

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie

Laufen während der Schwangerschaft verbessert im Mausmodell der
Alzheimer-Krankheit die cerebrovaskuläre Funktion der nächsten
Generation

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Ellen Uslar
aus Halle an der Saale
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Jan Buer
1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. K. Keyvani
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. G. Hilken

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2013

Teile dieser Arbeit sind in der folgenden Veröffentlichung enthalten:

Herring, A., Donath, A., Yarmolenko, M., **Uslar, E.**, Conzen, C., Kanakis, D.,
Bosma, C., Worm, K., Paulus, W., Keyvani, K. (2012): Exercise during pregnancy
mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. *FASEB J.* 26, 117–128.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Alzheimer-Krankheit: Geschichte und Epidemiologie	7
1.2	Alzheimer-Krankheit: Klinik und Therapie	7
1.3	Risikofaktoren für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit	8
1.4	Alzheimer-Krankheit: Histopathologie und Pathophysiologie	10
1.4.1	Beta-Amyloid-Plaques	11
1.4.2	Neurofibrilläre Tangles	12
1.4.3	Cerebrale Amyloidangiopathie (CAA)	13
1.5	Alzheimer-Krankheit und die neurovaskuläre Einheit	13
1.5.1	Die neurovaskuläre Einheit	14
1.5.2	RAGE	16
1.5.3	MDR1	17
1.5.4	LRP1	17
1.5.5	APOE	18
1.5.6	A2M	18
1.5.7	LRPAP1	18
1.5.8	APOJ/Clusterin	18
1.6	Transgene Mausmodelle der Alzheimer-Krankheit	19
1.6.1	Einfach transgene Mäuse	19
1.6.2	Doppelt transgene Mäuse	19
1.6.3	Dreifach transgene Mäuse	19
1.7	Effekte kognitiver und physischer Stimulation	20
1.7.1	Effekte von Umweltereicherung auf Gesunde und andere Erkrankungen	20
1.7.2	Effekte postnataler Umweltereicherung auf die Alzheimer-Krankheit	21
1.7.3	Übertragung der Auswirkungen von Umwelteinflüssen auf nachfolgende Generationen	22
1.7.4	Effekte pränataler Stimulation auf Gesunde und andere Erkrankungen	23
1.8	Vorarbeiten	23
1.8.1	Reduktion neurovaskulärer Dysfunktion nach postnataler Stimulation im AD-Tiermodell	23
1.8.2	Reduktion zerebraler A β -Plaques-Belastung der Nachkommen nach pränataler Stimulation	24
1.9	Ziele der Arbeit	24
1.10	Hypothesen	24
2	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	26

2.1	Tiermodell	26
2.2	Tierhaltung	27
2.3	Versuchsaufbau	27
2.4	Gewebeaufbereitung	28
2.5	Nukleinsäureanalyse	29
2.5.1	RNA-Vorbereitung	29
2.5.2	cDNA-Synthese	29
2.5.3	Quantitative Real-time PCR (TaqMan-Assay).....	30
2.6	Proteinanalyse	31
2.6.1	Probenvorbereitung	31
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.6.3	Proteintransfer und Immobilisierung.....	32
2.6.4	Immunologische Proteindetektion	33
2.7	Immunhistologie von Laminin	34
2.8	Stereologische Quantifizierung von Laminin	34
2.9	Statistik	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Effekte von maternalem Laufen auf die neurovaskuläre Einheit.....	36
3.2	Effekte auf die A β -Transportproteine LRP1, RAGE und MDR1	36
3.3	Effekte auf die Expression von <i>Lrpap1</i> , <i>A2m</i> , <i>ApoE</i> und <i>ApoJ</i>	38
3.4	Effekte auf den Grad der Gefäßverzweigungen	39
4	DISKUSSION	41
4.1	Effekte von maternalem Laufen auf die neurovaskuläre Einheit.....	41
4.2	Fazit	45
4.3	Einschränkungen der Arbeit und Ausblick.....	45
5	ZUSAMMENFASSUNG	50
6	LITERATURVERZEICHNIS	51

7 ANHANG	64
7.1 Abkürzungsverzeichnis	64
7.2 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Geräte.....	66
7.2.1 Chemikalien.....	66
7.2.2 Lösungen und Puffer	67
7.2.3 Materialien, Geräte und Software.....	68
8 DANKSAGUNG	69
9 LEBENSLAUF	70

1 Einleitung

1.1 Alzheimer-Krankheit: Geschichte und Epidemiologie

Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieb der Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer den ersten Fall einer Patientin mit progressivem Gedächtnisverlust, zunehmender räumlicher Desorientierung und Paranoia. Auguste D. war eine 51 – jährige Patientin, bei der sich die Symptome innerhalb von fünf Jahren entwickelt hatten. Nach ihrem Tod konnte Alzheimer in ihrem Gehirn Proteinablagerungen (Amyloid-Plaques) und neurofibrilläre Bündel (Neurofibrilläre Tangles, NFT) identifizieren (Alzheimer, 1907). Später wurde diese bisher unbekannte Erkrankung des Gehirns von dem Psychiater Emil Kraepelin nach ihrem Entdecker „Alzheimer-Krankheit“ (engl. *Alzheimer's Disease*, AD) benannt (Kraepelin, 1909). Innerhalb der Demenzerkrankungen ist die AD mit ca. 60 % die häufigste Ursache für Demenz. Der Hauptrisikofaktor ist das Alter. Die Prävalenz verdoppelt sich von 2 % bei den 60 bis 65-Jährigen alle fünf Jahre, bis ab einem Alter von 85 Jahren jeder Dritte betroffen ist (Brookmeyer et al., 2007). Studien an Hundertjährigen haben jedoch gezeigt, dass AD nicht zwangsläufig eine Folge des Alters sein muss (den Dunnen et al., 2008).

Im Jahre 2010 waren weltweit mehr als 36 Millionen Personen von der AD betroffen und verursachten geschätzte jährliche Kosten von 604 Milliarden US\$. Angesichts der zunehmenden Alterung der Bevölkerung und einer steigenden Lebenserwartung wird geschätzt, dass sich die Anzahl der AD-Patienten bis 2050 verdreifachen wird (Wimo & Prince, 2010).

1.2 Alzheimer-Krankheit: Klinik und Therapie

Im Jahre 2011 hat das *National Institute on Aging* (NIA) und die *Alzheimer's Association* neue diagnostische Kriterien und Leitlinien vorgeschlagen. Sie definieren dabei drei Stadien der Erkrankung:

1. Präklinisches Stadium
2. Milde kognitive Einschränkungen (*mild cognitive impairment*, MCI)
3. Demenz aufgrund der Alzheimer-Krankheit

Im präklinischen Stadium zeigen die Patienten bereits messbare Veränderungen des Gehirns, Liquors oder Blutes, jedoch keine Gedächtniseinschränkungen. Diese Veränderungen beginnen schon Jahrzehnte vor der eigentlichen Alzheimer-Erkrankung. Somit ist diese Phase das Ziel erster therapeutischer oder präventiver Maßnahmen. Über dem 65. Lebensjahr zeigen 10–20 % der Menschen MCI, welche jedoch noch nicht zu Einschränkungen des täglichen Lebens führen. Studien zeigen, dass 10 % dieser Personen pro Jahr eine Demenz entwickeln werden (*Alzheimer's Association*, 2012).

Sowohl für die Patienten selbst als auch für ihre Angehörigen ist der genaue Beginn der AD daher schwer zu bestimmen. Bei der klinischen Manifestation der AD kommt es zunächst zu subtilen, nur intermittierend auftretenden Gedächtnisstörungen. Frühe Symptome werden oft als normale Zeichen des Alterns missverstanden. Zu Beginn stehen die Defizite in der Konsolidierung neuer Gedächtnisinhalte im Vordergrund. Nach Jahren eines langsam progredienten Gedächtnisverlustes treten weitere neurologische Ausfälle hinzu, wie Aphasie, Apraxie, Orientierungsstörungen, Verhaltensänderungen und Halluzinationen. Im Stadium der fortgeschrittenen Demenz leiden die Patienten zusätzlich an extrapyramidal-motorischen Störungen, Inkontinenz und dem Ausfall weiterer neurologischer Systeme. Im Endstadium kommt es zum Persönlichkeitszerfall der Betroffenen im Sinne einer Depersonalisierung. Die Patienten werden bettlägerig, erkennen ihre engsten Angehörigen nicht mehr und verharren schließlich in Mutismus und Stupor (Castellani et al., 2010).

Nach klinischer Diagnosestellung beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung meist noch acht bis zehn Jahre. Der Tod tritt bei den meist bettlägerigen Patienten durch respiratorische Komplikationen wie beispielsweise eine Aspirationspneumonie oder kardiovaskuläre Ereignisse ein (*Alzheimer's Association*, 2012).

Obwohl Cholinesteraseinhibitoren und der NMDA-Rezeptorantagonist Memantin zu leichten symptomatischen Verbesserungen führen, ist bisher keine krankheitsmodifizierende Therapie bekannt (Castellani et al., 2010).

1.3 Risikofaktoren für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit

Zur Entstehung der Erkrankung führt höchstwahrscheinlich eine komplexe Interaktion zwischen Genetik, Epigenetik und Umweltfaktoren (Bertram et al., 2010).

Innerhalb der AD können zwei Subtypen unterschieden werden. Je nach Manifestation der ersten Symptome unterscheidet man die frühe AD (*early-onset Alzheimer's disease*, EOAD) und die spät auftretende AD (*late-onset Alzheimer's disease*, LOAD). Die EOAD macht ca. 1–5 % aller Erkrankungsfälle aus und beginnt vor dem 60.–65. Lebensjahr. Die häufigere LOAD umfasst den Großteil aller Erkrankungsfälle und beginnt nach dem 65. Lebensjahr. Zudem kann die sporadische und familiäre AD unterschieden werden, wobei die familiäre Form fast immer früh beginnt und die sporadische Variante nach dem 65. Lebensjahr einsetzt (Anand et al., 2012).

Zur frühen familiären Form der AD können Mutationen innerhalb des Amyloidvorläuferprotein-(*amyloid precursor protein*, APP)-Gens auf Chromosom 21, als auch des Presenilin 1-(PS1)- und Presenilin-2-(PS2)-Gens auf Chromosom 14 bzw. Chromosom 1 führen. Diese Mutationen fördern die amyloidogene APP-Prozessierung und führen zu einer veränderten Produktion verschiedener β -Amyloid (A β)-Peptide (Bertram et al., 2010). Menschen mit Down-Syndrom tragen ein zusätzliches Chromosom 21, auf dem das APP-Gen lokalisiert ist, und entwickeln eine frühe Form der Demenz mit den pathologischen Kennzeichen der AD. Dies unterstützt die Hypothese, dass eine Überexpression von APP zur EOAD führt (Millan Sanchez et al., 2011).

Verschiedene Allele des Apolipoprotein E (APOE)-Gens, insbesondere das ApoE4, zeigen eine starke Assoziation mit der LOAD (> 65. Lebensjahr). Genomweite Assoziationsstudien haben gezeigt, dass ApoE4 die wichtigste Genvariante für das Auftreten der späten Form der Alzheimer-Krankheit ist. Das Lebensrisiko für das Auftreten der AD beträgt für Personen mit zwei Kopien des ApoE4-Allels (ca. 2 % der Bevölkerung) ungefähr 60 % bei einem Alter von 85 Jahren, und für jene mit einer Kopie des Allels (ca. 25 % der Bevölkerung) noch 30 % (Bertram et al., 2010).

Auch epigenetische Mechanismen scheinen eine Rolle in der Entstehung der AD zu spielen (Day & Sweatt, 2011). Studien an *post mortem* entnommenen Gehirnproben, peripheren Leukozyten und am transgenen Tiermodell konnten zeigen, dass sowohl das Altern als auch die Alzheimer-Krankheit mit vielfältigen epigenetischen Dysregulationen assoziiert ist. Zu diesen epigenetischen Veränderungen gehören beispielweise Histon-Modifikationen und Änderungen der DNA-Methylierung in AD-assoziierten Gehirnarealen wie dem Temporallappen

und dem Hippokampus. Obwohl bisher unklar ist, ob die bei Alzheimer-Patienten beobachteten epigenetischen Veränderungen eher die Ursache oder die Folge der Erkrankungen darstellen, scheinen Zwillingsstudien darauf hinzudeuten, dass epigenetische Mechanismen das Alzheimer-Risiko modifizieren können (Chouliaras et al., 2010). Bemerkenswert ist, dass die pharmakologische Inhibition der DNA-Methylierung im Hippokampus bei Mäusen nach einer Lernaufgabe zu einer Beeinträchtigung der Gedächtniskonsolidierung geführt hat (Day & Sweatt, 2011). Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Verstärkung der Histon-Acetylierung zu einer verbesserten Lern- und Gedächtnisleistung bei Mäusen mit einer neurodegenerativen Erkrankung führen kann (Fischer et al., 2007). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass epigenetische Mechanismen sowohl bei Gesunden als auch bei Kranken eine regulierende Rolle im Rahmen von Lernen und Gedächtnis spielen (Day & Sweatt, 2011).

Neben dem Alter als dem wichtigsten nicht-genetischen Risikofaktor konnten epidemiologische Studien Umweltfaktoren identifizieren, die mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit assoziiert sind. Zu diesen weiteren Faktoren gehören u.a. Schädelhirntraumata, kardiovaskuläre Risikofaktoren (z.B. Arterielle Hypertonie und Diabetes) und psychosoziale Faktoren (z.B. Depressionen) (Barnes & Yaffe, 2001). Zudem scheint ein physisch und kognitiv aktiver Lebensstil im mittleren Lebensalter, insbesondere durch regelmäßige körperliche Aktivität, protektiv wirksam zu sein (Buchman et al., 2012; DeFina et al., 2013).

1.4 Alzheimer-Krankheit: Histopathologie und Pathophysiologie

Die wichtigsten histopathologischen Veränderungen in erkrankten Gehirnen stellen die extrazelluläre Ablagerung seniler β -Amyloid-(A β)-Plaques und die intrazelluläre Aggregation neurofibrillärer Bündel (engl. *Neurofibrillary Tangles*, NFTs) dar (Abbildung 1-1). Diese pathologischen Kennzeichen sind seit der Erstbeschreibung durch Alois Alzheimer Teil der Diagnostik und werden auch heute noch zur definitiven postmortalen Diagnose benötigt (Castellani et al., 2010). Sowohl die A β -Peptide als auch das Tau-Protein sind physiologische Zellbestandteile, die bei der Erkrankung in einer veränderten fibrillären Struktur auftreten (Duyckaerts et al., 2009).

Darüber hinaus kommt es zum Untergang von Neuronen und Synapsen und daraus folgender Gehirnatrophie, kongophiler Amyloidangiopathie, erhöhter

Inflammation, vermehrtem oxidativem Stress und Veränderungen der neurovaskulären Einheit (Abbildung 1-1; Castellani et al., 2010).

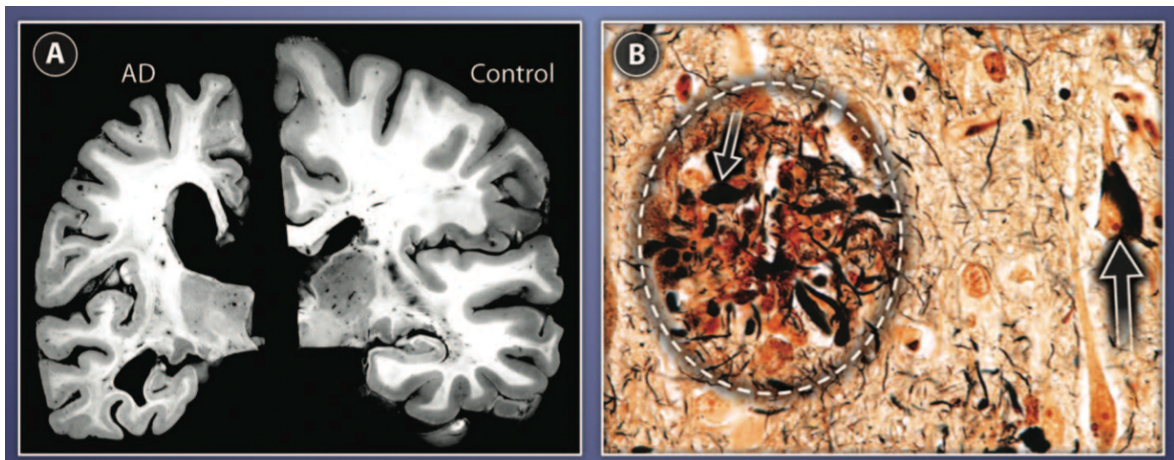


Abbildung 1-1 Pathologie der Alzheimer-Erkrankung

(A) Postmortaler Gehirnschnitt eines AD-Patienten (links) verglichen mit dem eines nicht-dementen gleichaltrigen Individuums (rechts) offenbart eine deutliche Gehirnatrophie bei AD; (B) Hochauflösende Photomikrographie eines neuritischen A β -Plaques (Kreis) mit dystrophischen Neuriten (kleiner Pfeil) und eines Neurofibrillären Tangles (großer Pfeil), 400x Vergrößerung, Silberfärbung; übernommen aus Holtzmann et al., 2011

1.4.1 Beta-Amyloid-Plaques

In der Literatur werden verschiedene Subtypen von Amyloid-Plaques beschrieben, darunter diffuse, neuritische und kompakte Plaques. Die neuritischen Plaques sind dabei jedoch für die Pathogenese am bedeutendsten und stellen das Hauptkriterium für die Diagnose nach den CERAD-(*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*)-Kriterien dar. (Mirra et al., 1991). Die CERAD-Kriterien bilden zusammen mit den Braak-Stadien (Braak & Braak, 1991) die Grundlage der neuropathologischen Diagnostik (Hyman et al., 2012). Erst kürzlich wurde ein Konsensuspapier zur Vereinheitlichung der neuropathologischen Diagnostik veröffentlicht, in dem das sogenannte ABC-System empfohlen wird, dass folgende Veränderungen bewertet: A steht für die Amyloid-Plaque-Dichte, B für die Tau-Pathologie nach Braak und C für die neuritischen Plaques nach den CERAD-Kriterien (Montine et al., 2012).

Die Akkumulation von A β -Peptiden entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau bzw. Abtransport. A β -Peptide bestehen aus 36 bis 43 Aminosäuren. Bei der Alzheimer-Krankheit sind vor allem die 40 und 42 Aminosäuren langen Formen A β_{40} und A β_{42} von Bedeutung, wobei A β_{42} stärker

zur Aggregation neigt und damit mehr neurotoxisches Potential besitzt. Freigesetzt werden sie aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (engl. *Amyloid-Precursor-Protein*, APP), einem Transmembranprotein, das sequentiell gespalten wird. Die Spaltung erfolgt durch zwei verschiedene Enzyme. Dazu gehören eine β -Sekretase (engl. *Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1*, BACE1) und eine γ -Sekretase, ein Protein-Komplex, dessen katalytisches Zentrum Presenilin 1 oder 2 bildet. Die vorherrschende Theorie zur Entstehung der Alzheimer-Krankheit, die Amyloid-Hypothese, sieht die Akkumulation von A β -Peptiden als initiales Ereignis in der Pathogenese der Erkrankung (Hardy & Selkoe, 2002). Die Tatsache, dass Mutationen im APP-, PS1- oder PS2-Gen zu einer frühen erblichen Form der AD führen, unterstützen diesen Erklärungsansatz (Bertram et al., 2010).

Die physiologische Funktion der A β -Peptide ist bisher weitestgehend ungeklärt. A β besitzt die Eigenschaft der spontanen Selbst-Aggregation in verschiedene koexistierende physikalische Formen. Eine mögliche Erscheinungsform sind A β -Oligomere (2-6 Peptide), die Vorstufen der A β -Plaques darstellen. Lösliche Oligomere scheinen die A β -Form mit der größten Toxizität zu sein (Walsh & Selkoe, 2007). Untersuchungen zeigen, dass A β -Oligomere neuro- und synaptotoxisch wirken und damit zur Einschränkung der hippokampalen Langzeitpotenzierung führen (Wilcox et al., 2011). Zudem zeigt sich, dass die Schwere der kognitiven Einschränkungen besser mit dem Level der A β -Oligomere korreliert als mit der Gesamt-A β -Plaques-Belastung (Lue et al., 1999).

1.4.2 Neurofibrilläre Tangles

Das Tau-Protein ist das wichtigste Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) in adulten Neuronen. Bei der Alzheimer-Krankheit und verwandten neurodegenerativen Erkrankungen, den Tauopathien, kommt es zur Hyperphosphorylierung und Aggregation in Form neurofibrillärer Bündel (engl. *Neurofibrillary tangles*, NFTs) (Grundke-Iqbal et al., 1986). Die physiologische Funktion des Tau-Proteins liegt nicht nur in der Stabilisierung des Zytoskelett und dem axonalen Wachstum, sondern auch im Molekül-Transport entlang der Axone. Damit sind sie für den Metabolismus der Zelle essentiell (Weingarten et al., 1975).

Neben den CERAD-Kriterien zur Diagnose der Alzheimer-Erkrankung, die sich auf das Auftreten neuritischer Amyloid-Plaques konzentrieren, existiert die Stadieneinteilung nach Braak und Braak, in deren Fokus die Ausbreitung der NFTs in den verschiedenen Gehirnbereichen steht (Braak & Braak, 1991).

Das genaue Zusammenspiel von A β -Peptiden und Tau ist noch nicht vollständig geklärt. Einige Autoren postulieren, dass das Auftreten von A β -Plaques in der Pathogenese der AD zeitlich und kausal vor der Entstehung von NFTs steht. So wurde festgestellt, dass Mutationen im APP- oder Presenilin-Gen zur Entstehung der AD einschließlich Amyloid-Plaques und NFTs führen. Dagegen kommt es bei Mutationen im Tau-Gen nur zum Auftreten von NFTs, nicht jedoch zur Akkumulation von A β oder der Manifestation der Alzheimer Demenz (Bertram et al., 2010). Obwohl A β eine Schlüsselrolle in der Alzheimer-Pathologie spielt, scheint die Schwere der kognitiven Einschränkungen am stärksten mit der Anzahl der NFTs im Neocortex zu korrelieren (Nelson et al., 2012).

1.4.3 Cerebrale Amyloidangiopathie (CAA)

Im Rahmen der Alzheimer-Krankheit kommt es in über 80 % der Fälle zur zerebralen Amyloidangiopathie (engl. *cerebral amyloid angiopathy*, CAA) (Attems et al., 2007). Die CAA ist charakterisiert durch die extrazelluläre Ablagerung von A β -Peptiden in den Wänden zerebraler und leptomeningealer Blutgefäße (Glennner & Wong, 1984). Die A β -Peptide besitzen neben ihrer schon beschriebenen neuronalen auch eine vaskuläre Toxizität (Paris et al., 2004). Die A β -Peptide lagern sich dabei an der Außenseite der Basalmembran an und führen zu einer neuroinflammatorischen Reaktion der umgebenden Zellen. Durch den Einbau toxischer Peptide kommt es zu einer veränderten Architektur der neurovaskulären Einheit und zum Funktionsverlust mit unzureichendem Nährstoffangebot und einem Ausfall der Filterfunktion der Bluthirnschranke (Bailey et al., 2004). Dementsprechend konnte ein starker Zusammenhang zwischen CAA und messbaren kognitiven Einschränkungen festgestellt werden (Attems et al., 2007).

1.5 Alzheimer-Krankheit und die neurovaskuläre Einheit

Das Gehirn ist, mehr noch als jedes andere Organ, auf eine ausreichende Durchblutung angewiesen. Sauerstoff, Nährstoffe und Hormone müssen zugeführt und Kohlendioxid und andere potentiell toxische Moleküle, wie β -Amyloid, abtransportiert werden. Trotz der Tatsache, dass das Gehirn nur 2 % der Körpermasse ausmacht, benötigt es 20 % des Herzzeitvolumens und ist für 20–25 % des Sauerstoff- und Glucoseverbrauchs des Körpers verantwortlich. Die neurovaskuläre Einheit einschließlich der Bluthirnschranke (BHS) übernimmt die oben beschriebenen Aufgaben (Zlokovic, 2008).

1.5.1 Die neurovaskuläre Einheit

Die neurovaskuläre Einheit umfasst vaskuläre Zellen (Endothel, Perizyten und glatte vaskuläre Muskelzellen), Gliazellen (Astrozyten, Mikroglia und Oligodendroglia) und perivaskuläre Neurone. In der neurovaskulären Einheit bilden die Endothelzellen eine hochspezialisierte Membran um die Blutgefäße. Diese Membran ist Grundlage der BHS, welche den Eintritt von Plasmabestandteilen, Erythrozyten und Leukozyten in das Gehirn limitiert. Gleichzeitig reguliert sie die Lieferung von Energiemetaboliten und Nährstoffen. Die neurovaskuläre Einheit kontrolliert die Permeabilität der BHS und den zerebralen Blutfluss und ist somit für die Aufrechterhaltung des neuronalen Milieus von großer Bedeutung. Die Barrierefunktion der BHS wird durch verschiedene Mechanismen aufrechterhalten, darunter *tight junctions* zwischen den benachbarten Endothelzellen, die den ungehinderten Eintritt von Blutbestandteilen ins Gehirn verhindern, als auch aktive Transportmechanismen, die Moleküle vom Blut ins Gehirn und umgekehrt befördern (Zlokovic, 2008). Abbildung 1-2 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau und die vielfältigen Funktionen der neurovaskulären Einheit.

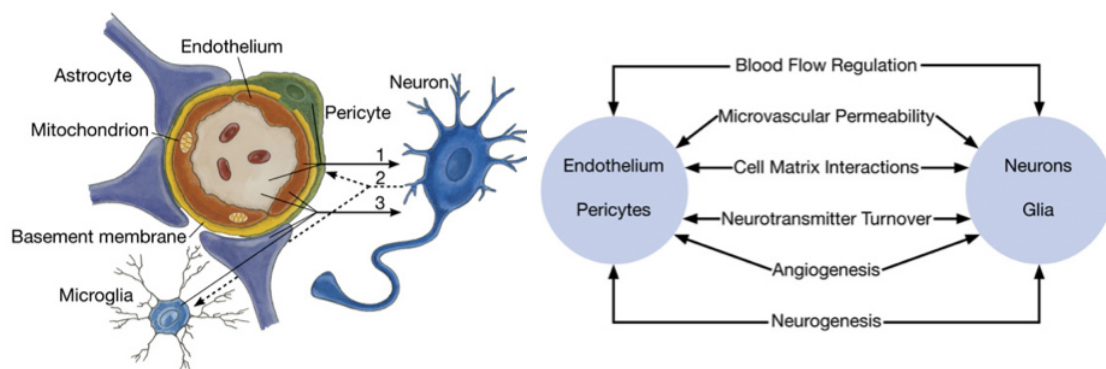


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit und ihrer Funktion

Pfeil 1: Durch neurovaskuläre Schäden können neurotoxische Substanzen die BHS überqueren sowie proinflammatorische Signale und ein reduzierter Blutfluss neuronalen Schaden triggern, Pfeil 2: Mikroglia- und Endothelzellen können neuronale Signale empfangen, Pfeil 3: Die Aktivierung der vaskuloglialen Einheit führt zur Progression des Schadens, übernommen aus Zlokovic, 2008

Die Dysfunktion der BHS ist eng mit der Akkumulation von vaso- und neurotoxischen Molekülen im Gehirnparenchym, der Reduktion des zerebralen Blutflusses und Hypoxie assoziiert. Dies scheint die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zu fördern oder sogar zu initiieren (Abbildung 1-3; Zlokovic, 2011).

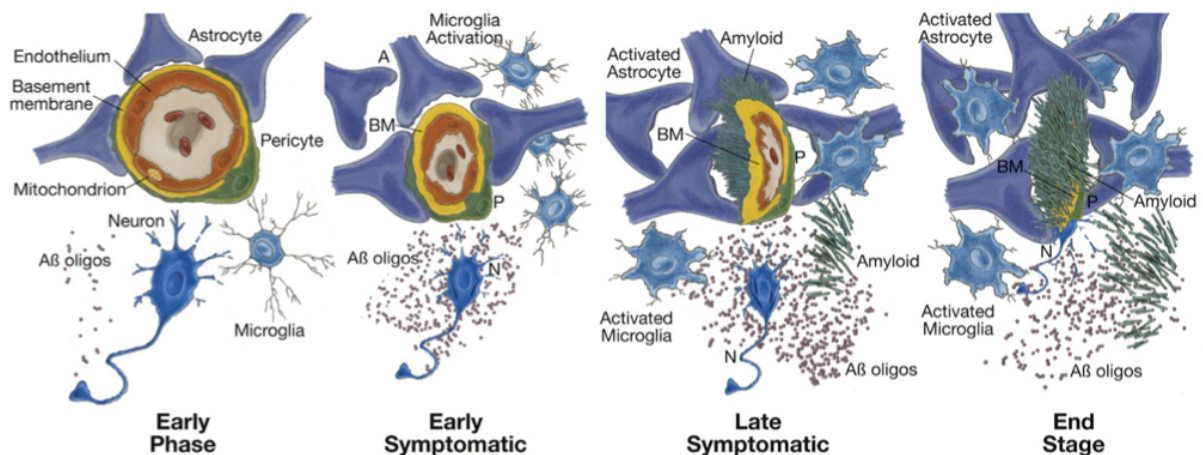


Abbildung 1-3 Schematische Darstellung des Einflusses der neurovaskulären Einheit in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit

Frühstadium: Zerebrale Minderperfusion und eingeschränkter Transport von A β über die BHS führen zur Akkumulation neurotoxischer A β -Oligomere, Frühsymptomatisch: Weitere Abnahme des zerebralen Blutflusses, Aktivierung von Mikroglia, Endothel und Perizyten und zunehmende Akkumulation von A β führen zur Einschränkung neuronaler und synaptischer Funktion, NFTs akkumulieren in Neuronen als Antwort auf ischämischen Schaden und A β , Spätsymptomatisch: Degeneration der Endothelzellwand und Perizyten führt zur weiteren Einschränkung des A β -Transports, Akkumulation metabolischer Abbau-Produkte, pH-Wert-Veränderung und Elektrolyt-Dysbalance, Amyloid akkumuliert an Gefäßwand. Endstadium: Ausgeprägte neuroinflammatorische Antwort, Kollabieren der kapillären Einheit, Verlust von Synapsen und Neuronen bei zunehmender A β -Ablagerung, BM = Basalmembran, A = Astrozyt, P = Perizyt, N = Neuron, übernommen aus Zlokovic, 2008

Die Integrität der Blut-Hirn-Schranke ist essentiell für die A β -Homöostase und reguliert den A β -Transport über drei wichtige Rezeptoren: den *Receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE), das *Multidrug-resistance Protein 1* (MDR1) und das *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) (Jedlitschky et al., 2010).

Einige Autoren postulieren einen zweistufigen A β -Efflux-Mechanismus, wobei LRP1 im ersten Schritt die ApoE-abhängige Endozytose von A β an der abluminalen Endothelmembran vermittelt und MDR1 (auch bekannt als P-Glycoprotein) in einem zweiten Schritt A β ATP-abhängig über die luminal Membran ins Blut transportiert. RAGE vermittelt hingegen den Influx von systemischem A β ins Gehirn (Abbildung 1-4; Jedlitschky et al., 2010).

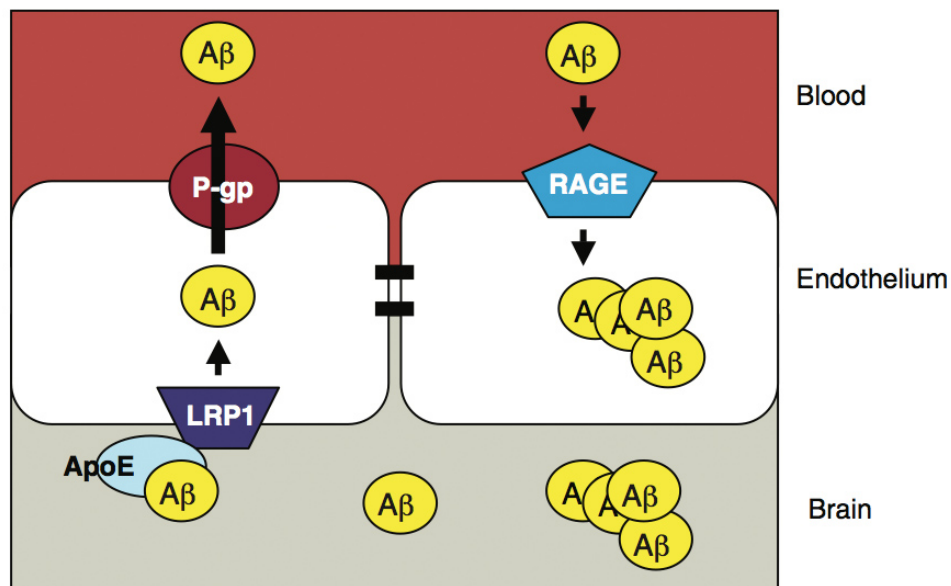


Abbildung 1-4 Schematische Darstellung des möglichen A β -Transports an der BHS

Links: Zweistufiger A β -Efflux-Mechanismus, ApoE-abhängige Endozytose von A β an der abluminalen Endothelmembran nach Bindung an LRP1, anschließend ATP-abhängiger Transport über die luminal Membran ins Blut mittels MDR1 (auch bekannt als P-Glycoprotein); **Rechts:** RAGE ist am Influx des systemischen A β beteiligt; übernommen aus Jedlitschky et al., 2010

1.5.2 RAGE

Der wichtigste A β -Influx Transporter ist der *Receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE). Der Transmembran-Rezeptor besitzt verschiedene Liganden, unter anderem *advanced glycation end products* (AGE), A β und Amphoterin (Koch et al., 2010). Bei Alzheimer-Patienten spielt RAGE eine bedeutende Rolle als Zelloberflächenrezeptor für A β an der Blut-Hirn-Schranke, Neuronen und der Mikroglia (Zlokovic, 2011). RAGE vermittelt dabei den Einstrom von zirkulierendem A β und von mit A β -beladenen Monozyten über das Endothel der Blut-Hirn-Schranke (Deane et al., 2003). Des Weiteren überträgt RAGE in neuronalen Zellen A β -induzierten oxidativen Stress und steuert den Transport von

A β , was wiederum zu mitochondrialer Dysfunktion führt (Yan et al., 1996). Die gezielte Überexpression von RAGE führt zu einem beschleunigten kognitiven Abbau und A β -induzierten neuronalen Störungen bei APP-transgenen Mäusen (Arancio et al., 2004). In A β -reicher Umgebung kommt es zu einer deutlich verstärkten Expression von RAGE am Endothel des Gehirns und in neuronalen Zellen, was wiederum die A β -induzierte pathogenetische Antwort am Gehirn und der Blut-Hirn-Schranke verstärkt (Yan et al., 1995).

1.5.3 MDR1

Das *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1) auch bekannt als *P-Glycoprotein 1* (P-gp) oder *ATP Binding Cassette Subfamily Member 1* (ABCB1)-Transporter arbeitet an der Blut-Hirn-Schranke als aktive A β -Efflux-Pumpe (Lam et al., 2001). Es wird in Organen exprimiert, die eine Barriere- oder exkretorische Funktion besitzen, wie Darm, Leber, Niere oder die BHS. An der BHS wird es vor allem an der luminalen Seite der Endothelzellen exprimiert, wo es als Efflux-Transporter für ein großes Spektrum von Molekülen fungiert (de Lange, 2004). Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass A β ein Ligand von MDR1 ist, sondern auch, dass die Blockade des P-Glycoproteins zu einem verminderten A β -Transport führt (Kuhnke et al., 2007). Weiterhin konnte eine inverse Korrelation zwischen der Expression von MDR1 im Gehirn älterer nicht-dementer Individuen und der Ablagerung von β -Amyloid herausgestellt werden (Vogelgesang et al., 2002).

1.5.4 LRP1

Das *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) ist ein großer, multifunktionaler Transport- und Signalrezeptor, der zur LDL Rezeptor Familie gehört (Dieckmann et al., 2010). Es wird im Gehirn auf Neuronen, Endothelzellen und aktivierten Gliazellen exprimiert. Zunächst wurde seine Funktion als Schlüsselrezeptor für den Transport und Metabolismus von Cholesterin und Apolipoprotein E (APOE) enthaltenden Lipoproteinen beschrieben (Herz et al., 2001). In Bezug auf die AD fungiert LRP1 als wichtigster Efflux-Transporter von A β über die Bluthirnschranke (Shibata et al. 2000) und ist in der Leber an der systemischen Ausscheidung von A β beteiligt (Dieckmann et al., 2010).

LRP1 besitzt eine Vielzahl von Liganden, zu diesen gehören das Apolipoprotein E (APOE), das α 2-Makroglobulin (A2M), der *tissue Plasminogen Activator* (tPA) und

das *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Associated Protein 1* (LRPAP1). Diese beeinflussen direkt und indirekt den A β -Transport.

1.5.5 APOE

APOE ist das vorherrschende Apolipoprotein des Zentralen Nervensystems. Es existieren verschiedene Isoformen, wobei die APOE4-Allelvariante den bisher stärksten bekannten genetischen Risikofaktor für die Entstehung der LOAD darstellt (Bertram et al., 2010). APOE vermittelt den Abtransport und Abbau von A β . Die Bindung von APOE an A β führt zur Entstehung von Komplexen, die mit APOE-Rezeptoren interagieren und dadurch zur Endozytose von A β führen. Entweder folgt darauf der Abtransport von A β über die BHS oder der intrazelluläre Abbau durch Mikroglia und Astrozyten (Elliot et al., 2010).

1.5.6 A2M

Das α 2-Makroglobulin (A2M) ist ein freies Plasmaprotein, das sowohl als ein Protease-Inhibitor fungiert, als auch einen der Hauptliganden von LRP1 darstellt (Borth, 1992). A2M wird in erhöhten Konzentrationen in senilen Plaques gefunden und besitzt eine starke Affinität zum A β -Peptid (Du et al., 1997). Es ist ein Mediator des A β -Abbaus und Abtransports durch LRP1 (Narita et al., 1997)

1.5.7 LRPAP1

Beim *low-density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1* (LRPAP1), auch bekannt als Receptor-associated protein (RAP), handelt es sich um ein Chaperon, das die Bindung der meisten Liganden von LRP1 blockiert (Boucher & Herz, 2011). Damit besitzt es einen inhibierenden Einfluss auf den A β -Abtransport und Abbau. Zusätzlich ist ein A β -Binde-Protein und fördert dessen zelluläre Aufnahme (Kanekiyo & Bu, 2009).

1.5.8 APOJ/Clusterin

APOJ, auch bekannt als Clusterin, ist sowohl ein Lipidtransportprotein, als auch ein vielseitiges Chaperon im Rahmen der zellulären Stressantwort (Jones & Jomary, 2002). Experimentell konnte gezeigt werden, dass APOJ A β -Peptide binden, die weitere Aggregation von A β hemmen und den Abtransport über die BHS fördern kann (Bell et al., 2007).

1.6 Transgene Mausmodelle der Alzheimer-Krankheit

Der Aufbau des murinen und humanen APP (hAPP) unterscheidet sich in 17 Aminosäuren. Dies ist eine Erklärung dafür, dass eine spontane murine Form der AD nicht existiert. In den letzten 20 Jahren wurden jedoch zahlreiche transgene Mausmodelle mit dem Ziel entwickelt, die Ursache, die Pathologie und die Symptome der Erkrankung möglichst genau zu replizieren (Duyckaerts et al., 2008).

1.6.1 Einfach transgene Mäuse

Die ältesten und am häufigsten verwendeten Mausmodelle basieren auf der transgenen Expression des humanen APP (hAPP). Es existieren viele transgene Mauslinien, wobei diese im Allgemeinen durch eine ausgeprägte Amyloidpathologie und kognitive Defizite gekennzeichnet sind (Hall & Roberson, 2012). Die erste transgene Linie mit signifikanter A β -Akkumulation war die PDPAPP-Maus, welche die Indiana-Mutation (V717F) trägt. Weitere transgene Mauslinien tragen meist mehrere Mutationen des hAPP, wie beispielweise die Tg2576 Mauslinie mit der doppelten Swedish-Mutation. Die in dieser Arbeit verwendete TgCRND8-Linie trägt die Swedish- und Indiana-Mutation und wird im nächsten Kapitel näher beschrieben (für eine Übersicht siehe Duyckaerts et al., 2008).

1.6.2 Doppelt transgene Mäuse

Doppelt transgene Mäuse enthalten zusätzlich eine transgene Form der β -Sekretase (BACE1) oder der humanen γ -Sekretase (PS1) (für eine Übersicht siehe Duyckaerts et al., 2008).

1.6.3 Dreifach transgene Mäuse

Zur weiteren Untersuchung der Interaktion zwischen A β und Tau sowie deren Einfluss auf die synaptische Funktion wurden dreifach transgene Mausmodelle entwickelt, welche Transgene von PS1, hAPP und Tau (3xTG-AD) enthalten. Diese Mäuse entwickeln altersabhängig und progressiv A β - und Tau-Pathologien, synaptische Dysfunktionen und kognitive Defizite. Extrazelluläre A β -Ablagerungen können ab einem Alter von sechs Monaten festgestellt werden (Oddo et al., 2003). Bisher existiert jedoch kein Mausmodell, das alle Merkmale der Alzheimer Krankheit zeigt. Zudem imitieren die bisherigen Mausmodelle ausschließlich die

seltene familiäre Form der AD (FAD). Ziel zukünftiger Forschung sollte die Entwicklung eines Modells der sporadischen AD (SAD) sein.

1.7 Effekte kognitiver und physischer Stimulation

Trotz intensiver Forschung in den letzten 25 Jahren existiert bisher keine Behandlung der Alzheimer Krankheit, die das Auftreten oder den Verlauf effektiv beeinflussen kann. Aus diesem Grund richtet sich die Aufmerksamkeit zunehmend auf frühere Stadien der Erkrankung und die Prävention.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Umweltanreicherung (sog. *Environmental Enrichment*) einen positiven Einfluss auf die kognitiven Fähigkeiten der Tiere entfalten kann. Unter *Environmental Enrichment* versteht man das Anreichern der Käfighaltung von Labortieren durch physische, kognitive und sensorische Stimuli. Dieses experimentelle Paradigma wurde erstmals von Donald Hebb wissenschaftlich genutzt. Im Jahre 1947 stellte er fest, dass Ratten, die wie Haustiere gehalten wurden und ihre Umgebung frei erkunden konnten, im Vergleich zu ihren im Käfig gehaltenen Artgenossen in Labyrinth- und Gedächtnisaufgaben besser abschnitten (Hebb, 1947).

1.7.1 Effekte von Umweltanreicherung auf Gesunde und andere Erkrankungen

Körperliches Training konnte in Studien an Menschen und Tieren zahlreiche Aspekte der Gehirnfunktion positiv beeinflussen. Es erhöht die Widerstandskraft des Gehirns gegenüber ischämischem Schaden und Neurodegeneration. Vermittelt wird dieser Effekt durch eine Steigerung der Plastizität und positive Auswirkungen hinsichtlich Neurogenese, Metabolismus und vaskulärer Funktion (Cotman et al., 2007). Diese positiven Effekte stehen in Zusammenhang mit Auswirkungen der körperlichen Aktivität auf das Gehirn, dessen Gefäße und die peripheren Organe. Zahlreiche epidemiologische Studien konnten zeigen, dass körperliche Aktivität periphere Risikofaktoren wie Diabetes Mellitus Typ II, arterielle Hypertonie und kardiovaskuläre Erkrankungen positiv beeinflusst, die wiederum zu Dysfunktionen des Gehirns und Neurodegeneration führen können (Lee et al., 2012).

In Bezug auf die vaskuläre Funktion konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass physische Stimulation bei adulten Ratten zu einer Zunahme der zerebralen Angiogenese führt (Black et al., 1990) und die negativen Folgen neurovaskulärer Dysfunktion, wie beim Schlaganfall, reduzieren kann (Ding et al., 2004).

Ein zentraler Mechanismus dieses Effekts ist die aktivitätsabhängige Regulation peripherer und zentraler Wachstumsfaktoren. Körperliche Aktivität führt zu einer Hochregulation des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), der *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) und der Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen, wodurch es die postischämische zerebrale Durchblutung verbessert und die BHS schützt (Endres et al., 2003). Zudem führt physische Umweltsanreicherung zu einer Erhöhung der hippocampalen Neurogenese, des *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) und des *Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF1), was wiederum mit einer erhöhten Resistenz gegenüber neuronalem Schaden assoziiert ist (Berchtold et al., 2005; Llorens-Martín et al., 2010).

Zusammenfassend basiert der zerebroprotektive Effekt physischer Aktivität auf einer Verbesserung des zerebralen Blutflusses, der Wahrung der vaskulären Integrität und der Unterdrückung der negativen Auswirkungen von Inflammation und Apoptose (Zhang et al., 2011).

1.7.2 Effekte postnataler Umweltsanreicherung auf die Alzheimer-Krankheit

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass physische und kognitive Aktivität während des Jugend- und Erwachsenenalters mit einem verringerten Risiko für AD einhergeht (Friedland et al., 2001; Scarmeas et al., 2009). Zudem führt eine sechs- bis zwölfmonatige regelmäßige aerobe Aktivität zu verbesserten kognitiven Leistungen, sowohl bei gesunden Erwachsenen als auch bei Patienten mit Demenz oder MCI (Ahlskog et al., 2011).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine postnatale, intraindividuelle Umweltsanreicherung die Amyloid-Belastung in unterschiedlichen AD-Tiermodellen senken und die kognitive Leistung verbessern kann (Ambrée et al., 2006; Adlard et al., 2005; Lazarov et al., 2005).

Wie zuvor beschrieben konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass postnatale physische und kognitive Stimulation im TgCRND8-Mausmodell verschiedene Aspekte der AD-Pathologie bekämpfen kann. Dazu gehören eine signifikante Reduktion der A β -Plaques-Belastung und Amyloid-Angiopathie (Ambree et al., 2006), eine Reduktion von oxidativem Stress und die Verstärkung antioxidativ wirkender Schutzmechanismen (Herring et al., 2010). Zudem zeigte sich eine Erhöhung der hippocampalen Neurogenese transgener Tiere auf das Niveau von Wildtyp-Tieren sowie eine vermehrte Bildung Plastizitäts-assoziiierter Moleküle (Herring et al., 2009). Auf Verhaltensseite konnte eine Zunahme des

Erkundungsverhaltens, eine Abnahme ängstlichen Verhaltens, jedoch keine sichere Verbesserung der Lern- und Gedächtnisleistung gezeigt werden (Görtz et al., 2008). Des Weiteren konnte ein Effekt von Environmental Enrichment auf die neurovaskuläre Einheit im AD-Mausmodell nachgewiesen werden, wobei dieser Effekt durch eine erhöhte Angiogenese-Rate, die Hochregulation der Efflux-assoziierten Proteine LRP1, APOE und A2M sowie eine Herabregulation des Influx-Transporters RAGE vermittelt war (Herring et al., 2008).

Welchen Effekt die Umweltanreicherung entfaltet, variiert je nachdem zu welchem Zeitpunkt die körperliche und geistige Aktivität stattgefunden hat. Bei einer therapeutischen Behandlung, also nach Beginn der A β -Pathologie, kam es zur Hemmung der A β -Aggregation und der Abnahme von oxidativem Stress. Im Vergleich dazu verschiebt präventive Umweltanreicherung das A $\beta_{42/40}$ -Verhältnis zu Gunsten von A β_{40} und führt zu einer Zunahme des A β -Abtransports und der A β -Degradation (Herring et al., 2011).

1.7.3 Übertragung der Auswirkungen von Umwelteinflüssen auf nachfolgende Generationen

Es gibt Hinweise darauf, dass epigenetische Informationen von Säugetieren vererbt werden können und damit einen Weg darstellen, wie transgenerational Umweltinformationen übertragen werden können (Rando & Verstrepen, 2007). Die meisten beschriebenen Beispiele transgenerationaler Umwelteffekte untersuchen den Einfluss mütterlicher Umweltveränderung. Diese sind jedoch schwer von Umwelteinflüssen zu differenzieren, die *in utero* stattfinden. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen zu väterlichen Effekten. Eine solche Studie konnte zeigen, dass eine Nahrungskarenz männlicher Mäuse vor der Befruchtung die Serum-Glukose-Level der Nachkommen verändert (Anderson et al., 2006). Zudem konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass Nachkommen männlicher Tiere, die eine proteinreduzierte Diät erhalten hatten, im Vergleich zu Nachkommen männlicher Tiere, die mit Standardfutter ernährt wurden, epigenetische Veränderungen Cholesterinmetabolismus-assoziiierter Gene aufwiesen (Carone et al., 2010). Es existieren also Hinweise darauf, dass väterliche Ernährungsgewohnheiten den Metabolismus der Nachkommen verändern.

1.7.4 Effekte pränataler Stimulation auf Gesunde und andere Erkrankungen

Ob der positive Effekt postnataler Stimulation auf die Alzheimer-Pathologie auch durch pränatale Stimulation der Mutter auf die Nachkommen übertragbar ist, bleibt bisher ungeklärt. Bei Menschen führt körperliche Aktivität während der Schwangerschaft zu einer verbesserten fetalen Gesundheit (Weissgerber et al., 2006) und zu einem positiven Einfluss auf die kognitive Leistung während der Kindheit (Clapp, 1996). Bei Nagetieren führt eine kognitiv stimulierende Haltung inklusive Laufrad während der Schwangerschaft zu einer vorübergehenden Verbesserung des Gedächtnisses und zu einer Steigerung der hippocampalen Neurogenese bei den Nachkommen während des Heranwachsens (Kim et al., 2007, Bick-Sander et al., 2006). Darüber hinaus führt juveniles Enrichment transgenerational dazu, dass die negativen Folgen eines genetischen Defekts der Langzeitpotenzierung und des Gedächtnisses bei *ras-grf-knockout* Mäusen abgeschwächt werden (Arai et al., 2009).

1.8 Vorarbeiten

Die im Folgenden aufgelisteten molekularbiologischen Ergebnisse wurden im Institut für Neuropathologie der Universitätsklinik Münster und im Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universitätsklinik Essen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Kathy Keyvani von Dr. rer. nat. Arne Herring und Dr. rer. nat. Anja Donath mit Hilfe medizinischer Doktoranden und medizinisch-technischer Assistenten erhoben. Die im Folgenden aufgelisteten verhaltensbiologischen Ergebnisse wurden im Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie der Universität Münster unter Leitung von Prof. Dr. Norbert Sachser von Dr. rer. nat. Lars Lewejohann erhoben.

1.8.1 Reduktion neurovaskulärer Dysfunktion nach postnataler Stimulation im AD-Tiermodell

Postnatale Umweltanreicherung bewirkte eine Verringerung der neurovaskulären Dysfunktion im AD-Tiermodell. Die postnatal stimulierten Tiere zeigten eine erhöhte Angiogenese-Rate und eine veränderte Regulation von A β -Rezeptoren und -Transportern im Vergleich zu unstimulierten Tieren. Im Detail ließ sich eine Hochregulation der A β -Efflux-assoziierten Moleküle LRP1, APOE und A2M, sowie eine Herabregulation des A β -Influx-Rezeptors RAGE nachweisen.

1.8.2 Reduktion zerebraler A β -Plaques-Belastung der Nachkommen nach pränataler Stimulation

Mütterliches Laufen während der Schwangerschaft führte zu einer signifikanten Reduktion der A β -Plaques-Belastung der transgenen Nachkommen im Vergleich zu transgenen Tieren, die in Standardhaltung gelebt hatten. Zudem zeigten pränatal stimulierte transgene Tiere verglichen mit ihren nicht stimulierten transgenen Artgenossen eine verbesserte kognitive Leistung im *Barnes-Maze-Test*, der das Hippokampus-assoziierte räumliche Lernen und Gedächtnis prüft.

1.9 Ziele der Arbeit

Ausgehend von der Tatsache, dass in Voruntersuchungen eine signifikante Reduktion amyloider Ablagerungen pränatal stimulierter TgCRND8-Mäuse im Vergleich zu nicht stimulierten Nachkommen festgestellt werden konnte und schon zuvor ein Einfluss von Umweltanreicherung auf die neurovaskuläre Einheit beschrieben wurde, sollten hier die Auswirkungen pränataler Stimulation auf die neurovaskuläre Einheit der Nachkommen bestimmt werden. Dies könnte ein Mechanismus sein, der den Effekt pränataler Stimulation auf die AD-typische Pathologie der Nachkommen erklärt.

Im Einzelnen sollten die Proteinlevel der A β -Transporter LRP1, MDR1 und RAGE sowie Transkriptionsveränderungen der Rezeptorliganden *ApoE*, *ApoJ*, *A2M* und *Lrpap1* in transgenen und Wildtyp-Nachkommen nach pränataler Stimulation bestimmt werden. Zudem sollte die Dichte des Gefäßnetzes bei transgenen und Wildtyp-Nachkommen nach mütterlichem Laufen gemessen werden.

1.10 Hypothesen

Resultierend aus den bisherigen Erörterungen lassen sich folgende Hypothesen ableiten, die mittels der in Kapitel 2. Tiere, Material und Methoden beschriebenen Untersuchungen überprüft werden:

1. Nach pränataler körperlicher Aktivität zeigen die transgenen Nachkommen eine erhöhte Proteinexpression der A β -Efflux-Transporter LRP1 und MDR1 sowie eine verminderte Proteinexpression des A β -Influx-Transporters RAGE.
2. Bei transgenen Nachkommen von physisch aktiven Müttern lassen sich eine Verminderung der Transkription des A β -Efflux-Inhibitors *Lrpap1* als

auch eine Steigerung der Transkription der A β -Efflux vermittelnden Moleküle *A2m*, *ApoE* und *ApoJ* nachweisen.

3. Maternale körperliche Aktivität induziert bei transgenen- und Wildtyp-Mäusen die Angiogenese.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit Mäusen der Linie TgCRND8 durchgeführt. Tiere der Linie TgCRND8 tragen eine doppelt mutierte Form des humanen Amyloid-Vorläuferproteins (*Amyloid Precursor Protein*, APP), Splicevariante 695 (APP 695), dessen Genexpression unter der Kontrolle des Prion Protein-Promoters des syrischen Goldhamsters steht. Aufgrund dieses Promoters wird die Expression des Transgens hauptsächlich auf Neuronen des zentralen Nervensystems und in geringerem Maße auf Astrozyten beschränkt. TgCRND8-Mäuse sind hinsichtlich des Transgens hemizygot und tragen die Doppelmutation K670N / M671L („APP *Swedish*“, APP_{Swe}) sowie die Mutation V717F („APP *Indiana*“, APP_{Ind}) (Chishti et al., 2001). Die Tiere wurden auf einem C57BL/6-C3H/HeJ-Hintergrundstamm gezüchtet. Durch eine Überexpression des humanen APP können bereits im dritten Lebensmonat beta-Amyloid-(A β)-Ablagerungen und ab dem fünften Monat extrazelluläre Plaques und eine neuritische Pathologie im Gehirn der Tiere gefunden werden. Zudem zeigen die Mäuse ab dem dritten Monat Defizite bei der Speicherung räumlicher Informationen, was anhand des *Morris-Water-Maze*-Test gezeigt werden konnte (Chishti et al., 2001). Anhand des *conditioned taste aversion*-Test, einer Form Pawlowscher klassischer Konditionierung, konnte gezeigt werden, dass die Mäuse der Linie TgCRND8 signifikante Beeinträchtigungen des bedingungslosen, impliziten Gedächtnisses aufweisen (Janus et al., 2004). Tiere der Linie TgCRND8 bilden im Gegensatz zum Menschen zwar keine neurofibrillären Tangles aus, sie entwickeln jedoch ab dem 210. Lebenstag abnorme Tau-Phosphorylierungen (Bellucci et al., 2007). Für Untersuchungen bezüglich der Pathogenese, Therapie und Prophylaxe der AD ist dieses Tiermodell besonders geeignet, da sich die Alzheimer-ähnliche Pathologie in sehr kurzer Zeit entwickelt und die Untersuchungen somit schnell durchführbar sind.

2.2 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gehalten. Futter (Altromin 1324, Altromin GmbH, Lage, BRD) und Wasser waren für alle Tiere jederzeit *ad libitum* verfügbar. Die Raumtemperatur wurde bei 22 ± 2 °C konstant gehalten, die Luftfeuchtigkeit betrug 45 ± 10 % und ein zwölfstündiger Licht/Dunkel-Rhythmus wurde eingehalten.

Für die Tierexperimente dieser Arbeit bedurfte es weder einer Tierversuchsgenehmigung im Sinne des § 8 des Tierschutzgesetzes noch lag eine behördliche Meldepflicht vor. Alle experimentellen Abläufe erfüllten internationale Standards für Tierhaltung in Übereinstimmung mit den europäischen Tierschutzrichtlinien der Europäischen Union (86/609/EWG) und wurden von der lokalen Regierung von Münster akzeptiert.

2.3 Versuchsaufbau

Vier männliche transgene Mäuse der Linie TgCRND8 wurden für sieben Tage mit weiblichen Wildtyp-Mäusen derselben Hintergrundlinie verpaart. Die verwendeten weiblichen Versuchstiere hatten vor Versuchsbeginn mindestens einen Wurf Nachkommen erfolgreich zur Welt gebracht. Als Anzeichen einer erfolgten Befruchtung ist ein Vaginalplug feststellbar, der den Tag 1 der Embryogenese markiert. Die trächtigen Weibchen ($n = 10$) wurden randomisiert in 2 Gruppen eingeteilt und einzeln entweder in Standardkäfigen ($37 \times 21 \times 15$ cm) ohne Laufrad (maternale Standardhaltung, mSH) oder in Standardkäfigen mit Laufrad (maternale Laufradhaltung, mLR) gehalten. Um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede in der Motivation zur Bewegung bestehen könnten, wurde vor Versuchsbeginn überprüft, ob alle potentiellen Muttertiere freiwillig ein Laufrad benutzen. Zudem wurde die Laufleistung mithilfe eines Fahrradcomputers gemessen. Um systematische Auswirkungen bezüglich des elterlichen Genotyps auf den Phänotyp der Nachkommen zu minimieren, wurden die mütterlichen Käfigbedingungen und die Zuchtmännchen von Schwangerschaft zu Schwangerschaft gewechselt.

Die weiblichen Nachkommen aus zehn Würfen wurden als Versuchstiere verwendet und in vier Gruppen eingeteilt: die Einteilung erfolgt anhand des Genotyps (WT: Wildtyp, TG: Transgen) und der Haltungsbedingungen der Mütter

während der Schwangerschaft (mSH, mLR). Nach der Geburt lebten die Nachkommen bis zum postnatalen Tag 30 (P30) in SH bei der Mutter. Nach der Trennung von der Mutter wurden die Nachkommen von P30 bis P150 in geschlechtergetrennten Gruppen von 2–5 Tieren in SH ohne die Möglichkeit zur postnatalen physischen Stimulation gehalten.

Aufgrund des zunehmend aggressiven Verhaltens männlicher Mäuse in Gruppen untersuchten wir im Rahmen dieser Arbeit nur weibliche Nachkommen. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 2-1 dargestellt.

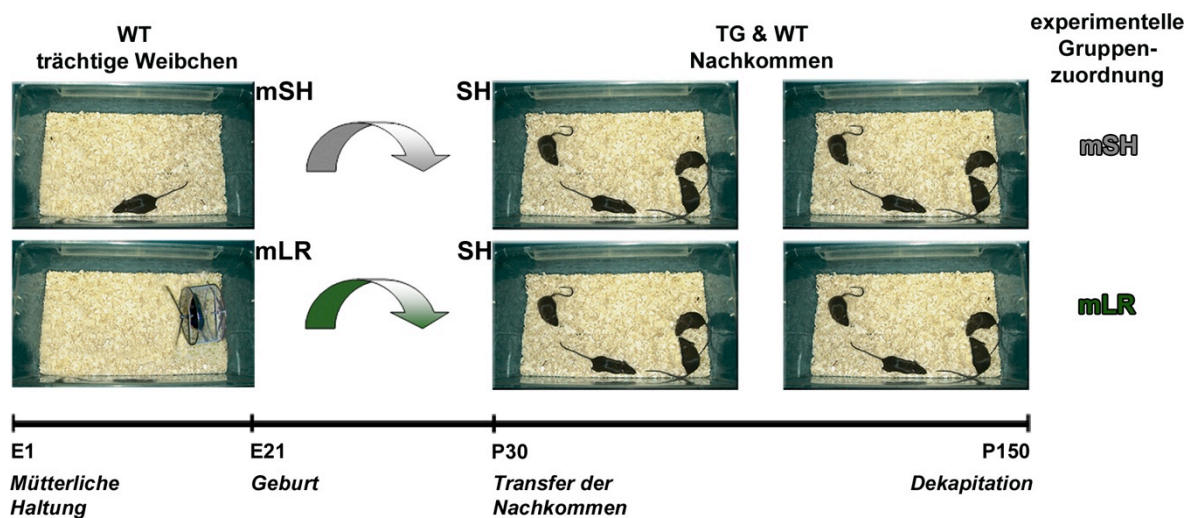


Abbildung 2-1 Versuchsaufbau, modifiziert nach Herring et al., 2012, FASEB J, 26, 117–128.

2.4 Gewebeaufbereitung

Am 150. Lebenstag (P150) wurden alle Tiere tief sediert (1,5 ml Xylazin auf 8,5 ml Ketanest) und dekapitiert. Die Gehirne wurden in der mittleren Sagittalebene halbiert. Die rechte Hemisphäre wurde in 4 % gepuffertem Formaldehyd über Nacht fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und später für die Immunhistochemie verwendet. Die linke Hemisphäre (ohne Cerebellum und Hirnstamm) wurde sofort nach Entnahme schockgefroren und für die RNA- und Proteinextraktion verwendet. Dies geschah unter Verwendung von TRIzol (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die isolierten Proteine wurden in 1 % SDS gelöst und wie die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5 Nukleinsäureanalyse

2.5.1 RNA-Vorbereitung

Die RNA wurde mit DNase (Qiagen RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, BRD) behandelt, aufgereinigt und anschließend mittels des Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) qualitätsgeprüft. Nachfolgend wurde die RNA-Konzentration photometrisch ermittelt (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, BRD).

2.5.2 cDNA-Synthese

Für die Bestimmung des Expressionsniveau der zu untersuchenden Gene mittels TaqMan-Assay wurde die bei der Extraktion gewonnene RNA in ihre komplementäre cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte dabei für jede Maus separat unter Anwendung des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (#4368814, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Zunächst wurde ein Mastermix für die cDNA-Synthese angesetzt (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1 Mastermix für die cDNA-Synthese (2x Ansatz)

Komponenten	Volumen (µl)
10× RT Buffer	2
25× dNTPs (100 mM)	0,8
10× RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
RNase Inhibitor N808-0119	1
Nuclease-free H ₂ O/DEPC H ₂ O	3,2

Anschließend wurde die PCR zur cDNA-Synthese mittels des Primus 25 Thermal-Cyclers (MWG-Biotech Inc., Ebersberg, BRD) durchgeführt (PCR-Programm siehe Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2 PCR-Programm für die cDNA-Synthese

Schritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	10:00	25
2	120:00	37
3	5:00	85

2.5.3 Quantitative Real-time PCR (TaqMan-Assay)

Die transkriptionelle Regulation der folgenden Gene nach Standardhaltung bzw. pränataler Stimulation wurde unter Verwendung eines TaqMan-Assays bestimmt: *Low-density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1 (Lrpap1)*, *α-2-macroglobulin (A2m)*, *Apolipoprotein E (ApoE)*, und *Apolipoprotein J (ApoJ, auch bekannt als Clusterin)*.

Für das Design der PCR-Primer und der TaqMan-Sonden wurde die Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet und um die Spezifität der Amplikonsequenzen zu garantieren wurde sie anschließend einer BLAST-(Basic Local Alignment Search Tool)-Suche unterzogen (www.ncbi.nlm.gov/blast). Die Qualität der Primer wurde vor der Real-time PCR mittels konventioneller PCR überprüft.

Die Proben wurden jeweils im Triplikat untersucht und *Gapdh* diente der Normalisierung. Dabei kam folgender Mastermix zur Verwendung (Tabelle 2-3), wobei der TaqMan Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) die Taq-Polymerase, dNTPs und den PCR-Puffer enthielt.

Tabelle 2-3 Mastermix für die Real-time PCR

Komponenten	Volumen (µl), 1× Probenmessung
TaqMan Mastermix	12,5
DEPC-Wasser	8
Primer _{forward}	0,75
Primer _{reverse}	0,75
Sonde	1

Zu dem Mastermix wurde 1 µl template cDNA hinzugefügt, so dass ein Endvolumen von 25 µl entstand. Dieser Probenansatz wurde jeweils in den RT-Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gegeben, der wiederum mit einem Lasergerät und einer Detektionsapparatur verbunden war (Cycling-Bedingungen und Primer siehe Tabelle 2-4 und 2-5).

Im Anschluss erfolgte die Expressionsanalyse mittels der 7500 Fast System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabelle 2-4 Cycling-Bedingungen des TaqMan-assays

Zyklusanzahl	Zeit (min)	Temperatur (°C)
1	02:00	50
1	10:00	95
40	00:15	95
1	01:00	60

Tabelle 2-5 Primer und Sonden-Sequenzen des TaqMan-assays

Ziel, Zugriffsnr. GeneBank	Primer und Sonden-Sequenzen
<i>Gapdh</i> BC083065	F: GCTACACTGAGGACCAGGTTGTCT R: ACCAGGAAATGAGCTTGACAAAG S: 6FAM-CAGCAACTCCCACTCTTCCACCTTCG-TAMRA
<i>Lrpap1</i> NM_013587	F: TCAGATGCACCTTCACTAATGTTTG R: TGCCCATTTCTAAGCCTTAGCA S: 6FAM-CTCCATCCCTAGAGCCAGAGGCC-TAMRA
<i>A2m</i> NM_175628	F: ACCTATCTCAATACGGGTTACCAAA R: CCAGGTTTATCCCCAAAAGTACTG S: 6FAM-CAATTAACTACAAGCACCGGGATGGCTC-TAMRA
<i>ApoE</i> NM_009696	F: TGGCTACCAACCCCATCATC R: GCAGGACAGGAGAAGGATACTCA S: 6FAM-CCCCAGTGGCCCAGGAGAATCA-TAMRA
<i>ApoJ</i> NM_013492	F: CCATGCAGGACAGCTTTGC R: GCGAAGAACCGGTCCTGAA S: 6FAM-CGGGCATCTGGCATCATAGACACG-TAMRA

F = 5' Primer (forward); R = 3' Primer (reverse); S = TaqMan-Sonde (forward)

2.6 Proteinanalyse

2.6.1 Probenvorbereitung

Zunächst wurden die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben mithilfe eines DC Protein assays (5000112; Bio-Rad, München, BRD) bestimmt. Für die weitere Untersuchung wurden 20 µg Protein pro Probe mit Laemmli-Lysepuffer und Ladepuffer verdünnt (Endvolumen 25 µl). Es wurde zudem eine Verdünnungsreihe mittels Zugabe von Lysepuffer vorbereitet, wobei jede Verdünnungsstufe eine Halbierung der Proteinmenge bedeutete. Die Verdünnungsstufe V1 enthielt 40 µg Protein in 25 µl Volumen.

Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert, danach jeweils 1 min bei 4 °C und auf Wassereis abgekühlt und zuletzt 5 min bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE. Als Gel wurden ein 4 %iges Sammelgel und ein 10 %iges Trenngel verwendet (Tabelle 2-3).

Nach Aufbau der Elektrophoresekammer erfolgte die Probenbeladung in die Geltaschen des Sammelgels sowie das Auffüllen der Kammer mit 1× SDS Laufpuffer (SDS-Rezept im Anhang). Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde eine Tasche eines jeden Gels mit 5 µl eines Proteinstandards bestückt (Bluerange® Prestained Protein Marker Mix, PIERCE Biotechnology, Rockford, IL, USA). Bei einer konstanten Elektrophoresespannung von 120 V erfolgte die Auftrennung der Proteine für ca. 1,5 h. Sobald die Bromphenolblaubande des Probenpuffers das untere Ende des Laufgels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

Tabelle 2-3 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Sammeigel (4 %)	Trenngel (10 %)
415 µl Acrylamid/Bisacrylamid	2,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid
625 µl Upper Tris	1,75 ml Lower Tris
1,46 ml H ₂ O _{dest.}	2,92 ml H ₂ O _{dest.}
20 µl APS (10 %)	50 µl APS (10 %)
5 µl Temed	10 µl Temed

2.6.3 Proteintransfer und Immobilisierung

Um die Proteine für die weitere Analyse zu immobilisieren erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mithilfe des *Tank-Blot*-Verfahrens (Towbin et al. 1979). Nach Waschen des Gels in Blot-Puffer wurde es zusammen mit Filterpapier und Schwämmen zu einem „*Blot-Sandwich*“ zusammengesetzt und in die mit Blot-Puffer (Blot-Puffer-Rezept im Anhang) gefüllte Blotting-Kammer eingesetzt. Anschließend erfolgte die Proteinübertragung bei 4 °C, einer Spannung von 140 V und konstanten 0,25 A innerhalb einer Stunde. Nach dem Transfer wurde die Membran 5 min lang in 1× TST gewaschen und im Anschluss mit Ponceau S

gefärbt. Hierdurch kann der Blotting-Erfolg durch Rotverfärbung bestätigt werden. Nach Entfärbung der Membran mit 1× TST erfolgte nun die Proteinmarkierung.

2.6.4 Immunologische Proteindetektion

Zur Detektion der jeweiligen Proteine wurden spezifische Antikörper verwendet. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an der Membran zu verhindern mussten die Nitrozellulosemembranen zunächst für 30 min in Blockierungsmedium [5 % Magermilchpulver in 1× TST (TST-Rezept im Anhang)] inkubiert werden. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des jeweiligen Erstantikörpers in der entsprechenden Konzentration für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach zweifachem Waschen für 10 min mit 1× TST und erneuter Blockierung erfolgte die Zugabe des Zweitantikörpers. Dieser lagert sich wiederum an den Erstantikörper und ist mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert, welche die nachfolgende Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Proteine *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1* (LRP1), *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1) und *Receptor For Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) untersucht. Dies geschah mithilfe der folgenden Antikörper und Konzentrationen:

Tabelle 2-4 Beim Westernblot verwendete Antikörper

AK-Art	Antikörper	Verdünnung	Firma, Katalognummer
#1	Anti-β-Actin (Maus)	1:15.000	Sigma-Aldrich, München, BRD; A5441
#2	Anti-Maus (Ziege)	1:30.000	Sigma-Aldrich, München, BRD; A3682
#1	Anti-LRP1 (Maus)	1:5.000	Calbiochem, San Diego, USA; 438192
#2	Anti-Maus (Ziege)	1:2.000	Sigma-Aldrich, München, BRD; A3682
#1	Anti-MDR1 (Hase)	1:500	Acris, San Diego, USA; AP09346PU-N
#2	Anti-Hase (Ziege)	1:5.000	Jackson ImmunoResearch Lab Inc., West Grove, USA; 111-035-003
#1	Anti-RAGE (Hase)	1:1.000	Acris, San Diego, USA; SP515P
#2	Anti-Hase (Ziege)	1:7.500	Jackson ImmunoResearch Lab Inc., West Grove, USA; 111-035-003

Immunpositive Banden konnten mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper und verstärkender Chemilumineszenz (Immobilon, WBKLS0500; Millipore) sichtbar gemacht werden. Beta-Actin wurde zur Normalisierung verwendet (A5441, 1:15000, Sigma-Aldrich). Die Intensität der Chemilumineszenz konnte daraufhin mit einer Digitalkamera (ChemiDoc XRS; Bio-Rad) aufgenommen und mithilfe der Image Lab 2.0 Densitometrie Software (Bio-Rad) quantifiziert werden.

2.7 Immunhistologie von Laminin

Zur immunhistologischen Untersuchung wurde die rechte Hemisphäre jedes Versuchstieres nach Formalinfixierung (4 % Formalin, über Nacht) in Paraffin eingebettet und anschließend in 2 µm dicke Sagittalschnitte geschnitten. Jeweils sechs Schnitte, welche 102, 104, 152, 156, 202 und 206 µm lateral des Interhemisphärenspaltes lokalisiert waren, wurden pro Tier immunhistologisch markiert.

Zur Detektion zerebraler Blutgefäße wurden die Gehirnschnitte auf Laminin hin markiert. Bei Laminin handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes, nicht-kollagenes Glykoprotein von Bindegewebe, das einen Hauptbestandteil der Endothelmembran zerebraler Mikrogefäße darstellt (Ding et al. 2004). Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und mit einer 0,4 %igen Pepsinlösung (Pepsin P6887, Sigma-Aldrich, gelöst in 10 mM HCl) für 30 min bei 37 °C vorbehandelt. Anschließend wurden die Präparate automatisiert (TechMate Instrument, DakoCytomation) mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Laminin Antikörper (L9393, 1:300; Sigma-Aldrich) inkubiert. Zur Visualisierung wurde das Zytocem Plus (Meerrettich-Peroxidase) One-Step Polymer Kit (anti-Maus/Hase/Ratte) verwendet (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland).

2.8 Stereologische Quantifizierung von Laminin

Die Anzahl der Blutgefäßverzweigungen wurde sowohl im Neokortex als auch im Hippokampus mithilfe eines Lichtmikroskops (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan) und der Stereo Investigator 9.02 Software (MicroBright-Field, Williston, VT, USA) quantifiziert, wobei konstante Licht und Filterbedingungen geherrscht haben. Die Anzahl der Blutgefäßverzweigungen (n/mm^2) wurde in einer 100× Vergrößerung unter Verwendung des Fraktionator-Programms bestimmt

(Zählrahmen $500 \times 500 \mu\text{m}$, Gittergröße $1000 \times 500 \mu\text{m}$), indem Gefäßenden und Verzweigungspunkte markiert wurden und anschließend die Summe durch zwei geteilt wurde (Prinzip nach Casella: Casella et al., 2002). Die absoluten Zahlen stehen im Verhältnis zur untersuchten Fläche. Der Untersucher war gegenüber der Präparatezuordnung während des Zählvorganges verblindet.

2.9 Statistik

Die Ergebnisse werden im Folgenden als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Um die Normalverteilung aller Datensätze zu bestätigen wurde ein Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt und ein Q-Q-Plot angelegt. Die Homogenität der Varianz wurde mithilfe des Levene-Tests überprüft. Die weitere Analyse der Daten erfolgte mittels 1- und 2-faktorieller *Analysis of Variance* (ANOVA), wobei die Haltung der Mutter (mSH, mLR) oder der Genotyp (WT, TG) als Zwischensubjektfaktoren verwendet wurden. Eine *Fisher's least significant difference* (LSD)-Analyse wurde für die *post-hoc* Analyse genutzt um signifikante Gruppenunterschiede aufzudecken. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Alle Tests wurden mit dem Softwarepaket SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte von maternalem Laufen auf die neurovaskuläre Einheit

Zur Untersuchung des Einflusses von mütterlichem Laufen auf die neurovaskuläre Einheit der Nachkommen wurde die Expression der im Folgenden genannten A β -Transporter, die transkriptionelle Regulation den A β -Transport-vermittelnder Liganden sowie die Dichte des Gefäßnetzes bestimmt.

3.2 Effekte auf die A β -Transportproteine LRP1, RAGE und MDR1

Mittels Western-Blot untersuchten wir die Expressionsmuster der A β -Efflux-Transporter *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) und *Multidrug resistance protein 1* (MDR1) als auch des A β -Influx-Transporters *Receptor for advanced glycosylation end products* (RAGE). Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse:

Die Regulation von MDR1 ist abhängig vom mütterlichen Laufen [mSH vs. mRW: $F(1,30) = 11,79$, $P = 0,002$], jedoch unabhängig vom Genotyp. Sowohl transgene als auch wildtypische Nachkommen zeigten eine erhöhte Expression von MDR1 nach pränataler Stimulation (TG mSH vs. TG mLR: $1,064 \pm 0,098$ vs. $1,623 \pm 0,235$, +53 %, $p = 0,018$, WT mSH vs. WT mLR: $1 \pm 0,068$ vs. $1,491 \pm 0,134$, +49 %, $p = 0,026$). Die Regulation der MDR1-Proteinlevel in Folge pränataler Stimulation ist in Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 graphisch dargestellt.

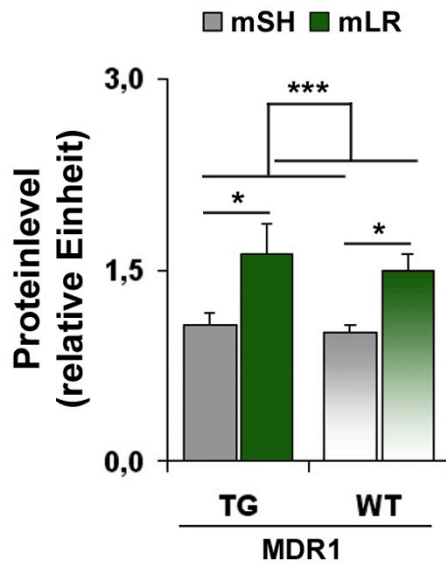


Abbildung 3-1 Proteinlevel von MDR1 von transgenen und Wildtyp-Mäusen ohne und mit pränataler Stimulation, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, modifiziert nach Herring et al., 2012, FASEB J, 26, 117–128

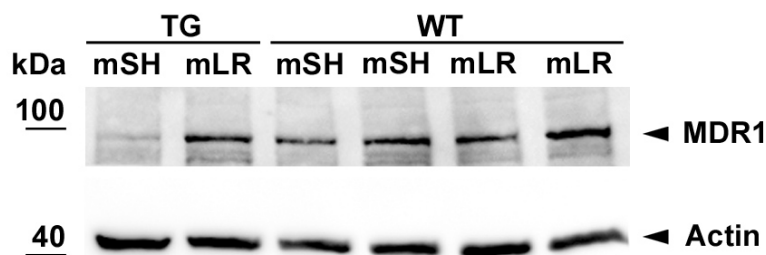


Abbildung 3-2 Repräsentativer Western-Blot von MDR-1 und Actin zur Normalisierung, modifiziert nach Herring et al., 2012, FASEB J, 26, 117–128

Zudem zeigte sich bei transgenem Nachwuchs eine Herabregulation des A β -Influx-Rezeptors RAGE nach mütterlichem Laufen [TG mSH vs. TG mLR: $1,543 \pm 0,1$ vs. $1 \pm 0,137$, -35 %, $F(3,28) = 3$, $p = 0,028$] auf ein niedrigeres Niveau als bei Wildtyptieren (TG mLR vs. WT mLR: $1,67 \pm 0,221$, -40 %, $p = 0,009$).

Im Gegensatz zu MDR1 und RAGE wies LRP1 keine Expressionsveränderung nach pränataler Aktivität [mSH vs. mLR: $F(1,32) = 0,78$, $p = 0,384$] auf. Jedoch zeigte sich ein um 61 % erhöhtes Niveau von LRP1 bei transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren [TG vs. WT: +61 % $F(1,32) = 12,33$, $p = 0,001$]. In Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4 sind die Proteinlevel von RAGE und LRP1 in Abhängigkeit von der pränatalen Stimulation und vom Genotyp dargestellt.

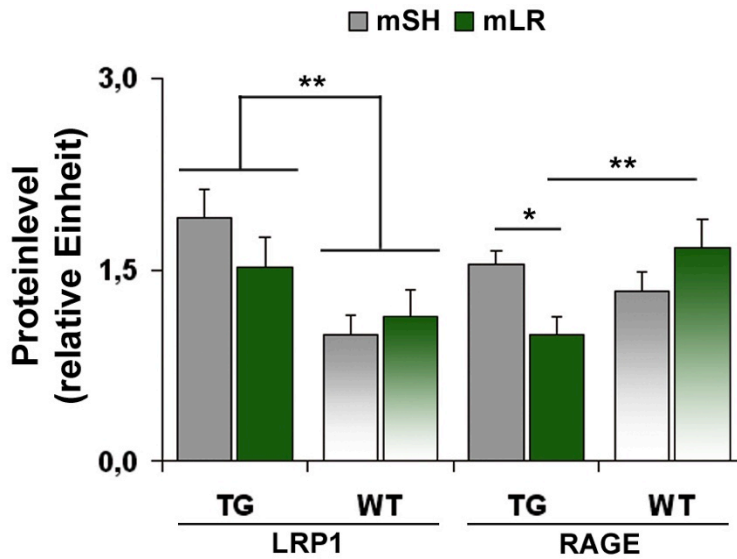


Abbildung 3-3 Proteinlevel von LRP1 und RAGE, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, modifiziert nach Herring et al., 2012, FASEB J, 26, 117–128

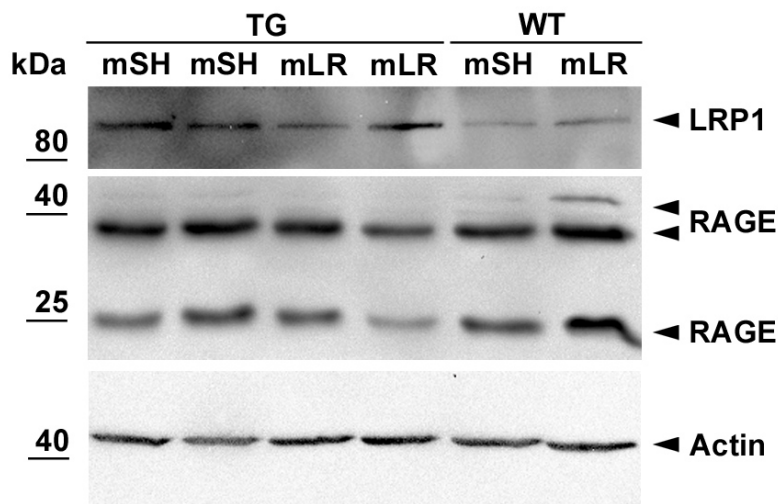


Abbildung 3-4 Repräsentative Western-Blots von LRP1 und RAGE und Actin zur Normalisierung, modifiziert nach Herring et al., 2012, FASEB J, 26, 117–128

3.3 Effekte auf die Expression von *Lrpap1*, *A2m*, *ApoE* und *ApoJ*

Die transkriptionelle Regulation des A β -Efflux-Inhibitors *Lrpap1* und der A β -Efflux vermittelnden Moleküle *A2m*, *ApoE* und *ApoJ* wurde mittels TaqMan-Assay untersucht.

Es konnte sowohl eine Herabregulation des LRP1-Inhibitors *Lrpap1* bei transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyp-tieren festgestellt werden [TG vs. WT: -38 %, $F(1,32) = 25,4$, $P < 0,001$], als auch eine Verringerung der Genexpression von *Lrpap1* bei transgenen Nachkommen nach mütterlichen Laufen um 31 % [TG mSH vs. TG mLR: $1,444 \pm 0,079$ vs. $1 \pm 0,112$, -31 %, $F(3,32) = 11,74$, $P = 0,011$].

Die pränatale Stimulation entfaltete jedoch keinen Einfluss auf die A β -Efflux vermittelnden Moleküle *A2m*, *Apoe* und *Apoj* [mSH vs. mLR: *A2m*: $F(1,32) = 0,42$, $P = 0,524$; *Apoe*: $F(1,32) = 2,2$, $P = 0,148$; *Apoj*: $F(1,32) = 0,22$, $P = 0,642$]. Die Abbildung 3-5 veranschaulicht diese Ergebnisse.

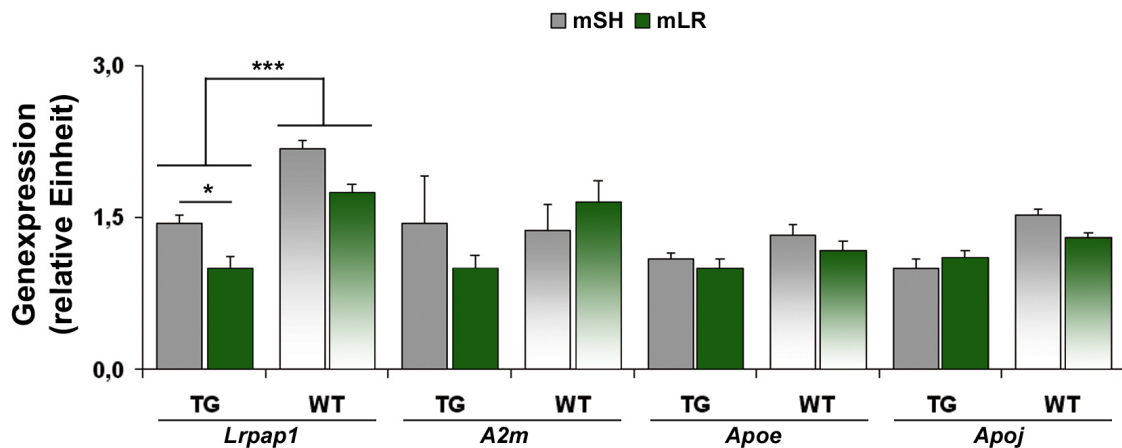


Abbildung 3-5 Genexpression des A β -Efflux-Inhibitors *Lrpap1* und der A β -Efflux-Vermittler *A2m*, *Apoe* und *Apoj*, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, modifiziert nach Herring et al., 2012, FASEB J, 26, 117–128

3.4 Effekte auf den Grad der Gefäßverzweigungen

Der Grad der Gefäßverzweigung, der ein Maß für die Angiogenese darstellt, wurde stereologisch bestimmt.

Obwohl die Gefäßdichte vom Genotyp nicht beeinflusst wurde [TG vs. WT: $F(1,29) = 0,14$, $p = 0,711$], zeigte sich eine signifikant erhöhte Dichte nach pränataler Stimulation [mSH vs. mLR: $F(1,29) = 6,26$, $p = 0,018$]. Die Anzahl der verzweigten Gefäße erhöhte sich im Neokortex und Hippokampus transgener Nachkommen nach mütterlichem Laufen um 29 % (TG mSH vs. TG mLR: $74,884 \pm 4,663$ vs. $96,928 \pm 8,923$, $p = 0,022$). Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht bei Wildtyp-Mäusen (WT mSH vs. WT mLR: $79,184 \pm 4,783$ vs. $88,018 \pm 4,801$, $p = 0,297$). Abbildung 3-5 zeigt repräsentative Aufnahmen der zerebralen Blutgefäße aller vier Gruppen und in Abbildung 3-6 wird die Regulation der Gefäßverzweigungen visualisiert.

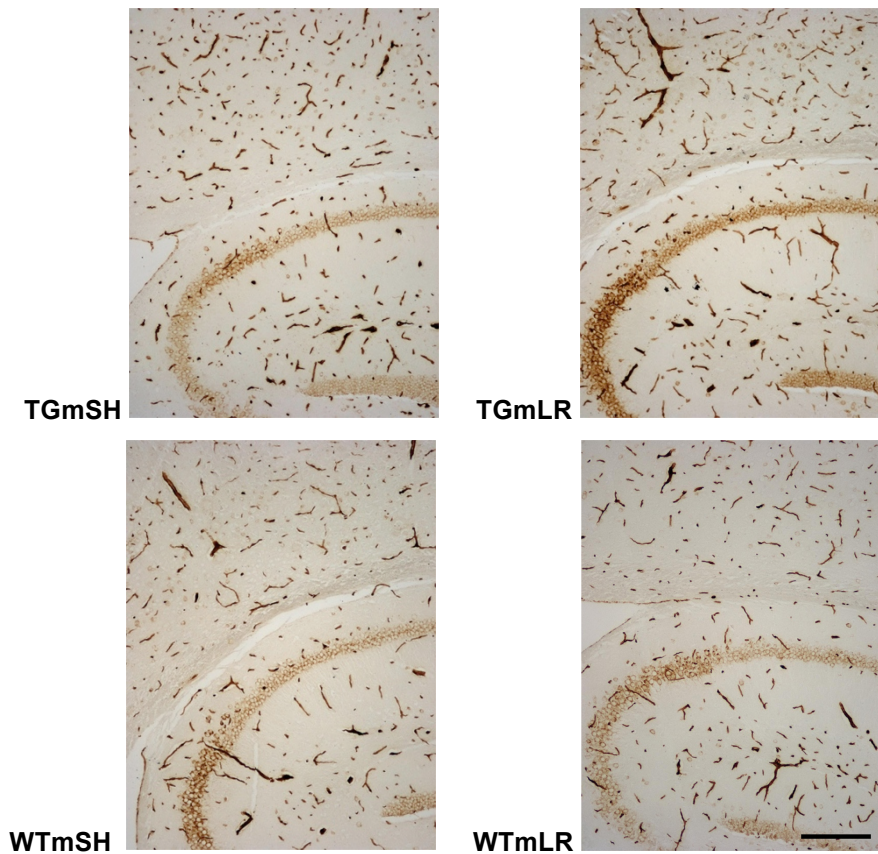


Abbildung 3-5 Repräsentative Aufnahmen der zerebralen Blutgefäße nach immunhistochemischer Färbung gegen Laminin, Aufnahme in 100× Vergrößerung, Messbalken = 200 µm, modifiziert nach Herring et al., 2012, FASEB J, 26, 117–128

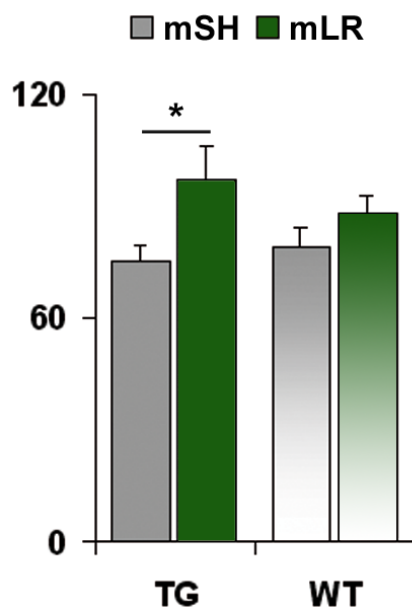


Abbildung 3-6 Anzahl der Gefäßverzweigungen (n/mm^2), * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, modifiziert nach Herring et al., 2012, FASEB J, 26, 117–128

4 Diskussion

Die AD stellt uns aufgrund einer stark zunehmenden Prävalenz und fehlender effektiver Therapeutika vor eine immense gesellschaftliche und wirtschaftliche Belastung und ist damit eine der größten medizinischen Herausforderungen dieses Jahrhunderts. Einige vielversprechende klinische Studien der letzten Jahre sind gescheitert und legen die Vermutung nahe, dass die Erkrankung noch früher, im präsymptomatischen Stadium oder sogar noch vor dem ersten Auftreten der AD-Pathologie präventiv bekämpft werden sollte.

Zahlreiche epidemiologische Studien konnten zudem einen positiven Einfluss von körperlicher Aktivität auf das Auftreten und den Verlauf der Erkrankung nachweisen (Friedland et al., 2001; Scarmeas et al., 2009; Ahlskog et al., 2011). Anders als bisherige Untersuchungen richtet die vorliegende Arbeit ihren Fokus auf eine der frühesten Präventionsmöglichkeiten der AD, durch physische Stimulation der Mutter während der Schwangerschaft.

4.1 Effekte von maternalem Laufen auf die neurovaskuläre Einheit

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten einen positiven Einfluss der pränatalen Stimulation auf die neurovaskuläre Einheit der Nachkommen nachweisen, vermittelt durch eine Zunahme der Gefäßverzweigungen und eine veränderte Regulation der A β -Transporter und deren Liganden. Der wichtigste A β -Influx-Transporter RAGE zeigte nach pränataler Stimulation bei transgenen Tieren ein verringertes Expressionsniveau. Die A β -Efflux-Transporter MDR1 und LRP1 veränderten sich wie folgt: Nach mütterlichem Laufen wiesen transgene als auch Wildtypnachkommen eine signifikante Expressionssteigerung von MDR1 auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Expressionsveränderung von LRP1 nach mütterlichem Laufen, jedoch ein deutlich erhöhtes LRP1-Niveau bei transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren (siehe Abb. 3-1 und 3-3). Bei der Untersuchung der Rezeptorliganden *Lrpap1*, *A2m*, *ApoE* und *ApoJ* konnte nur für den LRP1-Inhibitor *Lrpap1* eine veränderte transkriptionelle Regulation nachgewiesen werden, wobei das *Lrpap1*-Niveau nach pränataler Stimulation bei transgenen Tieren erniedrigt war (siehe Abb. 3-5).

Voruntersuchungen konnten zeigen, dass der Mechanismus durch den die Umweltanreicherung auf die AD-Pathologie wirkt, vom Zeitraum der Anreicherung abhängig ist. Der Vergleich des Effekts präventiver und therapeutischer

Umweltanreicherung ergab, dass nur präventives *Enrichment* einen Einfluss auf die den A β -Transport-vermittelnden Moleküle besitzt. Im Detail ließ sich eine Hochregulation der A β -Efflux-assoziierten Moleküle LRP1, *ApoE* und *A2m* sowie eine Herabregulation des A β -Influx-Rezeptors RAGE nachweisen. Wie in der Einleitung beschrieben, entfaltet die therapeutische Umweltanreicherung ihren Effekt hingegen durch eine Reduktion der A β -Aggregation und des oxidativen Stresses (Herring et al., 2011).

In dieser Arbeit zeigte RAGE analog zu den Ergebnissen von Herring et al. (2008 und 2011) nach pränataler physischer Umweltanreicherung ein reduziertes Expressionslevel, welches eine Verminderung des A β -Influx begünstigt. Die Tatsache, dass das Niveau niedriger als das von Wildtyptieren liegt, könnte bedeuten, dass nach pränataler körperlicher Aktivität der Influx von A β und anderen Molekülen noch geringer als bei Gesunden ist. Dies könnte einen zusätzlichen Schutz darstellen. Da RAGE neben seiner Transportfunktion auch proinflammatorische sowie vasokonstriktorische Eigenschaften besitzt und oxidativen Stress vermittelt, scheint pränatale Umweltanreicherung zudem protektiv hinsichtlich dieser schädlichen Einflüssen zu sein (Yan et al., 1996; Deane et al., 2003).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach postnatalem *Enrichment* konnte in dieser Arbeit nach pränataler körperlicher Aktivität keine Steigerung der Expression von LRP1 im Vergleich zu unstimulierten Nachkommen festgestellt werden (Herring et al., 2008). Interessanterweise ergab sich aber ein um 61 % erhöhtes Niveau von LRP1 bei transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtyptieren. Es existieren zahlreiche Studien zur Expression von LRP1 bei AD, jedoch mit uneinheitlichen Ergebnissen. Einige Autoren konnten eine signifikante Reduktion des Gesamt-LRP1-Levels bei AD-Patienten (Kang et al., 2000) sowie eine Abnahme der LRP1-Expression an zerebralen Gefäßen im AD-Tiermodell messen (Donahue et al., 2006). Die Untersuchungen von Deane et al. konnten zudem zeigen, dass toxische A β -Konzentrationen wie im transgenen AD-Mausmodell oder bei AD-Patienten mit einer signifikanten Reduktion des LRP1-Levels der Gehirnkapillaren einhergeht (Deane et al., 2004). Diese Autoren sehen die Abnahme der LRP1-Expression als einen pathophysiologischen Schritt der Erkrankung, der durch verminderten A β -Abtransport zur A β -Pathologie beiträgt.

Andere Autoren hingegen konnten eine Expressionserhöhung von LRP1 bei AD-Patienten und im Tiermodell (Qiu et al., 2001; Akram et al., 2012) oder gar keine LRP1-Veränderung bei AD nachweisen (Causevic et al., 2003). Diese Autoren sehen als Begründung dieser Ergebnisse, dass eine vermehrte A β -Plaques-Belastung zu einer reaktiven LRP1-Erhöhung führt. Dies wird durch die Arbeit von Qiu et al. unterstützt, die ein positives Feedback der LRP1-Liganden A β und A2M auf die Expression dieses Rezeptors beschreibt (Qiu et al., 2001).

Ein Grund dieser unterschiedlichen Ergebnisse könnten verschiedene experimentelle Designs und Messtechniken sein. Da LRP1 mit A β -Plaques kolokalisiert (Causevic et al., 2003), kann eine Messung der Gesamt-LRP1-Level im Gehirn-Homogenisat einen zu hohen Wert vortäuschen. Entscheidend für den A β -Abtransport ist jedoch die endotheliale LRP1-Expression. Die Ergebnisse von Donahue et al. konnten dementsprechend zeigen, dass die Immunreaktivität von LRP1 bei AD in Neuronen zwar erhöht, in Endothelzellen jedoch erniedrigt ist, wobei die Gesamt-LRP1-Messung des Hippokampus erhöhte Werte ergab (Donahue et al., 2006). Denkbar ist auch ein dynamisches LRP1-Expressionsmuster, das durch Messungen zu nur einem Zeitpunkt nicht aufgedeckt werden kann. Zu Beginn der Erkrankung könnte LRP1 erniedrigt sein und dadurch zu Einschränkungen des A β -Abtransports führen. Im Verlauf der Erkrankung ist durch positives Feedback und Kolokalisation mit A β , vor allem in Neuronen, ein erhöhtes Level denkbar.

Mütterliches Laufen erhöht die MDR1-Expression Genotyp-unabhängig. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die physische Umweltanreicherung der Mutter nicht nur eine positive Auswirkung auf die neurovaskuläre Funktion von erkrankten Individuen besitzt, sondern auch auf jene von Gesunden. Das erhöhte MDR1-Niveau führt zu einem verbesserten Molekültransport, inklusive des A β -Abtransports und kann so zu einer Reduktion der A β -Plaques-Belastung beitragen.

Entsprechend der Regulation von RAGE zeigte sich bei transgenen Tieren nach pränataler Stimulation ein niedrigeres Transkriptionsniveau des LRP1-Inhibitors *Lrpap1* als bei unstimulierten Nachkommen. Zugleich wiesen transgene Nachkommen ein niedrigeres *Lrpap1*-Level als Wildtypiere auf.

Dies ist der erste Hinweis auf den Einfluss körperlicher Aktivität auf die *Lrpap1*-Transkription, da bisherige Untersuchungen nach postnataler Stimulation keinen

Effekt feststellen konnten (Herring et al. 2008 und 2011). Das Ergebnis, dass *Lrpap1* bei transgenen Tieren weniger transkribiert wird als bei Wildtyptieren, könnte analog zur Erhöhung des LRP1-Levels erklärt werden. Die vermehrte A β -Plaques-Belastung führt reaktiv zur verminderten Transkription des LRP1-Inhibitors *Lrpap1*, woraus kompensatorisch ein verbesserter A β -Abtransport resultiert.

Die vermehrte Transkription der A β -Efflux-assoziierten Moleküle *ApoE* und *A2m*, die nach postnataler Stimulation bei transgenen Tieren festgestellt werden konnte (Herring et al., 2008), zeigte sich in dieser Arbeit nicht.

Nach pränataler Umweltsanreicherung besitzen die transgenen Nachkommen ein dichteres Gefäßnetzwerk. Dadurch ist die Gesamtgefäßoberfläche vergrößert und der Stoffaustausch erhöht, woraus ein verbesserter A β -Transport sowie eine verbesserte O $_2$ - und Nährstoffversorgung resultiert. Bei gesunden Wildtyptieren zeigt postnatale Aktivität ausgeprägte proangiogenetische (Black et al., 1990) und antioxidative Effekte (Yamashita et al., 1999). In dieser Arbeit konnte eine kurzdauernde und indirekte pränatale Stimulation während der Schwangerschaft die Angiogenese im gesunden Gehirn nicht beeinflussen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit nur für MDR1 eine genotyp-unabhängige Regulation festgestellt werden. Bezüglich der anderen gemessenen Werte ergab sich kein Einfluss maternaler Stimulation auf gesunde Nachkommen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass transgene Tiere mit ihrer eingeschränkten vaskulären Funktion empfänglicher für den positiven Effekt maternaler Stimulation sind. Zudem ist die pränatale Stimulation im Vergleich zur postnatalen Stimulation indirekter und kürzer und dadurch weniger effektiv in der Wirkung auf gesunde Tiere. Es ist denkbar, dass der Effekt pränataler Stimulation auf das gesunde Gehirn aufgrund der geringen Tieranzahl und einer nur kurz währenden Stimulation in der vorliegenden Arbeit statistisch nicht signifikant war. In folgenden Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sollte der Effekt pränataler Stimulation auf die neurovaskuläre Funktion gesunder Individuen jedoch weiter untersucht werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schließen, dass pränatale körperliche Aktivität der Mutter während der Schwangerschaft mit einer verbesserten neurovaskulären Funktion der transgenen Nachkommen assoziiert ist. Aus einer erniedrigten Expression des A β -Influx-Rezeptors RAGE und des A β -

Efflux-Inhibitors *Lrpap1*, sowie einer erhöhten Expression des A β -Efflux-Rezeptors MDR1 in Verbindung mit einer Steigerung der Gefäßdichte, könnte insgesamt ein erhöhter A β -Netto-Ausstroms und damit einer Verringerung der A β -Peptid-Belastung im Gehirn resultieren. Daraus folgt möglicherweise wiederum eine verringerte A β -Plaques-Belastung und eine Reduktion der Konzentration löslicher A β -Oligomere, die das stärkste synaptotoxische Potential besitzen. Zudem konnte körperliche Aktivität während der Schwangerschaft neben der Verbesserung der neurovaskulären Funktion auch die Inflammation und den oxidativen Stress der Nachkommen verringern (Herring et al., 2012). Diese Ergebnisse sind eine Erklärung für die verbesserten kognitiven Leistungen der Nachkommen nach mütterlicher Aktivität, die in Voruntersuchungen festgestellt wurden.

4.2 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass die veränderte AD-Pathologie der Nachkommen nach mütterlicher körperlicher Aktivität durch eine Verbesserung der neurovaskulären Funktion mitbedingt ist. Es wurde bereits gezeigt, dass postnatale Aktivität die zerebrale Angiogenese sowohl bei gesunden (Black et al., 1990) als auch erkrankten Nagetieren (Herring et al., 2008) erhöht. Des Weiteren führt sie bei transgenen Mäusen zu einer veränderten Expression der wichtigsten A β -Transporter (Herring et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Hypothese, dass diese proangiogenetischen und Transporter-regulierenden Effekte des Laufens auch auf die ungeborenen erkrankten Nachkommen übertragbar sind. Dies zeigt sich durch stabile Veränderungen der neurovaskulären Einheit bis zum Erwachsenenalter bei ansonsten unstimulierten transgenen Nachkommen. Ein dichteres Gefäßnetzwerk verbessert die Gehirnversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und führt zusammen mit einer Regulation der A β -Transporter wahrscheinlich zu einem verbesserten A β -Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke. Welchen Effekt die Umweltsanreicherung jedoch entfaltet, hängt davon ab, zu welchem Zeitpunkt sie stattfindet und welche Rahmenbedingungen herrschen.

4.3 Einschränkungen der Arbeit und Ausblick

Wenn die Umweltbedingungen während der Schwangerschaft einen Einfluss auf die neurovaskuläre Einheit der Nachkommen besitzen, stellt sich die Frage, wie dieser Effekt übertragen wird. Aus zahlreichen epidemiologischen, klinischen und

experimentellen Studien ist bekannt, dass die Umweltbedingungen während der Prä- und Perinatalzeit Auswirkungen auf den Phänotyp und Gesundheitszustand des späteren Lebens entfalten können (Gluckman et al., 2008). Um langanhaltende postnatale Effekte zu etablieren, ist eine stabile Modulation der Genexpression notwendig, die zumindest zum Teil durch epigenetische Veränderungen vermittelt wird. Zur Epigenetik gehören Mechanismen, die zur Chromatinmodifikation führen und dauerhaft oder dynamisch die Genexpression modulieren, ohne dabei die DNA-Sequenz selbst zu verändern. Dazu gehören beispielsweise DNA-Methylierungen, posttranslationale Histon-Modifikationen und *small noncoding RNAs* (Bohacek et al., 2012). Epigenetische Regulationen sind ubiquitär im ZNS und essentiell für komplexe neuronale Prozesse wie beispielsweise die Gedächtnisbildung (Day & Sweatt, 2011). Exemplarisch könnte für die in dieser Arbeit festgestellte verminderte postnatale Expression des A β -Influx-Rezeptors RAGE in Folge der mütterlichen Stimulation während der Schwangerschaft die verstärkte Methylierung des *Rage*-Promotors verantwortlich sein. Die Methylierungsmuster der entsprechenden Promotoren wurden in dieser Arbeit nicht untersucht und sollten daher in zukünftigen Untersuchungen bestimmt werden.

Die Untersuchung des Einflusses von Umweltveränderungen auf das Epigenom ist Gegenstand aktueller Forschung. In diesem Zusammenhang konnten Fischer et al. zeigen, dass Umweltsanierung die Gedächtnisleistung in einem Tiermodell der Neurodegeneration wiederherstellen kann, wobei das *Enrichment* mit einer verstärkten Histon-Acetylierung assoziiert ist (Fischer et al., 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine paternale Ernährungsmodifikation zu epigenetischen Veränderungen Cholesterinmetabolismus-assoziiierter Gene der Nachkommen geführt hat (Carone et al., 2010). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass epigenetische Veränderungen zur Übertragung des Effekts pränataler Aktivität beigetragen haben.

Wenn epigenetische Veränderungen den Verlauf der AD beeinflussen können, sollte nach epigenetischen Therapeutika gesucht werden. In der Krebstherapie existieren bereits epigenetisch wirkende Medikamente, die im klinischen Einsatz erfolgreich sind (Dawson & Kouzarides, 2012).

Epigenetische Veränderungen, die durch bedeutsame Ereignisse oder Umweltstimulation induziert wurden, persistieren oft ein Leben lang und können

unter bestimmten Umständen auch auf nachfolgende Generationen übertragen werden (Guerrero-Bosagna & Skinner, 2012). Ob die in dieser Arbeit beobachteten neurovaskulären Veränderungen nur in der F1-Generation zu finden sind, oder auch auf weitere Generationen übertragen werden können, lässt sich hier nicht beantworten. Für den eindeutigen Nachweis eines transgenerationalen Effekts mütterlicher körperlicher Aktivität wären mindestens vier Generationen notwendig (F0 bis F3), da neben der F1-Generation auch die F2-Generation Umwelteinflüssen *in utero* ausgesetzt ist (siehe Abbildung 4-1).

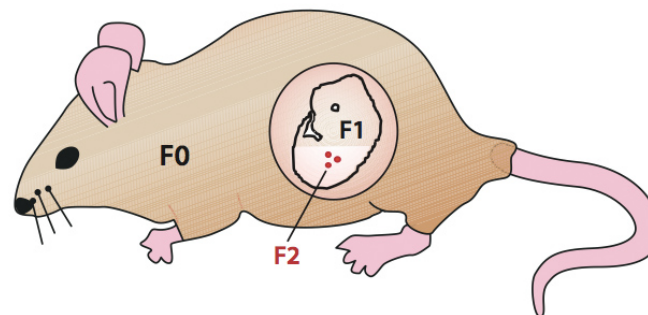


Abbildung 4-1 Drei Generationen sind direkten und indirekten Umwelteinflüssen ausgesetzt: die Mutter (F0), der Embryo (F1) und die F2-Generation in Form sich entwickelnder Keimzellen, übernommen aus Youngson & Whitelaw, 2008

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur eine Folgegeneration untersucht, wodurch transgenerationale epigenetische Effekt nicht von *in utero*-Effekten auf die Nachkommen zu trennen sind. Zum Nachweis einer transgenerationalen epigenetischen Vererbung wären bei paternalen Übertragung hingegen nur zwei Generationen notwendig.

Pränatale Effekte können durch direkte oder indirekte *in utero*-Effekte hervorgerufen werden. Dazu gehören Veränderungen der Plazenta oder der Blutzusammensetzung der Mutter. Zudem kann die vorherige physische Stimulation postnatal zu Veränderungen des Aufzuchtverhaltens oder der Muttermilch geführt haben. Hinsichtlich des Effektes körperlicher Aktivität während der Schwangerschaft auf die Nachkommen, konnte beim Menschen gezeigt werden, dass regelmäßige aerobe Aktivität nach Ausschluss von Kontraindikationen zu einem erhöhten Blutfluss, einem verbessertem Gasaustausch und zu Umbauprozessen der Plazenta mit verbesserter plazentarer Perfusion geführt haben. Gleichzeitig sank das Risiko für Gestationsdiabetes, Präeklampsie, Frühgeburtlichkeit sowie Geburtsgewichtextreme. Entgegen

häufiger Bedenken konnte unter Beachtung der Kontraindikationen keine Zunahme des Fehlgeburtsrisikos oder der Anzahl an Geburtskomplikationen festgestellt werden (Ferraro et al., 2012). Eine regelmäßige und aerobe körperliche Aktivität während der Schwangerschaft ist somit nicht nur in Hinblick auf die Alzheimer-Pathologie der Nachkommen zu empfehlen. Sie zeigt zudem deutliche positive gesundheitliche Effekte auf die Nachkommen und die Mutter selbst.

Eine Einschränkung dieser Arbeit ist die Tatsache, dass hier nur der Einfluss maternaler Stimulation und nur weibliche Nachkommen untersucht wurden. Zudem wurden die Nachkommen nach der Geburt von ihrer leiblichen Mutter nicht getrennt, sodass potentielle postnatale Aufzuchteffekte nicht ausgeschlossen sind. Verhaltensbiologisch wurden jedoch in Voruntersuchungen dieser Arbeit keine signifikanten Verhaltensänderungen der Mütter bezüglich des Putzverhaltens oder der Nestrückführung nach der Stimulation festgestellt. Interessant wären weiterführende Untersuchungen, welche die Auswirkungen paternaler und maternaler Stimulation vergleichen, bei denen die Aufzucht der Nachkommen bei Ammenmüttern stattfindet und bei denen sowohl weibliche als auch männliche Nachkommen untersucht würden. Zudem könnten durch Untersuchung mehrerer Nachfolgegenerationen Aussagen bezüglich eines transgenerationalen Effekts gemacht werden.

Des Weiteren wäre es sinnvoll, nicht nur zu einem Zeitpunkt die Auswirkungen auf die neurovaskuläre Einheit zu bestimmen. Die hier bestimmten Parameter wurden im adulten Stadium zum Zeitpunkt P150 nach Ausbruch der Krankheit ermittelt. Eine Möglichkeit bestünde darin, Zwischenmessungen einzuführen: Am Tag der Geburt (P0) könnten ausschließlich *in utero*-Effekte ermittelt, an P90 könnten präsymptomatische Werte bestimmt und zum Zeitpunkt P150 Werte nach Ausbruch der Krankheit gemessen werden. Dies würde einen zeitlichen Verlauf und ein dynamisches Bild der Regulation erzeugen. Da Tiere zur Untersuchung der hier bestimmten Parameter dekapitiert wurden, wäre jedoch nicht die longitudinale Untersuchung desselben Tieres möglich. Neue Untersuchungsmethoden, wie die Multiphotonenmikroskopie bieten zukünftig die Möglichkeit neurovaskuläre Veränderungen *in vivo* zu untersuchen (Grutzendler et al., 2011).

Bezüglich der Übertragbarkeit der erhobenen Ergebnisse auf den Menschen ergeben sich einige Einschränkungen: Mausmodelle der AD simulieren hauptsächlich die autosomal-dominante Variante der Erkrankung. Es existieren jedoch wichtige pathophysiologische Unterschiede zwischen der autosomal-dominanten und der viel häufiger auftretenden sporadischen Alzheimer Krankheit. Erstere wird vor allem durch eine Überproduktion von A β verursacht, letztere jedoch nicht zwangsläufig. Therapieansätze, die bei der ersten Form erfolgreich scheinen, müssen nicht unbedingt bei der Zweiten Wirkung zeigen. Jedoch sind beide Varianten durch ein erhöhtes A β -Level gekennzeichnet und Therapien, die das A β -Level reduzieren oder dessen schädlichen Wirkungen neutralisieren, können bei beiden Krankheitsformen wirksam sein (Hall & Roberson, 2012).

Zudem stellt sich die grundlegende Frage, ob der Begriff der Umweltanreicherung einer kritischen Betrachtung standhält. In experimentellen Untersuchungen ist mit dem Paradigma der Umweltanreicherung eine Anreicherung nur im Verhältnis zur Standardlabortierhaltung gemeint. Eigentlich stellt die sogenannte Standardhaltung in Käfigen ohne Laufrad und natürliche soziale Strukturen eine verarmte Lebenswelt dar. Untersuchungen zeigen, dass die Nichtbefriedigung grundlegender Bedürfnisse der Tiere zur gestörten Gehirnentwicklung und Verhaltensauffälligkeiten wie Stereotypien führt (Balcombe, 2006). Dieser Kritik folgend, gleicht das Hinzufügen eines Laufrades daher mehr einer Wiederherstellung der ursprünglichen Lebensbedingungen eines Nagetieres als einer echten Anreicherung. Interessant wären daher Untersuchungen, die den Einfluss einer zusätzlichen physischen Stimulation auf die AD-Pathologie bestimmen, bei einer ansonsten mehr an den natürlichen Bedingungen orientierten Haltung der Nagetiere.

Aus der zunehmenden gesamtgesellschaftlichen Herausforderung, die mit der AD verbunden ist, ergibt sich die Notwendigkeit, die Mechanismen, die zur Krankheitsentstehung führen, näher zu erforschen und Faktoren zu identifizieren, die das Auftreten der AD verhindern oder verlangsamen können. Da es zunehmend experimentelle Hinweise darauf gibt, dass die neurovaskuläre Dysfunktion ein frühes Ereignis in der Pathogenese der AD darstellt (Zlokovic, 2011), scheint ein präventiver Ansatz vielversprechend, der die neurovaskuläre Funktion verbessert.

5 Zusammenfassung

Körperliche Aktivität verbessert sowohl die Funktion des Gehirns von Gesunden als auch von Personen, die an der Alzheimer-Krankheit erkrankt sind. Bisher gab es jedoch nur wenige Untersuchungen, die sich mit dem Effekt von mütterlicher Aktivität auf die Gehirnfunktion der Nachkommen beschäftigt haben und wenn beschränkten sich diese auf gesunde Individuen.

Vorarbeiten konnten zeigen, dass mütterliches Laufen während der Schwangerschaft die Amyloidpathologie der Nachkommen im Alzheimer-Mausmodell signifikant verringert. In dieser Arbeit wurde darauf aufbauend der Einfluss pränataler physischer Aktivität auf die neurovaskuläre Dysfunktion im Tiermodell der Alzheimer-Erkrankung untersucht, als mögliche Erklärung dieses Effekts. Hierbei wurde die mütterliche Stimulation durch freiwilliges Laufen im Laufrad während der Schwangerschaft im Gegensatz zur Standardhaltung gewährleistet. Nach 5-monatiger Standardhaltung der Transgenen und Wildtyp-Mäuse wurden die Gehirne der Nachkommen untersucht. Dabei zeigt sich eine Verbesserung der neurovaskulären Funktion der transgenen Tiere durch veränderte Expression der Amyloid- β -Transporter und eine gesteigerte Angiogenese. Der Amyloid- β -Efflux Transporter *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1) ist nach mütterlichem Laufen hochreguliert, während der A β -Influx Transporter *Receptor for advanced glycation endproducts* (RAGE) herabreguliert ist. *Low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1), ein weiterer Amyloid- β -Efflux Transporter, zeigt sich unverändert. Jedoch konnte die transkriptionelle Herabregulation eines LRP1-Inhibitors festgestellt werden.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der positive Effekt mütterlichen Laufens auf die Amyloidpathologie der Nachkommen durch eine Veränderung der neurovaskulären Funktion mitverursacht ist. Einen möglichen Übertragungsweg stellen epigenetische Veränderungen der Nachkommen dar. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen unterliegt der eingeschränkten Vergleichbarkeit vom Tiermodell der Alzheimer-Krankheit und der humanen Alzheimer-Erkrankung. Dennoch können diese experimentellen Daten zeigen, dass körperliches Training nicht nur auf das Individuum selbst sondern auch auf die nachfolgende Generation positive Effekte ausüben und damit der Entstehung einer neurodegenerativen Erkrankung präventiv entgegenwirken kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Adlard, P.A., Perreau, V.M., Pop, V., Cotman, C.W. (2005): Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 25, 4217–4221.
2. Ahlskog, J.E., Geda, Y.E., Graff-Radford, N.R., Petersen, R.C. (2011): Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo. Clin. Proc.* 86, 876–884.
3. Alzheimer, A. (1907): Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatrie. Psychisch-Gerichtl. Med.* 64, 146-148.
4. Alzheimer's Association (2012): 2012 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers. Dement.* 8, 131–168.
5. Ambrée, O., Leimer, U., Herring, A., Görtz, N., Sachser, N., Heneka, M.T., Paulus, W., Keyvani, K. (2006): Reduction of amyloid angiopathy and Abeta plaque burden after enriched housing in TgCRND8 mice: involvement of multiple pathways. *Am. J. Pathol.* 169, 544–552.
6. Anand, R., Kaushal, A., Wani, W.Y., Gill, K.D. (2012): Road to Alzheimer's disease: the pathomechanism underlying. *Pathobiology.* 79, 55–71.
7. Anderson, L.M., Riffle, L., Wilson, R., Travlos, G.S., Lubomirski, M.S., Alvord, W.G. (2006): Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. *Nutrition.* 22, 327–331.
8. Arancio, O., Zhang, H.P., Chen, X., Lin, C., Trinchese, F., Puzzo, D., Liu, S., Hegde, A., Yan, S.F., Stern, A., et al. (2004): RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J.* 23, 4096–4105.

9. Attems, J., Quass, M., Jellinger, K.A., Lintner, F. (2007): Topographical distribution of cerebral amyloid angiopathy and its effect on cognitive decline are influenced by Alzheimer disease pathology. *J. Neurol. Sci.* 257, 49–55.
10. Bailey, T.L., Rivara, C.B., Rocher, A.B., Hof, P.R. (2004): The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 26, 573–578.
11. Balcombe, J.P. (2006): Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. *Lab. Anim.* 40, 217–235.
12. Barnes, D.E., Yaffe, K. (2011): The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 10, 819–828.
13. Bell, R.D., Sagare, A.P., Friedman, A.E., Bedi, G.S., Holtzman, D.M., Deane, R., Zlokovic, B.V. (2007): Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 909–918.
14. Bellucci, A., Rosi, M.C., Grossi, C., Fiorentini, A., Luccarini, I., Casamenti, F. (2007): Abnormal processing of tau in the brain of aged TgCRND8 mice. *Neurobiol. Dis.* 27, 328–338.
15. Berchtold, N.C., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J.P., Cotman, C.W. (2005): Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 133, 853–861.
16. Bertram, L., Lill, C.M., Tanzi, R.E. (2010): The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* 68, 270–281.

17. Black, J.E., Isaacs, K.R., Anderson, B.J., Alcantara, A.A., Greenough, W.T. (1990): Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5568–5572.
18. Bohacek, J., Gapp, K., Saab, B.J., Mansuy, I.M. (2013): Transgenerational epigenetic effects on brain functions. *Biol. Psychiatry* 73, 313–320.
19. Borth, W. (1992): Alpha 2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *Faseb J.* 6, 3345–3353.
20. Boucher, P., Herz, J. (2011): Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond. *Biochem. Pharmacol.* 81, 1–5.
21. Braak, H., Braak, E. (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta. Neuropathol.* 82, 239-259.
22. Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K., Arrighi, H.M. (2007): Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 3, 186- 191.
23. Buchman, A.S., Boyle, P.A., Yu, L., Shah, R.C., Wilson, R.S., Bennett, D.A. (2012): Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults. *Neurology* 78, 1323–1329.
24. Casella, G.T.B., Marcillo, A., Bunge, M.B., Wood, P.M. (2002): New vascular tissue rapidly replaces neural parenchyma and vessels destroyed by a contusion injury to the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 173, 63–76.
25. Castellani, R.J., Rolston, R.K., Smith, M.A. (2010): Alzheimer disease. *Dis. Mon.* 56, 484–546.
26. Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., Meissner, A., Weng, Z., Hofmann, H.A.,

- Friedman, N., Rando, O.J. (2010): Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143, 1084–1096.
27. Causevic, M., Ramoz, N., Haroutunian, V., Davis, K.L., Buxbaum, J.D. (2003): Lack of association between the levels of the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and either Alzheimer dementia or LRP exon 3 genotype. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 999–1005.
28. Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., Turner, S., Lozza, G., Grilli, M., Kunicki, S., Morissette, C., Paquette, J., Gervais, F., Bergeron, C., Fraser, P.E., Carlson, G.A., George-Hyslop, P.S., Westaway, D. (2001): Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J. Biol. Chem.* 276, 21562-21570.
29. Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L.-A. (2007): Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464–472.
30. Dawson, M.A., Kouzarides, T. (2012): Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150, 12–27.
31. Day, J.J., Sweatt, J.D. (2011): Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70, 813–829.
32. Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A.M., Armstrong, D.L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D., Zlokovic, B. (2003): RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* 9, 907–913.

33. Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., Xu, F., Parisi, M., LaRue, B., Hu, H.W., Spijkers, P., Guo, H., Song, X., Lenting, P.J., Van Nostrand, W.E., Zlokovic, B.V. (2004): LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 43, 333–344.
34. DeFina, L.F., Willis, B.L., Radford, N.B., Gao, A., Leonard, D., Haskell, W.L., Weiner, M.F., Berry, J.D. (2013): The Association Between Midlife Cardiorespiratory Fitness Levels and Later-Life Dementia: A Cohort Study. *Ann. Intern. Med.* 158, 162–168.
35. De Lange, E.C.M. (2004): Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1793–1809.
36. Den Dunnen, W., (2008): No disease in the brain of a 115-year-old woman. *Neurobiology of Aging*, 29, 1127–1132.
37. Dieckmann, M., Dietrich, M.F., Herz, J. (2010): Lipoprotein receptors--an evolutionarily ancient multifunctional receptor family. *Biol. Chem.* 391, 1341–1363.
38. Ding, Y.-H., Luan, X.-D., Li, J., Rafols, J.A., Guthinkonda, M., Diaz, F.G., Ding, Y. (2004): Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke. *Curr. Neurovasc. Res.* 1, 411–420.
39. Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan, J.A., 3rd, Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q., Sabo, E., Hovanesian, V., Stopa, E.G. (2006): RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 112, 405–415.

40. Duyckaerts, C., Potier, M.-C., Delatour, B. (2008): Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.* 115, 5–38.
41. Du, Y., Ni, B., Glinn, M., Dodel, R.C., Bales, K.R., Zhang, Z., Hyslop, P.A., Paul, S.M. (1997): alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein. *J. Neurochem.* 69, 299–305.
42. Elliott, D.A., Weickert, C.S., Garner, B. (2010): Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin. Lipidol.* 51, 555–573.
43. Endres, M., Gertz, K., Lindauer, U., Katchanov, J., Schultze, J., Schröck, H., Nickenig, G., Kuschinsky, W., Dirnagl, U., Laufs, U. (2003): Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann. Neurol.* 54, 582–590.
44. Ferraro, Z.M., Gaudet, L., Adamo, K.B. (2012): The potential impact of physical activity during pregnancy on maternal and neonatal outcomes. *Obstet. Gynecol. Surv.* 67, 99–110.
45. Glenner, G.G., Wong, C.W. (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890.
46. Görtz, N., Lewejohann, L., Tomm, M., Ambrée, O., Keyvani, K., Paulus, W., Sachser, N. (2008): Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behav. Brain Res.* 191, 43–48.
47. Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I. (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4913–4917.

-
48. Grutzendler, J., Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C.N., Gan, W.-B. (2011): Transcranial two-photon imaging of the living mouse brain. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2011. 9, 1080–1088.
49. Guerrero-Bosagna, C., Skinner, M.K. (2012): Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* 354, 3–8.
50. Hall, A.M., Roberson, E.D. (2012): Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 88, 3–12.
51. Hardy, J., Selkoe, D.J. (2002): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.
52. Hebb, D.O. (1947): The effects of early experience on problem-solving at maturity. *Am. Psychol.* 2, 306-307.
53. Herring, A., Ambree, O., Tomm, M., Habermann, H., Sachser, N., Paulus, W., Keyvani, K. (2009): Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp. Neurol.* 216, 184-192.
54. Herring, A., Blome, M., Ambree, O., Sachser, N., Paulus, W., Keyvani, K. (2010): Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology. *Brain. Pathol.* 20, 166-175.
55. Herring, A., Donath, A., Yarmolenko, M., Uslar, E., Conzen, C., Kanakis, D., Bosma, C., Worm, K., Paulus, W., Keyvani, K. (2012): Exercise during pregnancy mitigates Alzheimer-like pathology in mouse offspring. *FASEB J.* 26, 117–128.

56. Herring, A., Lewejohann, L., Panzer, A.-L., Donath, A., Kröll, 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.
57. Herring, A., Yasin, H., Ambree, O., Sachser, N., Paulus, W., Keyvani, K. (2008): Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in TgCRND8 mice. *Brain Pathol.* 18, 32-39.
58. Herz, J., Strickland, D.K. (2001): LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* 108, 779–784.
59. Holtzman, D.M., Morris, J.C., Goate, A.M. (2011): Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci. Transl. Med.* 3, 1-17.
60. Hyman, B.T., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Carrillo, M.C., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., Mirra, S.S., Nelson, P.T., Schneider, J.A., Thal, D.R., Thies, B., Trojanowski, J.Q., Vinters, H.V., Montine, T.J. (2012): National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 8, 1–13.
61. Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., and Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 7, 656–664.
62. Janus, C., Welzl, H., Hanna, A., Lovasic, L., Lane, N., St George-Hyslop, P., Westaway, D. (2004): Impaired conditioned taste aversion learning in APP transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 25, 1213–1219.
63. Jedlitschky, G., Vogelgesang, S., Kroemer, H.K. (2010): MDR1-P-glycoprotein (ABCB1)-mediated disposition of amyloid- β peptides: implications for the pathogenesis and therapy of Alzheimer's disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 88, 441–443.

64. Jones, S.E., Jomary, C. (2002): Clusterin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 427–431.
65. Kanekiyo, T., Bu, G. (2009): Receptor-associated protein interacts with amyloid-beta peptide and promotes its cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 284, 33352–33359.
66. Koch, M., Chitayat, S., Dattilo, B.M., Schiefner, A., Diez, J., Chazin, W.J., Fritz, G. (2010): Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. *Structure* 18, 1342–1352.
67. Kraepelin, E. (1909): *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte.* 8. vollständig umgearbeitete Auflage. 2 Bände. Leipzig: Barth Verlag.
68. Kuhnke, D., Jedlitschky, G., Grube, M., Krohn, M., Jucker, M., Mosyagin, I., Cascorbi, I., Walker, L.C., Kroemer, H.K., Warzok, R.W., Vogelgesang, S. (2007): MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides--implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol.* 17, 347–353.
69. Lam, F.C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A.B., Renoir, J.M., Sharom, F.J., and Reiner, P.B. (2001): Beta-Amyloid efflux mediated by P-glycoprotein. *J. Neurochem.* 76, 1121–1128.
70. Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y.-P., Hairston, I.S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V.M.-Y., Hersh, L.B., Sapolsky, R.M., Mirnic, K., Sisodia, S.S. (2005): Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice. *Cell* 120, 701–713.
71. Lee, I.-M., Shiroma, E.J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S.N., Katzmarzyk, P.T. (2012): Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *Lancet* 380, 219–229.

72. Llorens-Martín, M., Torres-Alemán, I., Trejo, J.L. (2010): Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 109–117.
73. Lue, L.-F., Kuo, Y.-M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., Rogers, J. (1999): Soluble Amyloid β Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology* 155, 853–862.
74. Mahley, R.W., Rall, S.C., Jr (2000): Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 1, 507–537.
75. Mealey, K.L., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Safe, S., Kochevar, D.T. (2002): Doxycycline induces expression of P glycoprotein in MCF-7 breast carcinoma cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 755–761.
76. Millan Sanchez, M., Heyn, S.N., Das, D., Moghadam, S., Martin, K.J., Salehi, A. (2012): Neurobiological elements of cognitive dysfunction in down syndrome: exploring the role of APP. *Biol. Psychiatry* 71, 403–409.
77. Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., Berg, L. (1991): The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479–486.
78. Molloy, D.W., Standish, T.I., Zhou, Q., Guyatt, G., and DARAD Study Group (2013): A multicenter, blinded, randomized, factorial controlled trial of doxycycline and rifampin for treatment of Alzheimer's disease: the DARAD trial. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 28, 463–470.

79. Montine, T.J., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., Mirra, S.S., Nelson, P.T., Schneider, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Vinters, H.V., Hyman, B.T. (2012): National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol.* 123, 1–11.
80. Narita, M., Holtzman, D.M., Schwartz, A.L., Bu, G. (1997): Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J. Neurochem.* 69, 1904–1911.
81. Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Haroutunian, V., Hof, P.R., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Iwatsubo, T., Jellinger, K.A., Jicha, G.A., Kövari, E., Kukull, W.A., Leverenz, J.B., Love, S., Mackenzie, I.R., Mann, D.M., Masliah, E., McKee, A.C., Montine, T.J., Morris, J.C., Schneider, J.A., Sonnen, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Wisniewski, T., Woltjer, R.L., Beach, T.G. (2012): Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381.
82. Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M. (2003): Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
83. Paris, D., Patel, N., DelleDonne, A., Quadros, A., Smeed, R., Mullan, M. (2004): Impaired angiogenesis in a transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. *Neurosci. Lett.* 366, 80–85.

84. Qiu, Z., Strickland, D.K., Hyman, B.T., Rebeck, G.W. (2001): Elevation of LDL receptor-related protein levels via ligand interactions in Alzheimer disease and in vitro. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 430–440.
85. Rando, O.J., Verstrepen, K.J. (2007): Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* 128, 655–668.
86. Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., Zlokovic, B.V. (2000): Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 106, 1489–1499.
87. Vogelgesang, S., Cascorbi, I., Schroeder, E., Pahnke, J., Kroemer, H.K., Siegmund, W., Kunert-Keil, C., Walker, L.C., Warzok, R.W. (2002): Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* 12, 535–541.
88. Walsh, D.M., Selkoe, D.J. (2007): A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* 101, 1172–1184.
89. Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W. (1975): A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1858–1862.
90. Wimo, A., Prince, M. (2010): World Alzheimer Report 2010: The Global Economic Impact of Dementia, Online-Publikation;
http://www.alz.org/documents/national/world_alzheimer_report_2010.pdf
91. Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T., Hori, M. (1999): Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation. *J. Exp. Med.* 189, 1699–1706.

-
92. Yan, S.D., Yan, S.F., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Kuppusamy, P., Smith, M.A., Perry, G., Godman, G.C., Nawroth, P. (1995): Non-enzymatically glycosylated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat. Med.* 1, 693–699.
93. Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., Migheli, A., Nawroth, P., Stern, D., Schmidt, A.M. (1996): RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382, 685–691.
94. Zhang, F., Wu, Y., Jia, J. (2011): Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. *Neuroscience* 177, 170–176.
95. Zlokovic, B.V. (2008): The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178–201.
96. Zlokovic, B.V. (2011): Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 723–738.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A2M	α 2-Makroglobulin
A β	Beta-Amyloid
AD	Alzheimer's Disease
APOE	Apolipoprotein E
APOJ	Apolipoprotein J
APP	Amyloid Precursor Protein
BHS	Bluthirnschranke
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAA	Cerebrale Amyloidangiopathie
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
h	Stunden
LRP1	Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1
LRPAP1	Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein Associated Protein 1
MCI	Mild cognitive impairment
MDR1	Multidrug Resistance Protein 1
MG	Molekulargewicht
Min	Minuten
MMP	Magermilchpulver
mSH	Maternale Standardhaltung
mLH	Maternale Laufradhaltung
NFTs	Neurofibrillary Tangles
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2

RAGE	Receptor for advanced glycosylation end products
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TG	Transgen
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.2 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Geräte

7.2.1 Chemikalien

Die angegebenen Chemikalien wurden von den folgenden Firmen in der Qualität *pro analysis* bezogen. Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Roth und Sigma-Aldrich GmbH bezogen.

Tab 7-1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, BRD
Igepal	Sigma-Aldrich GmbH, BRD
Immobilon Western, Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Cooperation, Billerica, MA, USA
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich GmbH, BRD
Proteinstandard	Bluerange® Prestained Protein Marker Mix, PIERCE Biotechnology, Rockford, IL, USA
Temed	BioRad, München, BRD
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN, Meckenheim, BRD
Tween 20	Merck, Darmstadt, BRD

7.2.2 Lösungen und Puffer

Tab 7-2 Verwendene Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver (MMP) in 1× TST-Puffer
Blotpuffer (1×)	48 mM Tris-HCl 39 mM Glycin 20 % Methanol
Lysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 2 % Igepal 1 % Natrium-Desoxycholat 1 mM PMSF
1× PBS	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 1,66 mM NaH ₂ PO ₄ 9,58 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Ponceau-S-Färbelösung	2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure 3 % Sulfosalicylsäure in aqua dest.
10× SDS-Laufpuffer	1,92 M Glycin 322 mM Tris 66 mM SDS
5× SDS-PAGE Auftragspuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 10 % Glycerol 2 % SDS 5 % 2β-Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau
10× TST-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 1,5 M NaCl 1 % Tween 20
Lower-Tris	1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS
Upper-Tris	0,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS

7.2.3 Materialien, Geräte und Software

Tab 7–3 Verwendete Geräte und Software

Geräte und Software	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell	BioRad, München, BRD
Elektrophoresekammer	Mini Protean Tetra Cell	BioRad, München, BRD
Digitalkamera	ChemiDoc XRS	BioRad, München, BRD
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, BRD
Lichtmikroskop	Nikon Eclipse 80i	Nikon, Tokyo, Japan
Magnetrührer	IKA RCT classic	IKA, Staufen, BRD
Nitrozellulosemembran	Protran Nitrocellulose Membran Filters	VWR International GmbH, Darmstadt, BRD
Photometer zur RNA-Konzentrationsbestimmung	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, BRD
PCR-Cycler	Primus 25	MWG-Biotech Inc., Ebersberg, BRD
RT-PCR-Cycler	7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RT-PCR-Auswertung	7500 Fast System SDS Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Spannungsgeräte	PowerPac HC	BioRad, München, BRD
Statistiksoftware	SPSS 17	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Stereologische Auswertung	Stereo Investigator 9.02	MicroBright-Field, Williston, VT, USA
Western-Blot Auswertung	Image Lab 2.0 Densitometry Software	BioRad, München, BRD
Vortex	Vortex-Genie II	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Zentrifuge	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Asheville, NC, USA

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Kathy Keyvani für die Überlassung des Dissertationsthemas und die fachlich exzellente sowie stets herzliche Betreuung. Ich danke zudem Dr. rer. nat. Arne Herring und Dr. rer. nat. Anja Donath für die Einarbeitung im Labor und stetige Unterstützung bei allen Fragen, Problemen und beim Verfassen der Dissertation. Für die ausserordentlich gute Zusammenarbeit im Labor danke ich Maksym Yarmolenko, Katharina Steiner, Manuel Widera, Claudius Bosma, Samira Hamzehian, Catharina Conzen, Dimitrios Kanakis sowie allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Es war eine Zeit, in der ich viel gelernt habe und an die ich mich immer gerne zurück erinnern werde. Mein Dank gilt zudem Sandra Swoboda, Tim Lehmann und meiner Mutter für das mehrfache Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die menschliche Unterstützung in allen Lebenslagen danke ich meiner Familie, meinen Freunden und Kübra.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.