminderte basale Atmungsrate (Glu/Mal; State 4-Atmung) der BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}- Mäuse im Vergleich zu den Wildtyptieren (t-Test, b: $p = 0,002$, c: $p = 0,005$). Im weiteren Verlauf der Atmungsmessungen zeigten sich keine Unterschiede der Atmungsraten der Mitochondrien zwischen den transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-tieren der Komplex-I, -II und -III abhängigen Atmung. Es konnte eine geringere Atmungsrate der Mitochondrien der BDNF^{+/-}-Mäuse nach Atraktolat-Zugabe im Vergleich zu den Wildtyp-tieren beobachtet werden (t-Test, b: $p = 0,003$). Dieser Wert der Atmungsrate sollte auf das Niveau der basalen Atmung (State 4-Atmung) zurückgehen, da Atraktolat den Transport von ADP in die Mitochondrien und die Phosphorylierung von ADP zu ATP und den damit verbundenen Sauerstoffverbrauch hemmt. Der RCI der Mitochondrien des Hippocampus von BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen unterschied sich signifikant von dem der Wildtypmäuse (t-Test, BDNF^{+/-}: $p = 0,005$, APP/PS1-BDNF^{+/-}: $p = 0,01$), wobei der RCI der BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere höher war.

Die im Kalziumstressansatz gemessenen Mitochondrien des Kortex der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere zeigten signifikant verminderte Atmungsraten nach ADP-Zugabe (State 3-Atmung) (t-Test, c: $p = 0,03$), nach Pyruvat-Applikation (t-Test, c: $p = 0,03$) und Succinatzugabe (t-Test, c: $p = 0,04$) im Vergleich zu Wildtypmäusen. Dies könnte darauf hinweisen, dass APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere eine gestörte Komplex-I (Pyr) und/oder Komplex-II (Suc) abhängige Atmung unter Kalziumstressbedingungen aufweisen. Die Komplex-I, -II und -III abhängige Atmung der APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäuse unterschied sich im Kortex unter Kalziumstress nicht von denen der Wildtyp-tiere. Der RCI der Wildtyp-tiere war signifikant niedriger als der RCI der APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Tiere unter Kalziumstressbedingungen (t-Test, APP/PS1: $p = 0,02$, BDNF^{+/-}: $p = 0,02$).

Die Messungen der Mitochondrienfunktion unter Kalziumstressbedingungen zeigte im Hippocampusgewebe eine geringere basale Atmung der Mitochondrien von APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Tieren. Im Vergleich zu BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren lag der RCI der Wildtyp-tiere signifikant niedriger. Im Kortexgewebe zeigten die Mitochondrien der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse eine geringere Komplex-I und-II abhängige Atmungsrate unter Kalziumstressbedingungen. Der RCI der Wildtyp-tiere lag niedriger im Vergleich zu dem RCIs der APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Tiere.

Hippocampus



Kortex

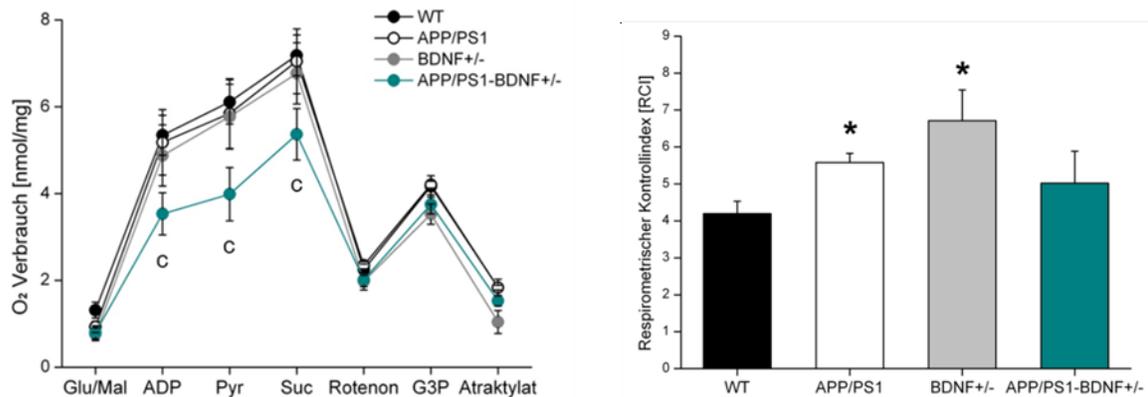


Abbildung 24: Atmungsraten (links) und RCI (rechts) von Hippocampus- und Kortexgewebe aus Wildtyp-, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen im Alter von acht Monaten im Kalziumstressansatz. Der RCI berechnet sich aus dem Verhältnis der Atmungsraten nach ADP-Zugabe und Glu/Mal-Zugabe. (MW ± SEM, a = signifikanter Unterschied zwischen WT und APP/PS1, b = signifikanter Unterschied zwischen WT und BDNF^{+/-}, c = signifikanter Unterschied zwischen WT und APP/PS1-BDNF^{+/-}, * signifikanter Unterschied zu Wildtypieren).

4 Diskussion

4.1 Einfluss des endogenen Mangels an BDNF auf das Extinktionslernen

Die Ergebnisse des Furchtextinktionsexperiments zeigen ein altersabhängiges Lerndefizit der BDNF^{+/-}-Mäuse. Hierbei zeigten sieben Monate alte BDNF^{+/-}-Tiere Defizite innerhalb des Extinktionstrainings und im Extinktionsgedächtnistest. Zwei Monate alte BDNF^{+/-}-Tiere zeigten hingegen ein zu den gleichalten Wildtyptieren vergleichbares Furchtextinktionslernen und -gedächtnis. Weiterhin war eine gleichzeitige Reduktion der BDNF-Proteinmenge in Hippocampus, der Amygdala und dem mPFC von sieben Monate alten Tieren im Vergleich zu zwei Monate alten Tieren zu beobachten. Diese Reduktion an BDNF in furchtextinktionsrelevanten Gehirnarealen spricht zusätzlich für den Einfluss von BDNF auf das Lernen und die Gedächtnisbildung der Furchtextinktion. Die vorliegenden Ergebnisse werden von einer Studie unterstützt, die zeigte, dass Menschen und Mäuse, welche den Val66Met-Polymorphismus im BDNF-Genlocus tragen, ein Defizit im Extinktionslernen aufwiesen (Soliman et al., 2010). Eine weitere Arbeit zeigte, dass BDNF eine essentielle Rolle bei der Extinktion von konditionierter Furcht spielt und dass das Extinktionslernen eine Histonacetylierung an der BDNF-Promotorregion im Präfrontalkortex auslöste und dies wiederum in einem Anstieg der BDNF-mRNA Expression innerhalb dieser Gehirnregion von Mäusen resultierte (Bredy et al., 2007). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass einmalige Infusion von BDNF in den IL mPFC von Ratten ausreichte, um ein Extinktionsgedächtnis zu induzieren, ohne ein Extinktionstraining mit den Tieren durchzuführen (Peters et al., 2010). Die Autoren der genannten Arbeit vermuteten, dass das für das Extinktionslernen benötigte BDNF von hippocampalen Neuronen stammt. Diese Annahme wurde von einer kürzlich erschienenen Arbeit dieser Arbeitsgruppe unterstützt, in der u.a. gezeigt wurde, dass eine Infusion von BDNF in den ventralen Hippocampus eine Erhöhung der Aktivität im IL mPFC bei furchtkonditionierten Ratten zur Folge hatte. Weiterhin war BDNF im ventralen Hippocampus und der BLA, jedoch nicht im IL oder PL mPFC, nach dem Extinktionstraining erhöht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine extinktionsinduzierte Erhöhung des BDNF-Levels im ventralen Hippocampus die Erregbarkeit im IL mPFC erhöht und somit das Extinktionsgedächtnis unterstützt (Rosas-Vidal et al., 2014). Der Umstand, dass sie-

ben Monate alte BDNF^{+/-}-Mäuse schon innerhalb des Extinktionstrainings keine Reduktion des Freezing-Verhaltens zeigten, könnte ein Hinweis darauf sein, dass bereits die Akquisition des Extinktionsgedächtnisses von BDNF abhängt. Diese These wird von einer Arbeit unterstützt, die ebenfalls keinen Lerneffekt während des Extinktionstrainings bei unbehandelten drei Monate alten BDNF^{+/-}-Mäusen beobachten konnte (Karpova et al., 2011). Da bei einer lokalen Störung des BDNF-Signalwegs in der basolateralen Amygdala die Akquisition des Extinktionsgedächtnisses intakt blieb (Chhatwal et al., 2006), scheint es wahrscheinlich, dass es weitere BDNF abhängige Prozesse gibt, die außerhalb der Amygdala lokalisiert sind und ebenfalls zur Akquisition des Extinktionsgedächtnisses beitragen. Vielversprechende Gehirnareale sind hierbei der Hippocampus und der IL mPFC. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Reduktion des BDNF-Levels im Hippocampus und dem mPFC von sieben Monate alten Tieren. Hierbei bleibt jedoch unklar, ob das gezeigte Defizit in der Akquisition des Furchtextinktionsgedächtnisses der sieben Monate alten BDNF^{+/-}-Mäuse von der reduzierten BDNF-Menge im Hippocampus, dem mPFC oder beiden Gehirnarealen verursacht wird. In der Studie von Peters und Kollegen wurde beschrieben, dass Tiere mit einem Defizit im Extinktionslernen eine Reduktion der BDNF-Menge im Hippocampus besaßen, jedoch nicht in der Amygdala oder dem IL mPFC (Peters et al., 2010), was für eine wichtige Rolle des Hippocampus im Extinktionslernen von Furcht spricht. In der vorliegenden Arbeit war es aufgrund der Größe des mPFCs der verwendeten Mäuse nicht möglich zwischen dem IL und dem PL mPFC zu unterscheiden, so dass der BDNF-Gehalt nur aus beiden Subarealen des mPFCs gemessen werden konnte. Der IL mPFC ist eine essentielle Struktur der Plastizität für die Vermittlung von Extinktionslernen und –gedächtnis (zusammengefasst z.B. in Maren und Quirk, 2004). Der PL mPFC hingegen ist eine Struktur die hauptsächlich an der Konsolidierung von Furchtgedächtnis (Choi et al. 2010) und an der Expression von Furchtantworten beteiligt ist (zusammengefasst z.B. in Sotres-Bayon und Quirk, 2010). So konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden, ob die altersabhängige Reduktion von sieben Monate alten Tieren im IL oder im PL des mPFCs oder in beiden Arealen gleichzeitig stattfindet. In der vorliegenden Arbeit wurde die BDNF-Menge von drei verschiedenen Gehirnarealen, welche nachweislich im Extinktionslernen involviert sind, bestimmt. Da BDNF^{+/-}-Mäuse einer chronischen Reduktion von BDNF im gesamten Gehirn unterliegen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht auch andere Gehirnareale für das gefundene Extinktionslerndefizit eine Rolle spielen.

Es konnte keine Generalisierung der Furchtreaktion von sieben Monate alten BDNF^{+/-}-Mäusen festgestellt werden, was an der geringen Furchtreaktion während der Habituationsphase des Extinktionsgedächtnistests erkennbar ist. Daraus kann geschlossen werden, dass sieben Monate alte BDNF^{+/-}-Tiere ein spezifisches Furchtgedächtnis gebildet haben, welches jedoch nicht durch das Extinktionstraining inhibiert werden konnte. Weiterhin konnten keine Veränderungen der spontanen motorischen Aktivität der BDNF^{+/-}-Tiere festgestellt werden, was die Ergebnisse der zurückgelegten Distanz im Objektwiedererkennungstest (Abbildung 9) zeigten und auch vorherige Arbeiten, welche BDNF^{+/-}-Mäuse verschiedener Alter im Offenfeldversuch untersuchten (Endres und Lessmann, 2012). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten BDNF^{+/-}-Tiere zeigten auch in Offenfeldversuchen, die im Rahmen eines Kooperationsprojektes durchgeführt wurden, keine generellen altersabhängigen Veränderungen im Aktivitätsverhalten (Rockhar, C., persönliche Mitteilung). Daher ist es unwahrscheinlich, dass das gezeigte Defizit im Furchtextinktionslernen auf eine generell reduzierte Aktivität der Mäuse während des Experiments zurückzuführen ist.

Die BDNF-Proteinquantifizierung zeigte eine signifikant geringere BDNF-Menge in Hippocampus, Amygdala und mPFC von sieben Monate alten Tieren im Vergleich zu zwei Monate alten Tieren. Diese altersabhängige Reduktion von BDNF wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben, welche sowohl in Wildtyptieren (Karege et al., 2002; Hayashi et al., 2001) als auch in BDNF^{+/-}-Mäusen (Boger et al., 2011; Carreton et al., 2012) vorhanden war. Weiterhin bestätigen diese Ergebnisse, dass altersabhängige Änderungen im BDNF-Gehalt in verschiedenen Gehirnarealen unterschiedlich reguliert werden (siehe z.B. Silhol et al., 2005). Im Allgemeinen zeigten die vorliegenden Ergebnisse eine Reduktion der BDNF-Proteinmenge von ca. 50 % in allen untersuchten Gehirnarealen der BDNF^{+/-}-Mäuse, im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtyptieren, was mit den Ergebnissen anderer Arbeiten im Einklang steht (Abidin et al., 2006; Hill und van den Buuse, 2011; Kolbeck et al., 1999). Interessanterweise scheint diese um etwa 50 % verringerte BDNF-Menge ausreichend zu sein, um in jüngeren BDNF^{+/-}-Mäusen ein mit Wildtyptieren vergleichbares Furcht- und Extinktionsgedächtnis zu bilden, wobei eine weitere, viel kleinere Reduktion während des Alters, in einem Lerndefizit resultiert. Diese Erkenntnisse könnten darauf hindeuten, dass es einen bestimmten Schwellenwert für die BDNF-Menge gibt, welche zum Furcht- und Ex-

tinktionslernen benötigt wird. Liegt die BDNF-Menge unter diesem Schwellenwert, scheint die Bildung eines Furcht- und/oder Extinktionsgedächtnisses nicht mehr möglich zu sein.

Die vorliegende Arbeit konnte eine altersabhängige Beeinträchtigung im Furchtextinktionslernen von BDNF^{+/-}-Mäusen zeigen. Sieben Monate alte BDNF^{+/-}-Mäuse besaßen ein Defizit in der Akquisition des Extinktionslernens, wobei zwei Monate alte Tiere ein intaktes Extinktionsgedächtnis zeigten. Dieses Defizit im Extinktionslernen war von einer Reduktion der BDNF-Proteinmenge bei BDNF^{+/-}-Tieren in furchtextinktionsrelevanten Gehirnregionen begleitet.

4.2 Untersuchung von Parametern des basalen Aktivitäts- und Angstverhaltens

Im Rahmen des Objektwiedererkennungstests wurde in der vorliegenden Arbeit neben dem Kurzzeitgedächtnis der verwendeten Genotypen verschiedener Altersgruppen, auch basale Parameter, wie die spontane Aktivität und das basale Angstverhalten, untersucht.

Um das Aktivitätslevel der Wildtypiere, APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse verschiedener Alter zu vergleichen, wurde die Wegstrecke, welche die Tiere innerhalb des Objektwiedererkennungstests zurückgelegt haben, analysiert. Es waren Unterschiede in der zurückgelegten Strecke innerhalb der fünf und zwölf Monate alten Tiere zu erkennen. Hierbei zeigten APP/PS1-Mäuse eine höhere Aktivität im Vergleich zu den entsprechend alten BDNF^{+/-}-Tieren, jedoch waren keine Unterschiede der zurückgelegten Wegstrecke der APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtypieren zu beobachten. Diese Ergebnisse entsprechen Beobachtungen einer vorangegangenen Arbeit, die zeigten, dass BDNF^{+/-}-Mäuse verschiedener Alter (ein bis sechs Monate) keine Unterschiede in der zurückgelegten Wegstrecke innerhalb eines Offenfeldversuches im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypmäusen aufwiesen (Endres und Lessmann, 2012). Andere Studien, welche u.a. das Aktivitätslevel von BDNF^{+/-}-Mäusen im Offenfeldversuch untersuchten, zeigten ebenfalls keine Unterschiede zu Wildtypkontrolltieren (Lyons et al., 1999; MacQueen et al., 2001; Chourbaji et al., 2004). Im Gegensatz dazu konnten einige Arbeiten ein hyperaktives

Verhalten bei BDNF^{+/-}-Mäusen beobachten (Kernie et al., 2000; Zhu et al., 2009). Welchen Einfluss der chronischen Mangel an BDNF auf das Aktivitätsverhalten hat, bleibt insgesamt noch unklar. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit keinerlei hyperaktives Verhalten der BDNF^{+/-}-Tiere beobachtet werden, was eine Beeinflussung des Aktivitätsverhaltens auf folgende Verhaltenversuche ausschließt. Erkenntnisse mehrerer anderer Arbeiten zeigten, dass bei BDNF^{+/-}-Mäusen ein erhöhter Anstieg der Körpermasse mit zunehmendem Alter im Vergleich zu Wildtypmäusen einherging (Kernie et al., 2000; Lyons et al., 1999; Rantamaki et al., 2013). Dieser Umstand könnte u.U. dazu führen, dass BDNF^{+/-}-Mäuse mit zunehmenden Alter und somit mit zunehmender Körpermasse, Einschränkungen der körperlichen Aktivität besitzen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass keine Veränderungen des Aktivitätsverhaltens der hier verwendeten BDNF^{+/-}-Mäuse, verschiedenen Alters im Vergleich zu Wildtypmäusen auftraten. Vorangegangene Untersuchungen konnten keinen Einfluss der erhöhten Körpermasse von älteren BDNF^{+/-}-Mäusen auf das Aktivitätsverhalten im Offenfeldversuch (Endres und Lessmann, 2012) und im Schwimmlabyrinthversuch erkennen (Petzold et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde daher keine Analyse der Körpermasse der verwendeten Tiere durchgeführt.

Ein Offenfeldversuch der in der vorliegenden Arbeit verwendeten APP/PS1-Mäuse im Alter von fünf und acht Monaten zeigte ebenfalls keine Unterschiede im Aktivitätsverhalten zu gleichaltrigen Wildtyptieren (Radde et al., 2006). Innerhalb eines Sozialpreferenztests der in der vorliegenden Arbeit verwendeten APP/PS1-Mäuse im Alter von acht Monaten, konnte ebenfalls kein Unterschied im Aktivitätsverhalten in Form der zurückgelegten Wegstrecke festgestellt werden (Lo et al., 2013a). Die genannten Ergebnisse lassen vermuten, dass auch Tiere, welche aus der Kreuzung von BDNF^{+/-}- und APP/PS1-Mäusen hervorgehen (APP/PS1-BDNF^{+/-}), ebenfalls keine Unterschiede im basalen Aktivitätslevel zeigen. Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt, da kein Unterschied der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen des entsprechenden Alters in der zurückgelegten Strecke innerhalb des Objektwiedererkennungstests zu beobachten war. Die Ergebnisse dieser Arbeit zum motorischen Aktivitätsverhalten der verwendeten Genotypen in verschiedenen Altersstufen, stehen im Einklang mit Offenfeldversuchen, welche mit den in dieser Arbeit verwendeten Tieren der selben Altersgruppen durchgeführt wurden. Erste Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass es keine systematischen Unterschiede

zwischen den Genotypen des Aktivitätsverhaltens gibt (Rockhar, C., persönliche Mitteilung).

Für die Überprüfung des basalen Angstverhaltens, der in der vorliegenden Arbeit verwendeten verschiedenen Genotypen, verschiedener Alter, wurde die Aufenthaltsdauer in der Zentrumszone im Vergleich zur Randzone der Arena des Objektwiedererkennungstests betrachtet. Da Nager potentielle Beutetiere sind, besitzen diese eine natürliche Tendenz sich vorzugsweise in dunkleren und geschützten Umgebungen aufzuhalten (Crawley und Goodwin, 1980). Daher erwartet man von Mäusen generell eine höhere Aufenthaltszeit innerhalb der Randzone, im Vergleich zur Zentrumszone einer Arena. In der vorliegenden Arbeit waren innerhalb der Altersgruppen zwischen den verschiedenen Genotypen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Generell zeigten alle getesteten Tiere eine signifikant höhere Aufenthaltszeit innerhalb der Randzone, im Vergleich zur Zentrumszone der Arena. Diese Ergebnisse stehen mit einer vorherigen Arbeit im Einklang, in der beobachtet wurde, dass BDNF^{+/-}-Mäuse verschiedener Alter ebenfalls keine Veränderungen im natürlichen Angstverhalten zeigten, wenn sie im erhöhten Pluslabyrinth getestet wurden (Endres und Lessmann, 2012). Hier war bei BDNF^{+/-}-Mäusen im Alter von eins bis sechs Monaten, weder ein Unterschied zu gleichalten Wildtyptieren in der Aufenthaltszeit auf dem offenen Arm, noch im sogenannten „Risikoabschätzungs-Verhalten“ (risk assessment behavior) zu erkennen. Andere Studien, die das Angstverhalten von BDNF^{+/-}-Mäusen, oder Mäusen mit einer spezifischen BDNF-Herunterregulierung im Vorderhirn untersucht haben, beobachteten ebenfalls keine Hinweise auf ein verändertes basales Angstverhalten (Ren-Patterson et al., 2005; Austry et al., 2009; Sakata et al., 2010). Ergebnisse eines erhöhten Pluslabyrinthversuchs, mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten APP/PS1-Mausmodell, zeigten keine Veränderungen des basalen Angstverhaltens von sechs und neun Monate alten APP/PS1-Mäusen im Vergleich zu Wildtypkontrolltieren, was anhand der Zeit im offenen Arm des Pluslabyrinths beobachtet wurde (Lok et al., 2013). Dass BDNF^{+/-}- und APP/PS1-Mäuse verschiedenen Alters keine Veränderungen im basalen Angstverhalten zeigten, konnte sowohl in der vorliegenden, als auch in anderen Arbeiten festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Arbeit, welche APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse der vorliegenden Arbeit mit fünf und zwölf Monate im erhöhten Pluslabyrinth testeten, beobachtet, dass im Alter von fünf Monaten APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse eine höhere Aufenthalts-

zeit in den offenen Armen im Vergleich zu den Wildtyptieren zeigten. Im Alter von 12 Monaten zeigten APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse eine höhere Aufenthaltszeit im offenen Arm (Rockhar, C., persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen könnten auf ein verändertes Angstverhalten der APP/PS1- und/oder APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse hinweisen und bedarf weiterer Untersuchungen anderer Parameter, welche das Angstverhalten dieser Tiere weiter betrachten.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass hier kein Unterschied im spontanen Aktivitäts-, Angst-, und Explorationsverhalten von APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen in den getesteten Altersgruppen, im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyptieren, festzustellen war. Daraus lässt sich schließen, dass weder ein chronischer Mangel an BDNF, noch der Alzheimerphänotyp, als auch die Kombination der beiden Faktoren einen Einfluss auf die hier untersuchten basalen Parameter der verschiedenen alten Mäuse in der vorliegenden Studie hatte.

4.3 Der Objektwiedererkennungstest zur Erfassung des Kurzzeitgedächtnisses

Der Objektwiedererkennungstest ist ein Verhaltenstest, der herangezogen wird, um bei Nagern das Kurzzeit- oder Langzeitgedächtnis zu testen. Vor allem bei Alzheimer-Tiermodellen ist dieser Test ein häufig genutzter Versuch, um kognitive Leistungen des Kurzzeitgedächtnisses zu untersuchen, die bei Alzheimerpatienten ähnlich beeinträchtigt sind (siehe z.B. Lee et al., 2003). Die Versuche zur Objektwiedererkennung in den verschiedenen alten APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen, im Vergleich zu gleich alten Wildtyptieren der vorliegenden Arbeit, zeigten keine Unterschiede des Explorationsverhaltens des neuen Objekts innerhalb einer Altersgruppe und auch innerhalb der Genotypen. Dies äußerte sich darin, dass alle Genotypen in allen Altersgruppen einen signifikant höheren Explorationsindex für das neue Objekt aufwiesen. Nager besitzen eine natürliche Tendenz noch nicht bekannte Objekte und auch Umgebungen intensiv zu explorieren (Ennaceur und Delacour, 1988). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Eigenschaft im Rahmen des Objektwiedererkennungstests genutzt, um das Kurzzeitgedächtnis der verschiedenen Geno-

typen verschiedener Altersstufen zu überprüfen. Hierbei wurden keine Beeinträchtigungen bei den getesteten Genotypen in den verschiedenen Altersgruppen beobachtet, so dass man von einem intakten Kurzzeitgedächtnis aller untersuchten Genotypen ausgehen kann. So scheinen weder der chronische Mangel an BDNF, noch die Alzheimerpathologie und/oder beide Pathologien zusammen die Art des getesteten Kurzzeitgedächtnisses zu beeinflussen. Andere Arbeiten, die einen größeren zeitlichen Abstand zwischen den beiden Objektpräsentationen verwendeten, beobachteten jedoch ein Defizit des Objektwiedererkennungsgedächtnisses in sieben Monate alten APP/PS1-Mäusen (Scholtzova et al., 2008). Dass in der vorliegenden Arbeit keine Beeinträchtigung der APP/PS1-Mäuse zu beobachten war, könnte aufgrund der Dauer der Pause zwischen Objektpräsentations- und Objektdiskriminierungsdurchgangs begründet sein. In der vorliegenden Arbeit betrug diese Pause 30 Minuten, was gegebenenfalls eine Zeitspanne war, in der die APP/PS1-Mäuse ein Objekt im Kurzzeitgedächtnis speichern können. Ist die Pause länger, z.B. drei Stunden (vergl. Scholtzova et al., 2008), sind –zumindest sieben Monate alte APP/PS1-Mäuse– nicht mehr in der Lage, sich an das schon gesehene Objekt zu erinnern. Für nachfolgende Arbeiten könnte es interessant sein, die Zeitspanne zwischen den Objektpräsentationen zu variieren, um das Langzeitgedächtnis für ein Objekt bestimmen zu können.

Es ist bekannt, dass BDNF auch bei der Gedächtnisbildung des Objektgedächtnisses eine Rolle spielt. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Gedächtnisleistung im Objektwiedererkennungstest und der BDNF-Expression im perirhinalen Kortex und eine negative Korrelation zwischen der Gedächtnisleistung und der Expression im Hippocampus von Ratten gezeigt werden (Munoz et al., 2010). Andere Arbeiten beobachteten, dass die Bildung eines Objektwiedererkennungsgedächtnisses bei Ratten mit einer Erhöhung der BDNF-Ausschüttung im Gyrus dentatus und im perirhinalen Kortex einhergeht. Diese Gedächtnisbildung konnte mit einem TrkB-Antagonisten inhibiert werden (Callaghan und Kelly, 2012; Hopkins und Bucci, 2010; Hopkins et al., 2011). Eine andere Arbeit konnte eine Verbesserung des Objektwiedererkennungsgedächtnisses bei Ratten beobachten, nachdem der TrkB-Agonist 7,8-DHF einmalig injiziert wurde (Bollen et al., 2013). Innerhalb dieser Arbeiten wurde das Objektgedächtnis 24 Stunden nach der Objektpräsentation getestet, was dem Abrufen des Langzeitgedächtnisses entspricht. In der vorliegenden Arbeit wurde das Objektgedächtnis nach einer relativ kurzen Zeitspanne getestet (30 Minuten), was dem Abrufen des

Kurzzeitgedächtnisses zuzuordnen wäre. Hierbei zeigten die Tiere ein intaktes Gedächtnis für das bekannte Objekt. Das bedeutet, dass die hier verwendeten Tiere mit einer chronischen Reduktion an BDNF eine Beeinträchtigung des Langzeitobjektgedächtnisses besitzen könnten. Ergebnisse einer anderen Arbeit deuten darauf hin, dass nach Infusion von Antisense-Oligonukleotiden gegen BDNF in den perirhinalen Kortex von Ratten, das Langzeit- jedoch nicht das Kurzzeitobjektgedächtnis, beeinträchtigt war (Seoane et al., 2011). Die verschiedenen Eigenschaften der Informationen, welche im Objektwiedererkennungstest aus den verschiedenen kortikalen Regionen ankommen, werden im Hippocampus in eine Gedächtnisspur integriert (Dudai, 2004; Romero-Granados et al., 2010). Die oben genannte Arbeit zeigte, dass BDNF von Zellen des Gyrus dentatus und des perirhinalen Kortex nach dem Objektwiedererkennungstest ausgeschüttet wird (Callaghan und Kelly, 2012). Dies passt zu anderen Erkenntnissen, dass die Ausschüttung von Neurotrophen an Synapsen Plastizität in diesen Gehirnregionen vermittelt und für die Konsolidierung von Gedächtnis essentiell ist (Hartmann et al., 2001; Alonso et al., 2004; Mizuno et al., 2003; Bekinschtein et al., 2007; Choi et al., 2010a; Mou et al., 2010). Die noch vorhandene Menge an BDNF der BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere, in den entsprechenden Gehirnarealen, reichte hier aus, um ein Kurzzeitgedächtnis für das Objekt zu bilden. In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass BDNF^{+/-}-Mäuse ebenfalls ein intaktes Kurzzeitgedächtnis für einen konditionierten Furchtreiz besaßen, dies jedoch nicht in ein Langzeitgedächtnis transferieren konnten (Endres und Lessmann, 2012). Man könnte in weiteren Versuchen die Pause zwischen den Objektpräsentationen erhöhen, um das Langzeitgedächtnis dieser Tiere für Objekte zu untersuchen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Arbeit in keinem der getesteten Mauslinien ein Defizit im Kurzzeitgedächtnis für ein Objekt beobachtet werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass die Alzheimerpathologie des hier verwendeten Mausmodells, sowie ein chronischer Mangel an BDNF, zu keiner Beeinträchtigung des getesteten Kurzzeitgedächtnisses geführt haben. Es könnte interessant sein, in zukünftigen Objektwiedererkennungstests, andere Zeitspannen zwischen den beiden Objektpräsentationsdurchgängen zu untersuchen, um einen Einfluss des chronischen Mangels an BDNF und der Alzheimerpathologie auf das Kurzzeit-, oder auch das Langgedächtnis der APP/PS1-BDNF^{+/-} Tiere zu ermitteln.

4.4 Das Schwimmlabyrinth zur Untersuchung des räumlichen Lernens

Das Schwimmlabyrinth nach Morris wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um das räumliche Lernen der verschiedenen Genotypen verschiedener Alter zu untersuchen. Die Erwartung bei diesem Lernparadigma war, dass die APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere aufgrund des chronischen BDNF-Mangels zusammen mit der A β -Pathologie, ein früheres Defizit oder ein verschlechtertes Lernen zeigen. Aufgrund dieser Hypothese wurden verschiedene Altersgruppen der APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu gleichalten Wildtyptieren getestet.

Um auszuschließen, dass beobachtete Unterschiede der Leistung im Schwimmlabyrinth nicht auf Unterschiede der körperlichen Leistung zurückzuführen sind, wurde die Schwimmgeschwindigkeit während des Trainingszeitraums des Schwimmlabyrinthversuchs näher betrachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass es keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen innerhalb einer Altersgruppe gab. Das bedeutet, dass u.a. höhere Latenzzeiten der Tiere höchstwahrscheinlich nicht auf eine verminderte Schwimmgeschwindigkeit innerhalb einer Altersgruppe zurückzuführen sind.

4.4.1 Das räumliche Lernen von APP/PS1-Mäusen im Schwimmlabyrinth

APP/PS1-Mäuse zeigten in der vorliegenden Arbeit eine Beeinträchtigung der Lernleistung während der Trainingsphase des Schwimmlabyrinthversuchs, ab einem Alter von sieben Monaten. Dies zeigte sich in Form einer signifikant höheren Latenz bis zum Erreichen der Plattform, im Vergleich zu den gleichalten Wildtyptieren bei sieben, neun und 12 Monate alten APP/PS1-Mäusen. Diese Ergebnisse weisen auf ein altersabhängiges Defizit für das räumliche Lernen der APP/PS1-Mäuse hin. Während des Trainings im Schwimmlabyrinth wiesen APP/PS1-Tiere ab einem Alter von sieben Monaten eine längere Latenz bis zum Finden der Plattform, jedoch gleichzeitig eine signifikante Reduktion der Latenz über den Trainingszeitraum von vier Tagen auf. Das bedeutet, dass diese Tiere generell in der Lage waren die Aufgabe zu lernen, dies jedoch langsamer taten als Wildtypmäuse im selben Alter. Im Langzeitgedächtnistest für die Plattformposition zeigten APP/PS1-Tiere mit fünf und 12

Monaten keinen Unterschied zwischen der Aufenthaltszeit im Zielquadranten und der mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass APP/PS1-Mäuse im Alter von 12 Monaten kein Langzeitgedächtnis für die Plattformposition bilden konnten. Hierbei ist der Probe Trial der eigentliche Test zur Überprüfung des räumlichen Gedächtnisses für die Plattform, da hier keine Plattform vorhanden ist, die zufällig erreicht werden kann (Morris et al., 1984). Die Aufenthaltszeit im Zielquadranten zeigt hierbei an, ob sich das Tier die Position im Raum gemerkt hat. Während des Trainings im Schwimmlabyrinth kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Maus eine Strategie zum Finden der Plattform entwickelt hat, ohne sich räumlich orientieren zu müssen. Somit kann der Probe Trial auch einen Hinweis darauf geben, ob die Maus eine räumliche Orientierungsstrategie genutzt hat. Durch die zahlreichen Wiederholungen der Aufgabe während des Trainings, wird ein Gedächtnis für die Position im Raum gebildet. Dies passierte bei den APP/PS1-Mäusen jedoch langsamer im Vergleich zu gleichalten Wildtyptieren. Ab einem Alter von 12 Monaten zeigten APP/PS1-Mäuse keinen Unterschied in der Aufenthaltsdauer zwischen den verschiedenen Quadranten während des Gedächtnistests. Dies ist ein Indikator dafür, dass das Gedächtnis für die Position der Plattform bei diesen Tieren nicht mehr vorhanden war. Während des Trainings fand jedoch ebenfalls eine Reduktion der Latenz bis zum Erreichen der Plattform bei 12 Monate alten APP/PS1-Mäusen statt. So zeigten APP/PS1-Mäuse im Alter von sieben und neun Monaten eine höhere Latenz bis zum Erreichen der Plattform während des Trainings, waren aber generell in der Lage die Position der Plattform als Langzeitgedächtnis zu speichern, was durch das Ergebnis des Probe Trials gezeigt wurde. Diese Ergebnisse könnten einen Hinweis darauf geben, dass APP/PS1-Mäuse ein räumliches Gedächtnis für die Position der Plattform bildeten, dies jedoch weniger präzise war, als bei den gleichalten Wildtypmäusen. Hierbei kennen die Tiere den ungefähren Ort der Plattform, welcher durch Suchen während des Trainings relativ schnell, im Vergleich zu den Wildtyptieren, jedoch signifikant langsamer, gefunden wurde. So kann im Probe Trial dennoch eine höhere Aufenthaltszeit im Zielquadranten beobachtet werden, da der Zielquadrant eine relativ große Fläche besitzt, so dass die Tiere trotzdem eine höhere Aufenthaltszeit im Zielquadranten zeigten, obwohl die Position der Plattform nur grob in Erinnerung blieb. Erst ab einem Alter von 12 Monaten waren APP/PS1-Tiere nicht mehr in der Lage ein zuverlässiges Gedächtnis für die Plattformposition zu bilden. Die Auswertung des Verhaltens während des Gedächtnistests im Schwimmlabyrinth kann durch mehrere Parameter erfolgen.

Oft sind diese, wie z.B. das Betrachten der sogenannten Plattform-Überschreitungen („*platform crossings*“) wenig präzise, um von diesen Parametern auf das Gedächtnis zu schließen (Maei et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Aufenthaltszeit im Zielquadranten im Vergleich zu der mittleren Aufenthaltszeit in den anderen Quadranten analysiert, um einen Parameter zu betrachten, welcher weniger von zufälligen Verhalten der Tiere beeinflusst werden kann. Dieser Parameter gibt Aufschluss darüber, wie lange und wo sich das Tier aufgehalten hat. So lassen sich mehrere Informationen in einem Parameter darstellen. Im Rahmen von Vorversuchen zur Etablierung des Schwimmlabyrinthversuchs wurde das Orientierungsverhalten von Wildtypmäusen anhand verschiedener Landmarken getestet. Hierbei wurden die Landmarken für den Schwimmlabyrinthversuch gewählt, bei denen durch eine Verschiebung der Landmarken im Raum, eine entsprechende Umorientierung der Tiere zu beobachten war. So konnte festgestellt werden, dass sich die Tiere höchstwahrscheinlich räumlich an den distalen Landmarken, anstatt durch Schwimmstrategien orientierten, um die Plattform zu finden bzw. sich die Position der Plattform zu merken. Diese Versuche können jedoch nicht ausschließen, ob sich die hier verwendeten transgenen Tiere eine andere Schwimmstrategie zu Nutze gemacht haben, um die Plattform zu finden. Dass APP/PS1-Mäuse im Alter von fünf Monaten keinen Unterschied in der Aufenthaltszeit zwischen den Quadranten zeigten, scheint höchstwahrscheinlich nicht auf ein Defizit der fünf Monate alten APP/PS1-Tiere zurückzuführen zu sein, da sowohl ein intaktes Gedächtnis für die Plattformposition während des Trainings zu erkennen war, als auch eine Tendenz zu einer höheren Aufenthaltszeit im Zielquadranten. Weiterhin zeigten fünf Monate alte APP/PS1-Mäuse im Rahmen des EE-Versuchs einen signifikanten Unterschied zwischen den Aufenthaltszeiten im Zielquadranten und der anderen Quadranten. Auch die Beobachtung, dass sieben und neun Monate alte APP/PS1-Mäuse höhere Aufenthaltszeiten im Zielquadranten zeigten, macht ein Defizit der fünf Monate alten Tiere unwahrscheinlich. Das Ergebnis, dass ein Defizit im räumlichen Lernen der APP/PS1-Tiere ab sieben Monaten zu erkennen war, wird von Arbeiten unterstützt, die ein Defizit im räumlichen Lernen der verwendeten Tiere beobachteten. Zwei Arbeiten konnten ein Defizit des räumlichen Lernens von acht und neun Monate alten APP/PS1-Mäusen beobachten. Hierbei wurden ebenfalls Defizite in der Trainingsphase des Schwimmlabyrinthversuchs beobachtet (Lo et al., 2013a; Lo et al., 2013b). Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, zeigten diese ein Defizit im Langzeitgedächtnistest der sieben und acht Monate alten APP/PS1-Tiere. Diese Abweichung könnte aufgrund

einer anderen Durchführung des Schwimmlabyrinthversuchs zurückzuführen sein. In den Arbeiten von Lo und Kollegen wurde eine deutlich längere Trainingszeit verwendet. Hierbei scheint eine längere Trainingsdauer, unterbrochen von zwei Tagen Pause, zu keiner Angleichung der Leistung der APP/PS1-Tiere an die der Wildtypiere gekommen zu sein. Der Probe Trial wurde an Tag 6 und 11 nach der Trainingszeit durchgeführt. Hierbei wurden die Tiere 100 Sekunden im Schwimmlabyrinth beobachtet. Die unterschiedliche Versuchsdurchführung und Auswertung des Gedächtnistests macht es schwierig, die Arbeit von Lo und Kollegen mit der vorliegenden zu vergleichen. Die längere Dauer des Versuchs könnte zu einem anderen Verhalten der Tiere geführt haben. Im Gedächtnistest wurde bei Lo und Kollegen nur die Aufenthaltszeit im Zielquadranten gezeigt, was die Vergleichbarkeit der Daten einschränkt. Eine andere Arbeit beobachtete in einem räumlichen Orientierungstest, durchgeführt mit einem Vier-Arm-Labyrinth, ein Defizit im Umkehrlernen des räumlichen Lernens acht Monate alter APP/PS1-Mäuse. Dies wurde auf ein Defizit in der Flexibilität dieses Lernens bei älteren Tieren zurückgeführt (Radde et al., 2006). Weiterhin zeigten zwei Arbeiten eine beeinträchtigte *in vivo* Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus von acht Monate alten APP/PS1-Mäusen (Gengler et al., 2010) und eine reduzierte Anzahl an aktivierten Zellen im Gyrus dentatus von acht bis neun Monate alten APP/PS1-Tieren nach einem Gedächtnistest, was auf eine beeinträchtigte Netzwerkaktivität in diesem Gehirnareal hindeuten könnte (Wegenast-Braun et al., 2009). *In vitro* Messungen von Feldpotentialen in der CA1-Region des Hippocampus von fünf, sieben und neun Monate alten APP/PS1-Mäusen, zeigten ebenfalls eine Beeinträchtigung der LTP (Edelmann, E., persönliche Mitteilung). Diese Befunde der veränderten Plastizität im Hippocampus der APP/PS1-Mäuse, welche höchstwahrscheinlich auf die A β -Pathologie zurückzuführen sind, könnten das Defizit in dem Hippocampus abhängigen Lernparadigma begründen. Einige Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen erhöhter Konzentration an löslichem A β -Peptiden und Defiziten in räumlichen Lernparadigmen bei Alzheimer-Mausmodellen (Lesne et al., 2006; Janus et al., 2000; Chen et al., 2000; Trinchese et al., 2004; Puolivali et al., 2002; Bruce-Keller et al., 2011). Die Quantifizierung der A β_{42} -Peptide, der in dieser Arbeit verwendeten Tiere, zeigte eine deutliche A β -Pathologie im Hippocampus, sowohl der APP/PS1- als auch der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse (Abbildung 20). Hierbei konnte A β_{42} bei Wildtypieren und BDNF^{+/-}-Mäusen nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden. Die Quantifizierung zeigte einen Anstieg der A β_{42} -Menge im Alter von neun Monaten im Vergleich zu fünf und sieben Mo-

nate alten Tieren. Eine andere Arbeit konnte einen kontinuierlichen Anstieg der A β ₄₂-Konzentration der ein bis acht Monate alten APP/PS1-Tiere feststellen (Radde et al., 2006). Hierbei handelte es sich um die Quantifizierung ganzer Gehirnhemisphären (ohne Kleinhirn), wobei sich die Quantifizierung der vorliegenden Arbeit auf den dorsalen Hippocampus konzentrierte. Es könnte davon ausgegangen werden, dass es zu einem weiteren Anstieg der A β ₄₂-Konzentration im weiteren Verlauf des Alters kommt, so dass bei 12 Monate alten APP/PS1-Tieren, aber auch bei APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen, eine höhere Menge an A β ₄₂ im Vergleich zu neun Monate alten Tieren zu erwarten wäre. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit bei 12 Monate alten Tieren eine geringere Menge des A β ₄₂ im Vergleich zu neun Monate alten Tieren beobachtet werden. Auch Untersuchungen zur Amyloid-Plaquedichte der APP/PS1-Mäuse zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der Dichte der Amyloidplaques mit dem Alter im Hippocampus (Radde et al., 2006; Gengler et al., 2010), wobei ein weiterer Anstieg bei 15 Monate alten Tieren zu beobachten war (Gengler et al., 2010). Hier könnte es aufgrund der relativ geringen Anzahl an Proben zu Ungenauigkeiten der Quantifizierung gekommen sein. Die individuellen Proben zeigten insgesamt eine relativ hohe Streuung, so dass die Anzahl der Proben einer Altersgruppe und Genotyps für weitere Versuche erhöht werden sollte. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes konnte gezeigt werden, dass bei den hier verwendeten APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren eine Anreicherung von Amyloidplaques im Hippocampus von neun Monate alten Tieren zu beobachten war (Abbildung 21). Hierbei stehen die Untersuchungen zu verschiedenen Alterszeitpunkten noch aus. Die hier gezeigten Amyloid-Plaquantifizierungen bestätigen andere Arbeiten, die ebenfalls Amyloid-Plaques im Hippocampus der APP/PS1-Mäuse zeigten. Diese Arbeiten beobachteten einen kontinuierlichen Anstieg der Amyloid-Pathologie mit dem Alter der Tiere (Radde et al., 2006; Hefendehl et al., 2011; Gengler et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass A β im Hippocampus die Bildung von LTP behindert (Townsend et al., 2006; Townsend et al., 2007) und die Dornenfortsätze von Neuronen im Hippocampus verringern kann (Hsieh et al., 2006). Diese Wirkungen von A β sind höchstwahrscheinlich an der Pathogenese der AK in hohem Maße beteiligt, da auch zahlreiche Arbeiten eine Korrelation des A β -Peptids und den kognitiven Beeinträchtigungen von Alzheimerpatienten zeigen konnten (Davies et al., 1987; Masliah et al., 2001; Terry et al., 1991). Das hier gefundene altersabhängige Defizit im Schwimmlabyrinth der APP/PS1-Mäuse kann nicht vollständig auf die hier ermittelte A β ₄₂-Pathologie im Hippocampus zurückgeführt werden, da kein kontinuierlicher Anstieg der

A β ₄₂-Konzentration zu erkennen war. Hierbei wäre es für weitere Untersuchungen interessant, auch andere A β -Spezies zu messen, aber auch andere Gehirnregionen zu betrachten, welche ebenfalls beim Schwimmlabyrinth beteiligt sind.

4.4.2 Das räumliche Lernen von BDNF^{+/-}-Mäusen im Schwimmlabyrinth

In der vorliegenden Arbeit zeigten BDNF^{+/-}-Mäuse im Alter von neun und 12 Monaten ein Defizit im Gedächtnistest des Schwimmlabyrinthversuchs, was sich daraus schließen lässt, dass BDNF^{+/-}-Tiere der genannten Altersgruppen keine höhere Aufenthaltszeit im Zielquadranten, im Vergleich zu den anderen Quadranten zeigten. Diese Ergebnisse weisen auf ein altersabhängiges Defizit des räumlichen Langzeitgedächtnisses der BDNF^{+/-}-Mäuse hin. Andere Arbeiten, die das räumliche Lernen mit Hilfe des Schwimmlabyrinthversuchs von heterozygoten BDNF-*knockout*-Mäusen untersuchten, berichteten konträre Resultate. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse unterstützen zwei Arbeiten, welche Defizite im räumlichen Orientierungslernen von 10 oder 12 Monate alten BDNF^{+/-}-Mäusen zeigten (Linnarsson et al., 1997; Rantamaki et al., 2013). Zwei andere Arbeiten beobachteten leichte Defizite während der Trainingsphase des Schwimmlabyrinthversuchs von zwei oder drei Monate alten BDNF^{+/-}-Mäusen, jedoch nicht beim Gedächtnistest für die vorherige Plattformposition (Linnarsson et al., 1997; Uutela et al., 2012). Diese unterschiedlichen Ergebnisse können durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, welche unabhängig von dem BDNF-Defizit sein könnten. So kann der genetische Hintergrundstamm einen Einfluss auf die Leistung im Schwimmlabyrinth nehmen (z.B. Wolfer und Lipp, 2000). In den oben genannten Arbeiten zum räumlichen Orientierungslernen von BDNF^{+/-}-Mäusen, wurden jeweils verschiedene genetische Hintergrundstämme verwendet. Linnarsson und Kollegen kreuzten die Tiere auf einen gemischten genetischen Hintergrund zurück (129/J und BALBc), wobei Uutela und Kollegen die Tiere auf den C57/BL6J01aHsd-Mausstamm zurück kreuzten. Es wurde gezeigt, dass der C57/BL6J01aHsd-Mausstamm genetisch zwar sehr nah an dem hier verwendeten C57/BL6J-Stamm ist, jedoch eine sporadische Mutation im Alpha-Synuklein-Gen besitzt (Specht und Schoepfer, 2001), welche das Lernverhalten der Tiere verändern kann (Siegmond et al., 2005). Es ist ebenfalls bekannt, dass verschiede-

ne Wildtyp-Mausstämme unterschiedliches Lernverhalten im Schwimmlabyrinth aufweisen (Klapdor und VanderStaay, 1996). Versuche des Schwimmlabyrinths mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten BDNF^{+/-}-Mäusen verschiedenen Alters wurden bereits in einer vorherigen Arbeit durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein Lerndefizit der BDNF^{+/-}-Mäuse ab einem Alter von sieben Monaten, wobei das Lernen im Gedächtnistest beeinflusst war. Ab einem Alter von neun Monaten wiesen die BDNF^{+/-}-Mäuse ein Defizit im Training und im Gedächtnistest auf (Petzold et al., 2014). Diese leichten Unterschiede der Ergebnisse zwischen dieser und der Arbeit von Petzold und Kollegen sind höchstwahrscheinlich darin begründet, dass Unterschiede in der Durchführung des Versuchsprotokolls bestanden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Pause zwischen den einzelnen Durchgängen des Trainings von 20-30 Minuten eingehalten. Bei der Arbeit von Petzold betrug diese Pause etwa eine Minute. Diese Abweichung im Versuchsprotokoll kann durchaus eine Veränderung der Leistung der Tiere im Schwimmlabyrinth zur Folge haben, da z.B. der Grad des Stresses für das Tier unterschiedlich sein kann und dadurch die Lernleistung beeinflusst sein könnte. Dies könnte wiederum ein Hinweis darauf sein, dass BDNF^{+/-}-Mäuse weniger stressresistent sind. Es konnte gezeigt werden, dass chronisch induzierter Stress bei BDNF^{+/-}-Mäusen zu einem Defizit im räumlichen Lernen führte (Klug et al., 2012).

Da BDNF ein aktivitätsabhängig ausgeschüttetes Neurotrophin ist, das synaptische Plastizität während Lernen- und Gedächtnisprozessen im Hippocampus moduliert (zusammengefasst in z.B. Tyler et al., 2002) und der Hippocampus die Region im Gehirn ist, welche die höchste Expression an BDNF aufweist (Murer et al., 2001), ist es wahrscheinlich, dass der chronische Mangel an BDNF zu einem Defizit im Schwimmlabyrinthversuch führt. Dass endogenes BDNF für Hippocampus abhängiges Lernen im Schwimmlabyrinth erforderlich ist, konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden. Ratten, denen Antikörper gegen BDNF in das Gehirn mittels osmotischer Pumpen eingebracht wurden, zeigten massive Beeinträchtigungen im räumlichen Lernen im Schwimmlabyrinth (Mu et al., 1999). Eine genetische Überexpression von BDNF im Hippocampus, aber auch im Kortex, führte zu einer Verbesserung der Leistung des räumlichen Lernens und Gedächtnisses im Schwimmlabyrinth (Nakajo et al., 2008). Des Weiteren wurde bei Mäusen mit einem regionspezifischen BDNF-*knockout* im dorsalen Hippocampus Lerndefizite im Schwimmlabyrinth festgestellt (Heldt et al., 2007).

Ebenso zeigten einige Arbeiten eine Abhängigkeit des räumlichen Lernens im Schwimmlabyrinth von der Funktionalität bzw. des Vorhandenseins des TrkB-Rezeptors. Mäuse, die einen nicht-katalytischen, verkürzten TrkB-Rezeptor (TrkB.T1) exprimierten, zeigten ein vermindertes Lernen im Schwimmlabyrinth (Saarelainen et al., 2000). Bei einem konditionalen TrkB-*knockout*-Mausmodell (*trkB*-CRE), indem der TrkB-Rezeptor postnatal nur im Vorderhirn nicht exprimiert wurde, war über die Trainingstage keine Verringerung der Latenz zum Erreichen der Plattform im Schwimmlabyrinthversuch zu erkennen (Minichiello et al., 1999), was auf ein massives Defizit des räumlichen Lernens hinweist. Aber auch die Verfügbarkeit des TrkB-Rezeptors könnte einen Beitrag zum altersabhängigen Defizit im Schwimmlabyrinth haben. Mit zunehmendem Alter ist eine Abnahme der TrkB-Expression im Hippocampus von Ratten zu beobachten (Croll et al., 1998; Silhol et al., 2005; Costa et al., 2012). Dieser Umstand könnte zu einem zu geringen Grad an TrkB-Phosphorylierung in älteren BDNF^{+/-}-Mäusen führen, was wiederum zu dem beobachteten Defizit führen könnte. Im Gegensatz hierzu zeigte eine Arbeit eine altersabhängige Hochregulierung des TrkB-Rezeptors im Hippocampus, jedoch nicht im motorischen Neokortex von BDNF^{+/-}-Mäusen im Alter von sieben Monaten (Carreton et al., 2012). Dieser Kompensationsmechanismus sorgte höchstwahrscheinlich in diesen Tieren für ein Intaktbleiben des räumlichen Lernens, im Gegensatz zu den aufkommenden motorischen Defiziten mit sieben Monaten bei den BDNF^{+/-}-Mäusen (Carreton et al., 2012). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit keine Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten der BDNF^{+/-}-Tiere beobachtet werden. Hier war weder in der Schwimmgeschwindigkeit während des Schwimmlabyrinthversuchs, noch während des Objektwiedererkennungstests ein Unterschied der Aktivität zu erkennen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Defizit im räumlichen Lernen ab einem Alter von neun Monaten bei BDNF^{+/-}-Mäusen beobachtet. Hierbei wurde eine Veränderung der TrkB-Rezeptor-Expression jedoch nicht untersucht. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es zahlreiche Hinweise gibt, dass BDNF an der Vermittlung und Bildung von Hippocampus abhängigen Lernen und Gedächtnis beteiligt ist und dass das verminderte räumliche Gedächtnis der neun und 12 Monate alten BDNF^{+/-}-Tiere höchstwahrscheinlich auf die fehlende Vermittlung des BDNF-TrkB-Signalwegs zurückzuführen ist. Die hier gemessenen BDNF-Konzentrationen im dorsalen Hippocampus zeigten eine etwa um die Hälfte reduzierte BDNF-Proteinmenge der BDNF^{+/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyptieren, welche sich über das Alter der Tiere nicht veränderte. Diese Ergebnisse bestätigen andere Arbeiten, wel-

che die Veränderungen der BDNF-mRNA- und Proteinexpression über das Alter untersuchten. Dabei zeigte sich, dass sich weder die BDNF-mRNA-, noch die BDNF-Proteinmenge im Hippocampus über das Alter veränderte (Calabrese et al., 2013; Croll et al., 1998; Francia et al., 2006; Silhol et al., 2005). Jedoch konnte bei 18 Monate alten Ratten eine reduzierte Menge an BDNF-Protein in Synaptosomen des ventralen und dorsalen Hippocampus beobachtet werden (Calabrese et al., 2013). Im Gegensatz dazu, konnten einige Arbeiten eine Erhöhung des hippocampalen BDNF-Levels zwischen zwei und 24 Monate alten Ratten beobachten. Diese verschiedenen Daten, zusammen mit denen der vorliegenden Arbeit, könnten zu der Annahme führen, dass der BDNF-Gehalt im Hippocampus bei Nagern, im mittleren Alter, relativ konstant bleibt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung der BDNF-Proteinmenge mit Hilfe von ELISA-Messungen durchgeführt. Hierbei konnte jedoch nicht zwischen pro-BDNF und maturem BDNF unterschieden werden. Diese beiden Isoformen besitzen unterschiedliche Effekte beim Kontextfurchtlernen. Ein erhöhter BDNF-Gehalt unterstützt die Konsolidierung des Furchtgedächtnisses, wobei ein erhöhter pro-BDNF-Spiegel die Konsolidierung von kontextueller Furchtextinktion förderte (Barnes and Thomas, 2008). Somit ist es denkbar, dass eine altersbedingte Veränderung in der Prozessierung von BDNF innerhalb des Hippocampus für das beobachtete altersbedingte Lerndefizit im Schwimmlabyrinth verantwortlich sein könnte. Dies wird von einer Arbeit unterstützt, die eine Reduktion von BDNF und steigende pro-BDNF-Konzentrationen im Hippocampus von alten Ratten beschreibt (Calabrese et al., 2013). Daher könnte es interessant sein in zukünftigen Experimenten das Verhältnis von pro-BDNF zu maturem BDNF zu untersuchen.

4.4.3 Das räumliche Lernen von APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen im Schwimmlabyrinth

Da Untersuchungen darauf hinweisen, dass die Störung der BDNF vermittelten neurotrophen Prozesse eine zentrale Rolle in der Pathologie der AK spielen könnte (siehe z.B. Allen et al., 2011; Murer et al., 2001; Markham et al., 2014), sollte untersucht werden, ob ein chronischer Mangel an BDNF in einem Alzheimer-Mausmodell das räumliche Lernen im Schwimmlabyrinth stärker beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass bei im

Schwimmlabyrinth getesteten APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen mit Alter von 12 Monaten ein Defizit sowohl in der Trainingsphase, als auch im Gedächtnistest zu beobachten war. Mit neun Monaten deutete sich bereits ein Defizit in der Trainingsphase dieser Tiere an. Betrachtet man die Leistungen der verschiedenen transgenen Tiere der verschiedenen Alter, ist zu erkennen, dass die APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse weder früher ein Defizit im räumlichen Lernen, noch generell ein verschlechtertes Lernen im Vergleich zu den APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäusen aufwiesen. Es stellte sich heraus, dass die APP/PS1-Mäuse zum frühesten Zeitpunkt ein Defizit im räumlichen Lernen während des Trainings besaßen (sieben Monate) und BDNF^{+/-}-Mäuse eine Veränderung des räumlichen Langzeitgedächtnisses ab neun Monaten. Dass ein Alzheimer-Mausmodell mit einem heterozygoten BDNF-*knockout* im Alter von 12 Monaten, aufgrund der mehrfach genetischen Veränderungen, ein schwereres Defizit im Schwimmlabyrinthversuch aufweist, im Vergleich zum Alzheimer-Mausmodell und/oder der BDNF-*knockout* Maus, konnte eine andere Arbeit zeigen (Rantamaki et al., 2013). Die Autoren dieser Arbeit erklären das verschlechterte Lernen dieser doppelt transgenen Mäuse damit, dass sich BDNF an Amyloidplaques anlagert, so nicht mehr an den TrkB-Rezeptor binden und diesen somit nicht mehr aktivieren kann. Diese und eine weitere Arbeit zeigten mit Hilfe von immunohistochemischen Verfahren, dass BDNF sich in reaktivierten Gliazellen um Amyloidplaques anreicherte (Burbach et al., 2004; Rantamaki et al., 2013). Gleichzeitig konnten Rantamaki und Kollegen eine zusätzliche Hochregulation von BDNF bei dem 12 Monate alten Alzheimer-Mausmodell, sowohl im Kortex, als auch im Hippocampus beobachten. In den hier verwendeten APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen, war weder ein verschlechtertes Lernverhalten, noch eine Hochregulation des BDNF-Proteins im Hippocampus im Alter von 12 Monaten zu erkennen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse zumindest eine vergleichbare Leistung zu den APP/PS1- oder den BDNF^{+/-}-Tieren zeigen. Jedoch war die Leistung der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere im Schwimmlabyrinth nicht vergleichbar mit denen der anderen transgenen Mäuse. Bis zu einem Alter von neun Monaten besaßen APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse ein intaktes räumliches Lernen, wobei das der APP/PS1-Tiere bereits ab sieben Monaten beeinträchtigt war. Bei neun Monate alten Tieren zeigte sich in der Trainingsphase des Schwimmlabyrinths ein verlangsamtes Lernen der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere, wobei diese aber dennoch ein Gedächtnis für die Plattformposition im Gedächtnistest aufwiesen. BDNF^{+/-}-Mäuse zeigten eine den Wildtyptieren entsprechende Leistung während des Trainings, aber im Gedächtnistest keine Präferenz für die vorherige Platt-

formposition. Dies könnte ein Indikator für eine nicht-räumliche Strategie der BDNF^{+/-}-Tiere im Alter von neun Monaten sein, die es den Tieren ermöglichte, relativ schnell die Plattform zu erreichen. Hierbei konnte sich jedoch die Position der Plattform, aufgrund des fehlenden Orientierens an den Landmarken, nicht gemerkt werden. Die Tiere könnten z.B. in einem bestimmten Abstand zum Rand des Beckens geschwommen sein, bis die Plattform zufällig auftauchte. APP/PS1-Tiere könnten, wie oben bereits diskutiert, sich zwar räumlich orientiert haben, jedoch nicht in der Lage gewesen sein, die räumliche Orientierung ausreichend präzise umzusetzen. Dies war anhand längerer Latenzen im Training und signifikant höherer Aufenthaltszeiten im Zielquadranten im Gedächtnistest zu erkennen. Mit 12 Monaten schienen alle transgenen Tiere nicht mehr in der Lage zu sein, sich die Position der Plattform zu merken, da keine der transgenen Tiere höhere Aufenthaltszeiten im Zielquadranten im Gedächtnistest aufwiesen. Während des Trainings zeigten sowohl 12 Monate alte APP/PS1- als auch APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse höhere Latenzen bis zum Erreichen der Plattform. BDNF^{+/-}-Mäuse hingegen eine vergleichbare Leistung zu dem Wildtyptieren. Zukünftige Versuche könnten die genutzten Strategien der verwendeten Mäuse näher betrachten, um so die kognitiven Defizite möglicherweise genauer definieren zu können. Während das ermittelte Lerndefizit der BDNF^{+/-}-Tiere, wie oben bereits diskutiert, höchstwahrscheinlich auf den chronischen Mangel an BDNF zurückgeführt werden kann, könnte es bei den APP/PS1-Mäusen aufgrund der A β -Pathologie zu dem beschriebenen Defizit gekommen sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten bei APP/PS1-Tieren ein hippocampales BDNF-Level, welches mit denen der Wildtyptiere zu vergleichen war. In den APP/PS1-Mäusen könnte es jedoch zu einer verminderten TrkB-Rezeptorkonzentration gekommen sein. Der TrkB-Rezeptor kann relativ früh in der Alzheimerpathologie reduziert sein (Ginsberg et al., 2010; Tapia-Arancibia et al., 2008; Zuccato und Cattaneo, 2009). Auch in Alzheimer-Mausmodellen kann die Konzentration an TrkB-Rezeptoren verringert sein (Devi und Ohno, 2012; Kempainen et al., 2012). Dies könnte zu einer Verringerung des BDNF-TrkB-Signalkaskade, trotz ausreichender Menge BDNF führen und somit zum beobachteten Lerndefizit. Diese Veränderungen könnten ebenfalls in den APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren vorhanden gewesen sein. Zusätzlich könnte es in diesen Tieren aber auch zu Kompensationsmechanismen gekommen sein, die das Lerndefizit erst im Alter von neun Monaten aufkommen ließen. Andere neurotrophe Signalwege könnten durch den Mangel an BDNF zusammen mit der A β -Pathologie hochreguliert sein und so zu einer Kompensation führen, so dass ein potentielles Defizit abgemildert wird. Es

ist bekannt, dass Substanzen wie Kupfer (Hwang et al., 2007) oder Zink (Hwang et al., 2005) den TrkB-Rezeptor transaktivieren können. So könnten in den APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren Substanzen, die aufgrund des chronischen Mangels an BDNF hochreguliert sind, bzw. eine veränderte Verfügbarkeit besitzen, den TrkB-Rezeptor oder auch andere neurotrophe Signalkaskaden aktivieren, die zu Kompensation eines Defizits führen. Weiterhin sind die kognitiven Leistungen im Schwimmlabyrinth wahrscheinlich nicht essentiell vom BDNF-TrkB-Signalweg im Hippocampus, sondern auch von anderen Gehirnarealen abhängig (zusammengefasst in z.B. Puzzo et al., 2014). Es könnten möglicherweise auch andere, BDNF unabhängige Mechanismen, in anderen Gehirnarealen involviert sein, welche bei den APP/PS1-Mäusen zu einem relativ frühen Defizit im Schwimmlabyrinthversuch führen, bei den BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren jedoch relativ lang intakt bleiben.

4.5 BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus der verwendeten Mausmodelle

Die Messungen der BDNF-Proteinkonzentrationen im Hippocampus von Tieren aus dem Schwimmlabyrinthversuch der verschiedenen Genotypen in verschiedenen Altersgruppen zeigten eine generelle Reduktion der Proteinkonzentration von ca. 50 % bei BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen, im Vergleich zu Wildtyp- und APP/PS1-Mäusen. Diese Reduktion der Proteinmenge bei BDNF^{+/-}-Mäusen bestätigten vorangegangene Arbeiten (Petzold et al., 2014; Endres und Lessmann, 2012; Abidin et al., 2006; Hill und van den Buuse, 2011; Kolbeck et al., 1999). Dass die APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse ebenfalls eine Reduktion um etwa die Hälfte der Wildtypiere aufweisen, entspricht den Erwartungen, da diese Mäuse ebenfalls einen heterozygoten *knockout* des BDNF-Gens tragen. Eine altersbedingte Reduktion des hippocampalen BDNF-Levels konnte in der vorliegenden Arbeit zwischen zwei Monate und sieben Monate alten BDNF^{+/-}- und Wildtypmäusen beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Arbeiten, die eine altersabhängige Reduktion von BDNF bei BDNF^{+/-}- und Wildtyptieren von drei zu sieben Monaten (Carreton et al., 2012), bzw. von drei zu 12 Monaten beschreiben (Boger et al., 2011). Das Ausmaß dieser Verringerung war hier zu denen der genannten Arbeiten vergleichbar. Wie oben bereits diskutiert, konnte zwi-

schen fünf, sieben, neun und 12 Monate alten Tieren keine weiteren altersabhängigen Veränderungen des hippocampalen BDNF-Gehalts festgestellt werden. Es muss daher bereits früher eine Reduktion des BDNF-Gehalts im Hippocampus bei BDNF^{+/-}- und Wildtypmäusen, zwischen zwei und fünf Monaten, stattfinden. Da die BDNF-Konzentrationen der sieben Monate alten Wildtyptiere, aber auch der BDNF^{+/-}-Tiere, der beiden Versuche auf einem vergleichbaren Level waren, können die Ergebnisse dieser unabhängig voneinander durchgeführten Versuche, miteinander in Verbindung gebracht werden. Bei sieben Monate alten APP/PS1-Mäusen war augenscheinlich eine Erhöhung des BDNF-Proteinlevels im Hippocampus zu erkennen. Andere Arbeiten konnten Unterschiede des hippocampalen BDNF-Levels von Alzheimer-Mausmodellen beobachten (Rantamaki et al., 2013; Szapacs et al., 2004). Hierbei zeigten diese Arbeiten im Vergleich zu Wildtyptieren eine Hochregulation des hippocampalen BDNF-Levels im Alter von 15 bzw. 12 und 18 Monaten, wobei diese Arbeiten keinen Vergleich zu jüngeren Tieren durchführten. Bei den hier, nach dem Schwimmlabyrinth untersuchten APP/PS1-Tieren im Alter von neun und 12 Monaten, war das BDNF-Level auf Wildtypniveau. Da statistisch kein Alterseffekt zu beobachten war, ist es wahrscheinlich von einer zufälligen Hochregulation der APP/PS1-Mäuse der vorliegenden Arbeit auszugehen, so dass angenommen werden kann, dass der BDNF-Gehalt im Hippocampus der APP/PS1-Tiere mit dem der Wildtyptiere zu vergleichen ist. Die vorliegende Arbeit untersuchte ebenfalls den Einfluss des Trainings im Schwimmlabyrinth auf den BDNF-Gehalt im Hippocampus der getesteten Mäuse, im Vergleich zu naiven Tieren und Mäusen, die eine Woche nach dem Versuch präpariert wurden. Hier war eine mögliche Tendenz zu einer Erhöhung des hippocampalen BDNF-Levels direkt nach dem Training im Schwimmlabyrinth zu erkennen (Abbildung 16), welche sich statistisch aber nicht von den anderen Gruppen unterschied. Jedoch konnte die vorliegende Arbeit eine signifikante Erhöhung des hippocampalen BDNF-Levels durch die Haltung in EE bei Wildtyp- und BDNF^{+/-}-Tieren zeigen (Abbildung 18).

In der vorliegenden Arbeit war zu erkennen, dass BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse eine um etwa die Hälfte reduzierte BDNF-Konzentration im Hippocampus und APP/PS1-Mäuse etwa den selben BDNF-Proteingehalt wie Wildtyptiere besaßen. Es konnte eine Veränderung über das Alter zwischen zwei und sieben Monate alten Wildtyptieren und BDNF^{+/-}-Tieren beobachtet werden. Bei APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen war im Alter von

fünf bis 12 Monaten kein Alterseffekt der BDNF-Konzentration im Hippocampus zu beobachten.

4.6 Schwimmlabyrinthversuch von APP/PS1-Tieren aus EE-Haltung

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde an zahlreichen Alzheimer-Mausmodellen gezeigt, dass durch eine reichhaltige und stimulierende Umgebung, welche durch die EE-Haltung gewährleistet wird, kognitive Defizite vermindert werden konnten (siehe z.B. Jankowsky et al., 2005; Costa et al., 2007; Lazarov et al., 2005; Arendash et al., 2004). Gleichzeitig ist bekannt, dass das BDNF-Proteinlevel im Gehirn von Mäusen und Ratten, welche im EE gehalten wurden, anstieg (siehe z.B. Hu et al., 2013; Vazquez-Sanroman et al., 2013; Ickes et al., 2000). Ebenso konnte bei Alzheimerpatienten beobachtet werden, dass physisches Training und kognitive Stimulation zu einer Verbesserung der Alzheimersymptomatik führen kann (siehe zusammenfassend z.B. Ahlskog et al., 2011). Physische und kognitive Stimulation führt zur Erhöhung der Expression von Neurotrophinen, und diese aktivitätsabhängigen Veränderungen können im Gehirn wiederum zu einer Verbesserung von kognitiven Beeinträchtigungen beitragen (siehe zusammenfassend z.B. Coelho et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Monate alte APP/PS1- und Wildtypmäuse aus EE-Haltung im Schwimmlabyrinth getestet und mit der Leistung von den entsprechenden Tieren aus der Standardhaltung verglichen. Dieser Versuch sollte klären, ob das hier verwendete EE einen Einfluss auf die Lernleistung von APP/PS1-Mäusen hat, da sich im Verlauf der Schwimmlabyrinthversuche ein Defizit der fünf Monate alten APP/PS1-Mäuse andeutete, was sich jedoch mit zunehmender Gruppengröße nicht bestätigen ließ. In diesem Versuch war ebenfalls erkennbar, dass die APP/PS1-Tiere im Alter von fünf Monaten generell kein Defizit im Schwimmlabyrinthversuch aufwiesen. Weiterhin wurde der BDNF-Gehalt des Hippocampus und des mPFCs dieser Tiere bestimmt. Nach Haltung im EE kann es bei Mäusen zu einer Verbesserung im räumlichen Lernen mit gleichzeitiger Erhöhung des BDNF-Gehalts im Hippocampus kommen (Wolf et al., 2006; Baraldi et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit war eine Erhöhung der BDNF-Konzentration im Hippocampus nach EE-Haltung bei Wildtyptieren und eine vergleichbare BDNF-Konzentration der APP/PS1-Tiere zu Wildtyptieren

aus Standardhaltung zu erkennen. Der Schwimmlabyrinthversuch der fünf Monate alten Tiere aus EE-Haltung, zeigte keine Unterschiede der Leistungen von Wildtypmäusen aus EE-Haltung im Vergleich zu Wildtyptieren aus Standardhaltungsbedingungen. Andere Arbeiten konnten eine Erhöhung der hippocampalen BDNF-Konzentration mit gleichzeitiger Verbesserung des räumlichen Lernens bei Wildtypmäusen beobachten (Baraldi et al., 2013). Möglicherweise ist bei dem hier verwendeten Schwimmlabyrinth-Paradigma generell keine weitere Verbesserung möglich, da auch in anderen Versuchen, die im Schwimmlabyrinth durchgeführt wurden, keine besseren Leistungen beobachtet werden konnten. Es konnte zwar kein Effekt der EE-Haltung auf das Lernverhalten beobachtet werden, jedoch einen Einfluss auf die BDNF-Proteinkonzentration im Hippocampus. Eine höhere Konzentration an BDNF muss jedoch nicht automatisch in einer Verbesserung der kognitiven Leistungen bei Wildtyptieren resultieren. Um eine Erhöhung des BDNF-Signalwegs zu erreichen, müsste auch die Konzentration des TrkB-Rezeptors erhöht sein. Eine Arbeit konnte kürzlich zeigen, dass die Haltung im EE bei Ratten mit keiner Erhöhung des TrkB-Levels im Hippocampus einherging (Ambrogini et al., 2013). Auch eine Behandlung mit dem TrkB-Agonisten 7,8-DHF führte bei Wildtypmäusen zu keiner Verbesserung im Schwimmlabyrinth (Castello et al., 2014). In den hier verwendeten Wildtypmäusen kam es wahrscheinlich zu keinen Veränderungen der TrkB-Menge oder anderen Veränderungen, die zu einer Verbesserung der Leistung im Schwimmlabyrinth führten. Eine andere Arbeit beschreibt ebenfalls keine Verbesserung der kognitiven Leistungen von Wildtyptieren nach EE-Haltung. Im Vergleich zu dem hier verwendeten EE war das aus der erwähnten Arbeit jedoch weniger vielfältig (Chourbaji et al., 2008). Dieselben EE-Bedingungen führten jedoch zu einer Erhöhung des BDNF-Proteinlevels im Hippocampus von BDNF^{+/-}- und Wildtyptieren (Chourbaji et al., 2012), welche sich interessanterweise in etwa demselben Rahmen bewegten wie in der vorliegenden Arbeit. Im Schwimmlabyrinthversuch, durchgeführt mit dem APP/PS1-Mäusen aus der EE-Haltung, konnte sich eine Verbesserung der APP/PS1-Mäuse aus der EE-Haltung an Trainingstag eins und zwei andeuten, statistisch war jedoch kein Unterscheid zwischen den Haltungsbedingungen zu erkennen. Ob vorhandene Defizite der verwendeten Mausstämme durch die Haltung im EE kompensiert werden könnten bleibt hier ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Haltung im EE eine Erhöhung des hippocampalen BDNF-Levels bei fünf Monate alten BDNF^{+/-}- und Wildtyptieren zur Folge hatte.

Die generelle BDNF-Reduktion der BDNF^{+/-}-Mäuse konnte in vorherigen Arbeiten bereits beschrieben werden (Petzold et al., 2014; Endres und Lessmann, 2012; Abidin et al., 2006; Hill und van den Buuse, 2011; Kolbeck et al., 1999) und steht im Einklang mit den Messungen im Rahmen des Extinktionsexperiments und der BDNF-Proteinbestimmung aller verwendeten Genotypen, der hier verwendeten Altersgruppen im Hippocampus der Tiere. Auch wenn sich der hippocampale BDNF-Gehalt von APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen aus EE-Haltung statistisch nicht von dem der aus Standardhaltung kommenden APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen unterschied, war dieser jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur BDNF-Menge von Wildtyptieren aus Standardhaltung. Das lässt vermuten, dass die Reduktion an endogenen BDNF im Hippocampus auch von APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren, durch die Haltung im EE, in etwa auf das Niveau von Wildtyptieren erhöht werden kann. Dies steht im Einklang mit einer Arbeit, welche ebenfalls eine Erhöhung des BDNF-Gehalts im Hippocampus von BDNF^{+/-}-Mäusen nach EE-Haltung beobachten konnte (Chourbaji et al., 2012). APP/PS1-Tiere zeigten keinen Unterschied der BDNF-Proteinmenge im Hippocampus nach EE-Haltung, im Vergleich zu naiven APP/PS1-Tieren aus Standardhaltung, da das BDNF-Level der Standardhaltungsbedingungen fast genau so hoch lag, wie das der Tiere aus der EE-Haltung. Hier unterschied sich der BDNF-Gehalt zwischen Wildtyptieren und APP/PS1-Mäusen aus der Standardhaltung nicht voneinander. Im Rahmen der BDNF-Proteinbestimmung der fünf Monate alten Tiere (Abbildung 19) lag der BDNF-Gehalt leicht unter dem Wert, der im Rahmen des EE-Experiments der APP/PS1-Tiere gemessen wurde (Abbildung 18). Da die Proben zur BDNF-Proteinbestimmung der fünf Monate alten Tiere aus einer größeren Stichprobe bestand und die APP/PS1-Proben aus EE-Haltung sich aus Geschwistertieren zweier Käfige zusammenstellte, könnte es sein, dass es durch die geringere Variabilität der Proben zu einer leichten Erhöhung des BDNF-Levels aufgrund von Umwelteinflüssen kam. Generell kann davon ausgegangen werden, dass sich der BDNF-Proteingehalt im Hippocampus der APP/PS1-Mäuse wahrscheinlich nicht von dem der Wildtypmäuse unterscheidet, da auch die BDNF-Proteinbestimmung bei fünf Monate alten Tieren nach dem Schwimmlabyrinthversuch keinen Unterschied zwischen APP/PS1- und Wildtypmäusen zeigte (Abbildung 19). Dies lässt vermuten, dass auch bei APP/PS1-Mäusen die BDNF-Proteinmenge durch die Haltung im EE beeinflusst sein könnte. Im mPFC war keine Veränderung der BDNF-Proteinmenge in keiner der Genotypen zu beobachten. Der präfrontale Kortex ist ein Gehirnareal, welches generell von der EE-Haltung beeinflusst werden kann (Brenes et al., 2008).

An Ratten wurde gezeigt, dass die EE-Haltung eine Erhöhung der Serotonin-Konzentration und generell eine antidepressive Wirkung auf das Verhalten der Tiere zur Folge hatte (Brenes et al., 2008). Die vorliegende Arbeit konnte keinen Effekt der EE-Haltung auf die BDNF-Proteinkonzentration im mPFC beobachten. Dies könnte aufgrund des kleinen Ausschnitts des Präfrontalkortex begründet sein, da hier nur der mediale Präfrontalkortex extrahiert wurde und nicht der gesamte frontale Kortex, wie z.B. in der Arbeit von Brenes et al., wobei diese Arbeit an Ratten durchgeführt wurde, was ebenfalls zu abweichenden Ergebnissen führen kann. Eine andere Arbeit konnte ebenfalls eine Erhöhung der BDNF-Konzentration im Hippocampus, jedoch nicht im frontalen Kortex (Chourbaji et al., 2012), nach EE-Haltung bei Wildtypmäusen und BDNF^{+/-}-Mäusen beobachten. Hierbei wurde diese Erhöhung des BDNF-Proteinlevels im Hippocampus für die zuvor gefundene Erhöhung der synaptischen Plastizität im Hippocampus bei männlichen BDNF^{+/-}-Mäusen nach EE-Haltung verantwortlich gemacht (Zhu et al., 2009), welche wiederum zu einer Reduktion des erhöhten Angstverhaltens und zu einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit der BDNF^{+/-}-Mäuse führte (Chourbaji et al., 2008). Der mPFC fungiert als eine Art Schaltzentrale, in der die Integration von ankommenden Informationen und eine emotionale Bewertung stattfindet (siehe zusammenfassend z.B. Euston et al., 2012). Somit ist der mPFC höchstwahrscheinlich eine Region, in der aktivitätsabhängig eine Veränderung im BDNF-Level stattfindet, die mit der hier durchgeführten Proteinbestimmung nicht nachweisbar war, oder die verwendete EE-Haltung war hier nicht in der Lage den mPFC so zu stimulieren, dass es zu einer Erhöhung des BDNF-Levels kam.

4.7 Mitochondrienfunktion der verwendeten Mausmodelle

Zelltoxisches A β -Peptid kann u.a. zur mitochondrialen Dysfunktion führen und so ein Faktor sein, der zu den multifaktoriellen pathologischen Veränderungen der AK beiträgt (Rhein et al., 2009; Yao et al., 2009; Trushina et al., 2012). Mitochondriale Dysfunktion, verursacht durch die A β -Pathologie, hat u.a. Einfluss auf den axonalen Transport von Neurotrophinen (siehe z.B. Markham et al., 2014). Da der normale axonale Transport die Basis der Wirkung von BDNF ist und BDNF die Aktivität von neuronalen Mitochondrien erhöhen kann (Mark-

ham et al., 2004; Markham et al., 2012), sollte in der vorliegenden Arbeit die Funktion der Mitochondrien der verwendeten Mausmodelle untersucht werden. Die in dieser Arbeit erfassten Daten zu den Atmungsraten der Mitochondrien der verschiedenen transgenen Tiere sollten in erster Linie dazu dienen, einen Überblick über mögliche Defizite der verschiedenen mitochondrialen Enzymkomplexe der Alzheimer-Mausmodelle zu erlangen.

In der vorliegenden Arbeit wurden an Homogenaten des Hippocampus und Kortex von APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren, im Vergleich zu Wildtypkontrollmäusen im Alter von acht Monaten, Respirometriemessungen zur Bestimmung der Mitochondrienfunktion durchgeführt. Die erhobenen Daten aus diesen Messungen zeigten, dass es prinzipiell möglich ist, Atmungsraten von Mitochondrien aus Hippocampus- und Kortexhomogenaten zu messen. In der Regel werden für Funktionsmessungen von Mitochondrien, diese aus dem entsprechenden Gewebe extrahiert und aufgereinigt, so dass die Funktion isolierter Mitochondrien im Oxygraphen analysiert werden kann. So können die gewonnenen Messdaten auf die Mitochondrienmasse normiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Homogenate der genannten Gehirnregionen verwendet, da die Isolation von Mitochondrien immer mit einem hohen Verlust an Mitochondrien verbunden ist (10-30 % Ausbeute, vergl. Gellerich, F.N., persönl. Mitteilung). So wäre aus den verfügbaren Gewebemengen der analysierten Gehirnareale, die Menge an isolierten Mitochondrien nicht ausreichend gewesen, um aussagekräftige Messungen von mehreren Enzymkomplexen durchzuführen. Um eventuelle Defizite der Mitochondrienfunktion zu detektieren, wird in der Regel die Funktion eines Enzymkomplexes, bzw. ein spezifischer Parameter der Mitochondrienfunktion untersucht. Ein Nachteil von Gewebshomogenaten ist, dass man die Menge der im Messansatz vorhandenen Mitochondrien nicht kennt und dass diese sich u.U. zwischen verschiedenen Messansätzen, die untereinander verglichen und/oder zusammengefasst werden sollen, unterscheidet. Schlussfolgerungen über eventuelle mitochondriale Defekte aus den Atmungsraten zu ziehen, welche auf das Probengewicht normiert wurden, ist somit weniger aussagekräftig. Um mitochondriale Dysfunktionen erkennen zu können, wird in der Regel der RCI oder andere Verschiebungen zwischen den Atmungsraten mit unterschiedlichen Substraten betrachtet, da diese Verhältnisse unabhängig von der Mitochondrienmasse sind. Die Zusammenfassungen, der in dieser Arbeit angefertigten Messungen der Atmungsraten eines Genotyps, zeigten einen ähnlichen Kurvenverlauf und bewegten sich auf ähnlichem Niveau, sowohl

innerhalb des Standardmessansatzes, als auch unter Kalziumstressbedingungen. Daraus kann man schließen, dass sich die funktionellen Eigenschaften der Mitochondrien zwischen den beiden getesteten Gehirnregionen höchstwahrscheinlich nicht voneinander unterscheiden. Es wird davon ausgegangen, dass nach Zugabe des Komplex-I-Hemmstoffs Rotenon die Atmungsraten wieder auf das Ausgangsniveau sinken. Dies ist ein generelles Kriterium für funktionierende respirometrische Messungen. In der vorliegenden Arbeit war bei allen Genotypen ein Rückgang der Atmungsraten nach Zugabe von Rotenon zu beobachten, wobei alle im selben Messbereich lagen. Daher kann man generell davon ausgehen, dass die Messungen insgesamt erfolgreich waren.

In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, ob aus der A β -Pathologie der APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere ein Defizit der Mitochondrien in den gemessenen Gehirnregionen resultiert. Ob der chronische Mangel an BDNF zu einer Veränderung der mitochondrialen Funktion führt, sollte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls geklärt werden. Beide Pathologien gemeinsam könnten in dem APP/PS1-BDNF^{+/-} Mausmodell zu einer Verschlechterung der mitochondrialen Funktion führen. Es waren signifikante Unterschiede der Atmungsraten, sowohl im Hippocampus-, als auch im Kortexgewebe, zwischen den transgenen und den Wildtypkontrolltieren erkennbar, wobei die Atmungsraten der transgenen Tiere, wenn signifikant unterschiedlich zu den Wildtyptieren, höher lagen. Der RCI ist das Verhältnis der State 3- zur State 4-Atmung. Als State 4-Atmung wird die Komplex-I abhängige Atmung mit Malat und Glutamat als Substrate ohne die Zugabe von ADP bezeichnet. Diese Atmungsrate ist sehr gering, da aufgrund der geringen ADP-Konzentration keine Protonen aus dem Intermembranspalt über die ATPase zurück in die mitochondriale Matrix fließen können. Dieser Zustand wird daher auch als Ruhezustand der Mitochondrien bezeichnet. Die State 4-Atmung ist demnach die nicht phosphorylierende Atmung und hängt von der Intaktheit der Innenmembran der Mitochondrien ab. Durch die Zugabe von ADP in den Messansatz erreicht die Komplex-I abhängige Atmung ein Maximum, welches als State 3-Atmung bezeichnet wird. Der Quotient aus diesen beiden Funktionszuständen der Mitochondrien ist ein Maß für die Kopplung der oxidativen Phosphorylierung und gibt Auskunft über die Intaktheit der Mitochondrien. Durch eventuelle Schädigungen der Innenmembran der Mitochondrien können Protonen in die Matrix zurückfließen, und es kommt zu Substratoxidation ohne ATP-Synthese, und somit zu einer erhöhten State 4-Atmung. Je kleiner der Zahlenwert

des RCIs ist, desto größer ist die Schädigung der Mitochondrien. Die Unterschiede der Atmungsraten und der RCIs unter Standardmessbedingungen zwischen den APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäusen, im Vergleich zu Wildtyptieren im Hippocampus und Kortex, könnten infolge einer zu geringen Anzahl an gelungenen Messungen von Wildtypiergewebe oder aufgrund eines Defizits der Mitochondrienfunktion der Wildtypmäuse zustande gekommen sein. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wildtypiere der genetische Hintergrund der transgenen Mäuse waren, ist es unwahrscheinlich, dass der beobachtete Unterschied zwischen den transgenen und Wildtypieren auf einem mitochondrialen Defizit der Wildtypiere beruht. Wäre es der Fall, dass der C57/BL6J-Stamm (Wildtyp-Stamm) ein mitochondriales Defizit hat, müssten entweder alle RCIs der verwendeten Genotypen auf einem vergleichbar niedrigen Niveau sein, oder im Falle eines zusätzlichen Defizits aufgrund der A β -Pathologie und/oder des Mangels an BDNF, müssten die Wildtypiere dennoch den höchsten RCI zeigen. Zukünftige zusätzliche Messungen von Wildtypiergewebe sollten klären, ob der genannte Unterschied tatsächlich auf einem Defizit der Mitochondrienfunktion beruht, oder aufgrund von Messungenauigkeiten zustande kommt. Die RCIs der Wildtypiere mit RCIs von Wildtypmäusen aus der Literatur zu vergleichen, könnte eine Möglichkeit sein, die hier ermittelten Werte einzuordnen. Je nach verwendetem Mausstamm liegen diese zwischen 4 (SWR/J, Markham et al., 2012) und 7 (C57BL/6/129S, Yao et al., 2009). Hierbei wird die Vergleichbarkeit jedoch durch die Verwendung anderer Wildtypmausstämme eingeschränkt. Festzuhalten bleibt, dass in der vorliegenden Arbeit keine mitochondrialen Funktionsstörungen der APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und/oder der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere im Alter von acht Monaten unter Standardmessbedingungen festgestellt werden konnten.

Die Messungen der mitochondrialen Atmungsraten unter Kalziumstressbedingungen in Hippocampus- und Kortexgewebe der APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse, im Vergleich zu Wildtypkontrolltieren, sollten weitere Erkenntnisse über die Funktionalität der Mitochondrien der jeweiligen transgenen Mäuse unter Stressbedingungen liefern. Kalzium ist für Mitochondrien eine essentielle Substanz. Mitochondrien dienen zudem als Kalzium pufferndes Organell der Zelle. Ein Überangebot von Kalzium führt zu Stress durch sich verändernde funktionelle Parameter, sowie im Extremfall zur Öffnung der Permeabilitäts-Transition-Poren, einer Membranruptur und/oder zur Zerstörung von Zellorganellen. Die neuronalen, potentiell geschädigten Mitochondrien, der in der vorliegenden Arbeit unter-

suchten transgenen Tiere, könnten sensitiver auf eine erhöhte Kalziumkonzentration reagieren. Die Ergebnisse der Atmungsratenmessungen unter erhöhter Kalziumkonzentration zeigten im Hippocampus eine niedrigere State 4-Atmung der Mitochondrien (Glu/Mal) von BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren, im Vergleich zu denen der Wildtypiere. Auch nach Zugabe von Atraktylat zeigten die Mitochondrien der BDNF^{+/-}-Mäuse eine signifikant geringere Atmungsrate, im Vergleich zu den Wildtypmitochondrien. Dies könnte auf eine Funktionsstörung der Mitochondrien aufgrund des chronischen Mangels an BDNF hinweisen. Zwei Arbeiten konnten zeigen, dass BDNF einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Komplex-I abhängigen RCIs von Ratten- (Markham et al., 2004) und Mäusemitochondrien (Markham et al., 2012) der synaptosomalen Bereiche von Neuronen erhöhte. Da BDNF ein aktivitätsabhängig ausgeschüttetes Neurotrophin ist (zusammenfassend z.B. Edelman et al., 2014), könnte BDNF auch daran beteiligt sein, den erhöhten Energiebedarf bei neuronaler Aktivität und Neuroplastizität zu vermitteln oder zu initiieren. Die Erkenntnis, dass BDNF die RCIs in Ratten- und Mäuseuronen erhöhte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass BDNF ein Beitrag zur aktivitätsabhängigen Energielieferung leistet und dass ein chronischer Mangel an BDNF zu einem Defizit der mitochondrialen Funktion führen könnte. Dies konnten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigen. Die Atmungsraten der Mitochondrien im Kortex der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere zeigten unter Kalziumstressbedingungen nach Komplex-I und -II Substratzugabe eine signifikant erniedrigte Atmungsrate im Vergleich zu Wildtypmitochondrien. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die A β -Pathologie zusammen mit dem chronischen BDNF-Mangel im Kortex zu einem Defizit der Komplex-I und -II abhängigen Atmung führt. Dass eine Erniedrigung der Atmungsraten der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere im Kortex, aber nicht im Hippocampus zu beobachten war, könnte aufgrund der höheren A β -Pathologie im Kortex, im Vergleich zum Hippocampus begründet sein. Färbungen der Amyloidplaques von kortikalen und hippocampalen Strukturen der APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere im Alter von acht Monaten zeigten eine höhere Plaquedichte im Kortex, im Vergleich zum Hippocampus (Rockhar, C., persönl. Mitteilung; Radde et al., 2006). Da jedoch keine Erniedrigung des RCIs der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere zu beobachten war, kann höchstens von einer Tendenz zu einem Defizit der mitochondrialen Atmung des Komplex-I gesprochen werden, der, auch nur unter Kalziumstressbedingungen, schwer nachweisbar ist. Die Betrachtung der RCIs, welche unter Kalziumstress ermittelt wurden, sind auch hier schwierig zu interpretieren, da der RCI der Wildtypmitochondrien

sowohl im Hippocampus, als auch im Kortex niedriger ist, als derjenige der transgenen Tiere. RCIs, die von Mäusen ermittelt wurden, unterliegen je nach verwendetem Mausstamm zwischen 4 und 7 (Yao et al., 2009; Markham et al., 2012), was eine Aussage über den hier ermittelten RCI der Wildtypiere erschwert. Wie oben bereits diskutiert, könnten zusätzliche Messungen von Wildtypmitochondrien Aufschluss darüber geben, inwieweit ein Defizit der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mitochondrien unter Kalziumstressbedingungen vorliegt. Um ein eventuelles mitochondriales Defizit der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere im Kortex näher zu betrachten, könnte es ebenfalls sinnvoll sein, Komplex-I und -II abhängige Atmungsmessungen an isolierten Mitochondrien der Tiere durchzuführen, um auch Differenzen in der Mitochondrienmasse als Ursache für die beobachteten Unterschiede ausschließen zu können. Interessanterweise scheint die in den APP/PS1-Mäusen beobachtete A β -Pathologie hier keine Auswirkungen auf die Funktionalität der Mitochondrien gehabt zu haben. Andere Arbeiten zeigten von A β induzierte Dysfunktionen auf neuronale Mitochondrien von Alzheimer-Mausmodellen, welche sich mit dem Alter der Tiere verschlechterten (Yao et al., 2009; Calkins et al., 2011). Hier könnte es interessant sein, zusätzlich weitere Altersstufen der APP/PS1-Tiere zu betrachten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in der vorliegenden Arbeit keine Defizite der mitochondrialen Funktionalität von APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen im Alter von acht Monaten festgestellt werden konnten. Hierbei zeigten sich jedoch teilweise geringere Atmungsraten und RCIs der Wildtypiere im Vergleich zu APP/PS1-, BDNF^{+/-}- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren in Kortex- und Hippocampusgewebe. Daher sollte über zukünftige zusätzliche Messungen von Wildtypgewebe Klarheit über die Funktionalität der Mitochondrien gewonnen werden. Respirometrische Messungen unter Kalziumstressbedingungen zeigten allerdings eine Tendenz für ein Defizit in der Komplex-I abhängigen Atmung der Mitochondrien aus Kortexgewebe von APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen. Auch hier sollten zusätzliche Messungen diesen Verdacht überprüfen.

4.8 Vergleichende Diskussion

Die vorliegende Arbeit konnte kein verschlechtertes Lernen der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere, im Vergleich zu den APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäusen, aufgrund der Kombination des chronischen Mangels an BDNF und der A β -Pathologie, feststellen. APP/PS1-Mäuse zeigten im Schwimmlabyrinth das schlechteste Lernverhalten im Vergleich zu Wildtyptieren bei unverändertem BDNF-Gehalt und erhöhtem A β ₄₂-Gehalt im Hippocampus. Im Vergleich zu anderen Arbeiten war hier kein deutlicher Anstieg der A β ₄₂-Konzentration im Hippocampus über das Alter zu erkennen. Andere Arbeiten, welche die A β -Pathologie in diesen Tieren altersabhängig untersuchten, konnten einen kontinuierlichen Anstieg der löslichen A β ₄₂-Konzentration im gesamten Gehirn beobachten (Radde et al., 2006), sowie der Amyloid-Plaques in kortikalen Bereichen und dem Hippocampus (Radde et al., 2006; Gengler et al., 2010; Hefendehl et al., 2011). Diese Befunde weisen darauf hin, dass in diesen Tieren neben dem Hippocampus auch andere Gehirnareale von der A β -Pathologie altersabhängig und möglicherweise in unterschiedlicher Stärke betroffen sind, was wiederum zu dem hier beobachteten Lerndefizit führen könnte. Die Genmutationen des APP und PS1-Genlocus werden unter dem Thy1-Promotor exprimiert. Dieser Promotor wird hauptsächlich im Vorderhirn exprimiert, aber auch in den Basalganglien (Chen et al., 2012), welche eine wichtige Rolle beim räumlichen Lernen im Schwimmlabyrinth spielen (Devan et al., 1999; Sukumar et al., 2012). Auch der Gehalt an BDNF und dessen Prozessierung könnten sich in verschiedenen Gehirnarealen unterscheiden bzw. unterschiedlich reguliert sein und so zu Veränderungen in der Lernleistung beitragen (z.B. Calabrese et al., 2013; Psotta et al., 2013; Kolbeck et al., 1999). Es könnte aber auch zu einem verschlechterten Transport von BDNF aufgrund der A β -Pathologie kommen (Markham et al., 2014), was auch bei gleichbleibendem BDNF-Level zu Defiziten der APP/PS1-Mäuse führen könnte. So wurde in den untersuchten Gehirnarealen ein konstanter BDNF-Gehalt ermittelt, obwohl es zu potentiellen Beeinträchtigungen des axonalen Transports und somit zu einer funktionalen Reduktion an BDNF gekommen sein könnte. Möglicherweise könnte dies auch bei den APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren der Fall sein, was in den hier durchgeführten Verhaltensversuchen jedoch nicht zu beobachten war.

Die EE-Haltung führte insgesamt zu einer Erhöhung des hippocampalen BDNF-Gehalts, hatte aber keinen Einfluss auf die Lernleistung von APP/PS1- und Wildtyp-Tieren. Ob das EE bei älteren Tieren zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungen führen kann, muss in Folgeversuchen geklärt werden. Bei BDNF^{+/-}-Tieren zeigte sich ebenfalls ein altersabhängiges Lerndefizit, welches wahrscheinlich auf Veränderungen im BDNF-TrkB-Signalweg bzw. auf eine altersbedingte Veränderung der Prozessierung von BDNF im Hippocampus zurückgeführt werden kann (Barnes und Thomas, 2008; Calabrese et al., 2013). Untersuchungen der Amyloid-Plaquedichte der APP/PS1- und APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere zeigten eine höhere Menge an Amyloid-Plaques in kortikalen Arealen, im Vergleich zu hippocampalen Arealen in diesen Tieren (Rockhar, C., persönl. Mitteilung; Radde et al., 2006). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die A β -Pathologie in kortikalen Arealen generell stärker ausgeprägt ist und es so zu erschwerten Defiziten in anderen, vermehrt Kortex abhängigen Lernparadigmen, kommen könnte. Im Rahmen eines Kooperationsprojekts wurden das aktive Vermeidungslernen der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere in verschiedenen Altersgruppen getestet. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse ein früheres Lerndefizit im Vergleich zu den APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Mäuse aufweisen (Psotta et al., 2015, in Vorbereitung). Da das aktive Vermeidungslernen im Vergleich zum Schwimmlabyrinthversuch ein komplexeres Lernparadigma darstellt, welches hauptsächlich Kortex abhängig ist (Choi et al., 2010b; Cain und LeDoux, 2008; LeDoux, 2000), könnte dieses kognitive Defizit der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse durch die stärker ausgeprägte A β -Pathologie im Kortex, im Vergleich zum Hippocampus, der Tiere erklärt werden.

Die hier durchgeführten Funktionsmessungen der neuronalen Mitochondrien deuten auf ein Defizit der Komplex-I abgängigen Atmung bei APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tieren im Alter von acht Monaten im frontalen Kortex, jedoch nicht im Hippocampus, hin. Dies könnte möglicherweise aufgrund eines verschlechterten Transports des ohnehin schon reduzierten BDNFs durch A β hervorgerufen werden (Poon et al., 2011). Da mitochondriale Dysfunktionen relativ früh in der Alzheimer-Symptomatik auftreten (zusammengefasst in z.B. Swerdlow et al., 2010), könnte die beobachtete mitochondriale Dysfunktion auch zum beobachteten Lerndefizit, welches sich bei neun Monate alten APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäusen andeutet und mit 12 Monaten vorhanden ist, mitverantwortlich sein. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Versuche des Schwimmlabyrinths die Hypothese des verstärkten bzw. verfrühten Defi-

zits des Lernens der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Tiere im Vergleich zu den APP/PS1- und BDNF^{+/-}-Tieren zwar nicht bestätigen, dennoch kann aufgrund von Befunden aus anderen, mehr Kortex abhängigen Lernversuchen, wie dem aktiven Vermeidungslernen, diese Hypothese nicht generell abgelehnt werden.

4.9 Abschließende Schlussfolgerung

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Alzheimer-Mausmodell APP/PS1-BDNF^{+/-} zeigte keine Veränderungen im Kurzzeitgedächtnis und relativ spät eine Veränderung im räumlichen Lernen mit gleichzeitig erhöhter A β ₄₂-Pathologie und reduziertem BDNF-Gehalt im Hippocampus. Hierbei könnte es interessant sein, die A β -Pathologie in weiteren Gehirnarealen altersabhängig zu betrachten. Sowohl die A β -Pathologie, als auch die Expression von BDNF ist in unterschiedlichen Gehirnarealen verschieden reguliert und könnte so zu den unterschiedlichen Defiziten in verschiedenen Lernparadigmen führen. So zeigte sich im Kortex ein ausgeprägteres Bild der Pathologie und somit auch in Kortex abhängigen Lernparadigmen stärkere Beeinträchtigungen. In diesem neu entwickelten Alzheimer-Mausmodell könnten beide Pathologien zusammen auf zellulärer Ebene einen potenzierenden Effekt haben, welcher über Untersuchungen auf zellulärer bzw. molekularer Ebene, wie z.B. die Anzahl an Dornenfortsätzen oder das Messen von anderen Neurotrophin-Konzentrationen in mehreren lernrelevanten Gehirnregionen, untersucht werden könnte. Weiterhin könnten zusätzliche Untersuchungen klären, ob es einen oder mehrere Kompensationsmechanismen in diesem Mausmodell gibt, welche ein Lerndefizit zu einem späteren Zeitpunkt, im Vergleich zum APP/PS1-Mausmodell, aufkommen lassen. Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen andere, bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht in Betracht gezogene, Methoden zur Verbesserung der Alzheimer-ähnlichen Symptomatik zu untersuchen. Die Übertragbarkeit des Mausmodells auf die Pathologie der AK kann noch nicht abschließend beurteilt werden, da weitere Untersuchungen nötig sind, um mehrere Aspekte der Übertragbarkeit zu adressieren. Festgehalten werden kann jedoch, dass die hier betrachtete, neugeschaffene APP/PS1-BDNF^{+/-}-Maus die Möglichkeit bietet, zwei Komponenten der Alzheimerpathologie in Wechselwirkung miteinander *in vivo* zu betrachten und damit ein geeignetes Modell sein

könnte, um die Mechanismen der AK auf zellulärer, sowie Verhaltensebene weiter zu untersuchen.

Zusammenfassung

Das Neurotrophin BDNF spielt bei Lern- und Gedächtnisprozessen eine essentielle Rolle. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass BDNF auch bei der Extinktion des Furchtgedächtnisses eine wesentliche Rolle spielt. Wie sich der Mangel an BDNF im Alzheimer-Mausmodell verhält, muss in Folgeversuchen untersucht werden. Die Vermutung, dass ein chronischer Mangel an BDNF zu einer zusätzlichen Verschlechterung der Alzheimersymptomatik führt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Lernversuche zeigten kein erschwertes oder verfrühtes Defizit der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse. Hierbei sind wahrscheinlich Kompensationsmechanismen, welche sowohl von der Alzheimerpathologie als auch von dem chronischen Mangel an BDNF ausgelöst werden, für ein intakt bleiben der kognitiven Leistungen im APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mausmodell verantwortlich. Andere Arbeiten konnten zeigen, dass die Symptomatik der AK durch die Aktivierung des TrkB-Signalwegs verbessert wurde, es aber hierbei zu keiner Veränderung der Alzheimerpathologie kam (Blurton-Jones et al., 2009; Zhang et al., 2013). Eine weitere Arbeit konnte ebenfalls keine Veränderungen der A β - und Tau-Pathologie in einem Alzheimer-Mausmodell welches ein chronisches Defizit an BDNF besaß, zeigen (Castello et al., 2012). Dies könnte die Vermutung unterstützen, dass die zwei Prozesse zwar offensichtliche Schnittpunkte besitzen, diese sich aber im hier untersuchten APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mausmodell nicht direkt beeinflussen. BDNF kann eine protektive Wirkung auf die Alzheimer-Symptomatik haben, beeinflusst hier die A β ₄₂-Prozessierung aber höchstwahrscheinlich nicht direkt. Gleichzeitig hat die A β -Pathologie der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Maus keine Auswirkungen auf die Expression von BDNF. Auf der Ebene der mitochondrialen Funktion scheint sich ein Defizit der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Maus im Vergleich zu den anderen Genotypen anzudeuten. Es gibt Hinweise, dass BDNF einen Einfluss auf die Energieumsetzung von Mitochondrien hat (Markham et al., 2012) und A β nachweislich die Mitochondrienmembran schädigen kann (Chen und Yan, 2010; Tillement et al., 2011). Es könnte auf der Ebene der mitochondrialen Funktion zu einer direkten Kombination dieser beiden Pathologien gekommen sein, welche zu einer Potenzierung einer Schädigung führte. Weitere Experimente der mitochondrialen Funktionalität der APP/PS1-BDNF^{+/-}-Mäuse, die weitere mitochondriale Komponenten untersuchen, könnten weitere Erkenntnisse zu dieser Thematik liefern.

Abstract

The neurotrophic factor BDNF is abundantly expressed in the mammalian brain and mediates processes of learning and memory in an activity-dependent manner. In the pathology of Alzheimer's disease (AD) BDNF plays a crucial role. It was shown that brain areas which have high expression of BDNF –like the hippocampus and frontal cortex areas– are the first brain areas which are affected by AD pathology. It was already shown that the levels of BDNF concentration in AD patients are lower within these brain areas and in the blood serum. Furthermore, studies show protective effects of BDNF on A β -treated cell cultures and in animal models of AD. The goal of this study was to investigate the connection between an endogenous deficiency of BDNF within an AD mouse model on cognitive, emotional, and energy-providing processes. Therefore a heterozygous BDNF knockout mouse model (BDNF^{+/-}) was crossbred with an APP/PS1 mouse model of AD to investigate the cognitive performance of this newly created mouse line at different ages *in vivo*. The hypothesis was that the endogenous deficiency and the additional A β -pathology would lead to an accelerated or an aggravated learning deficit of the APP/PS1-BDNF^{+/-} mouse model in comparison to BDNF^{+/-} and APP/PS1 mice. The present study shows an essential role of BDNF within emotional learning of extinction learning of conditioned fear. There BDNF^{+/-} mice showed an age-dependent learning deficit, which could be a first basis for future work focusing on this effect in the AD mouse model. Basal parameters like activity and anxiety behavior are not affected by a deficiency of BDNF, AD pathology, or both conditions together. Furthermore, the tested short-term object recognition memory is also not impaired by both pathologies in the tested animals of different ages. APP/PS1, BDNF^{+/-} as well as APP/PS1-BDNF^{+/-} mice showed an age-dependent learning deficit in spatial learning. In this test APP/PS1-BDNF^{+/-} mice did not show an accelerated or aggravated learning deficit within the spatial navigation task. Compensatory mechanisms, which occur when the two pathologies are combined, could lead to a relatively late onset of spatial impairment in these animals. Other results of a more complex learning paradigm, derived from a cooperation project, showed a tendency for an accelerated onset of a learning impairment in APP/PS1-BDNF^{+/-} mice. Consequently, the hypothesis cannot be completely rejected. Furthermore, an investigation of the respiratory mitochondrial functionality shows a potential deficit of the complex-I dependent respiration under calcium stress conditions of APP/PS1-BDNF^{+/-} mice. The newly developed

mouse model APP/PS1-BDNF^{+/-} gives the opportunity to investigate the connection between the deficiency of BDNF within AD pathology *in vivo* which further allows the investigation of the mechanisms of AD-related disruptions during neuronal processes.

Literaturangaben

Abidin I, Kohler T, Weiler E, Zoidl G, Eysel UT, Lessmann V, Mittmann T (2006) Reduced presynaptic efficiency of excitatory synaptic transmission impairs LTP in the visual cortex of BDNF-heterozygous mice. *Eur J Neurosci* 24:3519-3531.

Ahlskog JE, Geda YE, Graff-Radford NR, Petersen RC (2011) Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc* 86:876-884.

Akatsu H, Yamagata HD, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K (2006) Variations in the BDNF gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in Japan. *Dement Geriatr Cogn Disord* 22:216-222.

Alderson RF, Alterman AL, Barde YA, Lindsay RM (1990) Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* 5:297-306.

Aliaga E, Silhol M, Bonneau N, Maurice T, Arancibia S, Tapia-Arancibia L (2010) Dual response of BDNF to sublethal concentrations of beta-amyloid peptides in cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* 37:208-217.

Allen SJ, Watson JJ, Dawbarn D (2011) The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* 9:559-573.

Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L (2004) ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* 11:172-178.

Alonso M, Vianna MR, Depino AM, Mello e Souza, Pereira P, Szapiro G, Viola H, Pitossi F, Izquierdo I, Medina JH (2002) BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation. *Hippocampus* 12:551-560.

Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Betti M, Fanelli M, Cuppini R (2013) Physical exercise and environment exploration affect synaptogenesis in adult-generated neurons in the rat dentate gyrus: possible role of BDNF. *Brain Res* 1534:1-12.

Andero R, Daviu N, Escorihuela RM, Nadal R, Armario A (2012) 7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, blocks long-term spatial memory impairment caused by immobilization stress in rats. *Hippocampus* 22:399-408.

Andero R, Heldt SA, Ye K, Liu X, Armario A, Ressler KJ (2010) Effect of 7,8-Dihydroxyflavone, a Small-Molecule TrkB Agonist, on Emotional Learning. *Am J Psychiatry*.

Andero R, Heldt SA, Ye K, Liu X, Armario A, Ressler KJ (2011) Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning. *Am J Psychiatry* 168:163-172.

Angelucci F, De BP, Gelfo F, Foti F, Cutuli D, Bossu P, Caltagirone C, Petrosini L (2009) Increased concentrations of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat cerebellum after exposure to environmental enrichment. *Cerebellum* 8:499-506.

Angelucci F, Spalletta G, di IF, Ciaramella A, Salani F, Colantoni L, Varsi AE, Gianni W, Sancesario G, Caltagirone C, Bossu P (2010) Alzheimer's disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. *Curr Alzheimer Res* 7:15-20.

Arancibia S, Silhol M, Mouliere F, Meffre J, Hollinger I, Maurice T, Tapia-Arancibia L (2008) Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. *Neurobiol Dis* 31:316-326.

Arendash GW, Garcia MF, Costa DA, Cracchiolo JR, Wefes IM, Potter H (2004) Environmental enrichment improves cognition in aged Alzheimer's transgenic mice despite stable beta-amyloid deposition. *Neuroreport* 15:1751-1754.

Artero S, Tierney MC, Touchon J, Ritchie K (2003) Prediction of transition from cognitive impairment to senile dementia: a prospective, longitudinal study. *Acta Psychiatr Scand* 107:390-393.

Autry AE, Adachi M, Cheng P, Monteggia LM (2009) Gender-specific impact of brain-derived neurotrophic factor signaling on stress-induced depression-like behavior. *Biol Psychiatry* 66:84-90.

Balogh SA, Wehner JM (2003) Inbred mouse strain differences in the establishment of long-term fear memory. *Behav Brain Res* 140:97-106.

Baraldi T, Schowe NM, Balthazar J, Monteiro-Silva KC, Albuquerque MS, Buck HS, Viel TA (2013) Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice. *Exp Gerontol* 48:831-838.

Barbacid M (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 7:148-155.

Barnes P, Thomas KL (2008) Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. *PLoS One* 3:e3248.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and. *Neuron* 53:261-277.

Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipeczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH (2008) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2711-2716.

Berlyne DE (1950) Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. *Br J Pharmacol* 68-80.

Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22:123-131.

Bird TD (2005) Genetic factors in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 352:862-864.

Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* 68:129-135.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387-403.

Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Muller FJ, Loring JF, Yamasaki TR, Poon WW, Green KN, Laferla FM (2009) Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13594-13599.

Bodner SM, Berrettini W, van D, V, Bennett DA, Wilson RS, Trojanowski JQ, Arnold SE (2005) Genetic variation in the brain derived neurotrophic factor gene in Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134B:1-5.

Boger HA, Mannangatti P, Samuvel DJ, Saylor AJ, Bender TS, McGinty JF, Fortress AM, Zaman V, Huang P, Middaugh LD, Rundall PK, Jayanthi LD, Rohrer B, Helke KL, Granholm AC, Ramamoorthy S (2011) Effects of brain-derived neurotrophic factor on dopaminergic function and motor behavior during aging. *Genes Brain Behav* 10:186-198.

Bollen E, Vanmierlo T, Akkerman S, Wouters C, Steinbusch HM, Prickaerts J (2013) 7,8-Dihydroxyflavone improves memory consolidation processes in rats and mice. *Behav Brain Res*.

Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76:99-125.

Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M (2007) Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 14:268-276.

Brenes JC, Rodriguez O, Fornaguera J (2008) Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav* 89:85-93.

Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3:186-191.

Bruce-Keller AJ, Gupta S, Knight AG, Beckett TL, McMullen JM, Davis PR, Murphy MP, Van Eldik LJ, St CD, Keller JN (2011) Cognitive impairment in humanized APPxPS1 mice is linked to A β (1-42) and NOX activation. *Neurobiol Dis* 44:317-326.

Buckmaster CA, Eichenbaum H, Amaral DG, Suzuki WA, Rapp PR (2004) Entorhinal cortex lesions disrupt the relational organization of memory in monkeys. *J Neurosci* 24:9811-9825.

Burbach GJ, Hellweg R, Haas CA, Del TD, Deicke U, Abramowski D, Jucker M, Staufenbiel M, Deller T (2004) Induction of brain-derived neurotrophic factor in plaque-associated glial cells of aged APP23 transgenic mice. *J Neurosci* 24:2421-2430.

Bussey TJ, Aggleton JP (2002) The "what" and "where" of event memory: independence and interactivity within the medial temporal lobe. *The Cognitive Neuroscience of Memory: Encoding and Retrieval* 217-233.

Cain CK, LeDoux JE (2008) Brain mechanisms of Pavlovian and Instrumental Aversive Conditioning. *Handbook of Anxiety and Fear* 17:103-125.

Calabrese F, Guidotti G, Racagni G, Riva MA (2013) Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor. *Neurobiol Aging* 34:2768-2776.

Callaghan CK, Kelly AM (2012) Differential BDNF signaling in dentate gyrus and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. *Hippocampus* 22:2127-2135.

Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 20:4515-4529.

Carreton O, Giralt A, Torres-Peraza JF, Brito V, Lucas JJ, Gines S, Canals JM, Alberch J (2012) Age-dependent decline of motor neocortex but not hippocampal performance in heterozygous BDNF mice correlates with a decrease of cortical PSD-95 but an increase of hippocampal TrkB levels. *Exp Neurol* 237:335-345.

Castello NA, Green KN, LaFerla FM (2012) Genetic knockdown of brain-derived neurotrophic factor in 3xTg-AD mice does not alter Abeta or tau pathology. *PLoS One* 7:e39566.

Castello NA, Nguyen MH, Tran JD, Cheng D, Green KN, Laferla FM (2014) 7,8-Dihydroxyflavone, a small molecule TrkB agonist, improves spatial memory and increases thin spine density in a mouse model of Alzheimer disease-like neuronal loss. *PLoS One* 9:e91453.

Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG (2000) A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:975-979.

Chen JX, Yan SS (2010) Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2:S569-S578.

Chen Q, Schubert D (2002) Presenilin-interacting proteins. *Expert Rev Mol Med* 4:1-18.

Chen Q, Cichon J, Wang W, Qiu L, Lee SJ, Campbell NR, Destefino N, Goard MJ, Fu Z, Yasuda R, Looger LL, Arenkiel BR, Gan WB, Feng G (2012) Imaging neural activity using Thy1-GCaMP transgenic mice. *Neuron* 76:297-308.

Chen SY, Wright JW, Barnes CD (1996) The neurochemical and behavioral effects of beta-amyloid peptide(25-35). *Brain Res* 720:54-60.

Chhatwal JP, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ (2006) Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. *Nat Neurosci* 9:870-872.

Cho YH, Friedman E, Silva AJ (1999) Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behav Brain Res* 98:77-87.

Choi DC, Maguschak KA, Ye K, Jang SW, Myers KM, Ressler KJ (2010a) Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2675-2680.

Choi JS, Cain CK, LeDoux JE (2010b) The role of amygdala nuclei in the expression of auditory signaled two-way active avoidance in rats. *Learn Mem* 17:139-147.

Chong ZZ, Li F, Maiese K (2005) Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 49:1-21.

Chourbaji S, Brandwein C, Vogt MA, Dormann C, Hellweg R, Gass P (2008) Nature vs. nurture: can enrichment rescue the behavioural phenotype of BDNF heterozygous mice? *Behav Brain Res* 192:254-258.

Chourbaji S, Hellweg R, Brandis D, Zorner B, Zacher C, Lang UE, Henn FA, Hortnagl H, Gass P (2004) Mice with reduced brain-derived neurotrophic factor expression show decreased choline acetyltransferase activity, but regular brain monoamine levels and unaltered emotional behavior. *Brain Res Mol Brain Res* 121:28-36.

Chourbaji S, Hortnagl H, Molteni R, Riva MA, Gass P, Hellweg R (2012) The impact of environmental enrichment on sex-specific neurochemical circuitries - effects on brain-derived neurotrophic factor and the serotonergic system. *Neuroscience* 220:267-276.

Cirulli F, Berry A, Chiarotti F, Alleva E (2004) Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus* 14:802-807.

Clark RE, Zola SM, Squire LR (2000) Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 20:8853-8860.

Coelho FG, Gobbi S, Andreatto CA, Corazza DI, Pedrosa RV, Santos-Galduroz RF (2013) Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 56:10-15.

Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M (1997) Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 49:71-81.

Costa DA, Cracchiolo JR, Bachstetter AD, Hughes TF, Bales KR, Paul SM, Mervis RF, Arendash GW, Potter H (2007) Enrichment improves cognition in AD mice by amyloid-related and unrelated mechanisms. *Neurobiol Aging* 28:831-844.

Costa MS, Ardais AP, Fioreze GT, Mioranza S, Botton PH, Souza DO, Rocha JB, Porciuncula LO (2012) The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats. *Neuroscience* 222:100-109.

Cotman CW, Su JH (1996) Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 6:493-506.

Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol* 3:12-29.

Crawley J, Goodwin FK (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13:167-170.

Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ (1998) Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res* 812:200-208.

Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr., Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ (2002) Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277:32046-32053.

Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78:151-164.

De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC (2008) Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 31:151-173.

Decker MW (1987) The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res* 434:423-438.

Devan BD, White NM (1999) Parallel information processing in the dorsal striatum: relation to hippocampal function. *J Neurosci* 19:2789-2798.

Devi L, Ohno M (2012) 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 37:434-444.

Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55:51-86.

Dudai Y, Eisenberg M (2004) Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44:93-100.

Eacott MJ, Gaffan EA (2005) The roles of perirhinal cortex, postrhinal cortex, and the fornix in memory for objects, contexts, and events in the rat. *Q J Exp Psychol B* 58:202-217.

Edelmann E, Lessmann V, Brigadski T (2014) Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76 Pt C:610-627.

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257-269.

Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C (2007) The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30:123-152.

Endres T, Lessmann V (2012) Age-dependent deficits in fear learning in heterozygous BDNF knockout mice. *Learn Mem* 19:561-570.

Ennaceur A (2010) One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 215:244-254.

Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59.

Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin SA, Vieira VJ, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2010) Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J Neurosci* 30:5368-5375.

Erickson KI, Voss MW, Prakash RS, Basak C, Szabo A, Chaddock L, Kim JS, Heo S, Alves H, White SM, Wojcicki TR, Mailey E, Vieira VJ, Martin SA, Pence BD, Woods JA, McAuley E, Kramer AF (2011) Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3017-3022.

Ermini FV, Grathwohl S, Radde R, Yamaguchi M, Staufenbiel M, Palmer TD, Jucker M (2008) Neurogenesis and alterations of neural stem cells in mouse models of cerebral amyloidosis. *Am J Pathol* 172:1520-1528.

Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL (2012) The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 76:1057-1070.

Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindfors N (1992) Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neurosci Lett* 138:153-156.

Farr SA, Ripley JL, Sultana R, Zhang Z, Niehoff ML, Platt TL, Murphy MP, Morley JE, Kumar V, Butterfield DA (2014) Antisense oligonucleotide against GSK-3beta in brain of SAMP8 mice improves learning and memory and decreases oxidative stress: Involvement of transcription factor Nrf2 and implications for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 67:387-395.

Feld M, Krawczyk MC, Sol FM, Blake MG, Baratti CM, Romano A, Boccia MM (2013) Decrease of ERK/MAPK Overactivation in Prefrontal Cortex Reverses Early Memory Deficit in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*.

Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Mendonca VA, Ojopi EB, Gattaz WF, Teixeira AL (2009) Increased serum IL-1beta level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28:507-512.

Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Radanovic M, Yassuda MS, Ojopi EB, Gattaz WF (2010) Clinical and biological predictors of Alzheimer's disease in patients with amnesic mild cognitive impairment. *Rev Bras Psiquiatr* 32:216-222.

Francia N, Cirulli F, Chiarotti F, Antonelli A, Aloe L, Alleva E (2006) Spatial memory deficits in middle-aged mice correlate with lower exploratory activity and a subordinate status: role of hippocampal neurotrophins. *Eur J Neurosci* 23:711-728.

Friedman WJ, Ibanez CF, Hallbook F, Persson H, Cain LD, Dreyfus CF, Black IB (1993) Differential actions of neurotrophins in the locus coeruleus and basal forebrain. *Exp Neurol* 119:72-78.

Fu W, Lu C, Mattson MP (2002) Telomerase mediates the cell survival-promoting actions of brain-derived neurotrophic factor and secreted amyloid precursor protein in developing hippocampal neurons. *J Neurosci* 22:10710-10719.

Fukumoto N, et al. (2010) Sexually dimorphic effect of the Val66Met polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease: New data and meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B:235-242.

Furini CR, Rossato JI, Bitencourt LL, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2010) Beta-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus* 20:672-683.

Galindo MF, Ikuta I, Zhu X, Casadesus G, Jordan J (2010) Mitochondrial biology in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurochem* 114:933-945.

Gengler S, Hamilton A, Holscher C (2010) Synaptic plasticity in the hippocampus of a APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease is impaired in old but not young mice. *PLoS One* 5:e9764.

Gibbs RB (1998) Levels of *trkA* and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. *Brain Res* 810:294.

Ginsberg SD, Alldred MJ, Counts SE, Cataldo AM, Neve RL, Jiang Y, Wu J, Chao MV, Mufson EJ, Nixon RA, Che S (2010) Microarray analysis of hippocampal CA1 neurons implicates early endosomal dysfunction during Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry* 68:885-893.

Gottmann K, Mittmann T, Lessmann V (2009) BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp Brain Res* 199:203-234.

Gunstad J, Benitez A, Smith J, Glickman E, Spitznagel MB, Alexunder T, Juvancic-Heltzel J, Murray L (2008) Serum brain-derived neurotrophic factor is associated with cognitive function in healthy older adults. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 21:166-170.

Ha DH, Robertson RT, Ribak CE, Weiss JH (1996) Cultured basal forebrain cholinergic neurons in contact with cortical cells display synapses, enhanced morphological features, and decreased dependence on nerve growth factor. *J Comp Neurol* 373:451-465.

Hartmann M, Heumann R, Lessmann V (2001) Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* 20:5887-5897.

Harvey DR, McGauran AM, Murphy J, Burns L, McMonagle E, Commins S (2008) Emergence of an egocentric cue guiding and allocentric inferring strategy that mirrors hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* 89:462-479.

Hayashi M, Mistunaga F, Ohira K, Shimizu K (2001) Changes in BDNF-immunoreactive structures in the hippocampal formation of the aged macaque monkey. *Brain Res* 918:191-196.

Hefendehl JK, Wegenast-Braun BM, Liebig C, Eicke D, Milford D, Calhoun ME, Kohsaka S, Eichner M, Jucker M (2011) Long-term in vivo imaging of beta-amyloid plaque appearance and growth in a mouse model of cerebral beta-amyloidosis. *J Neurosci* 31:624-629.

Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12:656-670.

Herring A, Lewejohann L, Panzer AL, Donath A, Kroll O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K (2011) Preventive and therapeutic types of environmental enrichment counteract beta amyloid pathology by different molecular mechanisms. *Neurobiol Dis* 42:530-538.

Heumann R (1994) Neurotrophin signalling. *Curr Opin Neurobiol* 4:668-679.

Hill RA, van den Buuse M (2011) Sex-dependent and region-specific changes in TrkB signaling in BDNF heterozygous mice. *Brain Res* 1384:51-60.

Hoelzl G, Edelmann E, Lessmann V, Endres T, Impaired fear learning in APP/PS1 mice (2014). In Vorbereitung

Hohmann GF, Wenk GL, Lowenstein P, Brown ME, Coyle JT (1987) Age-related recurrence of basal forebrain lesion-induced cholinergic deficits. *Neurosci Lett* 82:253-259.

- Hollenbeck PJ (1996) The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci* 1:d91-102.
- Hollenbeck PJ, Saxton WM (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118:5411-5419.
- Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnestock M (2000) Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 76:347-354.
- Hopkins ME, Bucci DJ (2010) BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 94:278-284.
- Hopkins ME, Nitecki R, Bucci DJ (2011) Physical exercise during adolescence versus adulthood: differential effects on object recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* 194:84-94.
- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52:831-843.
- Hu Y, Russek SJ (2008) BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem* 105:1-17.
- Hu YS, Long N, Pigino G, Brady ST, Lazarov O (2013) Molecular mechanisms of environmental enrichment: impairments in Akt/GSK3beta, neurotrophin-3 and CREB signaling. *PLoS One* 8:e64460.
- Hu YS, Xu P, Pigino G, Brady ST, Larson J, Lazarov O (2010) Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice. *FASEB J* 24:1667-1681.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Huang X, Atwood CS, Hartshorn MA, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Cuajungco MP, Gray DN, Lim J, Moir RD, Tanzi RE, Bush AI (1999a) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 38:7609-7616.
- Huang X, Cuajungco MP, Atwood CS, Hartshorn MA, Tyndall JD, Hanson GR, Stokes KC, Leopold M, Multhaup G, Goldstein LE, Scarpa RC, Sunders AJ, Lim J, Moir RD, Glabe C, Bowden EF, Masters CL, Fairlie DP, Tanzi RE, Bush AI (1999b) Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J Biol Chem* 274:37111-37116.
- Hwang JJ, Park MH, Choi SY, Koh JY (2005) Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. *J Biol Chem* 280:11995-12001.
- Hwang JJ, Park MH, Koh JY (2007) Copper activates TrkB in cortical neurons in a metalloproteinase-dependent manner. *J Neurosci Res* 85:2160-2166.
- Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol* 164:45-52.

Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Bianchi B, Sun YE, Ye K (2010) A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2687-2692.

Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV (2005) Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:5217-5224.

Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Chishti MA, Horne P, Heslin D, French J, Mount HT, Nixon RA, Mercken M, Bergeron C, Fraser PE, St George-Hyslop P, Westaway D (2000) A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408:979-982.

Johnston AN, Rose SP (2001) Memory consolidation in day-old chicks requires BDNF but not NGF or NT-3; an antisense study. *Brain Res Mol Brain Res* 88:26-36.

Kambeitz JP, Bhattacharyya S, Kambeitz-Ilankovic LM, Valli I, Collier DA, McGuire P (2012) Effect of BDNF val(66)met polymorphism on declarative memory and its neural substrate: a meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 36:2165-2177.

Karege F, Schwald M, Cisse M (2002) Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett* 328:261-264.

Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kuleskaya N, Agustsdottir A, Antila H, Popova D, Akamine Y, Bahi A, Sullivan R, Hen R, Drew LJ, Castren E (2011) Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science* 334:1731-1734.

Katoh-Semba R, Semba R, Takeuchi IK, Kato K (1998) Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Neurosci Res* 31:227-234.

Kemppainen S, Rantamaki T, Jeronimo-Santos A, Lavoisier G, Autio H, Karpova N, Karkkainen E, Staven S, Vicente MH, Outeiro TF, Diogenes MJ, Laroche S, Davis S, Sebastiao AM, Castren E, Tanila H (2012) Impaired TrkB receptor signaling contributes to memory impairment in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 33:1122-1139.

Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF (2000) BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* 19:1290-1300.

Klapdor K, VanderStaay FJ (1996) The Morris water-escape task in mice: Strain differences and effects of intra-maze contrast and brightness. *Physiology & Behavior* 60:1247-1254.

Klug M, Hill RA, Choy KH, Kyrios M, Hannan AJ, van den BM (2012) Long-term behavioral and NMDA receptor effects of young-adult corticosterone treatment in BDNF heterozygous mice. *Neurobiol Dis* 46:722-731.

Kolbeck R, Bartke I, Eberle W, Barde YA (1999) Brain-derived neurotrophic factor levels in the nervous system of wild-type and neurotrophin gene mutant mice. *J Neurochem* 72:1930-1938.

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8856-8860.

- Kundel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038.
- Kunugi H, Ueki A, Otsuka M, Isse K, Hirasawa H, Kato N, Nabika T, Kobayashi S, Nanko S (2001) A novel polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene associated with late-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 6:83-86.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Maetzler W, Wittorf A, Soekadar S, Richartz E, Koehler N, Bartels M, Buchkremer G, Schott K (2007) BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res* 41:387-394.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Schott K, Langer H, Gawaz M (2006a) Decreased brain-derived neurotrophic factor (BDNF)- and beta-thromboglobulin (beta-TG)- blood levels in Alzheimer's disease. *Thromb Haemost* 96:102-103.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, Bartels M, Buchkremer G, Schott K (2006b) Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113:1217-1224.
- Lazarov O, Robinson J, Tang YP, Hairston IS, Korade-Mirnic Z, Lee VM, Hersh LB, Sapolsky RM, Mirnic K, Sisodia SS (2005) Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120:701-713.
- LeDoux J (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* 44:1229-1238.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- Lee AC, Rahman S, Hodges JR, Sahakian BJ, Graham KS (2003) Associative and recognition memory for novel objects in dementia: implications for diagnosis. *Eur J Neurosci* 18:1660-1670.
- Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.
- Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.
- Li G, Peskind ER, Millard SP, Chi P, Sokal I, Yu CE, Bekris LM, Raskind MA, Galasko DR, Montine TJ (2009) Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS One* 4:e5424.
- Linnarsson S, Bjorklund A, Ernfors P (1997) Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 9:2581-2587.
- Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD (2010a) Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res*.
- Liu P, Bilkey DK (1998) Perirhinal cortex contributions to performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 112:304-315.

Liu X, Chan CB, Jang SW, Pradoldej S, Huang J, He K, Phun LH, France S, Xiao G, Jia Y, Luo HR, Ye K (2010b) A Synthetic 7,8-Dihydroxyflavone Derivative Promotes Neurogenesis and Exhibits Potent Antidepressant Effect. *J Med Chem*.

Liu X, Qi Q, Xiao G, Li J, Luo HR, Ye K (2013) O-methylated metabolite of 7,8-dihydroxyflavone activates TrkB receptor and displays antidepressant activity. *Pharmacology* 91:185-200.

Lo AC, Callaerts-Vegh Z, Nunes AF, Rodrigues CM, D'Hooge R (2013a) Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) supplementation prevents cognitive impairment and amyloid deposition in APP/PS1 mice. *Neurobiol Dis* 50:21-29.

Lo AC, Tesseur I, Scopes DI, Nerou E, Callaerts-Vegh Z, Vermaercke B, Treherne JM, De SB, D'Hooge R (2013) Dose-dependent improvements in learning and memory deficits in APP/PS1-21 transgenic mice treated with the orally active Abeta toxicity inhibitor SEN1500. *Neuropharmacology* 75C:458-466.

Lok K, Zhao H, Shen H, Wang Z, Gao X, Zhao W, Yin M (2013) Characterization of the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease in senescence accelerated background. *Neurosci Lett*.

Lolova I, Davidoff M (1990) Histo- and immunohistochemical changes in acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities in the amygdaloid complex in aged rats. *Acta Histochem* 89:173-182.

Lustbader JW, et al. (2004) AβAD directly links Aβeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304:448-452.

Lyons WE, Mamounas LA, Ricarte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15239-15244.

MacQueen GM, Ramakrishnan K, Croll SD, Siuciak JA, Yu G, Young LT, Fahnstock M (2001) Performance of heterozygous brain-derived neurotrophic factor knockout mice on behavioral analogues of anxiety, nociception, and depression. *Behav Neurosci* 115:1145-1153.

Maei HR, Zaslavsky K, Teixeira CM, Frankland PW (2009) What is the Most Sensitive Measure of Water Maze Probe Test Performance? *Front Integr Neurosci* 3:4.

Maren S (2011) Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron* 70:830-845.

Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5:844-852.

Markham A, Bains R, Franklin P, Spedding M (2014) Changes in mitochondrial function are pivotal in neurodegenerative and psychiatric disorders: how important is BDNF? *Br J Pharmacol* 171:2206-2229.

Markham A, Cameron I, Bains R, Franklin P, Kiss JP, Schwendimann L, Gressens P, Spedding M (2012) Brain-derived neurotrophic factor-mediated effects on mitochondrial respiratory coupling and neuroprotection share the same molecular signalling pathways. *Eur J Neurosci* 35:366-374.

Markham A, Cameron I, Franklin P, Spedding M (2004) BDNF increases rat brain mitochondrial respiratory coupling at complex I, but not complex II. *Eur J Neurosci* 20:1189-1196.

Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, Jr., Morris JC (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56:127-129.

Matrone C, Ciotti MT, Mercanti D, Marolda R, Calissano P (2008) NGF and BDNF signaling control amyloidogenic route and Abeta production in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:13139-13144.

Minichiello L, Korte M, Wolfert D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R (1999) Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24:401-414.

Mizuno M, Yamada K, He J, Nakajima A, Nabeshima T (2003) Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem* 10:108-115.

Moehlmann T, Winkler E, Xia X, Edbauer D, Murrell J, Capell A, Kaether C, Zheng H, Ghetti B, Haass C, Steiner H (2002) Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8025-8030.

Molendijk ML, Bus BA, Spinhoven P, Kaimatzoglou A, Oude Voshaar RC, Penninx BW, van IJzendoorn MH, Elzinga BM (2012) A systematic review and meta-analysis on the association between BDNF val(66)met and hippocampal volume--a genuine effect or a winners curse? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 159B:731-740.

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

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.

Moscardo E, Salvetti B, Becchi S, Bertini G, Fabene PF (2012) The Novel Object Recognition Test in Rodents: Which Are the Essential Methodological Aspects? *Proceedings of Measuring Behavior* 28-31.

Moser E, Moser MB, Undersen P (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13:3916-3925.

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

Mou L, Heldt SA, Ressler KJ (2010) Rapid brain-derived neurotrophic factor-dependent sequestration of amygdala and hippocampal GABA(A) receptors via different tyrosine receptor kinase B-mediated phosphorylation pathways. *Neuroscience*.

Mu JS, Li WP, Yao ZB, Zhou XF (1999) Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res* 835:259-265.

- Muller WE, Eckert A, Kurz C, Eckert GP, Leuner K (2010) Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease--therapeutic aspects. *Mol Neurobiol* 41:159-171.
- Munoz PC, Aspe MA, Contreras LS, Palacios AG (2010) Correlations of recognition memory performance with expression and methylation of brain-derived neurotrophic factor in rats. *Biol Res* 43:251-258.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R (2001) Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 63:71-124.
- Nabeshima T, Nitta A (1994) Memory impairment and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid protein in rats. *Tohoku J Exp Med* 174:241-249.
- Nagahara AH, Mateling M, Kovacs I, Wang L, Eggert S, Rockenstein E, Koo EH, Masliah E, Tuszynski MH (2013) Early BDNF Treatment Ameliorates Cell Loss in the Entorhinal Cortex of APP Transgenic Mice. *J Neurosci* 33:15596-15602.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH (2009) Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15:331-337.
- Nakajo Y, Miyamoto S, Nakano Y, Xue JH, Hori T, Yanamoto H (2008) Genetic increase in brain-derived neurotrophic factor levels enhances learning and memory. *Brain Res* 1241:103-109.
- Newman M, Musgrave IF, Lardelli M (2007) Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *Biochim Biophys Acta* 1772:285-297.
- Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T (1994) beta-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 170:63-66.
- Nunan J, Small DH (2000) Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett* 483:6-10.
- Opazo C, Huang X, Cherny RA, Moir RD, Roher AE, White AR, Cappai R, Masters CL, Tanzi RE, Inestrosa NC, Bush AI (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease beta-amyloid. Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol, and biological reducing agents to neurotoxic H₂O₂. *J Biol Chem* 277:40302-40308.
- Ou LC, Yeh SH, Gean PW (2010) Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiol Learn Mem* 93:372-382.
- Park SS, Stranahan AM, Chadwick W, Zhou Y, Wang L, Martin B, Becker KG, Maudsley S (2011) Cortical gene transcription response patterns to water maze training in aged mice. *BMC Neurosci* 12:63.
- Pattwell SS, Bath KG, Perez-Castro R, Lee FS, Chao MV, Ninan I (2012) The BDNF Val66Met polymorphism impairs synaptic transmission and plasticity in the infralimbic medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 32:2410-2421.

Peng S, Garzon DJ, Marchese M, Klein W, Ginsberg SD, Francis BM, Mount HT, Mufson EJ, Salehi A, Fahnstock M (2009) Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:9321-9329.

Peters J, eppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ (2010) Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF. *Science* 328:1288-1290.

Petzold A, Psotta L, Endres T, Leßmann V (2014) Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. In Vorbereitung

Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW (1991) BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7:695-702.

Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, Rosenthal A, Winslow JW (1990) Widespread expression of BDNF but not NT3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* 250:290-294.

Pietro Paolo S, Paterna JC, Bueler H, Feldon J, Yee BK (2007) Bidirectional changes in water-maze learning following recombinant adenovirus-associated viral vector (rAAV)-mediated brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Behav Pharmacol* 18:533-547.

Poon WW, Blurton-Jones M, Tu CH, Feinberg LM, Chabrier MA, Harris JW, Jeon NL, Cotman CW (2011) beta-Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking. *Neurobiol Aging* 32:821-833.

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26:7212-7221.

Priller C, Mitteregger G, Paluch S, Vassallo N, Staufenbiel M, Kretschmar HA, Jucker M, Herms J (2009) Excitatory synaptic transmission is depressed in cultured hippocampal neurons of APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging* 30:1227-1237.

Psotta L, Lessmann V, Endres T (2013) Impaired fear extinction learning in adult heterozygous BDNF knock-out mice. *Neurobiol Learn Mem* 103:34-38.

Psotta L, Rockhar C, Bock J, Gruss M, Kirches E, Braun AK, Endres T, Leßmann V (2014) Impact of endogenous deficiency of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in a novel model of Alzheimer's disease. In Vorbereitung

Puolivali J, Wang J, Heikkinen T, Heikkilä M, Tapiola T, van GT, Tanila H (2002) Hippocampal A beta 42 levels correlate with spatial memory deficit in APP and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis* 9:339-347.

Puzzo D, Lee L, Palmeri A, Calabrese G, Arancio O (2014) Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem Pharmacol* 88:450-467.

Quartu M, Lai ML, Del FM (1999) Neurotrophin-like immunoreactivity in the human hippocampal formation. *Brain Res Bull* 48:375-382.

Quirk GJ, Mueller D (2008) Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33:56-72.

Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jaggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Holscher C, Mathews PM, Jucker M (2006)

Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7:940-946.

Ralph MA, Patterson K, Garrard P, Hodges JR (2003) Semantic dementia with category specificity: a comparative case-series study. *Cogn Neuropsychol* 20:307-326.

Rantamaki T, Kemppainen S, Autio H, Staven S, Koivisto H, Kojima M, Antila H, Miettinen PO, Karkkainen E, Karpova N, Vesa L, Lindemann L, Hoener MC, Tanila H, Castren E (2013) The impact of Bdnf gene deficiency to the memory impairment and brain pathology of APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 8:e68722.

Rattiner LM, Davis M, French CT, Ressler KJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci* 24:4796-4806.

Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ (2005) Brain-derived neurotrophic factor in amygdala-dependent learning. *Neuroscientist* 11:323-333.

Reddy PH, McWeeney S, Park BS, Manczak M, Gutala RV, Partovi D, Jung Y, Yau V, Searles R, Mori M, Quinn J (2004) Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 13:1225-1240.

Redolat R, Mesa-Gresa P (2012) Potential benefits and limitations of enriched environments and cognitive activity on age-related behavioural decline. *Curr Top Behav Neurosci* 10:293-316.

Ren-Patterson RF, Cochran LW, Holmes A, Sherrill S, Huang SJ, Tolliver T, Lesch KP, Lu B, Murphy DL (2005) Loss of brain-derived neurotrophic factor gene allele exacerbates brain monoamine deficiencies and increases stress abnormalities of serotonin transporter knockout mice. *J Neurosci Res* 79:756-771.

Rhein V, Song X, Wiesner A, Ittner LM, Baysang G, Meier F, Ozmen L, Bluethmann H, Drose S, Brandt U, Savaskan E, Czech C, Gotz J, Eckert A (2009) Amyloid-beta and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20057-20062.

Robbins TW, Arnsten AF (2009) The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annu Rev Neurosci* 32:267-287.

Rohe M, Synowitz M, Glass R, Paul SM, Nykjaer A, Willnow TE (2009) Brain-derived neurotrophic factor reduces amyloidogenic processing through control of SORLA gene expression. *J Neurosci* 29:15472-15478.

Romero-Granados R, Fontan-Lozano A, gado-Garcia JM, Carrion AM (2010) From learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus* 20:584-595.

Roof RL, Zhang Q, Glasier MM, Stein DG (1993) Gender-specific impairment on Morris water maze task after entorhinal cortex lesion. *Behav Brain Res* 57:47-51.

Rosas-Vidal LE, Do-Monte FH, Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2014) Hippocampal-Prefrontal BDNF and Memory for Fear Extinction. *Neuropsychopharmacology*.

Rupp NJ, Wegenast-Braun BM, Radde R, Calhoun ME, Jucker M (2010) Early onset amyloid lesions lead to severe neuritic abnormalities and local, but not global neuron loss in APPS1 transgenic mice. *Neurobiol Aging*.

Ruscheweyh R, Willemer C, Kruger K, Duning T, Warnecke T, Sommer J, Volker K, Ho HV, Mooren F, Knecht S, Floel A (2011) Physical activity and memory functions: an interventional study. *Neurobiol Aging* 32:1304-1319.

Saarelainen T, Pussinen R, Koponen E, Alhonen L, Wong G, Sirvio J, Castren E (2000) Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons have impaired long-term spatial memory but normal hippocampal LTP. *Synapse* 38:102-104.

Sakata K, Jin L, Jha S (2010) Lack of promoter IV-driven BDNF transcription results in depression-like behavior. *Genes Brain Behav* 9:712-721.

Salehi A, Verhaagen J, Dijkhuizen PA, Swaab DF (1996) Co-localization of high-affinity neurotrophin receptors in nucleus basalis of Meynert neurons and their differential reduction in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 75:373-387.

Sastre M, Klockgether T, Heneka MT (2006) Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 24:167-176.

Scharfman HE, MacLusky NJ (2006) Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Front Neuroendocrinol* 27:415-435

Scharfman HE, Mercurio TC, Goodman JH, Wilson MA, MacLusky NJ (2003) Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23:11641-11652.

Schindowski K, Belarbi K, Buee L (2008) Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav* 7 Suppl 1:43-56.

Scholtzova H, Wadghiri YZ, Douadi M, Sigurdsson EM, Li YS, Quartermain D, Banerjee P, Wisniewski T (2008) Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's-disease-model transgenic mice shown as by micromagnetic resonance imaging. *J Neurosci Res* 86:2784-2791.

Schulz-Klaus B, Lessmann V, Endres T (2013) BDNF-dependent consolidation of fear memories in the perirhinal cortex. *Front Behav Neurosci* 7:205.

Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.

Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.

Seoane A, Tinsley CJ, Brown MW (2011) Interfering with perirhinal brain-derived neurotrophic factor expression impairs recognition memory in rats. *Hippocampus* 21:121-126.

Siegmund A, Langnaese K, Wotjak CT (2005) Differences in extinction of conditioned fear in C57BL/6 substrains are unrelated to expression of alpha-synuclein. *Behav Brain Res* 157:291-298.

Sik A, van NP, Prickaerts J, Blokland A (2003) Performance of different mouse strains in an object recognition task. *Behav Brain Res* 147:49-54.

Silhol M, Arancibia S, Maurice T, Tapia-Arancibia L (2007) Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience* 146:962-973.

Silhol M, Bonnichon V, Rage F, Tapia-Arancibia L (2005) Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132:613-624.

Soliman F, Glatt CE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SS, Jing D, Tottenham N, Amso D, Somerville LH, Voss HU, Glover G, Ballon DJ, Liston C, Teslovich T, Van KT, Lee FS, Casey BJ (2010) A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. *Science* 327:863-866.

Sotres-Bayon F, Quirk GJ (2010) Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol* 20:231-235.

Specht CG, Schoepfer R (2001) Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC Neurosci* 2:11.

Springer JE, Tayrien MW, Loy R (1987) Regional analysis of age-related changes in the cholinergic system of the hippocampal formation and basal forebrain of the rat. *Brain Res* 407:180-184.

Stokin GB, Goldstein LS (2006) Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem* 75:607-627.

Sukumar D, Rengaswamy M, Chakravarthy VS (2012) Modeling the contributions of Basal ganglia and Hippocampus to spatial navigation using reinforcement learning. *PLoS One* 7:e47467.

Swerdlow RH (2007) Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? *Neurobiol Aging* 28:1465-1480.

Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM (2010) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2:S265-S279.

Szapacs ME, Numis AL, Andrews AM (2004) Late onset loss of hippocampal 5-HT and NE is accompanied by increases in BDNF protein expression in mice co-expressing mutant APP and PS1. *Neurobiol Dis* 16:572-580.

Taguchi K, Yamagata HD, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T (2005) Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 57:585-588.

Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S (2008) New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev* 59:201-220.

Terry AV, Jr. (2009) Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd edition.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.

Theuns J, Marjaux E, Vundenbulcke M, Van LK, Kumar-Singh S, Bormans G, Brouwers N, Van den BM, Vennekens K, Corsmit E, Cruts M, De SB, Van BC, Vundenberghe R (2006) Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Hum Mutat* 27:888-896.

Thornton E, Vink R, Blumbergs PC, Van Den HC (2006) Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain Res* 1094:38-46.

Tillement L, Lecanu L, Papadopoulos V (2011) Alzheimer's disease: effects of beta-amyloid on mitochondria. *Mitochondrion* 11:13-21.

Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ (2007) Soluble Aβ inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* 282:33305-33312.

Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572:477-492.

Trinchese F, Liu SM, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O (2004) Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Annals of Neurology* 55:801-814.

Trushina E, Nemetlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, Siddiqui A, Tamura Y, Sesaki H, Wengenack TM, Dzeja PP, Poduslo JF (2012) Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS One* 7:e32737.

Tsai SJ, Hong CJ, Liu HC, Liu TY, Hsu LE, Lin CH (2004) Association analysis of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphisms with Alzheimer's disease and age of onset. *Neuropsychobiology* 49:10-12.

Tsai SJ, Hong CJ, Liu HC, Liu TY, Liou YJ (2006) The brain-derived neurotrophic factor gene as a possible susceptibility candidate for Alzheimer's disease in a Chinese population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 21:139-143.

Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305.

Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD (2002) From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9:224-237.

Uutela M, Lindholm J, Louhivuori V, Wei H, Louhivuori LM, Pertovaara A, Akerman K, Castren E, Castren ML (2012) Reduction of BDNF expression in Fmr1 knockout mice worsens cognitive deficits but improves hyperactivity and sensorimotor deficits. *Genes Brain Behav* 11:513-523.

- Vazquez-Sanroman D, Sanchis-Segura C, Toledo R, Hernandez ME, Manzo J, Miquel M (2013) The effects of enriched environment on BDNF expression in the mouse cerebellum depending on the length of exposure. *Behav Brain Res* 243:118-128.
- Vepsalainen S, Castren E, Helisalml S, Iivonen S, Mannermaa A, Lehtovirta M, Hanninen T, Soininen H, Hiltunen M (2005) Genetic analysis of BDNF and TrkB gene polymorphisms in Alzheimer's disease. *J Neurol* 252:423-428.
- Walker ES, Martinez M, Brunkan AL, Goate A (2005) Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios. *J Neurochem* 92:294-301.
- Webster SJ, Bachstetter AD, Van Eldik LJ (2013) Comprehensive behavioral characterization of an APP/PS-1 double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 5:28.
- Wegenast-Braun BM, Fulgencio MA, Eicke D, Radde R, Herzig MC, Staufenbiel M, Jucker M, Calhoun ME (2009) Independent effects of intra- and extracellular Abeta on learning-related gene expression. *Am J Pathol* 175:271-282.
- Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E, Esler WP, Maggio JE, Mantyh PW (1998) Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *J Neurosci* 18:2161-2173.
- Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ (2004) Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 24:5901-5908.
- Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, Kempermann G (2006) Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 60:1314-1323.
- Wolfer DP, Lipp HP (2000) Dissecting the behaviour of transgenic mice: is it the mutation, the genetic background, or the environment? *Exp Physiol* 85:627-634.
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453-457.
- Yamada K, Mizuno M, Nabeshima T (2002) Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci* 70:735-744.
- Yanamoto H, Miyamoto S, Nakajo Y, Nakano Y, Hori T, Naritomi H, Kikuchi H (2008) Repeated application of an electric field increases BDNF in the brain, enhances spatial learning, and induces infarct tolerance. *Brain Res* 1212:79-88.
- Yao J, Irwin RW, Zhao L, Nilsen J, Hamilton RT, Brinton RD (2009) Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14670-14675.
- Zeng Y, Lv F, Li L, Yu H, Dong M, Fu Q (2012) 7,8-dihydroxyflavone rescues spatial memory and synaptic plasticity in cognitively impaired aged rats. *J Neurochem* 122:800-811.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3.

Zhang Z, Liu X, Schroeder 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*.

Zheng Z, Sabirzhanov B, Keifer J (2010) Oligomeric amyloid- β inhibits the proteolytic conversion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), AMPA receptor trafficking, and classical conditioning. *J Biol Chem* 285:34708-34717.

Zhu SW, Codita A, Bogdanovic N, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B, Dickins DW, Mohammed AH (2009) Influence of environmental manipulation on exploratory behaviour in male BDNF knockout mice. *Behav Brain Res* 197:339-346.

Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA, Perry G (2004) Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1000:32-39.

Zuccato C, Cattaneo E (2009) Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* 5:311-322.

Anhang

Puffer und Lösungen

Lysepuffer für ELISA-Messungen

Substanz	Konzentration	Hersteller
NaCl	1 M	Roth
Tris-HCl	0,5 M	Sigma
Nonoxynol		Roche
Glycerol	80%	Roth
PMSF	200 mM	Sigma
Aprotinin	2 mg/ml	Roche
Leupeptin	1 mg/ml	Roche

Artificial cerebrospinal fluid (ACSF)

Substanz	Konzentration	Hersteller
CaCl ₂	2 mM	Sigma
Glucose	1 mM	Sigma
KCl	2,5 mM	Sigma
MgCl ₂	1 mM	Sigma
NaCl	125 mM	Roth
NaH ₂ PO ₄	0,8 mM	Merck
NaHCO ₃	25 mM	Sigma

Brain Incubation Medium (BIM 1000), BIM0 (identische Zusammensetzung, ohne EGTA)

Substanz	Konzentration	Hersteller
Mannitol	120 mM	Merck
KCl	60 mM	Merck
KH ₂ PO ₄	5 mM	Merck
MgCl ₂ ·6H ₂ O	5 mM	Merck
MOPS	40 mM	Sigma
EGTA	1 mM	Sigma-Aldrich

Substrate und Substanzen zur Messung der Mitochondrienfunktion

Substanz	Konzentration	Hersteller
Malat	2 mM	Sigma
Glutamat	10 mM	Sigma
Digitonin	50 µg/ml	Sigma
ADP	2 mM	Sigma
CaCl ₂	100/200 µM	Sigma
Pyruvat	10 mM	Sigma
Succinat	10 mM	Sigma
Rotenon	1,5 µM	Sigma
Glycerin3phosphat	10 µM	Sigma
Atractylat	125 µM	Sigma

Lebenslauf

Nachname	Psotta
Name	Laura
Adresse	Langstraße 54 63075 Offenbach
E-Mail	psotta.laura@gmail.com
Telefon	0178/1 66 40 37
Geburtsdatum	20. Oktober 1984
Geburtsort	Offenbach am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung	
04/2000-06/2004	Allgemeine Hochschulreife, erworben an der Claus-von-Stauffenberg-Schule in Rodgau

Studium	
10/2004 – 11/2009	Studium der Biologie an der Goethe Universität in Frankfurt am Main mit dem Abschluss Diplom-Biologin

Promotion	
07/2010 – 07/2014	Promotion am Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät der Otto von Guericke Universität in Magdeburg

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Psotta, L., Rockahr, C., Gruss, M., Kirches, E., Braun, K.A., Lessmann, V., Bock, J. and Endres, T. (2015): “Impact of an additional chronic BDNF reduction on learning performance in an Alzheimer mouse model”, *Front. Behav. Neurosci.* 9

Petzold, A., Psotta, L., Brigadski, T., Endres, T. and Lessmann, V. (2015): “Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment of spatial learning”, *Neurobiology of Learning and Memory*

Psotta, L., Lessmann, V. and Endres, T. (2013): “Impaired fear extinction learning in adult heterozygous BDNF knock-out mice”, *Neurobiology of Learning and Memory* 103: 34-38

Danksagung

Mein größter Dank geht an meinen Betreuer Dr. Thomas Endres. Ohne die herausragende Betreuung hätte diese Arbeit in dieser Form nicht entstehen können. Danken möchte ich ihm für die Unterstützung und das Nahebringen der experimentellen Vorgehensweisen der Verhaltensphysiologie und auch den zahlreichen ertragreichen Diskussionen. Seine Begeisterung für dieses Thema hat mich immer mitgerissen.

Herrn Prof. Dr. Volkmar Leßmann möchte ich für die Möglichkeit danken, am Institut für Physiologie meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für die Bereitstellung des Themas und die produktiven Diskussionen.

Mein ganz spezieller Dank geht an Carolin Rockhar aus dem Institut für Biologie. Die enge Zusammenarbeit war sehr produktiv und hat immer Spaß gemacht. Vielen Dank für die Bereitstellung der Daten die mit in diese Arbeit mit eingeflossen sind.

Großen Dank geht an Herrn Dr. Gellerich und Frau Dr. Zemfira Gizatullina welche mir und Melanie die Möglichkeit der Nutzung der Oxygraphen gegeben haben und für die geduldigen Erklärungen zum Thema und der Methodik der Mitochondrienfunktionalität. Hierbei gilt mein Dank natürlich ebenfalls Melanie Veith ohne deren Hilfe die Messungen bestimmt nicht so gut gelungen wären und Herrn Prof. Dr. Elmar Kirches für die ergiebigen Diskussionen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank den technischen Angestellten Colette Obst und Evelyn Friedl. Vielen Dank für die Unterstützung wenn es um jegliche Fragen der Tierpflege und –organisation ging. Margit Schmidt und Angela Jahn möchte ich ganz herzlich für die immer schnelle Bearbeitung der ELISA-Messungen danken. Ich möchte mich auch bei Dr. Elke Edelman für die Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden und gleichzeitigen Bürokollegen Julia Daniel, Dijana Dobrota, Robert Eckenstaler, Petra Lichtenecker und Bianca Seifert bedanken. Wir hatten eine schöne gemeinsame Zeit. Ich werde euch vermissen.

Dmitry Balakhonov, Gloria Hölzl und Sandra Scheffel möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung der Tierorganisation und den Verhaltensversuchen danken, jedoch auch für die produktiven Gespräche im Rahmen unseres eigenen kleinen Arbeitskreises.

Natürlich nicht zuletzt, möchte ich meiner Familie und meinen Freunden herzlichst danken, die mich in meiner Doktorandenzeit am anderen Ende des Landes in zahlreicher Art und Weise unterstützt haben. Insbesondere Andrea Morcinek und Claudia Fleckenstein, die so fleißig Korrektur gelesen haben. Thilo Mann danke ich für die Unterstützung während dieser Zeit und dafür dass du an meiner Seite bist.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Thema „Einfluss der chronischen Reduktion des endogenen Neurotrophins BDNF auf kognitive Prozesse im APP/PS1 Alzheimer-Mausmodell“ selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Die Ergebnisse der Amyloid-Plauefärbungen, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt und diskutiert werden, wurden von Frau Carolin Rockhar aus dem Institut für Biologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg im Rahmen eines Verbundprojektes durchgeführt und zur Verfügung gestellt.

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.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe und an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Magdeburg, den 26. Juni 2014

Laura Psotta