

Aus der
Klinik für Neurologie
Direktor: Professor Dr. med. Lars Timmermann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Verhaltensanalyse bei Tau-transgenen Mäusen unter Intoxikation mit Saft
aus *Annona muricata*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Britta Jainsch
aus Kaposvár

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
16.06.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin:	Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner
Referent:	Herr Prof. Dr. Dr. h.c. W. H. Oertel
1. Korreferent:	Frau Prof. Dr. K. Thieme

Meinen Kindern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Tau-Protein bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	1
1.2 Genetik von Tau sowie Struktur und Funktion des Tau-Proteins.....	1
1.3 Phosphorylierung und Hyperphosphorylierung von Tau.....	2
1.4 Genetische Ursachen von Tauopathien.....	4
1.5 Biochemische und klinische Merkmale der Tau-R406W-Mutation.....	6
1.6 Tauopathien durch Umweltfaktoren.....	6
1.7 Atypische Parkinson-Syndrome auf Guadeloupe.....	7
1.8 Zusammenhang zwischen <i>Annonaceae</i> -Neurotoxinen und den atypischen Parkinson-Syndromen auf Guadeloupe.....	8
1.9 Evidenz für den Synergismus einer Annonacin-Intoxikation und der R406W-Mutation bei Tau-transgenen Mäusen <i>in vivo</i>	10
1.10 Tau-transgene Mausmodelle.....	10
1.11 Ziel der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Generierung der Tiere der beiden Mauskohorten.....	14
2.2 Tierhaltungsbedingungen der Mauskohorten.....	14
2.3 Behandlung mit Saft aus <i>A. muricata</i>	15
2.4 Übersicht über die experimentelle Phase.....	16
2.5 Rotarod-(ROD)-Test.....	17
2.6 Offenfeld-Test (OFT).....	18
2.7 Objektwiedererkennungstest (OWT).....	20
2.8 Sozialer-Interaktionstest (SIT).....	22
2.9 Forcierter-Schwimm-Test (FST).....	23
2.10 Statistik.....	25
3 Ergebnisse	26
3.1 Körpergewicht.....	26
3.2 Flüssigkeitsaufnahme.....	27
3.3 Rotarod-(ROD)-Test.....	27
3.3.1 Zeit auf dem Stab.....	27

3.3.2	Anzahl der Versuche auf dem Stab.....	29
3.4	Offenfeld-Test (OFT).....	31
3.4.1	Zurückgelegte Strecke im OFT.....	31
3.4.2	Geschwindigkeit im OFT.....	33
3.4.3	Aktivität im OFT.....	35
3.4.4	Aufrichtverhalten im OFT	37
3.4.5	Zeit in der zentralen Zone im OFT	39
3.5	Objektwiedererkennungstest (OWT).....	41
3.5.1	Aufenthaltszeit im Objektbereich	41
3.5.2	Anzahl der Objektbesuche im OWT.....	43
3.5.3	Durchschnittliche Zeit pro Objektbesuch im OWT	45
3.6	Sozialer-Interaktions-Test (SIT).....	47
3.6.1	Anzahl der Kontakte im SIT	47
3.6.2	Kontaktzeit im SIT.....	48
3.6.3	Zeit pro Kontakt im SIT.....	50
3.7	Forcierter-Schwimm-Test (FST)	51
3.7.1	Aktive Zeit im FST	51
3.7.2	Passive Zeit im FST	52
4	Diskussion	55
4.1	Körpergewicht	55
4.2	Rotarod-(ROD)-Test.....	55
4.3	Offenfeld-Test (OFT).....	58
4.4	Objektwiedererkennungstest (OWT).....	62
4.5	Sozialer-Interaktionstest (SIT).....	66
4.6	Forcierter-Schwimm-Test (FST)	68
4.7	Schlussfolgerung.....	70
5	Zusammenfassung.....	76
6	Summary.....	78
7	Literaturverzeichnis.....	80
8	Anhang	
a.	Lebenslauf	
b.	Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen.....	99
c.	Danksagung	100
d.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	101

Abkürzungsverzeichnis

0N-, 1N-, 2N-Tau	Tau-Isoform mit 0, 1 oder 2 Aminosäuresequenzen in der N-terminalen Region, entstehen durch das alternative Spleißen von Exon 2 und 3
3R-, 4R-Tau	Tau-Isoform mit 3 bzw. 4 Mikrotubuli-bindenden Aminosäuresequenzen (repeats) in der C-terminalen Region, entstehen durch das alternative Spleißen von Exon 10
3NT	3-Nitrotyrosin
<i>A. muricata</i>	<i>Annona muricata</i>
AD	Alzheimer-Erkrankung (disease)
ANOVA	Analysis of Variance
APP	Amyloid-Precursor-Protein
ASOs	Antisense-Oligonukleotide
ATP	Adenosintriphosphat
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum der Philipps-Universität Marburg
CBD	Corticobasale Degeneration, eine sporadische Tauopathie
C-terminale Region	Carboxy-terminale Region des Tau-Proteins
FST	Forcierter Schwimm-Test
FTD	Frontotemporale Demenz
FTDP-17	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17
FTLD	Frontotemporale Lobärdegeneration
FTLD-Tau	Frontotemporale Lobärdegeneration mit Ablagerungen von Tau
Gd-PDC	PDC-ähnliche Erkrankung von Guadeloupe
Gd-PSP	PSP-ähnliche Erkrankung von Guadeloupe
HSD	Honestly significant difference (post-hoc Test)
hWT-Tiere	transgene Mäuse, die das humane Wildtyp-Tau Protein überexprimieren
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
MCI	mild cognitive impairment, präklinisches Alzheimer-Stadium
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MWM	Morris Water Maze
NFT	Neurofibrillary tangles, intraneuronale Bündel aus Tau-Fibrillen
N-terminale Region	Amino-terminale Region des Tau-Proteins
nTg	nicht-transgen
OFT	Offenfeldtest
OWT	Objektwiedererkennungstest
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	Parkinson-Demenz-Komplex
PHF	Paired helical filaments, gepaarte schraubenförmige Tau-Fibrillen
PrP	Prion-Protein (Promotor)
PSP	Progressive supranukleäre Lähmung (palsy), eine sporadische Tauopathie
R406W	Mutation im MAPT-Gen, die den Austausch der Aminosäure Arginin (R) zu Tryptophan (W) auf Position 406 des Tau-Proteins bewirkt
R406W-Tiere	transgene Tiere, die humanes Tau-Protein mit der R406W-Mutation überexprimieren
ROD	Rota-Rod Test
Saft-Kohorte	Mauskohorte aus Tau-transgenen und nTg-Tieren, die mit Saft aus <i>A. muricata</i> behandelt wurden

SEM	Standard error of mean (Standardfehler)
SIT	Sozialer Interaktionstest
Wasser-Kohorte	Mauskohorte aus Tau-transgenen und nTg-Tieren, die Wasser erhielt
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	4-Kammer-Rotarod-Apparat aus Versuchsleiterperspektive (links) und Detaildarstellung einer Kammer mit Drehstab (rechts).....	18
Abb. 2.2:	Offenfeld-Testapparatur aus Versuchsleiterperspektive (links) und von oben aus der Kameraperspektive (rechts).....	19
Abb. 2.3:	Automatische Objektverfolgung der automatisierten Viewer tracking Software in einer Arena der Offenfeld-Testapparatur.....	20
Abb. 2.4:	Verwendete Objekte im Objektwiedererkennungstest (OWT, Beispiele)	21
Abb. 2.5:	Testapparatur für den Forcierten-Schwimm-Test (FST) – Ansicht von vorne aus der Kamera-/Versuchsleiterperspektive (links) und von der Seite (rechts Bild)	24
Abb. 3.1:	Körpergewicht (g) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	27
Abb. 3.2:	Maximale Zeit (s) auf dem Stab (Rotarod-(ROD)-Test) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	29
Abb. 3.3:	Anzahl der Versuche auf dem Stab (Rotarod-(ROD)-Test) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	31
Abb. 3.4:	Zurückgelegte Strecke (cm) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	33
Abb. 3.5:	Geschwindigkeit (cm/s) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	35
Abb. 3.6:	Aktivität (%) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	37
Abb. 3.7:	Anzahl der <i>Rearings</i> im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	39
Abb. 3.8:	Zeit in der zentralen Zone (s) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	41
Abb. 3.9:	Zeit in der Objektzone (s) im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	43
Abb. 3.10:	Anzahl der Objektbesuche im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	45
Abb. 3.11:	Zeit pro Objektbesuch (s) m Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	46
Abb. 3.12:	Anzahl der Kontakte der Genotypen-Paare im Sozialen-Interaktionstest (SIT) in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	48
Abb. 3.13:	Kontaktzeit (s) im Sozialen-Interaktionstest (SIT) der Genotypen-Paare in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	49
Abb. 3.14:	Zeit pro Kontakt (s) im Sozialen-Interaktionstest (SIT) der Genotypen-Paare in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	50
Abb. 3.15:	Aktive Zeit (%) im Forcierten-Schwimm-Test (FST) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	52
Abb. 3.16:	Passive Zeit (%) im Forcierten-Schwimm-Test (FST) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	54

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	Körpergewicht (g) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	26
Tab. 3.2:	Maximale Zeit auf dem Stab (s) im Rotarod-(ROD)-Test der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	28
Tab. 3.3:	Anzahl der Versuche auf dem Stab im Rotarod-(ROD)-Test der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	30
Tab. 3.4:	Zurückgelegte Strecke (cm) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	32
Tab. 3.5:	Geschwindigkeit (cm/s) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	34
Tab. 3.6:	Aktivität (%) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	36
Tab. 3.7:	Anzahl der <i>Rearings</i> im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	38
Tab. 3.8:	Zeit in der zentralen Zone (s) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	40
Tab. 3.9:	Zeit in der Objektzone (s) im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den zwei Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.	42
Tab. 3.10:	Anzahl der Objektbesuche im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.....	44
Tab. 3.11:	Anzahl der Kontakte der Genotypen-Paare im Sozialen-Interaktionstest (SIT) in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	47
Tab. 3.12:	Kontaktzeit (s) im Sozialen-Interaktionstest (SIT) der Genotypen-Paare in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	49
Tab. 3.13:	Aktive Zeit (%) im Forcierten-Schwimm-Test (FST) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte	51
Tab. 3.14:	Passive Zeit (%) im Forcierten-Schwimm-Test (FST) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte.	53

1 Einleitung

1.1 Tau-Protein bei neurodegenerativen Erkrankungen

Pathologische Veränderungen des Tau-Proteins spielen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle. Bei der Alzheimer-Erkrankung (AD) gehört die Ausbildung von Neurofibrillen zu den histopathologischen Charakteristika (Alzheimer, 1907; Brion et al., 1985). Die Beobachtung, dass diese intrazellulären filamentösen Ablagerungen verändertes Tau-Protein beinhalten, rückte dieses Protein in den Fokus der Forschung (Grundke-Iqbal et al., 1986a; Montejo de Garcini et al., 1986). Weitere, mit Tau-Ablagerungen einhergehende, neurodegenerative Erkrankungen sind verschiedene atypische Parkinson-Syndrome und Formen der Frontotemporalen Lobärdegeneration (FTLD) (Rabinovici und Miller, 2010).

Das Tau-Protein wurde erstmals 1975 als ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) beschrieben, das am Auf- und Abbau sowie an der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt ist (Weingarten et al., 1975; Cleveland et al., 1977a,b). Weiter reguliert Tau den axonalen Transport von Zellorganellen (Vershinin et al., 2007; Dixit et al., 2008). Bei Menschen kommt das Tau-Protein hauptsächlich im Zytosol der Neuronen des Zentralen Nervensystems (ZNS) und dort vorwiegend in den Axonen vor (Binder et al., 1985; Kowall und Kosik, 1987). Die variablen Funktionen des Tau-Proteins werden hauptsächlich durch die Expression verschiedener Isoformen und durch den Phosphorylierungsgrad des Proteins kontrolliert.

1.2 Genetik von Tau sowie Struktur und Funktion des Tau-Proteins

Das aus 16 Exons bestehende Gen (Andreadis et al., 1992, 1995) für das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau (MAPT) liegt als einzelne Kopie auf dem langen Arm des Chromosoms 17 auf Bandposition 17q21 (Neve et al., 1986). Die Isoformen des humanen Tau-Proteins entstehen durch alternatives Spleißen (Exon 2, 3 und 10) des primären Transkripts (Goedert et al., 1988; Andreadis et al., 1992). Im humanen ZNS werden sechs messenger Ribonukleinsäuren (mRNAs) (2-3-10-, 2+3-10-, 2+3+10-, 2-3-10+, 2+3-10+, 2+3+10+) und folglich sechs Tau-Isoformen mit 352–441 Aminosäuren gebildet. Die Tau-Isoformen unterscheiden sich durch das Vorhandensein von drei oder vier Wiederholungssequenzen (*repeats*) in der carboxy (C)-terminalen Region durch alternatives Spleißen mit Ein- oder Ausschluss von Exon 10 (4R- oder 3R-Tau) sowie durch das Vorhandensein bzw. Fehlen von ein oder zwei Aminosäuremotiven in der amino (N)-terminalen Region durch alternatives Spleißen von Exon 2 und 3 (0N-, 1N- oder 2N-Tau) (Goedert et al., 1989a,b; Himmler et al., 1989; Kosik et al., 1989).

Die N-terminale Tau-Projektionsdomäne bestimmt den Abstand der Mikrotubuli zueinander (Chen et al., 1992) und interagiert mit dem Zytoskelett (Hirokawa et al., 1988), unter anderem mit Aktin-

und Spektrin-Filamenten (Carlier et al., 1984), zytoplasmatischen Organellen wie Mitochondrien (Rendon et al., 1990) und mit der neuronalen Plasmamembran (Brandt et al., 1995).

Die C-terminale Mikrotubuli-bindende Domäne mit drei bzw. vier Sequenzwiederholungen (3R- bzw. 4R-Tau) fördert die Polymerisation der Mikrotubuli und vermittelt deren dynamische Stabilität (Mandelkow et al., 1996; Preuss et al., 1997). Über die Beteiligung am Auf- und Abbau der Mikrotubuli spielt Tau beim Erhalt der Zellform und -struktur sowie beim Wachstum von Axonen während der Entwicklung eine Rolle (Esmaeli-Azad et al., 1994). 4R-Tau weist eine größere Bindungsaffinität zu den Mikrotubuli auf als 3R-Tau auf (Goedert und Jakes, 1990; Butner und Kirschner, 1991). Die Mikrotubuli-Bindungsdomäne moduliert zudem den Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins (Sontag et al., 1999; Takashima et al., 1998).

Darüber hinaus interagiert Tau im Bereich der Synapsen mit postsynaptischen Komplexen der Signalübertragung, reguliert die Funktion glutamaterger Rezeptoren in den Dendriten und beeinflusst den Transport sowie die Funktion von synaptischen Mitochondrien (Pooler et al., 2014).

1.3 Phosphorylierung und Hyperphosphorylierung von Tau

Die Komplexität der Tau-Isoformen wird durch verschiedene posttranslationale Modifikationen, am Bedeutsamsten durch die Phosphorylierung, weiter erhöht. Der Tau-Phosphorylierungsstatus wird durch Kinasen und Phosphatasen reguliert (Sengupta et al., 1998; Wang et al., 1998; Zheng-Fischer et al., 1998; Jicha et al., 1999). Die Phosphorylierungsstellen treten gehäuft in den flankierenden Regionen der Mikrotubuli-bindenden Domänen auf. Phosphorylierte Tau-Isoformen binden weniger effektiv an Mikrotubuli und fördern daher auch schlechter deren Polymerisation (Drechsel et al., 1992; Bramblett et al., 1993; Biernat et al., 1993).

Im Gehirn von Alzheimer-Erkrankten ist die Tau-Phosphorylierungsrate im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen um das Drei- bis Vierfache erhöht (Khatoon et al., 1992, 1994). In isolierten „paired helical filaments“ (PHF) aus Gehirngewebe von Patienten mit AD (Grundke-Iqbal et al., 1984) ist hyperphosphoryliertes Tau-Protein der Hauptbestandteil (Grundke-Iqbal et al., 1986a, 1986b; Kosik et al., 1986, Wood et al., 1986). Laut *in vitro* Studien kann hyperphosphoryliertes Tau nicht mehr an Mikrotubuli binden und deren Polymerisierung fördern (Alonso et al., 1994; Wang et al., 1998). Zudem verdrängt hyperphosphoryliertes Tau normales Tau und andere MAPs von den Mikrotubuli und destabilisiert diese Proteine (Alonso et al., 1996). Nach Dephosphorylierung dissoziiert das Tau-Protein von den PHF und erlangt seine biologische Aktivität zurück (Wang et al., 1995, 1996). Prinzipiell fördert die Tau-Hyperphosphorylierung über Konformationsänderungen die Aggregation des Proteins (Baner et al., 1989, Köpke et al., 1993; Takeda et al., 2000a,b; Liu et al., 2005).

Studien belegen, dass zahlreiche MAPT-Mutationen zu veränderten Tau-Konformationen führen, die leichter phosphoryliert werden und im Vergleich zum Wildtyp-Tau bei einer niedrigeren Phosphorylierungsstufe zu Fibrillen polymerisieren (Alonso et al., 2004). Die Folgen der Tau-Hyperphosphorylierung sind die Störung des axonalen Transports, die Hemmung des Auswachsens von Axon-ähnlichen Ausläufern und das Auftreten von degenerativen Zellveränderungen (Yang et al., 2007). Das hyperphosphorylierte, in seiner Konformation veränderte Tau akkumuliert im Soma und den Dendriten der Nervenzellen (Kosik et al., 1993; Wood et al., 1986) und bildet dort intrazelluläre Ablagerungen. Die Tau-Hyperphosphorylierung fördert den pathologischen Wiedereintritt der Nervenzellen in den Zellzyklus und kann somit zur Neurodegeneration führen (Wen et al., 2004; Andorfer et al., 2005; Khurana et al., 2006; Zhu et al., 2007). Aktuell gilt die Hyperphosphorylierung von Tau als eine frühe Stufe der Tau-vermittelten Neurodegeneration und als eine wichtige Ursache für die Beschleunigung des Krankheitsprozesses der AD.

Zusammenfassend ist das Tau-Protein in pathologischen Zuständen hyperphosphoryliert und verliert seine natürlichen Funktionen in den Neuronen. Weiter kommt es zu einer unphysiologischen Umverteilung von Tau aus den Axonen in das Soma und die Dendriten. Diese Veränderungen werden unter dem „*loss of function*“ Modell zusammengefasst (Bodea et al., 2016).

Intrazelluläre neuronale Tau-Ablagerungen werden als „*neurofibrillary tangles*“ (NFTs) bezeichnet. Ultrastrukturell werden PHF und „*straight filaments*“ (SF) unterschieden (Kidd, 1963). Die sechs Braak-Stadien der AD basieren auf dem sequenziellen Auftreten von NFTs im ZNS, das mit der Schwere der Erkrankung korreliert (Braak und Braak, 1991; Braak et al., 2006). Die NFTs sind allerdings auch mit Einschränkungen des Gedächtnisses im Rahmen des normalen Alterns und in präklinischen Alzheimer-Stadien im Sinne eines „*mild cognitive impairment*“ (MCI) assoziiert (Arriagada et al., 1992; Guillozet et al., 2003).

Neuere Untersuchungen belegen, dass auch aus Gehirnen von Alzheimer-Erkrankten isolierte präfibrilläre kleinere Tau-Aggregate (Oligomere) für die Zellen des ZNS toxisch wirken (Maeda et al., 2018). Vermutlich trägt das lösliche oligomere Tau zur Degeneration von Synapsen und zur Dysfunktion von Mitochondrien bei Tauopathien bei (Lasagna-Reeves et al., 2011). Die Entwicklung toxischer Eigenschaften von Tau (u.a. durch Bildung von Oligomeren) bei neurodegenerativen Erkrankungen wird als „*gain of toxic function*“ Modell (Bodea et al., 2016) zusammengefasst.

Das Tau-Protein kommt nicht nur wie bislang angenommen intrazellulär, sondern auch außerhalb von Neuronen und Gliazellen in der interstitiellen Flüssigkeit (Yamada et al., 2011; Sato et al., 2018) und im Liquor (Blennow et al., 1995; Blennow und Zetterberg, 2018; Olsson et al., 2005) vor. Laut tierexperimentellen Studien wirkt extrazelluläres Tau neurotoxisch. Extrazelluläre Tau-Aggregate binden an neuronale Rezeptoren und werden von den Zellen aufgenommen, wo sie prionenartig eine Fehlfaltung und Aggregation des nativen intrazellulären Taus induzieren (Gao et al., 2018). Auf diese

Weise breitet sich die Tau-Pathologie über das Gehirn im Sinne der Braak-Stadien aus (Guo und Lee, 2014).

1.4 Genetische Ursachen von Tauopathien

Tauopathien sind eine heterogene Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen mit intrazellulären Einschlüssen aus verändertem Tau-Protein im ZNS. Anders als bei der AD, bei der die Ablagerungen aus intrazellulärem Tau-Protein und extrazellulärem β -Amyloid bestehen, enthalten die Ablagerungen bei primären Tauopathien ausschließlich Tau-Protein (Irwin, 2016).

1994 wurde eine familiäre autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit Verhaltensstörungen, Demenz vom Frontallappentyp, Parkinson-Symptomen und Amyotrophie beschrieben, die sich auf einen Locus auf dem Chromosom 17q21-22 zurückführen ließ (Wilhelmsen et al., 1994; Lynch et al., 1994). Seitdem wurden über 150 Familien mit klinischen und pathologischen Charakteristika einer Frontotemporalen Demenz (FTD) in Verknüpfung mit dem Chromosom 17q21-22 entdeckt (Wijker et al., 1996; Bird et al., 1997; Heutnik et al., 1997; Murrell et al., 1997; van der Zee und van Broeckhoven 2014). Die Krankheitsfälle wurden in eine Gruppe von Erkrankungen eingeordnet, die als Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus des Chromosoms 17 (FTDP-17) bezeichnet werden (Foster et al., 1997). 1998 wurden die ersten, mit einer FTDP-17 assoziierten Mutationen im Tau-Gen entdeckt (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Inzwischen sind mindestens 59 Mutationen im Tau-Gen beschrieben (Goedert und Spillantini, 2017).

2006 wurden Mutationen im Progranulin-Gen in einer benachbarten Region des Chromosoms 17 als zweite Ursache für eine FTDP-17 beschrieben (Baker et al., 2006; Cruts et al., 2006). Betroffene zeigen Ablagerungen des TAR-DNA-bindenden Proteins 43 (TDP-43) (Rademakers et al., 2012; Lee et al., 2017). Da der Begriff FTDP-17 nicht zwischen den Ursachen (Mutation im Tau-Gen bzw. Progranulin-Gen) bzw. der Erkrankung zugrundeliegenden Proteinablagerungen unterscheidet, wurde vorgeschlagen Frontotemporale Lobärdegenerationen mit Ablagerungen von Tau (FTLD-Tau) von Frontotemporalen Lobärdegenerationen mit Ablagerungen von TDP-43 (FTLD-TDP) abzugrenzen (Cairns et al., 2007; Forrest et al., 2018).

Zur FTLD-Tau-Gruppe zählen überwiegend sporadische Tauopathien wie die Pick-Erkrankung, die Corticobasale Degeneration (CBD), die Progressive supranukleäre Lähmung (PSP), die Globuläre gliale Tauopathie (GGT) (Forrest et al., 2018) sowie seltene primär altersabhängige Tauopathien (Crary et al., 2014). Weiter beinhaltet die FTLD-Tau-Gruppe seltenere, zumeist autosomal-dominant vererbte Erkrankungen mit Nachweis von MAPT-Mutationen mit sich überschneidenden klinischen und neuropathologischen Merkmalen (Rabinovici und Miller, 2010; Bahia et al., 2013). Klinische Symptome der FTLD-Tau-Erkrankungen assoziiert mit MAPT-Mutationen sind Verhaltensänderungen, Verlust der frontalen exekutiven Funktionen, Sprachstörungen und Hyperoralität; zwischen den

betroffenen Familien besteht jedoch eine große klinische Heterogenität. Bei einigen Familien wurden Parkinsonismus und Amyotrophie nachgewiesen (Reed et al., 2001). Die klinische Ausprägung der Symptome variiert mit der Art und der Lokalisation der Mutation. Bei derselben Mutation, auch innerhalb einer Familie, können aber verschiedene Phänotypen – vom typischen Bild einer FTD bis hin zu einer AD-typischen Demenz – auftreten (Lindquist et al., 2008). Bei den meisten Betroffenen beginnt die FTLD-Tau assoziiert mit MAPT-Mutationen früh (45.–65. Lebensjahr), schreitet rasch progredient fort und führt innerhalb von 8–10 Jahren zum Tod (Bird et al., 1999; Kobayashi et al., 2003); beschrieben wurden jedoch auch Fälle mit einem langsamen Verlauf von bis zu 25 Jahre (Kobayashi et al., 2003; Murrell et al., 1999). Bei allen *post mortem* untersuchten Patienten mit FTLD-Tau assoziiert mit MAPT-Mutationen wurde eine pathologische Tau-Akkumulation in Neuronen oder in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen.

MAPT-Mutationen sind für ca. 5 % der FTD-Fälle verantwortlich (Goedert und Spillantini, 2017). Die Mutationen treten gehäuft in den für die Mikrotubuli-bindenden Domänen kodierenden Regionen der Exons 9–12 sowie in den flankierenden Introns des Exons 10 auf. MAPT-Mutationen können in zwei funktionelle Gruppen unterteilt werden (Goedert und Spillantini, 2017).

Die erste Klasse der MAPT-Mutationen betrifft primär die Funktion von Tau als Protein. Dazu zählen Missense- und Deletions-Mutationen in den kodierenden Regionen des Tau-Gens, welche Veränderungen in der Aminosäuren-Sequenz von Tau bewirken. Diese Mutationen führen über Austausch oder Verlust von einzelnen Aminosäuren zu Veränderungen in der Sekundärstruktur der Tau-Isoformen. Da die Mutationen in den konstitutiv exprimierten Exons liegen, sind alle Isoformen des Tau-Proteins betroffen. Zu dieser Gruppe gehört die in dieser Arbeit untersuchte Punktmutation R406W im Exon 13 (Veränderung der DNA-Sequenz CGG zu TGG), bei der im C-terminalen Segment des Tau-Proteins auf Position 406 ein Arginin gegen ein Tryptophan ersetzt ist (Reed et al., 1997; Hutton et al., 1998).

Die zweite Klasse der MAPT-Mutationen, welche primär die Regulation des Spleißens von Exon 10 verändert, ist im Exon 10 und in den Introns an der 5' und 3' Spleißstelle dieses Exons lokalisiert und stört das alternative Spleißen über eine Veränderung der Struktur der Spleißstellen (Ghetti et al., 2015), wodurch sich das Verhältnis der 4R- und 3R-Isoformen verschiebt. Die Mehrzahl dieser Mutationen fördert den Einschluss von Exon 10 in die mRNA und damit die Expression der 4R-Tau-Isoform (Hutton et al., 1998), die daher in den unlöslichen Filamenten bei diesen Erkrankungen meist dominiert (Clark et al., 1998). Mutationen, die den Ausschluss von Exon 10 aus der mRNA fördern, verstärken dagegen die Expression von 3R-Tau (D'Souza et al., 1999; Stanford et al., 2003). Diese pathogenen Spleiß-Mutationen belegen die Wichtigkeit eines ausgeglichenen Verhältnisses von 4R- und 3R-Isoformen (Goedert, 2004).

1.5 Biochemische und klinische Merkmale der Tau-R406W-Mutation

Die R406W-Mutation reduziert die Fähigkeit des Tau-Proteins an Mikrotubuli zu binden. *In vitro* zeigt das Protein ein reduziertes Vermögen, die Polymerisierung der Mikrotubuli zu fördern (Hong et al., 1998; Perez et al., 2000). Eine Transfektion von MAPT-Gensequenzen mit R406W-Mutation verursacht in Zelllinien eine signifikante Instabilität der Mikrotubuli und eine Störung des zytoskelettalen Netzwerks (Rizzu et al., 1999; Barghorn et al., 2000; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2000). Weitere *in vitro* Untersuchungen belegen eine verminderte Bindung des mutierten Tau-Proteins an intrazelluläre Strukturen (Goedert et al., 2000; Gauthier-Kemper et al., 2011). R406W-Tau-transgene Mäuse zeigen zudem einen verlangsamten axonalen Transport (Zhang et al., 2004). *In vitro* erhöht die R406W-Mutation im Vergleich zum Wildtyp-Tau die Heparin- oder Arachidonsäure-induzierte Tau-Filament-Formation (Arrasate et al., 1999; Goedert et al., 1999; Nacharaju et al., 1999; Barghorn et al., 2000). Die R406W-Mutation betrifft die 3R-Tau- und die 4R-Tau-Isoformen (Clark et al., 1998; Spillantini et al., 1996; Morris et al., 1999; van Swieten et al., 1999), welche oft die ultrastrukturelle Formation von PHF ergeben (Reed et al., 1997; Spillantini et al., 1996).

Eine auf eine R406W-Mutation zurückzuführende hereditäre FTL-D-Tau (ehemals FTDP-17) wurde bisher in Nordamerika (Reed et al., 1997; Hutton et al., 1998), Belgien (Rademakers et al., 2003), Schweden (Ostojic et al., 2004; Passant et al., 2004; Ygland et al., 2018), Dänemark (Lindquist et al., 2008; 2009) und Japan (Ikeuchi et al., 2008) bei insgesamt neun Familien beschrieben (Ygland et al., 2018). Die Erstmanifestation der Erkrankung liegt zwischen 45 und 75 Jahren. Bei erheblich variierenden klinischen Phänotypen zeigen Patienten mit R406W-Mutation im Unterschied zu Patienten mit anderen MAPT-Mutationen einen initial meist langsam voranschreitenden Gedächtnisverlust, klinisch der AD ähnelnd (Reed et al., 1997; van Swieten et al., 1999; Rademakers et al., 2003; Ostojic et al., 2004) und später Frontallappen-Symptome und Sprachstörungen (Ostojic et al., 2004; Lindquist et al., 2008). Daneben existierten Verläufe mit frühem Krankheitsbeginn, schneller Progression und für eine FTD-typischen Verhaltensauffälligkeiten (Saito et al., 2002). Das Vorhandensein und die Ausprägung von Parkinson-Symptomen variiert (van Swieten et al., 1999; Reed et al., 1997).

1.6 Tauopathien durch Umweltfaktoren

Verschiedene Evidenzen belegen Umweltfaktoren als mögliche Auslöser von Tauopathien. Bei sporadischen Tauopathien wird eine Kombination aus genetischer Prädisposition und umweltbedingten Triggerfaktoren diskutiert. Auch die phänotypische Variabilität bei vererbten Tauopathien deutet auf das Vorhandensein von modifizierenden Umweltfaktoren hin. In den vergangenen 70 Jahren

wurde eine extrem hohe Prävalenz von atypischen Parkinson-Syndromen in fünf geografisch isolierten Regionen – Guam, Neuguinea, Kii-Halbinsel in Japan, Guadeloupe und Neukaledonien – beobachtet.

1999 postulierten Caparros-Lefebvre und Elbaz, dass die hohe Prävalenz von atypischen Parkinson-Syndromen auf Guadeloupe mit dem Verzehr von Früchten und Tees aus Pflanzen der *Annonaceae*-Familie in Zusammenhang steht, da die Samen und die Blätter dieser Pflanzen Neurotoxine wie Alkaloide und Acetogenine enthalten. Die atypischen Parkinson-Syndrome von Guadeloupe wurden neuropathologisch und biochemisch als Tauopathie eingestuft und zeigen ähnliche Tau-Ablagerungen wie bei der PSP (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Caparros-Lefebvre et al., 2002). 2004 wurde ein weiterer Fokus des atypischen Parkinson-Syndroms auf der pazifischen Insel Neukaledonien identifiziert, wo die Erkrankung ebenfalls mit dem Verzehr von *Annonaceae*-Pflanzen assoziiert ist (Angibaud et al., 2004; Caparros-Lefebvre 2004). Weiter besteht ein Zusammenhang zwischen dem Konsum von *Annonaceae*-Produkten und atypischen Parkinson-Syndromen bei in London lebenden Patienten karibischen Ursprungs (Chaudhuri et al., 2000).

Weitere Formen von atypischen Parkinson-Syndromen (Parkinson-Demenz-Komplex, PDC) in Kombination mit einer Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) wurden auf Guam, in Neuguinea und auf der Kii-Halbinsel in Japan gefunden. Die Ursache der Erkrankung auf Guam ist bis heute unbekannt (Sacks, 1997; Wiener, 2005), als möglicher Auslöser wird eine Exposition gegenüber der Sago-*palme* (*Cycas micronesia*) diskutiert (Spencer et al., 1987; Murch et al., 2004; Steele und McGeer, 2008). Erkrankte zeigen neuropathologisch eine ausgedehnte neurofibrilläre Degeneration (Hirano et al., 1961), die biochemisch ebenfalls als Tauopathie definiert wurde (Steele et al., 2002).

1.7 Atypische Parkinson-Syndrome auf Guadeloupe

In Europa und Nordamerika macht der idiopathische Morbus Parkinson den Hauptanteil der Parkinson-Syndrome aus. Der Anteil der atypischen Parkinson-Syndrome beträgt lediglich 20–30 % (de Rijk et al., 1997). Von 1995–2002 wurden auf der karibischen Insel Guadeloupe gehäuft atypische Parkinson-Syndrome detektiert, wodurch sich das Verhältnis zwischen atypischen (70–80 %) und idiopathischen (20–30 %) Formen umkehrte (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Caparros-Lefebvre et al., 2002; Lannuzel et al., 2007). Atypische Parkinson-Syndrome traten hauptsächlich bei Bewohnern mit einem regelmäßigen Konsum von Tees oder Früchten der *Annonaceae*-Familie auf (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Lannuzel et al., 2007). Caparros-Lefebvre und Elbaz (1999) führten die Erkrankung auf den Konsum von Früchten und Aufgüssen von *Annona (A.) muricata* zurück. Da Patienten mit atypischen Parkinson-Syndromen auf Guadeloupe verschiedene Ethnien und nur selten eine positive Familienanamnese aufweisen, erscheint eine genetische Ursache unwahrscheinlich.

In Guadeloupe ist *A. muricata* (Graviola, Soursop, Guanàbana, Corossol) der häufigste Vertreter der *Annonaceae*-Familie. *A. muricata* wird in der traditionellen kreolischen Medizin routinemäßig bei Herz- oder Verdauungsbeschwerden, als Beruhigungsmittel oder allgemein zum Gesundheitserhalt verwendet (Longuefosse und Nossin, 1996). *A. muricata* enthält Neurotoxine, wie Isoquinolin-Alkaloide (Leboeuf et al., 1980), und Acetogenine (Li et al., 1990; Cavé et al., 1997; Kotake et al., 2004), wie Annonacin. In einer Fall-Kontroll-Studie auf Guadeloupe (Lannuzel et al., 2007) war der Konsum an *A. muricata* bei Patienten mit atypischen Parkinson-Syndromen signifikant höher als in der Kontrollgruppe oder bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom.

Die Klinik des atypischen Parkinson-Syndroms auf Guadeloupe ist durch eine symmetrische Bradykinese, eine vorwiegend axiale Rigidity, eine frühe posturale Instabilität und einen kognitiven Verfall mit Zeichen einer Frontallappendysfunktion charakterisiert. Ein Ansprechen auf eine L-Dopa-Therapie fehlt, oder ist vorübergehend und schwach (Caparros-Lefebvre et al., 2002). Eine Klassifizierung des klinischen Phänotyps (inkl. neuropsychologische Tests, cerebrale Kernspintomografie) ergab zu jeweils einem Drittel ein idiopathisches Parkinson-Syndrom, ein PSP-ähnliches Syndrom (Gd-PSP) und eine Parkinson-Demenz-Komplex-ähnliche Erkrankung von Guadeloupe (Gd-PDC). Andere atypische Parkinson-Syndrome (CBD, Multisystematrophie vom Parkinson-Typ (MSA-P)) waren selten (Lannuzel et al., 2007). Gd-PSP- und Gd-PDC-Patienten weisen neben den klassischen, jedoch L-Dopa resistenten Parkinson-Symptomen (Rigidity, Akinesie, Tremor) visuelle Halluzinationen, eine frühe posturale Instabilität (Stürze), eine autonome Dysfunktion und eine fronto-subcorticale Demenz auf. Weiter zeigen Patienten mit atypischen Parkinson-Syndromen auf Guadeloupe häufig eine Rapid-Eye-Movement-(REM)-Schlaf-Verhaltensstörung (De Cock et al., 2007).

1.8 Zusammenhang zwischen *Annonaceae*-Neurotoxinen und den atypischen Parkinson-Syndromen auf Guadeloupe

In *in vitro* Experimenten erwiesen sich Alkaloide aus *A. muricata* als schwache Neurotoxine (Lannuzel et al., 2002, 2003). Die in Pflanzen weit verbreiteten, strukturell mit Tyramin und Dopamin verwandten, hydrophilen Isoquinolin-Alkaloide interferieren mit Neuramin-Rezeptoren und katabolen Enzymen. Isoquinolin-Alkaloide rufen bei Tieren eine nigrostriatale Neurodegeneration hervor (Nagatsu, 2002). Die für die *Annonaceae*-Familie spezifischen Acetogenine (Cavé et al., 1997; Alali et al., 1999) sind Fettsäurederivate (Polyketide), die aufgrund ihrer Lipophilie die Zellmembran durch passive Diffusion durchdringen (Degli Esposti, 1998). Acetogenine sind potente, spezifische Komplex-I-Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette (Tormo et al., 1999; Motoyama et al., 2002). Der Hauptvertreter der Acetogenine in *A. muricata* ist Annonacin (Laprévotte et al., 1993; Gleye, 1998).

In vitro Studien verglichen die neurotoxischen Effekte von Annonacin und anderer Komplex-I-Inhibitoren. Annonacin beeinträchtigt dopaminerge und nicht-dopaminerge Zellen (Lannuzel et al., 2002). Der neurotoxische Effekt von Annonacin ist 1000-fach stärker als der von Benzyl-Tetrahydroisoquinolin-Reticulin (häufigstes Alkaloid in *A. muricata*) bzw. 100-fach potenter als der von Methyl-Phenylpyridinium (MPP+, toxisches Derivat von 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)) (Langston et al., 1983). Die Toxizität von Annonacin für dopaminerge Neuronen im Mesencephalon beruht auf einer Störung des Energiemetabolismus (Lannuzel et al., 2003). *In vitro* führt Annonacin in niedrig-nanomolaren Bereichen zur Reduktion von Adenosintriphosphat (ATP), zur Umverteilung des Tau-Proteins von den Axonen zu somatodendritischen Kompartimenten und zum Tod striataler Neuronen (Escobar-Khondiker et al., 2007). Ein Vergleich von 24 Komplex-I-Inhibitoren mit ähnlichen Eigenschaften wie Annonacin (Höllerhage et al., 2009) ergab eine Korrelation zwischen der Stärke der Komplex-I-Hemmung und dem Ausmaß der somatodendritischen Umverteilung von phosphoryliertem Tau in kultivierten striatalen Neuronen von Nagern.

Bei intravenöser Gabe über 28 Tage (Champy et al., 2004) dringt Annonacin in das Hirnparenchym von Ratten ein, senkt die ATP-Konzentration und ruft eine ausgedehnte Neurodegeneration in der Substantia nigra und im Striatum hervor. Die Verteilung des Nervenzellverlustes ähnelt den Veränderungen bei atypischen Parkinson-Syndromen auf Guadeloupe (Höglinger et al., 2003, 2005a, 2005b). Die auch in den Verhaltensexperimenten der vorliegenden Arbeit verwendeten transgenen Mäuse entwickelten unter chronischem Konsum von Saft aus *A. muricata* eine Tau-Pathologie (nicht-transgene (nTg) Mäuse < transgene Mäuse mit humanem Wildtyp-Tau (hWT) < transgene Mäuse mit R406W-Tau) (Rottscholl et al., 2016). Die Behandlung von Mäusen mit Annonacin führt zu einer Tauopathie mit immunhistochemisch nachweisbaren Tau-Aggregaten, welche mit einer Verhaltensstörung der Mäuse korrelierten (Salama et al., 2019).

Analysen von Extrakten von *A. muricata* (Champy et al., 2005) ergaben einen Annonacin-Gehalt von 15 mg pro Frucht und 0,14 mg pro Liter Blattaufguss. Ein Erwachsener, der täglich eine Frucht oder eine Flasche Nektar konsumiert, nimmt im Jahr eine kumulative Dosis von 106 mg/kg Körpergewicht auf. Dies entspricht einer Dosis, die bei Ratten bei intravenöser Gabe eine Neurodegeneration hervorruft (3,8 mg/kg/Tag für 28 Tage = 106,4 mg/kg Körpergewicht) (Champy et al., 2004). Die geschätzte lebenslange Annonacin-Dosis aus Früchten und Aufgüssen von *A. muricata* bei Patienten mit Parkinson-Syndromen auf Guadeloupe liegt um ca. einen Faktor 20 höher (Champy et al., 2004, 2005). Da jedoch die Bioverfügbarkeit von Annonacin bei oraler und intravenöser Gabe nicht bekannt ist, sind diese Vergleiche vorsichtig zu interpretieren.

1.9 Evidenz für den Synergismus einer Annonacin-Intoxikation und der R406W-Mutation bei Tau-transgenen Mäusen *in vivo*

Bei einer kontinuierlichen subkutanen Infusion von Annonacin für drei Tage zeigten R406W-transgene Mäuse im Vergleich zu nTg-Mäusen dosisabhängig eine erhöhte Tau-Phosphorylierung und eine Umverteilung in somatodendritische Kompartimente (Yamada et al., 2014). Die mit Annonacin behandelten, R406W-transgenen Tiere wiesen im Vergleich zu nTg-Mäusen eine erhöhte Tau-Konzentration (humanes und murines Tau) und eine Zunahme von unlöslichen Tau-Aggregaten auf. Es gibt Hinweise, dass die Erhöhung der Tau-Menge bei R406W-transgenen Tieren aus einer reduzierten Aktivität der Proteasomen bei erhöhtem oxidativem Stress durch die Annonacin-vermittelte Komplex-I-Inhibition resultiert. Laut einer These können die Proteasomen die erhöhte Akkumulationsneigung der durch eine Mutation veränderten Tau-Proteine bei gleichzeitiger Annonacin-Behandlung nicht mehr kompensieren. Weiter erhöhte sich unter Annonacin-Intoxikation die Menge an phosphoryliertem Tau-Protein im Vergleich zum Tau-Gesamtprotein sowohl bei nTg-Tieren als auch bei R406W-transgenen Mäusen überproportional, mit Hinweisen auf einen ursächlichen veränderten Grad an Tau-Kinasen (Yamada et al., 2014).

1.10 Tau-transgene Mausmodelle

In Tiermodellen ist eine Analyse des Zusammenhangs zwischen Tau-vermittelten Effekten und der Neurodegeneration möglich. Anders als in *in vitro* Systemen lässt sich mit Tiermodellen die Tau-Aggregation und die Interaktion von Schlüssel molekülen unter physiologischen Bedingungen untersuchen. Mit Hilfe von Tau-transgenen Mausmodellen können sowohl histopathologische Merkmale humaner Tauopathien als auch Auswirkungen auf das Verhalten analysiert werden (Götz et al., 2013).

Die ersten Tau-transgenen Mäuse exprimierten die längste humane cerebrale Tau-Isoform (2N4R) (Götz et al., 1995). Neuropathologisch zeigten diese Mäuse Aspekte von humanen Tau-Pathologien mit einer somatodendritischen Lokalisation und Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins. Auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete hWT-Mausmodell exprimierte die längste bekannte Tau-Isoform (441 Aminosäuren, 2N4R, hTau40). Die meisten Mauslinien mit einer Überexpression von verschiedenen hWT-Isoformen unter Verwendung von stärkeren Promotoren (Brion et al., 1999; Ishihara et al., 1999; Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000) wiesen motorische Defizite auf. Trotz der Formation von Tau-Aggregaten und einer altersabhängigen Abnahme der Tau-Löslichkeit wurden nur bei sehr alten Mäusen NFTs beobachtet (Ishihara et al., 2001a,b). Inzwischen existieren transgene Mausmodelle, die alle sechs humane Tau-Isoformen exprimieren (Duff et al., 2000; Andorfer et al., 2003).

Nach der Identifikation von ursächlichen MAPT-Mutationen bei Familien mit einer FTD wurden entsprechende transgene Mauslinien entwickelt (Frank et al., 2008). Mäuse mit humanen mutierten Tau-Genen entwickelten aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehende Filamente, die mit einem neuronalen Zellverlust assoziiert waren. Bei den *in vivo* Modellen mit NFT-Formation traten sowohl neuronale (Allen et al., 2002; Götz et al., 2001a; Lewis et al., 2000; Tanemura et al., 2001; Tatebayashi et al., 2002) als auch gliale Tau-Pathologien (Götz et al., 2001b; Higuchi et al., 2005) auf. Die Expression des mutierten Tau-Proteins erfolgte über konstitutive oder Doxycyclin-regulierte Promotoren (Götz und Götz, 2009). In weiteren Untersuchungen wurde zusätzlich zu den histopathologischen Merkmalen auch das Verhalten der transgenen Tiere analysiert (Tanemura et al., 2002; Tatebayashi et al., 2002; Taniguchi et al., 2005; Pennanen et al., 2006).

Die erste publizierte Mauslinie mit ausgeprägter NFT-Formation enthielt das humane Tau-Gen mit der Missense-Mutation P301L unter der Kontrolle des murinen Prionprotein (PrP)-Promotors (Lewis et al., 2000). Die Tiere entwickelten im Alter von 10 Monaten schwere motorische Beeinträchtigungen. Die Expression einer anderen Tau-P301L-Isoform unter der Kontrolle eines Neuronen-spezifischen Promotors (mThy1.2) (Götz et al., 2001a) resultierte in Störungen des Gedächtnisses und des exploratorischen Verhaltens der Tiere (Pennanen et al., 2006). Die Verstärkung der Expression durch Zugabe von Doxycyclin zum Trinkwasser bei Mäusen mit humanem Tau-Gen mit der Mutation P301L unter Kontrolle eines Doxycyclin-regulierten Promotors (Santacruz et al., 2005) resultierte in einer 15-fachen Überexpression von mutiertem Tau und zunehmender NFT-Formation, verbunden mit einem Nervenzellverlust bevorzugt im Hippocampusbereich, einer makroskopischer Hirnatrophie sowie einer Verhaltensstörung. Das Abschalten des Promotors führte zu einer reduzierten Tau-Konzentration, zu verbesserten Gedächtnisfunktionen und zur Stabilisierung der Nervenzellzahl. Auch in anderen Mausmodellen kam es durch Abschalten der Promotoren, die das transgene humane Tau-Gen kontrollierten, zu einer verminderten Tau-Expression und Abnahme der Verhaltensstörungen (Xu et al., 2014b). Bei transgenen Mäusen mit dem Tau-P301L-Gen (unter der Kontrolle des murinen PrP-Promotors), denen gleichzeitig das Gen für die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) fehlte, zeigte sich eine Exazerbation der Tau-Pathologie mit ausgeprägter Tau-Hyperphosphorylierung vor allem im Bereich des Hippocampus (Deters et al., 2009).

Tau-K369I-transgene Mäuse entwickelten extrapyramidal-motorische Störungen im Sinne eines Parkinsonoids durch Expression des Transgens primär in der Substantia nigra pars compacta (Ittner et al., 2008). In diesem Modell war der axonale Transport von Mitochondrien und Tyrosin-Hydroxylase enthaltenden Vesikeln gestört. Auf molekularer Ebene wurde im Zellkörper eine Verbindung von Adapterproteinen und Bestandteilen des Kinesin-Motor-Apparates zu dem akkumulierten hyperphosphorylierten Tau nachgewiesen.

Aktuell existieren auch transgene Mausmodelle mit einer glialen Tau-Pathologie (Higuchi et al., 2002). Im Rahmen der Alzheimer-Forschung wurden zudem doppelt-transgene Mausmodelle mit

mutierten MAPT- und Amyloid-Precursor-Protein (APP)-Genen (Lewis et al., 2001) und dreifach-transgene Mausmodelle mit zusätzlichen Mutationen im Presenilin-Gen etabliert (Oddo et al., 2003). Bei Tau-R406W-transgenen Mäusen wurden altersabhängig hyperphosphorylierte Tau-Einschlüsse und NFTs gefunden (Tatebayashi et al., 2002; Zhang et al., 2004; Ikeda et al., 2005). Weiter kam es zu einer somatodendritischen Umverteilung von phosphoryliertem Tau im Neokortex, Hippocampus, Kleinhirn und Rückenmark (Zhang et al., 2004). Bei Tau-R406W-transgenen Mäusen mit der 2N4R-Isoform unter der Kontrolle des PrP-Promotors des syrischen Hamsters ging die Tau-Akkumulation ab einem Alter von 6 Monaten vom Hippocampus und Amygdala aus und zeigte eine schrittweise Ausbreitung in den Kortex und in subkortikale Areale. Zudem wurde eine Aktivierung der Glykogen-Synthase-Kinase (GSK) 3 Beta und eine Induktion des Maus-Tau in Astrozyten beobachtet (Ikeda et al., 2005). Bei 19 Monate alten R406W-transgenen Mäusen trat zudem eine Beeinträchtigung des assoziativen Gedächtnisses ohne offensichtliche sensomotorische Defizite auf (Tatebayashi et al., 2002). In anderen Studien zeigten alte R406W-transgene Mäuse motorische Schwächen der hinteren Extremitäten (Zhang et al., 2004) bzw. eine erhöhte Immobilitätszeit im Forcierten-Schwimm-Test (FST) (Egashira et al., 2005). Insgesamt wurde in zahlreichen Tau-transgenen Mausmodellen eine Korrelation des Verhaltens der Tiere zur Tau-Pathologie festgestellt.

1.11 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte die Verhaltensmerkmale und motorische Funktionen von Tau-transgenen und nTg-Mäusen bei Behandlung mit Saft aus *A. muricata* vs. Wasser über einen Zeitraum von annähernd einem Jahr untersuchen. Die Ergebnisse der Verhaltenstests sollten Aufschluss darüber geben, ob Tau-transgene Mäuse phänotypische Merkmale einer genetisch bedingten Tauopathie (FTLD-Tau assoziiert mit MAPT-Mutationen) aufzeigen. Eine weitere Frage war, ob eine Exposition gegenüber Saft von *A. muricata*, die als Ursache für die atypischen Parkinson-Syndrome von Guadeloupe gilt, bei nTg-Mäusen phänotypische Merkmale einer Tauopathie auslöst. Ebenso sollte geprüft werden, ob eine solche Exposition die Verhaltensmerkmale von Tau-transgenen Mäusen verstärkt. Folgende Fragestellungen sollten im Einzelnen beantwortet werden:

- Treten bei Tau-transgenen Mäusen bzw. bei nTg-Mäusen nach Behandlung mit Saft aus *A. muricata* motorische Defizite (Akinese, Bradykinese, posturale Instabilität) auf?
- Zeigen Tau-transgene Mäuse bzw. nTg-Mäuse nach Behandlung mit Saft aus *A. muricata* Auffälligkeiten bei der lokomotorischen Aktivität (Hyperaktivität/reduzierte Aktivität) und in ihrem exploratorischen Verhalten (z. B. ängstliches Verhalten)?
- Ergeben sich bei Tau-transgenen Mäusen bzw. bei nTg-Mäusen nach Behandlung mit Saft aus *A. muricata* Hinweise auf Defizite des Gedächtnisses?

- Treten zwischen Tau-transgenen und nTg-Mäusen mit und ohne Exposition gegenüber Saft aus *A. muricata* Unterschiede im sozialen Verhalten im Sinne einer Enthemmung (Disinhibition) oder eine Ablehnung von sozialen Kontakten auf?
- Gibt es bei Tau-transgenen Mäusen bzw. bei nTg-Mäusen nach Behandlung mit Saft aus *A. muricata* Hinweise auf eine verstärkte depressive Stimmungslage?
- Wie ist der zeitliche Verlauf dieser Verhaltenscharakteristika?

2 Material und Methoden

2.1 Generierung der Tiere der beiden Mauskohorten

Transgene Tiere wurden entsprechend der anerkannten wissenschaftlichen Methoden generiert (Zhang et al., 2004). Die Elterngeneration wurde beim *Center for Neurodegenerative Disease Research, Department of Pathology and Laboratory Medicine and Institute on Aging, The University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania* (Frau Prof. Virginia M. Lee) erworben. Die Tiere wurden in eigener Zucht in der geschlossenen Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Philipps-Universität Marburg vermehrt. Für die Durchführung der Tierversuche lag die Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen (Ordnungsnummer 45/2007) und der Tierschutzkommission der Universität Marburg vor.

Die verwendeten transgenen Mauslinien exprimierten die längste humane Tau-Isoform (2N4R, hTau40) mit und ohne R406W-Mutation unter der Kontrolle des murinen PrP-Promotors. Alle Tiere hatten einen B6C3 (C57BL6 x C3H) -Hintergrund (Zhang et al., 2004). Zur Herstellung der transgenen Mausmodelle wurden zwei komplementäre hTau40-DNAs mit und ohne Mutation (hWT-Tau und R406W-Tau) unter der Kontrolle des murinen PrP-Promotors in einen Expressionsvektor geklont (MoPrP.Xho). Ein 15,3 kB großes Fragment (Sequenzen für hTau40-Isoform, muriner PrP) wurde mit seinen 3' sowie 5' nicht-translatierten Sequenzen in eine fertilisierte Maus-Eizelle (C57BL6 x C3H, sog. B6C3/F1) mikroinjiziert, welche in ein pseudo-trächtiges Weibchen implantiert wurde. Durch Analyse der Schwanzproben des Wurfes mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden transgene und nTg-Tiere unterschieden und homozygote Tiere gezüchtet. Für die Versuche wurden heterozygote hWT-Tau-transgene (23+/-) und homozygote Tau-R406W-transgene Mäuse (37+/+) verwendet, da die beide Linien im Gehirn vergleichbare Mengen an humanem Tau-Protein exprimierten. Die Menge entsprach dem 8–10-Fachen der Menge des murinen Tau-Proteins (Zhang et al., 2004).

2.2 Tierhaltungsbedingungen der Mauskohorten

Die Mauskohorte, die mit Saft aus *A. muricata* behandelt werden sollte (Saft-Kohorte), wurde im August 2006 in der geschlossenen Tierhaltung des BMFZ gezüchtet. Die Mäuse wurden im Alter von 6 Wochen von den Zuchttieren getrennt. Männliche Mäuse wurden Ende September 2006 für die experimentelle Phase aus der geschlossenen in die offene Tierhaltung des BMFZ überführt.

Die ursprüngliche Saft-Kohorte bestand aus 22 transgenen, für die Punktmutation Tau-R406W homozygoten Mäusen (R406W-Mäuse). Diese stammten von fünf transgenen homozygoten Pärchen ab. Weiter enthielt die Saft-Kohorte 83 Mäuse, die von 16 Mäusepärchen abstammten, bei denen ein Elternteil heterozygot für das hWT-Tau-Gen (hWT +/-) und das andere nicht-transgen (hWT -/-)

war. Die Nachkommen dieser Tiere zeigten den Genotyp hWT +/- oder hWT -/-. Zur Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere wurde im Alter von 6 Wochen eine PCR durchgeführt. Dazu wurde den Tieren unter Narkose in der Narkosebox nach Erlöschen der Stellreflexe eine Gewebeprobe aus dem Schwanz entnommen. Gleichzeitig wurden alle Tiere an den Ohren markiert. Die PCR ergab 35 hWT +/- und 48 hWT -/- Tiere. Auf der Basis der PCR-Ergebnisse erfolgte die Zuordnung der Mäuse zu den Käfigen. Das Mausmodell hWT wurde verwendet um Mutations-spezifische Merkmale der Mäuse mit der Mutation R406W auf der Basis der gleichen Tau-Isoform unter der Kontrolle desselben Promotors herausstellen zu können.

Die Mauskohorte, die Wasser erhielt (Wasser-Kohorte), wurde ausführlich in der Dissertation von Frau M. Hägele (geb. Lunow) beschrieben. Die Wasser-Kohorte bestand initial aus 38 R406W-, 40 hWT- und 49 nTg-Tieren. Für die Wasser-Kohorte galten die gleichen Bedingungen bei der Züchtung und Genotypisierung wie für die Saft-Kohorte.

Auch die Tierhaltungsbedingungen waren für beide Mauskohorten identisch. In der offenen Tierhaltung herrschte ein 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus (Lichtphase 6:00–18:00 Uhr, Nachtphase 18:00–6:00 Uhr). Die Raumtemperatur betrug 22 °C, die Luftfeuchtigkeit 40–60 %. Alle Tiere wurden in Gruppen gehalten, dabei befanden sich maximal drei (bei der Wasser-Kohorte maximal vier), am häufigsten aber zwei Geschwistertiere möglichst mit demselben Genotyp in einem mit Streu gefülltem Käfig Typ Makrolon (35*20*14 cm, Fa. Ehret GmbH & Co. KG Emmendingen, Deutschland). Die Käfige mit Gitterdeckeln wurden einmal pro Woche gewechselt und neu eingestreut. Die Mäuse hatten jederzeit freien Zugang zum Futter (Teklad Global Diet).

2.3 Behandlung mit Saft aus *A. muricata*

Ab der 9. Lebenswoche erhielten alle Tiere der Saft-Kohorte (R406W-, hWT- und nTg-Mäuse), als Flüssigkeit verdünntes Fruchtsaftkonzentrat aus *A. muricata* anstelle von Wasser. Der industriell hergestellte Fruchtsaft (Graviola Juice, Firma Dafruta, Recife, Brasil) enthielt zu 50 % Püree aus *A. muricata*, Wasser sowie Metabisulfit, Natrium-Benzoat und Zitronensäure. Wie vom Hersteller für den menschlichen Verzehr empfohlen, wurde der Fruchtsaft 1:4 verdünnt (200 ml Graviola-Fruchtsaftkonzentrat + 800 ml Wasser), sodass die fertige Fruchtsaftzubereitung 20% Graviola-Saft enthielt. Jeweils 100 ml des fertigen Saftes wurden pro Käfig in eine Flasche gefüllt. Zu Beginn der Behandlung wurde regelmäßig überprüft, ob die Tiere ausreichend Flüssigkeit aufnahmen, ob der verdünnte Fruchtsaft von den Tieren vertragen wurde bzw. ob Nebenwirkungen bemerkbar waren. Nach einer Eingewöhnungsphase von ca. 3 Tagen, in denen die Mäuse im Vergleich zur Wasseraufnahme weniger Saft tranken, stellte sich ein Gleichgewicht ein. Der Saft wurde jeden 3. Tag gewechselt. Der Stuhlgang der Mäuse wies unter diesen Bedingungen eine normale Konsistenz auf.

Die durchschnittliche tägliche Flüssigkeitsaufnahme der Mäuse im Alter von 11 und 45 Wochen wurde repräsentativ in zwei Käfigen (je ein Käfig mit Tieren der Wasser- und Saft-Kohorte) gemessen, indem die Flaschen über einen Zeitraum von 9 Tagen jeden 2. Tag gewogen wurden.

2.4 Übersicht über die experimentelle Phase

In den Mauskohorten wurden fünf Testreihen mit jeweils fünf Verhaltenstests durchgeführt. Die erste Testreihe mit der Saft-Kohorte erfolgte mit 103 Versuchstieren (22 R406W-, 35 hWT- und 46 nTg-Mäuse) in der 12. Lebenswoche (Umstellung von Wasser auf Saft aus *A. muricata* in der 9. Lebenswoche). Die zweite Testreihe fand in der 20. Lebenswoche mit 100 Versuchstieren (22 R406W-, 34 hWT- und 44 nTg-Mäuse) statt. Vor der dritten Testreihe wurden zehn Mäuse jedes Genotyps für die histologische und immunhistochemische Untersuchung aus der Kohorte eliminiert. Die Ergebnisse wurden in der Dissertation von Herrn R. Rottscholl beschrieben und in Rottscholl et al., 2016 publiziert. Die dritte bis fünfte Testreihe erfolgte jeweils mit 70 Versuchstieren (12 R406W-, 24 hWT-, 34 nTg-Mäuse) im Alter von 6, 8 und 12 Monaten. Nach der fünften Testreihe wurden erneut je zwölf Tiere jedes Genotyps für die histologische und immunhistochemischen Untersuchung aus der Kohorte eliminiert (Rottscholl et al., 2016). Während der ersten 3 Wochen unter der Behandlung mit Saft aus *A. muricata* starben spontan zwei nTg-Tiere. Während der Versuchsreihe starben insgesamt fünf Tiere (2 hWT-, 3 nTg-Mäuse). Im Alter von ca. anderthalb Jahren wurden alle noch lebenden Mäuse der Restkohorte für die histologische / immunhistochemische Untersuchung eliminiert (Rottscholl et al., 2016).

Die Experimente mit der Wasser-Kohorte wurden ausführlich in der Dissertation von Frau M. Hägele, geb. Lunow, beschrieben. Die Wasser-Kohorte bestand initial aus 38 R406W-, 40 hWT- und 49 nTg-Mäusen. Durch begleitende histologische Untersuchungen während der Versuchsreihe reduzierte sich die Gruppengröße. Die Testreihen (1–5) wurden im Alter von 6, 18, 25, 32 und 54 Wochen durchgeführt. Während der Versuchsreihe verstarben drei R406W-Tiere.

Zur Vereinfachung der Darstellung der Ergebnisse werden die Testzeitpunkte in beiden Mauskohorten mit 2, 4, 6, 8 und 12 Monate bezeichnet.

Während einer Testreihe fanden die Verhaltenstest (an einem oder zwei aufeinanderfolgenden Tagen) zwischen 9 Uhr morgens und 20 Uhr abends in einem geräuschisolierten Verhaltenslabor in der Nähe der offenen Tierhaltung statt. Zur Stressminimierung wurden alle Verhaltenstests von einem Versuchsleiter durchgeführt. Der Versuchsleiter brachte die Käfige einzeln in das Verhaltenslabor. Nach Abschluss der Experimente setzte der Versuchsleiter die Versuchstiere wieder in ihre Heimatkäfige. Nach jedem Durchgang wurde der Versuchsstand mit einer verdünnten 0,01%-igen Essigsäurelösung besprüht und mit Papiertüchern gereinigt, um olfaktorische Spuren von anderen Testmäusen zu minimieren. Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde einmal pro Testdurchgang (zum

Zeitpunkt des Rotarod-(ROD)-Tests) dokumentiert. Die Verhaltenstests erfolgten in einer festen Reihenfolge.

2.5 Rotarod-(ROD)-Test

Der ROD-Test ist eine einfache Methode zur Prüfung der Motorik und Koordination von Nagetieren (Nakagawa et al., 1995; Bordet et al., 2001; Egashira et al., 2004). Die Durchführung erfolgt in einer Drehstab-Apparatur, durch die ein rotierender Stab verläuft. Der Durchmesser des Drehstabes hängt von der Größe der Versuchstiere (Mäuse, Ratten) ab. Die Geschwindigkeit der Rotation (Umdrehungen pro Minute) ist variabel. Beim ROD-Test wird die Zeit gemessen, die ein Tier auf dem rotierenden Stab verbleibt. Wenn das Versuchstier von der Stange fällt, wird die Zeit automatisch durch den Kontakt mit dem Boden (Lichtstrahlsensor) der Testapparatur erfasst.

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein 4-Kammer-ROD-Apparat (RotaRod Advanced 337500-R/A-3, Fa. TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) zur simultanen Testung von vier Tieren mit einem Drehstab (Durchmesser 30 mm) für Mäuse (337500-R-M, Fa. TSE Systems GmbH) verwendet (s. Abb. 2.1). Die Oberflächenbeschaffenheit des Drehstabs erlaubte den Mäusen einen sicheren Halt. Jedes Abteil (86 mm breit) verfügte über einen Zeitmesser und Lichtstrahlsensoren. Der Drehstab bewegte sich mit einer konstanten Drehzahl von 10 Umdrehungen pro Minute. Das RotaRod Advanced System war durch eine Prozess-Kontrolleinheit mit einem Rechner verbunden. Die Daten wurden im ASCII Format gespeichert.

Der Versuchsleiter setzte die Versuchstiere einzeln per Hand auf den rotierenden Drehstab und startete den Zeitmesser per Knopfdruck. Ein Versuch galt als erfolgreich beendet, wenn ein Tier 2 Minuten auf dem Drehstab verblieb. Fiel eine Maus vorher vom Stab herunter, wurde sie per Hand wieder auf den rotierenden Stab gesetzt. Jedes Tier hatte vier Versuche. Sowohl die Zahl der Versuche, als auch die längste Zeitspanne (in Sekunden), die sich eine Maus auf dem Stab bewegte ohne herunterzufallen (max. 120 Sekunden), wurde dokumentiert.



Abb. 2.1: 4-Kammer Rotarod-Apparat aus Versuchslaberperspektive (links) und Detaildarstellung einer Kammer mit Drehstab (rechtes Bild)
 Aufnahme im Verhaltenslabor des BMFZ der Philipps-Universität Marburg (Bildmaterial wurde auch bei der Dissertation von M. Lunow verwendet)

2.6 Offenfeld-Test (OFT)

Der 1975 erstmals durchgeführte OFT beruht darauf, dass Nagetiere in einer unbekanntem Umgebung ein natürliches Erkundungsverhalten (freie Exploration) zeigen (Giulian und Silverman, 1975). Der Test kann sich durch den Aufbau der Testanlage (rund oder quadratisch), die Beleuchtung (Takahashi et al., 1989; Prut und Belzung, 2003), die Platzierung der Tiere (Zentrum, Wandnähe) und durch die Dauer (2–60 Minuten) unterscheiden. Der OFT misst neben dem Erkundungsverhalten auch die Mobilität eines Versuchstiers (Whishaw et al., 1999). Dazu werden lokomotorische Parameter (horizontale / vertikale Aktivität) erfasst (Prut und Belzung, 2003). Die horizontale Aktivität (zurückgelegte Strecke) wird entweder über die Anzahl von durchkreuzten Infrarotsensoren (Marino et al., 2003; Koob et al., 2006) oder mit einer „tracking“-Software (Bronikowski et al., 2001) bestimmt. Die vertikale Aktivität entsteht durch das Aufrichtverhalten (*rearing*) der Tiere (Cools und Gingras, 1998; Thiel et al., 1999; Pawlak und Schwarting, 2002), das ebenfalls mittels Infrarotsensoren erfasst wird. Beide Aktivitäten korrelieren mit der lokomotorischen Aktivität des Versuchstieres (Borta und Schwarting, 2005). Der OFT wird in der tierpsychologischen Forschung auch zur Erfassung der Emotionalität (Ängstlichkeit, Neugierde) genutzt (Belzung et al., 1999). Ein vermehrter Aufenthalt in der Peripherie (Wand) der Arena (*Thigmotaxis*) und ein vermindertes Aufrichtverhalten wird als Ängstlichkeit gedeutet (Schwarting et al., 1993; Prut und Belzung, 2003).

Der OFT wurde in zwei OFT-Boxen mit jeweils vier Einzelboxen (8 Arenen), durchgeführt (Firma Peter Muth Feinmechanik, Marburg). Eine OFT-Apparatur bestand aus einer Grundplatte der Größe 123 x 108 cm, die in vier Arenen (50 x 50 x 40 cm) unterteilt war (s. Abb. 2.2). Der Boden jeder Arena wurde von einer Bodenplatte aus Metall (50 x 50 cm) bedeckt. Die Höhe der Wände betrug

40 cm. An zwei gegenüberliegenden Innenseiten waren in einer Höhe von 8 cm Lichtschrankeneinheiten (*Light Lines*, 50 cm lang, 5 cm breit, Biobserve GmbH Bonn, Deutschland) angebracht, um das Aufrichtverhalten der Tiere zu detektieren. Die Arenenwände wurden für die automatische Erkennung der dunklen (grauen bzw. schwarzen) Mäuse aus weißem undurchsichtigem PVC gefertigt.

Die OFT-Boxen enthielten eine Beleuchtungsanlage mit einer Streulichtscheibe und eine verstellbare Kamerahalterung. Eine Infrarot-sensitive Kamera (VIDEO B/W CCD CAMERA, Biobserve GmbH) wurde über je vier OFT-Arenen mit einem Kamera-Boden-Abstand von ca. 1,5 m montiert. Das analoge Kamerasignal wurde über einen Analog-Digital Wandler (Canopus ADVC-50, Biobserve GmbH) in ein digitales Videosignal umgewandelt und mit einem IBM-kompatiblen Computer (AMD-64 3000+ CPU FSB 1000, 1GB) verknüpft. Die temporäre Auflösung der Bilder betrug bis zu 25 Hz. Während der Tests war der Testraum aufgrund der nachaktiven Lebensweise der Mäuse verdunkelt. Die Beleuchtungsstärke am Boden einer Arena betrug 3–4 Lux (Messung mit einem digitalen Luxameter (MS-1500, Conrad Electronic GmbH) vor Beginn der Tests). Die Beleuchtung bestand aus einer direkten Beleuchtung mit Streulichtscheibe am Arenadach und einer indirekten Beleuchtung durch eine Tischlampe unter dem Arenaboden.



Abb. 2.2: Offenfeld-Testapparatur aus Versuchsleiterperspektive (links) und von oben aus Kameraperspektive (rechts)

Aufnahme im Verhaltenslabor des BMFZ der Philipps-Universität Marburg (Bildmaterial wurde auch bei der Dissertation von M. Lunow verwendet)

Der OFT erfolgte vollautomatisiert. Zur Objektverfolgung wurde die Viewer tracking Software (Viewer 2.0, Biobserve GmbH Bonn, Deutschland) verwendet (s. Abb. 2.3). Bis zu acht Mäuse wurden durch die Software simultan beobachtet (Kontrast-Filter-Methode). Neben der Position wurde auch die Orientierung der Mäuse (Identifizierung von Kopf und Schwanz) bestimmt. Die zurückgelegte Strecke, die Richtung und Geschwindigkeit einer Bewegung, die generelle Aktivität, das Aufrichtverhalten sowie die in der zentralen Zone verbrachte Zeit wurden in Echtzeit auf dem Bildschirm dargestellt. Nach Beendigung der Tests wurden die Rohdaten in Form von Tabellen oder Grafiken automatisch in MS-Excel exportiert (Schwarz et al., 2002). Die Filme wurden gespeichert (Format DivX 6.3).

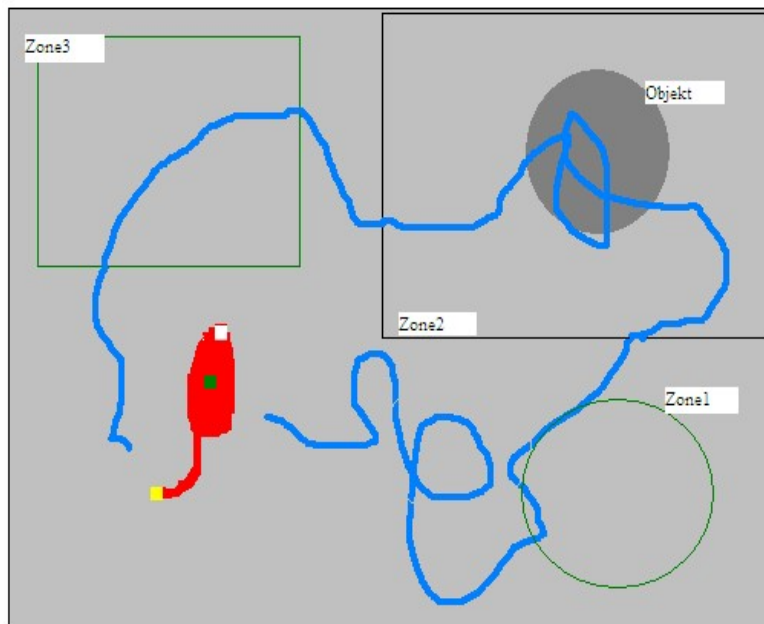


Abb. 2.3: Automatische Objektverfolgung der automatisierten Viewer tracking Software in einer Arena der Offenfeld-Testapparatur mit Tierdetektion (Nase mit weißem, Körpermitte mit grünem, Schwanz mit gelbem Quadrat markiert) sowie Streckenverfolgung und Zonenbestimmungen (Abbildung ebenfalls bei der Dissertation von M. Lunow verwendet)

2.7 Objektwiedererkennungstest (OWT)

Der erstmals 1988 durchgeführte OWT (Ennaceur und Delacour, 1988) basiert auf dem natürlichen Verhalten von Mäusen, die unbekannte Objekte durch Beschnupern, Berühren mit den Vorderpfoten oder durch Aufrichten am Objekt erkunden (Aggleton, 1985). Bei den Tieren besteht eine innere Tendenz neue Objekte gegenüber bekannten Objekten zu bevorzugen. Beim OWT macht sich das Tier in der Familiarisierungsphase mit einem Objekt vertraut. In der zweiten Phase wird durch das gleichzeitige Anbieten des vertrauten und eines neuen Objektes die Gedächtnisfunktion überprüft. Ein intaktes Gedächtnis zeigt sich an der natürlichen Präferenz des Versuchstieres für das neue Objekt. Die Vorteile des OWT sind die Nutzung des natürlichen Verhaltens und die Vermeidung von negativen Erfahrungen für das Versuchstier. Anders als beim Angst-Konditionierungstest erfolgt beim OWT weder eine Bestrafung noch eine Belohnung der Tiere. Weitere Vorteile sind die simple Durchführbarkeit des Tests ohne spezielle Testapparatur und ohne ein Training der Tiere im Vorfeld (Dere et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde der OWT-Versuchsaufbau (Ennaceur und Delacour, 1988) modifiziert. Die verwendeten einfarbigen Objekte ohne spiegelnde Oberfläche hatten annähernd die Größe der Mäuse (s. Abb. 2.4) und waren so schwer, dass sie von den Mäusen nicht bewegt werden konnten. Die beiden Objekte wiesen eine unterschiedliche Materialbeschaffenheit und Farbe auf. Als Objekte wurden ein anthrazitfarbener Zylinder aus Metall (Höhe 6,5 cm, oberer Durchmesser 3,5

cm, unterer Durchmesser 4 cm) und ein Glasobjekt (Höhe 2,5 cm, unterer Durchmesser 7,5 cm, oberer Durchmesser 4,5 cm) verwendet. Bei der Saft-Kohorte wurden die Objekte aus Metall und Glas in der 3.–5. Testreihe gegen Objekte aus Keramik (grün und orange) ausgetauscht, um einer Gewöhnung der Mäuse an die bereits bekannten Objekte entgegenzuwirken.



Abb. 2.4: Verwendete Objekte im Objektwiedererkennungstest (OWT, Beispiele)

Aufnahme im Verhaltenslabor des BMFZ der Philipps-Universität Marburg (Bildmaterial wurde auch bei der Dissertation von M. Lunow verwendet)

Am 1. Tag des OWT wurde in der Habituerungsphase (Gewöhnungsphase) die Maus in die Mitte einer quadratischen Arena (s. Kap. 2.6) platziert und konnte die neue Umgebung für 5 Minuten erkunden. Danach wurde eine Hälfte der Arena durch eine speziell angefertigte Schablone aus Plastik (Fa. Peter Muth Feinmechanik, Marburg) verdeckt. Nach der Platzierung zweier identischer Objekte in die verdeckte Hälfte der Arena wurde die Verdeckung entfernt. In dieser Phase (Familiarisierungsphase) konnten die Mäuse die zwei identischen Objekte für 5 Minuten erkunden. Danach wurden die Tiere wieder in ihre Käfige gesetzt und in die offene Tierhaltung zurückgebracht. Am folgenden Tag (nach 24 Stunden) wurden die Tiere in der Testphase unter Einhaltung der Reihenfolge während der Habituerungs- und Familiarisierungsphase, um die Verzögerungsphase für alle Tiere gleich lang zu gestalten, in die abgetrennten Hälfte der Arena gesetzt. In der anderen Hälfte befanden sich die beiden unterschiedlichen Objekte. Die Erkundung der beiden Objekte erfolgte ebenfalls für 5 Minuten. Das Erkundungsverhalten (leere Arena, identische Objekte, unterschiedliche Objekte) wurde von der automatisierten Viewer tracking Software (Viewer 2.0, Bioobserve GmbH Bonn, Deutschland) aufgezeichnet. Die Videofilme wurden gespeichert.

Durch die Zonenbestimmungsfunktion der Software wurden in der Habituerungs- und der Familiarisierungsphase Zonen um die Objekte herum definiert. Ein Aufenthalt in der Zone des Objektes wurde als Erkundungsverhalten gewertet. Dokumentiert wurden die Erkundungszeit und die Anzahl der Besuche für die bekannten bzw. neuen Objekte.

Zur Reduzierung potenzieller Objekt- und Lagepräferenzeffekte wurden verschiedene Maßnahmen durchgeführt. Für die Hälfte der Mäuse war das bekannte Objekt aus Metall und das neue Objekt aus Glas und für die andere Hälfte der Mäuse umgekehrt. Damit sollte eine mögliche Materialpräferenz

der Tiere erfasst werden. Bei der nächsten Testreihe (mindestens 1 Monat später) wurden neben dem Material auch die Position der Objekte (oben/unten) ausgetauscht.

2.8 Sozialer-Interaktionstest (SIT)

Der 1978 entwickelte SIT (File and Hyde, 1978) war der erste Test zur Bestimmung von Angst und angstauslösenden Effekten ohne die Verwendung aversiver Reize. Beim SIT werden zwei Versuchstiere zusammen in eine neutrale Testumgebung gebracht, aus der sie nicht entkommen können. Dabei wird die Zeit, welche die Testpartner in sozialer Interaktion (Folgeverhalten, Beschnüffeln, gegenseitiges Putzen, aggressive Verhaltensweisen) verbringen, gemessen. Neben der sozialen Interaktion wird die motorische Aktivität bestimmt, um die Ängstlichkeit der Testpartner zu beurteilen. Ein Anstieg der sozialen Interaktion ohne eine Erhöhung der motorischen Aktivität gilt als Zeichen einer Anxiolyse (Auflösung der Ängstlichkeit) bzw. Disinhibition (Enthemmung) der Testpartner, während eine Abnahme der sozialen Interaktion bei gleichbleibender motorischer Aktivität auf eine Ängstlichkeit hinweist.

Faktoren, wie Lichtbedingungen, Vertrautheit mit der Testarena und Haltungsbedingungen (Einzel- vs. Gruppenhaltung) beeinflussen das Verhalten der Versuchstiere. Eine helle Beleuchtung und eine fremde Umgebung fördern die Ängstlichkeit (File and Seth, 2003), eine Einzelhaltung erhöht dagegen die Zeit der sozialen Interaktion (Niesink und van Ree, 1982). Bei der Testauswertung werden die beiden Versuchstiere als eine Einheit und nicht als zwei Individuen betrachtet, da sich die Testpartner im Verhalten gegenseitig beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der SIT mit einer modifizierten Versuchsanordnung von File und Hyde (1978) durchgeführt. Da alle Tiere vor dem SIT den OFT und OWT absolviert hatten, waren sie an die Arenen gewöhnt, daher war vor dem Test keine erneute Habituerungsphase erforderlich. Die soziale Interaktion wurde zwischen R406W-Mäusen und nTg-Mäusen bzw. zwischen hWT-Mäusen und nTg-Mäusen getestet. Da die Zahl der nTg-Mäuse als Partner für die transgenen Mäuse nicht ausreichte, wurden nTg-Kontrollmäuse mit annähernd gleichem Alter, die nicht mit Saft aus *A. muricata* behandelt wurden, verwendet; diese Gruppe wurde bei der statistischen Analyse nachträglich ausgeschlossen.

Die nTg-Mäuse wurden vor dem Test am Schwanz mit einem schwarzen Stift (Edding) markiert, um die Identität der Mäuse unterscheiden zu können. Die zuerst in die Arena eingebrachten nTg-Tiere erhielten von der Software die Identität 1. Die folgenden transgenen Tiere wurden als Identität 2 geführt.

Die transgenen und nTg-Mäuse verbrachten 30 Minuten in sozialer Interaktion miteinander. Ihr Verhalten wurde mit der automatisierten Viewer tracking Software (Viewer 2.0, Biobserve GmbH Bonn, Deutschland) aufgezeichnet und der Videofilm gespeichert. Als Parameter der sozialen Interaktion

wurden die Kontaktzeit (Gesamtdauer der Kontakte (in Sekunden) zwischen den Testpartnern pro 30 min Testzeit) und die Anzahl der Kontakte (Zahl der einzelnen Kontakte der Testpartner pro 30 min Testdauer) erfasst.

Über die Körperachse wurde der Mittelpunkt der Tiere sowie die Lokalisation von Nase und Schwanz ermittelt. Hierdurch war es möglich, zwischen einem realen Kontakt (Nase zu Nase, Nase zu Schwanz, Nase zu Körper) und einem zufälligen Kontakt beim Passieren durch die Arena zu unterscheiden. Ein Kontakt wurde durch den Abstand der Tiere zueinander (≤ 10 Pixel) und durch die Dauer des Kontaktes (≥ 10 Millisekunden) definiert. Am Ende des Tests wurden zuerst die nTg-Tiere mit der Markierung am Schwanz aus der Arena entfernt, danach die transgenen Tiere. Auffälligkeiten (z. B. Blutspuren am Boden der Arena, verletzte Mäuse) wurden in den Testprotokollen festgehalten.

2.9 Forcierter-Schwimm-Test (FST)

Der FST wurde erstmals 1977 als Methode zur Erfassung von depressivem Verhalten bei Nagetieren beschrieben (Porsolt et al., 1977). Er nutzt das charakteristische Verhalten von Mäusen und Ratten, wenn sie in einem Behälter schwimmen, aus dem sie nicht entfliehen können. Nach einer anfänglichen Periode mit starker Aktivität mit der Intention zu entkommen (*struggling*) lassen sich die Mäuse passiv im Wasser treiben, wobei sie nur minimale Bewegungen mit den Vorder- oder Hinterpfoten durchführen, um ihre Nasen über der Wasseroberfläche zu halten (*floating*). Diese immobile Schwimmweise wurde als Zustand der Verzweiflung und Hoffnungslosigkeit gedeutet. Die Dauer der Immobilität der Versuchstiere lässt sich durch Medikamente reduzieren, die erfolgreich bei der Behandlung einer Depression eingesetzt wurden (Petit-Demouliere et al., 2005). Damit spiegelt die *immobility time* die Depressivität der Versuchstiere wider. Neben der Prüfung der Effektivität von Antidepressiva erlaubt der Test auch die Einschätzung depressionsähnlicher Verhaltensweisen von genetisch veränderten Versuchstieren (Kurtuncu et al., 2005).

Der FST-Testapparat (Firma Peter Muth Feinmechanik Marburg, Deutschland) bestand aus einem nach vorne und oben offenen Rechteck, das in vier Kammern unterteilt war (s. Abb. 2.5). Die Wände waren aus weißem Plastikmaterial gefertigt. In jede Kammer wurde ein Testbehälter eingebracht (Glaszylinder, Modell DURAN, Fa. Schott Mainz, Deutschland, Durchmesser und Höhe jeweils 14,5 cm). Die Beleuchtung erfolgte durch die Raumbeleuchtung und zwei Tischlampen hinter dem FST-Aufbau.

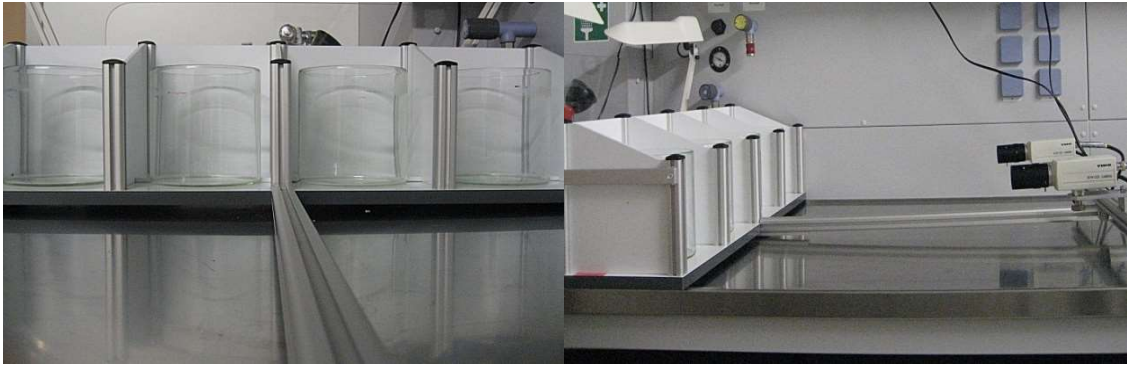


Abb. 2.5: Testapparatur für den Forcierten-Schwimm-Test (FST) – Ansicht von vorne aus der Kamera-/Versuchsleiterperspektive (links) und von der Seite (rechtes Bild)
 Aufnahme im Verhaltenslabor des BMFZ der Philipps-Universität Marburg (Bildmaterial wurde auch bei der Dissertation von M. Lunow verwendet)

Der FST wurde mit einem modifizierten Versuchsaufbaus nach Porsolt et al. (1977) durchgeführt. Die Mäuse wurden einzeln per Hand durch den Versuchsleiter aus ca. 10 cm Höhe in den wassergefüllten Glaszylinder fallen gelassen. Die Wasserhöhe (11 cm) stellte sicher, dass die Mäuse nicht aus dem Behälter entkommen konnten und dass nur die Spitzen ihrer Schwänze den Boden berührten. Die Wassertemperatur (Digitalthermometer Typ GTH 175/PT, Otto E. Kobe KG Marburg, Deutschland) betrug $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Der Test dauerte 6 Minuten. Nach dem Test wurden die Mäuse durch den Versuchsleiter per Hand aus den Wasserbehältern entnommen, mit Papiertüchern abgetupft und für ca. 8 Minuten zum Trocknen in einen mit Streu gefüllten Käfig (Fa. Ehret GmbH und Co KG Emmendingen, Deutschland) unter einer Infrarotlampe (Typ Infraphil R95 100W Rubin für Therapie von Philips, Hamburg, Deutschland) gesetzt, bis sie wieder ihre volle Aktivität erlangten. Nach jedem Durchgang wurde das Wasser in den Glaszylindern gewechselt, um Ausscheidungsrückstände und Duftmarken der zuvor getesteten Versuchstiere zu entfernen. Zudem wurde erneut die Wassertemperatur kontrolliert.

Die Versuchstiere in den Glaszylindern wurden mittels zwei Infrarot-sensitiver Videokameras (VIDEO, B/W CCD CAMERA) gefilmt. Eine Video Quad Unit kombinierte die beiden Videobilder der FST-Kameras zu einem Bild. Die Echtzeit-Darstellung und Auswertung der FST-Experimente erfolgte mit der automatisierten FST Analysis Software der Firma Biobserve Bonn, Deutschland. Die Software unterschied drei Verhaltensweisen. Beim *struggling* kratzen die Mäuse mit den vorderen Extremitäten an die Wände des Glaszylinders, um aus dem Behälter zu entkommen. Dabei richten sie ihren Körper senkrecht über eine definierte Linie auf. Beim *swimming* bewegen sich die Tiere waagrecht im Kreis und beim *floating* (immobile Phase) reduzieren die Mäuse ihre Schwimmbewegungen und lassen sich passiv im Wasser treiben.

Die Filter zur Erkennung der drei Muster wurden vor dem ersten Experiment in einem Probedurchgang eingestellt und im Verlauf nicht mehr geändert. Die Software bestimmte die Zeit, welche die Mäuse mit den Verhaltensweisen *struggling*, *swimming* oder *floating* verbrachten und stellte sie als

prozentuale Anteile an der Gesamtzeit in Echtzeit grafisch dar. Analysiert wurde die aktive (*swimming* und *struggling*) und inaktive Zeit (*floating*) (Flaisher-Grinberg und Einat, 2010). Die Ergebnisse der Analysen und die Videofilme (Format DivX) wurden gespeichert.

2.10 Statistik

Die statistischen Analysen der Verhaltensdaten erfolgten mit dem Statistikprogramm R für Linux Version 2.13.0 unter Zuhilfenahme der nlme und multcomp Pakete (R Development Core Team, 2011, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna). Für Gruppenvergleiche (nTg, hWT und R406W der Saft- und Wasser-Kohorte) und longitudinale Analysen wurde ein *2-way Analysis of Variance* (ANOVA) Test mit Genotyp und Behandlung als unabhängige Variablen mit einer nachfolgender post-hoc Tukey-HSD-Analyse verwendet. Beim OWT wurde ein 3-way-ANOVA-Verfahren eingesetzt.

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte (*mean*) \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. p-Werte $<0,05$ wurden als signifikant gewertet. Bei einem signifikanten Effekt des Genotyps in der ANOVA wurde in der nachfolgenden post-Hoc-Analyse der Zeitpunkt nicht berücksichtigt. Analog wurde bei einem signifikanten Effekt des Zeitpunktes in der nachfolgenden post-Hoc-Analyse der Genotyp nicht beachtet. Ergab die ANOVA einen signifikanten Interaktionseffekt des Genotyps mit dem Zeitpunkt, wurden in der post-Hoc-Analyse signifikante Unterschiede zwischen den 30 experimentellen Bedingungen (3 Genotypen, 5 Zeitpunkte und 2 Behandlungsarme) geprüft.

Die Ergebnisse der Wasser-Kohorte wurden ausführlich in der Dissertation von Frau M. Hägele, geboren Lunow, beschrieben. Diese Mausekohorte wurde in der vorliegenden Arbeit als Vergleichskohorte für die Saft-Kohorte verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere in der Saft- und Wasser-Kohorte) zu den fünf Testzeitpunkten ist in Tabelle 3.1. und Abbildung 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1: Körpergewicht (g) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM (g) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungs- arm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	31,89±0,46 (35)	35,91±0,64 (43)	37,69±0,95 (22)	42,06±0,67 (18)	43,44±0,99 (10)
hWT (Wasser)	30,83±0,55 (39)	34,42±0,69 (36)	37,08±1,15 (16)	41,17±1,31 (14)	40,74±1,29 (10)
R406W (Was- ser)	27,58±0,36 (44)	30,32±0,58 (40)	28,81±0,40 (19)	30,46±0,49 (16)	31,65±0,72 (10)
nTg (Saft)	30,70±0,41 (44)	36,15±0,60 (44)	38,11±0,68 (34)	40,03±0,73 (34)	42,75±0,90 (33)
hWT (Saft)	32,71±0,58 (35)	38,49±0,76 (34)	40,52±0,94 (24)	42,25±0,98 (24)	45,80±1,10 (23)
R406W (Saft)	27,96±0,45 (22)	30,38±0,60 (22)	30,99±1,18 (12)	31,45±1,19 (12)	32,30±0,88 (12)

Laut 2-way-ANOVA bestand ein signifikanter Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,001$). Weiter wurden signifikante Interaktionen zwischen Genotyp / Alter, Alter / Behandlung (jeweils $p < 0,001$) und zwischen Genotyp / Behandlung ($p < 0,05$) detektiert.

Die post-hoc-HSD-Analyse zeigte zu allen Alterszeitpunkten ein signifikant niedrigeres Gewicht für R406W-Mäuse im Vergleich zu hWT- und nTg-Mäusen ($p < 0,001$) in beiden Behandlungsarmen (z. B. 6 Monate – Saft-Kohorte: R406W-Tiere 30,99±1,18 g vs. hWT-Tiere 40,52±0,94 g vs. nTg-Tiere 38,11±0,68 g; Wasser-Kohorte: R406W-Tiere 28,81±0,40 g vs. hWT-Tiere 37,08±1,1 g vs. nTg-Tiere 37,69±0,95 g). Das höchste Gewicht zu allen Alterszeitpunkten wiesen die hWT-Mäuse der Saft-Kohorte auf. Signifikante Unterschiede zwischen den hWT-Mäusen und den nTg-Kontrolltieren fanden sich nur in der Saft-Kohorte zum Zeitpunkt 1 im Alter von 2 Monaten ($p < 0,05$).

Im Verlauf der Testreihe zeigten alle Genotypen in beiden Behandlungsarmen eine Gewichtszunahme ($p < 0,001$). Das Gewicht von R406W-Tieren nahm in beiden Behandlungsarmen nur leicht zu (2 Monate vs. 12 Monate: Saft-Kohorte 27,96±0,45 g vs. 32,30±0,88 g; Wasser-Kohorte 27,58±0,36 g vs. 31,65±0,72 g). Dagegen zeigten hWT- und nTg-Tiere im gleichen Zeitraum in beiden Behandlungsarmen eine deutliche Gewichtszunahme (Saft-Kohorte – hWT-Tiere 32,71±0,58 g vs. 45,80±1,10 g; nTg-Tiere 30,70±0,41 g vs. 42,75±0,90 g; Wasser-Kohorte hWT-Tiere 30,83±0,55 g

vs. $40,74 \pm 1,29$ g; nTg-Tiere $31,89 \pm 0,46$ g vs. $43,44 \pm 0,99$ g) (Interaktionseffekt, $p < 0,001$). Ein signifikanter Effekt der Behandlung bestand nicht.

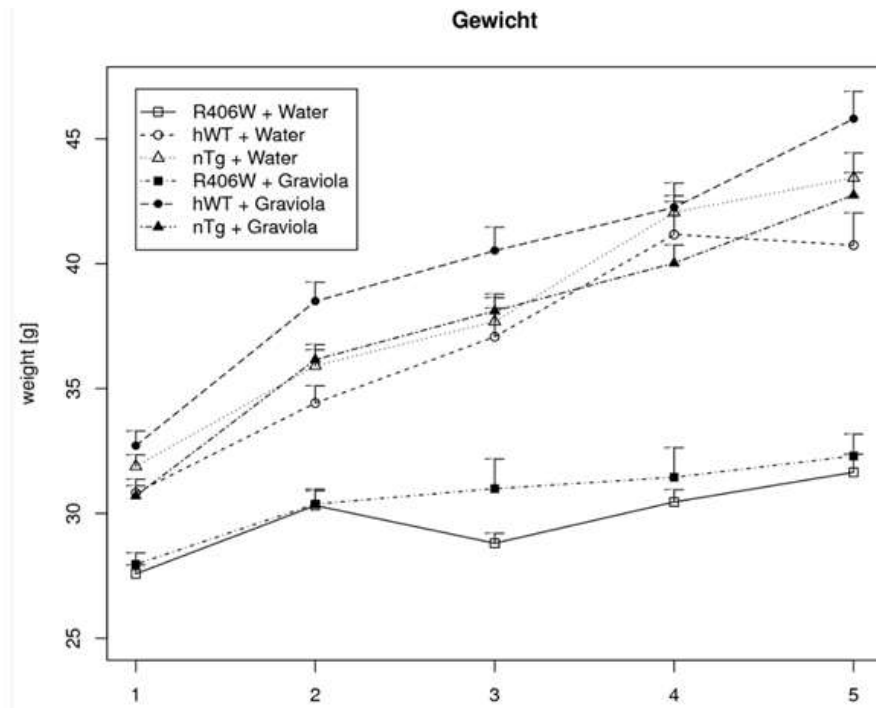


Abb. 3.1: Mittleres Körpergewicht (g) der Tiere der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
Mittelwerte (*mean*) \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.2 Flüssigkeitsaufnahme

Die Flüssigkeitsaufnahme wurde in beiden Behandlungsarmen im Alter von 11 und 45 Wochen gemessen. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der aufgenommenen Wasser- und Saft-Menge aus *A. muricata* zu beiden Zeitpunkten ($p=0,23$ bzw. $p=0,33$). Weiter fehlten signifikante Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Versuchstieren (Wasser-Kohorte $p=0,15$; Saft-Kohorte $p=0,76$). Die durchschnittliche tägliche Flüssigkeitsaufnahme betrug $3,3 \pm 0,29$ ml.

3.3 Rotarod-(ROD)-Test

3.3.1 Zeit auf dem Stab

Die maximale Zeit auf dem Stab der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.2 und Abbildung 3.2 dargestellt. Die 2-way-ANOVA ergab bei der Analyse einen signifikanten Effekt des Alters ($p < 0,001$) und der Behandlung

($p < 0,01$). Ein signifikanter Effekt des Genotyps wurde nicht detektiert. Weiter bestand eine signifikante Interaktion zwischen Alter / Behandlung ($p < 0,001$). Eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp / Alter bzw. zwischen Genotyp / Behandlung wurde nicht detektiert.

Tab. 3.2: Maximale Zeit auf dem Stab (s) im Rotarod-(ROD)-Test der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte \pm SEM (s) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungsarm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	72,55 \pm 7,92 (47)	96,36 \pm 6,80 (43)	95,87 \pm 9,73 (22)	101,18 \pm 9,47 (18)	92,38 \pm 14,45 (10)
hWT (Wasser)	74,78 \pm 8,57 (39)	111,05 \pm 4,36 (36)	106,95 \pm 8,18 (16)	112,13 \pm 7,87 (14)	80,28 \pm 16,95 (10)
R406W (Wasser)	75,80 \pm 7,28 (44)	109,64 \pm 4,84 (40)	108,67 \pm 7,78 (19)	120,00 \pm 0,00 (16)	120,00 \pm 0,00 (10)
nTg (Saft)	111,31 \pm 3,54 (44)	117,26 \pm 2,20 (44)	119,11 \pm 0,89 (34)	114,85 \pm 3,67 (34)	108,12 \pm 5,67 (33)
hWT (Saft)	100,05 \pm 6,87 (35)	116,56 \pm 3,44 (34)	111,46 \pm 5,98 (24)	115,71 \pm 4,29 (24)	103,13 \pm 7,30 (23)
R406W (Saft)	120,00 \pm 0,00 (22)	115,32 \pm 4,68 (22)	118,53 \pm 1,47 (12)	120,00 \pm 0,00 (12)	120,00 \pm 0,00 (12)

Die Tiere der Saft-Kohorte hielten sich im ROD-Test am längsten auf dem Stab, signifikant waren die Unterschiede nur im Alter von 2 Monaten. Eine Abnahme der Werte bei Zunahme des Alters trat nicht auf. In der Saft-Kohorte blieben die Werte konstant (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Tiere 120,00 \pm 0,00 s vs. 120,00 \pm 0,00 s; hWT-Tiere 100,05 \pm 6,87 vs. 103,13 \pm 7,30 s; nTg-Tiere 111,31 \pm 3,54 s vs. 108,12 \pm 5,67 s); in der Wasser-Kohorte nahmen die Werte zu (R406W-Tiere 75,80 \pm 7,28 s vs. 120,00 \pm 0,0 s, hWT-Tiere 74,78 \pm 8,57 s vs. 80,28 \pm 16,95 s; nTg-Tiere 72,55 \pm 7,92 s vs. 92,38 \pm 14,45 s).

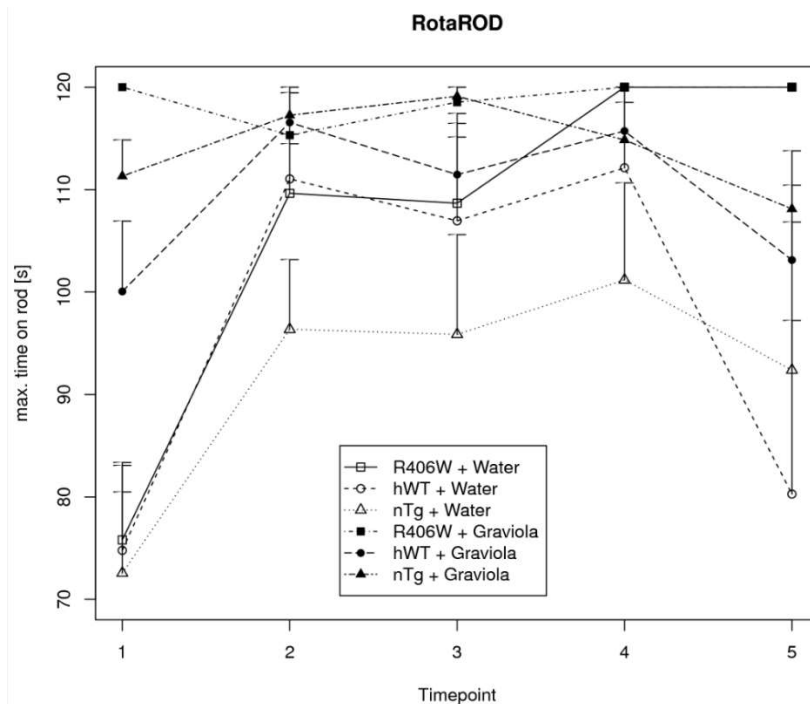


Abb. 3.2: Maximale Zeit (s) auf dem Stab (Rotarod-(ROD)-Test) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.3.2 Anzahl der Versuche auf dem Stab

Die Anzahl der Versuche im ROD-Test der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.3 und Abbildung 3.3 dargestellt. Die 2-way-ANOVA ergab bei der Anzahl der Versuche im ROD-Test einen signifikanten Effekt des Alters ($p < 0,001$), des Genotyps ($p < 0,05$) und der Behandlung ($p < 0,05$). Weiterhin bestand eine signifikante Interaktion zwischen Alter / Behandlung ($p < 0,001$) und zwischen Alter / Genotyp ($p < 0,05$). Signifikante Interaktionen zwischen Genotyp / Behandlung bzw. zwischen Alter / Genotyp / Behandlung traten nicht auf. Die post-Hoc-HSD-Analysen ergaben beim Vergleich der Interaktionen zwischen Alter / Genotyp sowie zwischen Alter / Behandlung signifikante Gruppenunterschiede insbesondere für den ersten Testzeitpunkt.

Tab. 3.3: Anzahl der Versuche auf dem Stab im Rotarod-(ROD)-Test der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungs- arm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	3,09±0,17 (47)	2,12±0,21 (43)	1,95±0,29 (22)	2,00±0,31 (18)	2,30±0,42 (10)
hWT (Wasser)	3,23±0,14 (39)	2,00±0,20 (36)	1,81±0,29 (16)	1,86±0,31 (14)	2,70±0,42 (10)
R406W (Wasser)	3,02±0,17 (44)	1,90±0,17 (40)	1,53±0,23 (19)	1,19±0,19 (16)	1,40±0,22 (10)
nTg (Saft)	2,48±0,19 (44)	1,68±0,14 (44)	1,35±0,14 (34)	1,32±0,13 (34)	2,30±0,22 (33)
hWT (Saft)	2,57±0,20 (35)	1,56±0,15 (34)	1,50±0,19 (24)	1,29±0,18 (24)	2,35±0,30 (23)
R406W (Saft)	1,73±0,20 (22)	1,55±0,18 (22)	1,75±0,33 (12)	1,08±0,08 (12)	1,08±0,08 (12)

In der Wasser-Kohorte brauchten die R406W-Mäuse die geringste Anzahl an Versuchen beim ROD (z. B. 8 Monate: R406W-Tiere 1,19 ±0,19 vs. hWT-Tiere 1,86±0,31 vs. nTg-Tiere 2,00±0,31). In der Saft-Kohorte war dies im Alter von 2, 4, 8, und 12 Monaten ebenfalls der Fall (z. B. 8 Monate: R406W-Tiere 1,08±0,08 vs. hWT-Tiere 1,29±0,18 vs. nTg-Tiere 1,32±0,13).

Im Verlauf zeigte die Wasser-Kohorte im Alter von 2–8 Monaten eine Abnahme der Anzahl der Versuche und danach einen Anstieg (12 Monate). Insgesamt nahm die Zahl der Versuche vom Beginn bis zum Ende der Versuchsreihe jedoch ab (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Tiere 3,02±0,17 vs. 1,40±0,22; hWT-Tiere 3,23±0,14 vs. 2,70±0,42; nTg-Tiere 3,09±0,17 vs. 2,30±0,42). Die R406W-Mäuse der Saft-Kohorte benötigten am Ende der Versuchsreihe ebenfalls weniger Versuche als zu Beginn (1,73±0,20 vs. 1,08±0,08).

Die hWT- und nTg-Tiere der Saft-Kohorte zeigten bis zum Alter von 8 Monaten ebenfalls eine Abnahme der Anzahl der Versuche und danach einen erneuten Anstieg (12 Monate); insgesamt waren die Werte zu Beginn und am Ende der Versuchsreihe nahezu konstant (2 Monate vs. 12 Monate: hWT-Tiere 2,57±0,20 vs. 2,35±0,30; nTg-Tiere 2,48±0,19 vs. 2,30±0,22). Die Saft-Kohorte zeigte insgesamt eine geringere Anzahl an Versuchen beim ROD.

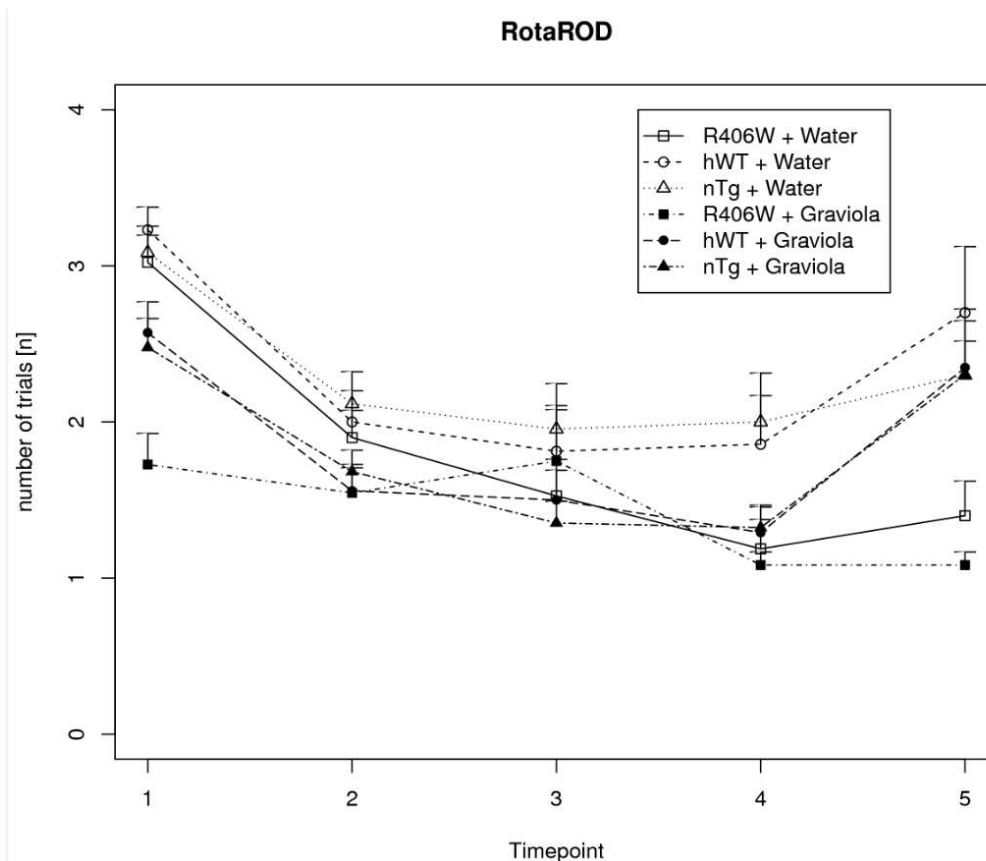


Abb. 3.3: Anzahl der Versuche auf dem Stab (Rotarod-(ROD)-Test) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte
 x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
 Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.4 Offenfeld-Test (OFT)

3.4.1 Zurückgelegte Strecke im OFT

Die zurückgelegte Strecke im OFT der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.4 und Abbildung 3.4 dargestellt. Die 2-way-ANOVA ergab für die zurückgelegte Strecke im OFT signifikante Effekte des Alters, des Genotyps und der Behandlung mit Saft aus *A. muricata* (jeweils $p < 0,001$). Signifikante Interaktionen bestanden zwischen Alter / Genotyp, zwischen Alter / Behandlung, zwischen Genotyp / Behandlung bzw. zwischen Alter / Genotyp / Behandlung (jeweils $p < 0,001$).

Aufgrund eines technischen Defektes während der Testphase der Wasser-Kohorte ist die Zahl der untersuchten R406W-Tiere zum Zeitpunkt 1 im Vergleich zum Zeitpunkt 2 geringer.

Tab. 3.4: Zurückgelegte Strecke (cm) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM (cm) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungs- arm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	9609±298 (49)	7545±329 (45)	7985±482 (22)	8837±746 (21)	7723±771 (10)
hWT (Wasser)	8805±408 (40)	6780±435 (35)	7664±540 (16)	7466±583 (16)	7660±425 (10)
R406W (Wasser)	11330±465 (38)	11403±587 (44)	15522±796 (19)	16373±841 (19)	14678±666 (10)
nTg (Saft)	7838±287 (46)	5236±312 (44)	5077±467 (36)	6845±615 (34)	4560±524 (34)
hWT (Saft)	7154±300 (35)	5122±293 (34)	4979±363 (28)	6582±512 (24)	5102±413 (24)
R406W (Saft)	14451±597 (22)	13728±854 (21)	12125±1037 (16)	14920±1211 (12)	15185±1531 (12)

In beiden Behandlungsarmen legten die R406W-Mäuse die längste Strecke zurück ($p < 0,001$), die von den R406W-Mäusen gelaufene Strecke betrug das Zwei- bis Dreifache der von den nTg- bzw hWT-Tieren des gleichen Behandlungsarms zurückgelegten Distanz.

R406W-Mäuse der beiden Behandlungsarme liefen zu Beginn und am Ende des Versuchszeitraumes jeweils etwa die gleiche Strecke (2 Monate vs. 12 Monate: Saft-Kohorte 14451±597 cm vs. 15185±1531 cm; Wasser-Kohorte 11330±465 cm vs. 14678±666 cm), während hWT-Tiere (2 Monate vs. 12 Monate: Saft-Kohorte 7154±300 cm vs. 5102±413 cm; Wasser-Kohorte 8805±408 cm vs. 7660±425 cm) und nTg-Tiere (2 Monate vs. 12 Monate: Saft-Kohorte 7838±287 cm vs. 4560±524 cm; Wasser-Kohorte 9609±298 cm vs. 7723±771 cm) zunehmend kürzere Strecken absolvierten.

Zusätzlich legten die hWT- und nTg-Tiere der Saft-Kohorte im Vergleich zu denselben Genotypen der Wasser-Kohorte zu allen Zeitpunkten eine etwas kürzere Strecke zurück ($p < 0,05$ bis $< 0,001$), was einer Interaktion zwischen Genotyp / Behandlung entspricht (4 Monate – Saft- vs. Wasser-Kohorte: hWT-Tiere 5122±293 cm vs. 6780±435 cm; nTg-Tiere 5236±312 cm vs. 7545±329 cm). Dieser Behandlungseffekt wurde bei den R406W-Tieren nicht beobachtet (12 Monate: Saft-Kohorte 15185±1531 cm vs. Wasser-Kohorte 14678±666 cm).

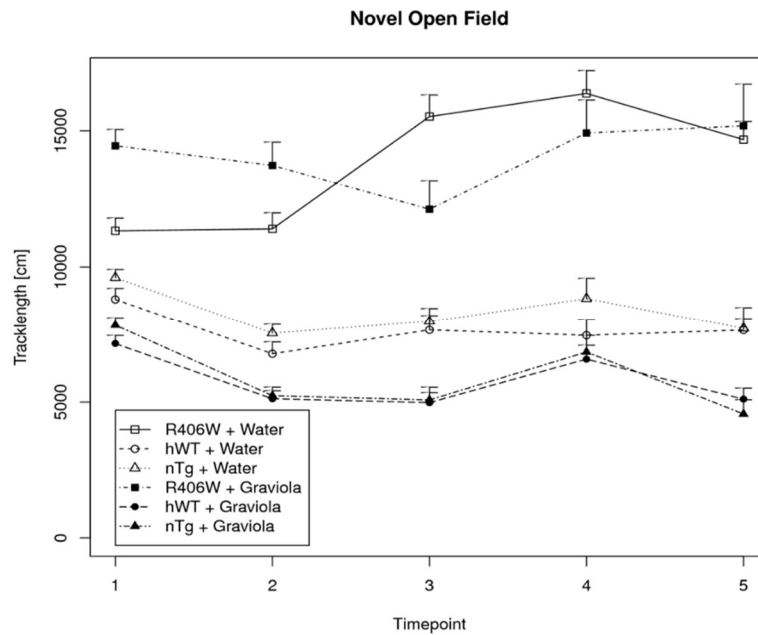


Abb. 3.4: Zurückgelegte Strecke (cm) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte
 x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
 Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.4.2 Geschwindigkeit im OFT

Die Geschwindigkeit im OFT der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.5 und Abbildung 3.5 dargestellt. Die 2-way-ANOVA ergab für die Geschwindigkeit im OFT signifikante Effekte des Alters, des Genotyps und der Saft-Behandlung (jeweils $p < 0,001$). Weiter wurden signifikante Interaktionen zwischen Alter / Genotyp, zwischen Alter / Behandlung, zwischen Genotyp / Behandlung und zwischen Alter / Genotyp / Behandlung berechnet (jeweils $p < 0,001$).

Tab. 3.5: Geschwindigkeit (cm/s) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM (cm/s) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungs- arm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	5,35±0,17 (49)	4,20±0,18 (45)	4,43±0,27 (22)	4,92±0,42 (21)	4,29±0,43 (10)
hWT (Wasser)	4,90±0,22 (40)	3,88±0,24 (35)	4,26±0,30 (16)	4,16±0,32 (16)	4,24±0,23 (10)
R406W (Wasser)	6,29±0,25 (38)	6,34±0,33 (44)	8,63±0,44 (19)	9,10±0,47 (19)	8,15±0,37 (10)
nTg (Saft)	4,35±0,16 (46)	2,91±0,17 (44)	2,82±0,26 (36)	4,03±0,37 (34)	2,53±0,29 (34)
hWT (Saft)	3,98±0,17 (35)	2,84±0,16 (34)	2,77±0,20 (28)	3,67±0,28 (24)	2,83±0,23 (24)
R406W (Saft)	8,02±0,33 (22)	7,63±0,47 (21)	6,73±0,58 (16)	8,29±0,67 (12)	8,44±0,85 (12)

In beiden Behandlungsarmen wiesen die R406W-Mäuse die höchste Geschwindigkeit auf ($p < 0,001$); die Geschwindigkeit der R406W-Mäuse betrug das Zwei- bis maximal Dreifache der Geschwindigkeit der anderen Tiere des jeweiligen Behandlungsarmes.

Die hWT- und nTg-Tiere wurden im Testverlauf langsamer (2 Monate vs. 12 Monate – hWT-Mäuse: Saft-Kohorte 3,98±0,17 cm/s vs. 2,83±0,23 cm/s; Wasser-Kohorte 4,90±0,22 cm/s vs. 4,24±0,23 cm/s; nTg-Mäuse: Saft-Kohorte nTg 4,35±0,16 cm/s vs. 2,53±0,29 cm/s; Wasser-Kohorte 5,35±0,17 cm/s vs. 4,29±0,43 cm/s). Demgegenüber blieb die Geschwindigkeit der R406W-Mäuse der Saft-Kohorte konstant (2 Monate vs. 12 Monate: 8,02±0,33 cm/s vs. 8,44±0,85 cm/s). In der Wasser-Kohorte nahm die Geschwindigkeit die R406W-Mäuse sogar zu (2 Monate vs. 12 Monate: 6,29±0,25 cm/s vs. 8,15±0,37 cm/s).

Zusätzlich wiesen die hWT- sowie die nTg-Tiere der Saft-Kohorte zu allen Zeitpunkten eine geringere Geschwindigkeit auf ($p < 0,05$), was einer Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung entspricht (6 Monate – Saft- vs. Wasser-Kohorte: hWT-Tiere 2,82±0,26 cm/s vs. 4,26±0,30 cm/s; nTg-Tiere 2,82±0,26 cm/s vs. 4,43±0,27 cm/s). Dieser Effekt wurde bei den R406W-Tieren nicht beobachtet (12 Monate – Saft- vs. Wasser-Kohorte: 8,44±0,85 cm/s vs. Wasser 8,15±0,37 cm/s).

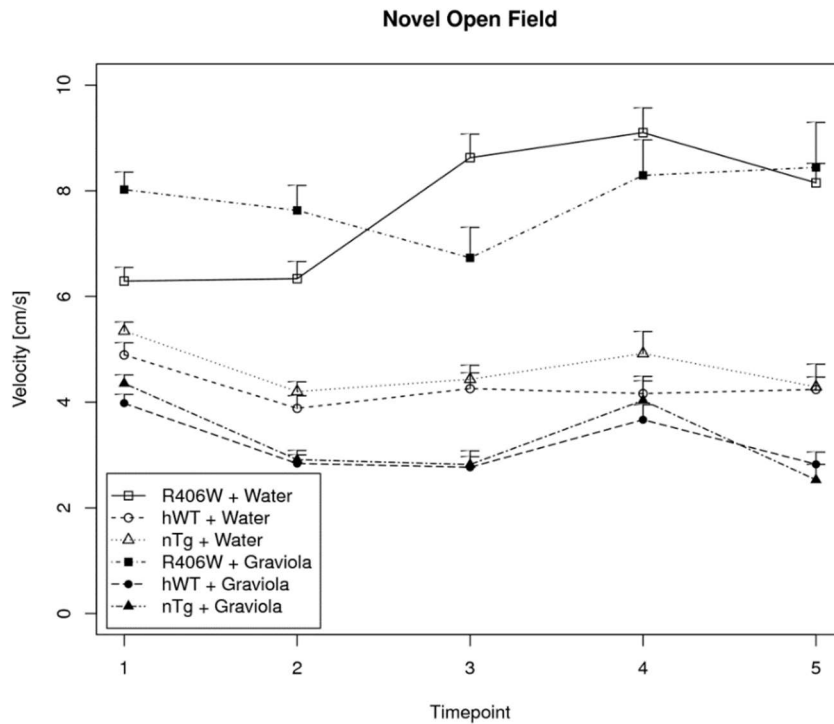


Abb. 3.5: Geschwindigkeit (cm/s) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte

Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.4.3 Aktivität im OFT

Die Aktivität im OFT der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.6 und Abbildung 3.6 dargestellt. Die 2-way-ANOVA ergab bei der Analyse der Aktivität im OFT signifikante Effekte des Alters, des Genotyps und der Behandlung mit Saft aus *A. muricata* (jeweils $p < 0,001$). Weiterhin wurden signifikante Interaktionen zwischen Alter / Genotyp, Alter / Behandlung sowie zwischen Genotyp / Behandlung berechnet (jeweils $p < 0,001$).

Tab. 3.6: Aktivität (%) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM (%) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungs- arm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	1 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	49,42±1,79 (49)	37,08±1,42 (45)	47,48±1,64 (22)	48,52±2,20 (21)	42,16±2,58 (10)
hWT (Wasser)	45,93±1,83 (40)	34,11±2,03 (35)	48,07±2,51 (16)	46,64±2,20 (16)	42,65±1,67 (10)
R406W (Wasser)	45,93±1,65 (38)	44,29±2,12 (44)	58,99±1,36 (19)	48,12±2,59 (19)	54,10±2,05 (10)
nTg (Saft)	50,04±1,09 (46)	20,42±1,11 (43)	24,92±2,01 (36)	50,67±4,20 (34)	15,62±1,69 (34)
hWT (Saft)	45,78±1,16 (35)	20,61±1,13 (34)	25,01±1,62 (28)	49,56±4,92 (24)	20,24±1,63 (24)
R406W (Saft)	61,35±0,97 (22)	38,37±1,60 (21)	40,90±2,28 (16)	60,04±4,98 (12)	41,58±2,57 (12)

Bei den Gruppenvergleichen zeigten R406W-transgene Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten eine signifikant höhere Aktivität (Saft-Kohorte – 2 Monate: $p < 0,001$, Wasser-Kohorte – 4, 6, 12 Monate $p < 0,05$ bis $p < 0,001$).

Bei der Saft-Kohorte war zu Beginn der Testreihe die Aktivität höher als am Ende der Testreihe (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Mäuse 61,35±0,97 % vs. 41,58±2,57 %; hWT-Mäuse 45,78±1,16 % vs. 20,24±1,63 %; nTg-Mäuse 50,04±1,09 % vs. 15,62±1,69 %). Im Allgemeinen nahm die Aktivität der hWT- und nTg-Tiere in der Saft-Kohorte am Ende der Versuchsreihe auf die Hälfte bis ein Drittel ab, während die Abnahme bei den R406W-Tieren weniger ausgeprägt war (ca. 30 %). Bei der Wasser-Kohorte war die Aktivität zu Beginn und am Ende der Testreihe relativ konstant (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Tiere 45,93±1,65 % vs. 54,10±2,05 %; hWT-Tiere 45,93±1,83 % vs. 42,16±2,58 %; nTg-Tiere 49,42±1,79 % vs. 42,16±2,58 %).

Im Alter von 4, 6 und 12 Monaten zeigten die hWT- und nTg-Tiere der Saft-Kohorte eine niedrigere Aktivität als die Tiere desselben Genotyps in der Wasser-Kohorte (z. B. 6 Monate – Saft- versus Wasser-Kohorte: hWT-Tiere 25,01±1,62 % vs. 48,07±2,51 %; nTg-Tiere 24,92±2,01 % vs. 47,48±1,64 %).

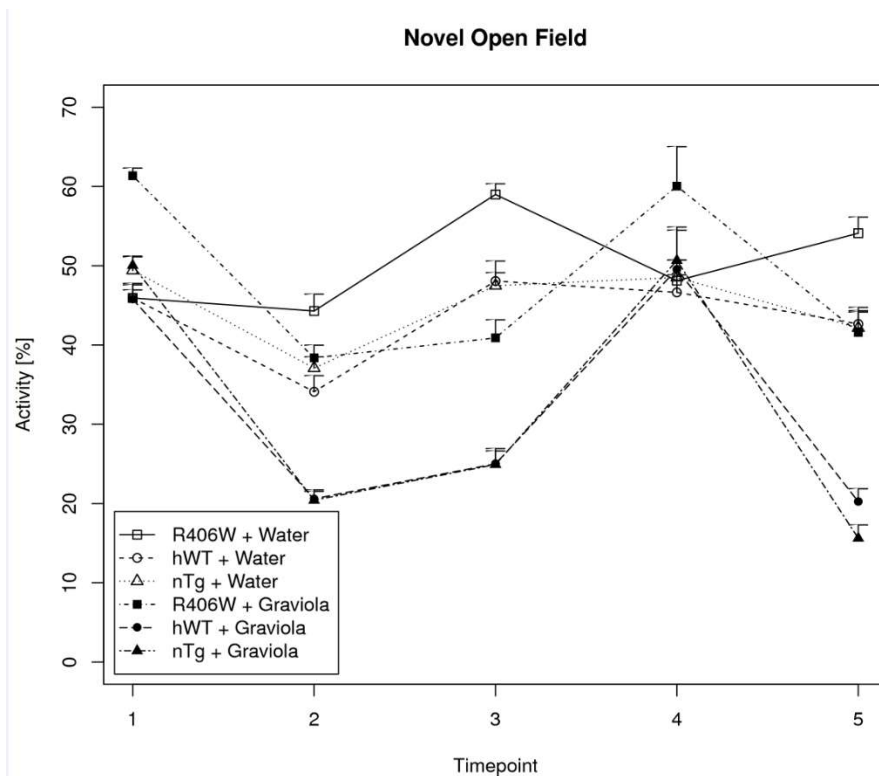


Abb. 3.6: Aktivität (%) im im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte
 x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
 Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.4.4 Aufrichtverhalten im OFT

Das Aufrichtverhalten im OFT der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.7 und Abbildung 3.7 dargestellt. Die 2-way-ANOVA ergab für das Aufrichtverhalten (Anzahl der *Rearings*) einen signifikanten Effekt des Alters, der Behandlung (jeweils $p < 0,001$) und des Genotyps ($p < 0,01$). Weiter bestanden signifikante Interaktionen zwischen Alter / Behandlung ($p < 0,001$) und zwischen Genotyp / Behandlung ($p < 0,05$). Ein genereller Effekt des Genotyps wurde nicht aufgezeigt. Für die Analyse wurden die Daten im Alter von 4 Monaten (Zeitpunkt 2) ausgeschlossen, da aufgrund eines technischen Defektes keine Daten für die nTg-Mäuse der Saft-Kohorte zur Verfügung standen.

Tab. 3.7: Anzahl der *Rearings* im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungsarm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	253,39±11,12 (36)	216,14±21,03 (21)	229,32±23,78 (19)	226,00±52,13 (4)	140,25±20,63 (8)
hWT (Wasser)	203,63±17,56 (32)	137,82±12,93 (34)	193,20±25,94 (10)	123,30±21,08 (10)	123,00±11,72 (9)
R406W (Wasser)	204,91±14,10 (32)	187,45±9,76 (40)	185,56±21,86 (16)	220,73±27,69 (11)	198,50±15,45 (8)
nTg (Saft)	257,26±16,13 (34)		83,29±12,10 (31)	83,00±11,94 (24)	65,53±9,98 (30)
hWT (Saft)	239,88±18,93 (26)	119,00±27,99 (5)	97,56±13,07 (25)	92,29±10,81 (21)	97,06±15,06 (17)
R406W (Saft)	257,31±20,81 (16)	181,75±28,41 (8)	135,29±10,97 (14)	122,60±4,09 (10)	177,71±26,97 (7)

In der Saft-Kohorte zeigten die R406W-Mäuse eine höhere Anzahl von *Rearings* als die hWT- und nTg-Mäuse, die Unterschiede waren jedoch nur in einem Alter von 12 Monaten signifikant. Insbesondere zu Beginn der Testreihe im Alter von 2 Monaten war die Anzahl der *Rearings* in allen untersuchten Gruppen vergleichbar.

In der Saft-Kohorte zeigten die hWT- und nTg-Tiere im weiteren Verlauf der Testreihe eine deutliche Abnahme der *Rearings* (2 Monate vs. 12 Monate: hWT-Tiere 239,88±18,93 vs. 97,06±15,06; nTg-Tiere 257,26±16,13 vs. 65,53±9,98), während bei den R406W-Tieren die Abnahme weniger ausgeprägt war (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Tiere 257,31±20,8 vs. 177,71±26,97). Eine im Verlauf der Testreihe abnehmende Anzahl von *Rearings* fand sich auch geringer ausgeprägt bei den hWT- und nTg-Mäusen der Wasser-Kohorte (2 Monate vs. 12 Monate: hWT-Tiere 203,63±17,56 vs. 123,00±11,72; nTg-Tiere 253,39±11,12 vs. 140,25±20,63), während die Anzahl der *Rearings* bei den R406W-Mäusen der Wasser-Kohorte nahezu konstant blieb (2 Monate vs. 12 Monate: 204,91±14,10 vs. 198,50±15,45).

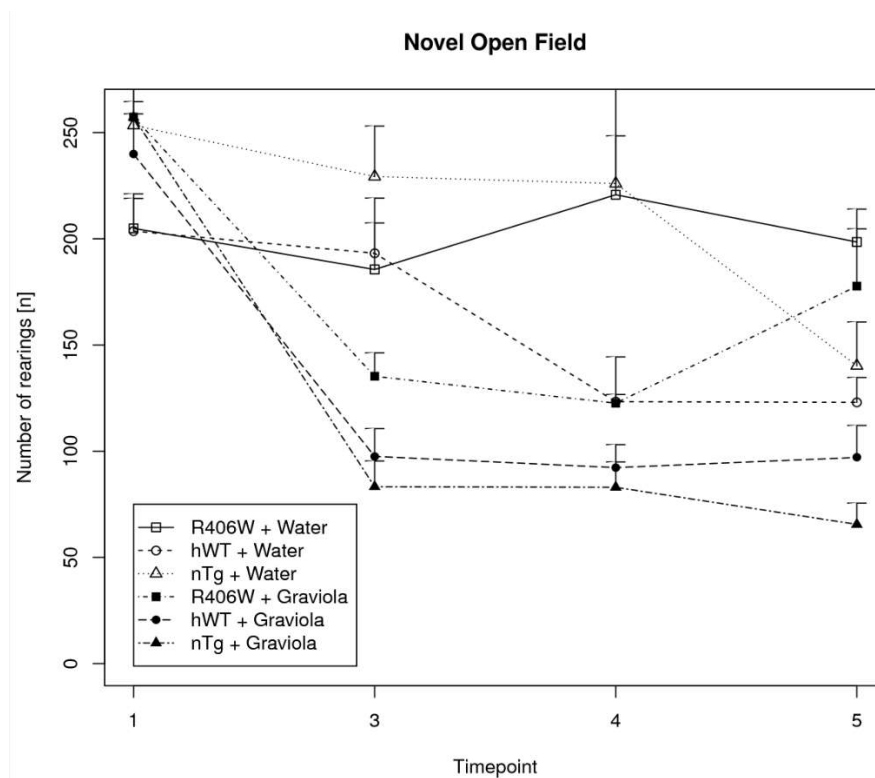


Abb. 3.7: Anzahl der *Rearings* im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.4.5 Zeit in der zentralen Zone im OFT

Die in der zentralen Zone verbrachte Zeit im OFT der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.8 und Abbildung 3.8 dargestellt. Die 2-way-ANOVA ergab für die in der zentralen Zone verbrachten Zeit im OFT einen signifikanten Effekt des Alters und der Behandlung (jeweils $p < 0,001$). Weiter wurden signifikante Interaktionen zwischen Alter / Genotyp ($p < 0,01$), zwischen Alter / Behandlung ($p < 0,001$) und zwischen Genotyp / Behandlung ($p < 0,05$) berechnet.

Tab. 3.8: Zeit in der zentralen Zone (s) im Offenfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM (s) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungsarm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	429,26±25,45 (49)	331,87±27,22 (45)	357,97±39,30 (22)	436,70±54,03 (21)	308,90±44,63 (10)
hWT (Wasser)	396,67±22,44 (40)	302,19±32,01 (35)	343,12±45,22 (16)	217,88±34,35 (16)	252,96±33,49 (10)
R406W (Wasser)	325,26±21,43 (38)	333,96±20,51 (44)	390,09±21,01 (19)	317,13±23,83 (19)	357,69±20,29 (10)
nTg (Saft)	313,34±22,23 (46)	194,02±21,49 (44)	144,12±31,12 (36)	176,77±30,67 (34)	119,58±22,42 (34)
hWT (Saft)	334,70±29,33 (35)	174,56±24,84 (34)	121,46±21,15 (28)	179,28±22,34 (24)	149,37±27,35 (24)
R406W (Saft)	319,05±19,65 (22)	264,02±24,12 (21)	192,15±27,46 (16)	227,88±20,26 (12)	228,11±16,15 (12)

Ein genereller Effekt des Genotyps auf die in der zentralen Zone verbrachte Zeit im OFT bestand nicht.

Im Verlauf der Testreihe verkürzte sich die in der zentralen Zone verbrachte Zeit bei allen Genotypen außer bei den R406W-Mäusen der Wasser-Kohorte (2 Monate vs. 12 Monate – Saft-Kohorte: R406W-Mäuse 319,05±19,65 s vs. 228,11±16,15 s; hWT-Mäuse 334,70±29,33 s vs. 149,37±27,35 s; nTg-Mäuse 313,34±22,23 s vs. 119,58±22,42 s; Wasser-Kohorte: hWT-Mäuse 396,67±22,44 s vs. 252,96±33,49 s; nTg-Mäuse 429,26±25,45 vs. 308,90±44,63 s)

Ab einem Alter von 4 Monaten verbrachten die Mäuse der Saft-Kohorte eine signifikant kürzere Zeit in der zentralen Zone als die Mäuse der Wasser-Kohorte ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$); 6 Monate – Saft- vs. Wasser-Kohorte: R406W-Tiere 192,15±27,46 s vs. 390,09±21,01 s; hWT-Tiere 121,46±21,15 s vs. 343,12±45,22 s; nTg-Tiere 144,12±31,12 s vs. 357,97±39,30).

Insgesamt nahm die Zeit in der zentralen Zone im Laufe der Versuchsreihe in der Saft-Kohorte bei nTg- und hWT-Tieren um mehr als 50 % ab; bei den R406W-Tieren war die Abnahme mit ca. 30 % etwas weniger ausgeprägt. Entsprechend stieg der Anteil der in der Peripherie verbrachten Zeit.

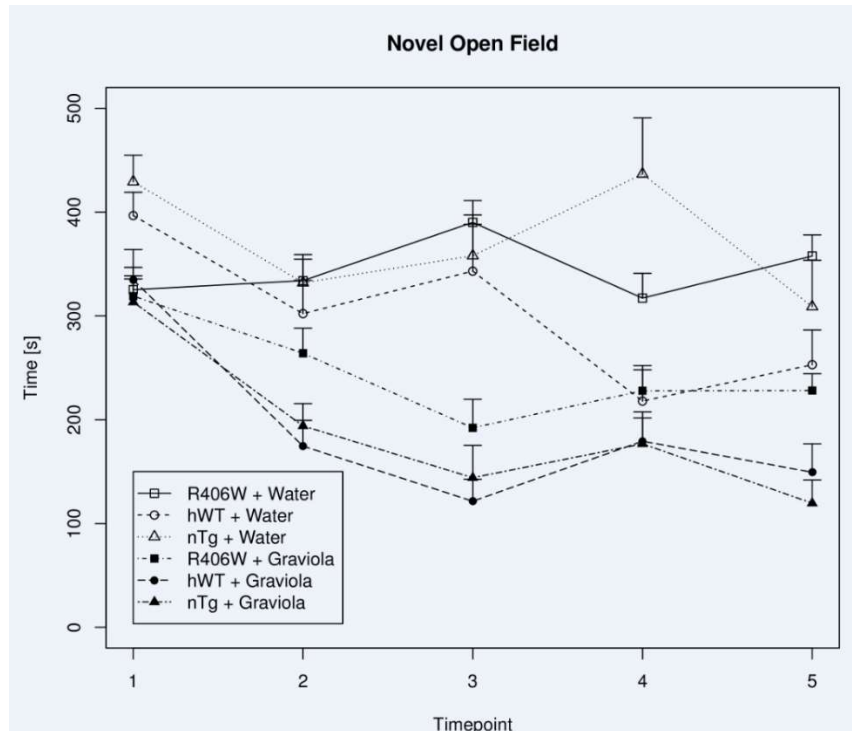


Abb. 3.8: Zeit in der zentralen Zone (s) im Offinfeld-Test (OFT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte
 x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
 Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean, SEM*)

3.5 Objektwiedererkennungstest (OWT)

3.5.1 Aufenthaltszeit im Objektbereich

Die Aufenthaltszeit im Objektbereich der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.9 und Abbildung 3.9 dargestellt. Die 3-way-ANOVA ergab für die Aufenthaltszeit im Objektbereich einen signifikanten Effekt des Objektes ($p < 0,001$). Bei der Auswertung des OWT ist eine Analyse der Haupteffekte (Genotyp, Alter, Behandlung) nicht ohne Berücksichtigung des Objekttyps (bekannt vs. neu) möglich. Es bestanden signifikante Interaktionen zwischen Objekt / Genotyp, zwischen Objekt / Alter / Behandlung, zwischen Objekt / Genotyp / Behandlung (jeweils $p < 0,001$) sowie zwischen Objekt / Behandlung ($p < 0,05$).

Tab. 3.9: Zeit in der Objektzone (s) im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM (s) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungsarm)	Objekt	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
		1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	bekannt	10,91±1,42 (43)	11,23±2,14 (46)	9,16±2,79 (22)	20,55±2,56 (18)	8,57±1,91 (10)
	neu	8,67±1,29 (43)	15,08±1,90 (46)	19,28±3,36 (22)	18,22±2,41 (18)	18,85±2,51 (10)
hWT (Wasser)	bekannt	9,86±1,36 (40)	11,68±1,72 (39)	11,37±3,20 (12)	18,26±3,86 (16)	10,89±2,27 (10)
	neu	10,49±1,54 (40)	13,12±1,78 (39)	27,23±14,13 (12)	18,28±2,51 (16)	22,59±2,89 (10)
R406W (Wasser)	bekannt	20,82±2,30 (45)	16,87±1,84 (39)	14,83±2,17 (19)	21,56±2,67 (16)	16,41±2,61 (10)
	neu	18,82±1,59 (45)	19,72±1,99 (39)	22,36±2,64 (19)	22,79±2,01 (16)	27,04±4,02 (10)
nTg (Saft)	bekannt	13,15±2,13 (46)	8,48±1,56 (44)	2,70±0,49 (34)	6,13±1,67 (34)	4,12±0,94 (33)
	neu	13,87±2,42 (46)	9,85±2,41 (44)	8,28±1,86 (34)	5,59±1,42 (34)	4,45±1,10 (33)
hWT (Saft)	bekannt	7,95±1,60 (35)	8,71±1,99 (34)	5,52±1,17 (24)	7,84±1,85 (24)	6,28±1,50 (24)
	neu	14,56±2,15 (35)	7,41±1,32 (34)	8,89±2,18 (24)	8,90±2,73 (24)	5,90±1,78 (24)
R406W (Saft)	bekannt	27,95±4,98 (22)	30,68±4,60 (22)	23,53±3,55 (12)	17,72±3,30 (12)	17,46±4,43 (12)
	neu	34,06±5,70 (22)	34,96±5,04 (22)	28,71±4,72 (12)	24,49±3,67 (12)	19,50±3,96 (12)

Während der Testreihe hielten sich die R406W-Mäuse in beiden Behandlungsarmen sowohl beim bekannten als auch beim neuen Objekt länger in der Objektzone auf. Eine Ausnahme bildeten R406W-Mäuse der Wasser-Kohorte in einem Alter von 6 Monaten. Im Alter von 2–6 Monaten zeigten insbesondere R406W-Mäuse der Saft-Kohorte die längsten durchschnittlichen Aufenthaltszeiten im Bereich des bekannten und neuen Objektes. Auch zeigten die R406W-Mäuse in beiden Behandlungsarmen jeweils längere Aufenthaltszeiten beim neuen als beim bekannten Objekt, mit Ausnahme der R406W-Mäuse der Wasser-Kohorte im Alter von 2 Monaten (z.B. 4 Monate bekanntes vs. neues Objekt: Saft-Kohorte / R406W-Tiere 30,68 ±4,60 s vs. 34,96±5,04 s; Wasser-Kohorte / R406W-Tiere: 16,87±1,84 s vs. 19,72±1,99 s). hWT- und nTg-Mäuse zeigten in beiden Behandlungsarmen etwas weniger konsistent längere Aufenthaltszeiten im Objektbereich des neuen im Vergleich zum bekannten Objekt (z. B. 6 Monate, bekanntes vs. neues Objekt – Saft-Kohorte / hWT-Tiere 5,52±1,17 s vs. 8,89±2,18 s; Saft-Kohorte / nTg-Tiere 2,70±0,49 s vs. 8,28±1,86 s; Wasser-Kohorte / hWT-Tiere 11,37±3,20 s vs. 27,23±14,13 s; Wasser-Kohorte / nTg-Tiere 19,16±2,79 vs. 19,28±3,36 s). Bei den R406W-Tieren der Saft-Kohorte verkürzten sich ab einem Alter von 8 Monaten die Aufenthaltszeiten in der Nähe des neuen und bekannten Objektes. Am Ende der Versuchsreihe zeigten fast alle Genotypen in beiden Behandlungsarmen eine kürzere Aufenthaltsdauer beim bekannten Objekt

als zu Beginn der Testreihe (2 Monate vs. 12 Monate – Saft-Kohorte: R406W-Tiere 27,95±4,98 s vs. 17,46±4,43 s; hWT-Tiere 7,95±1,60 s vs. 6,28±1,50 s; nTg-Tiere 13,15±2,13 s vs. 4,12±0,94 s; 2 Monate vs. 12 Monate – Wasser-Kohorte: R406W-Tiere 20,82±2,30 s vs. 16,41±2,61 s; nTg-Tiere 10,91±1,42 s vs. 8,57±1,91 s); bei den hWT-Mäusen der Wasser-Kohorte blieb der Wert konstant (9,86±1,36 s vs. 10,89±2,27 s).

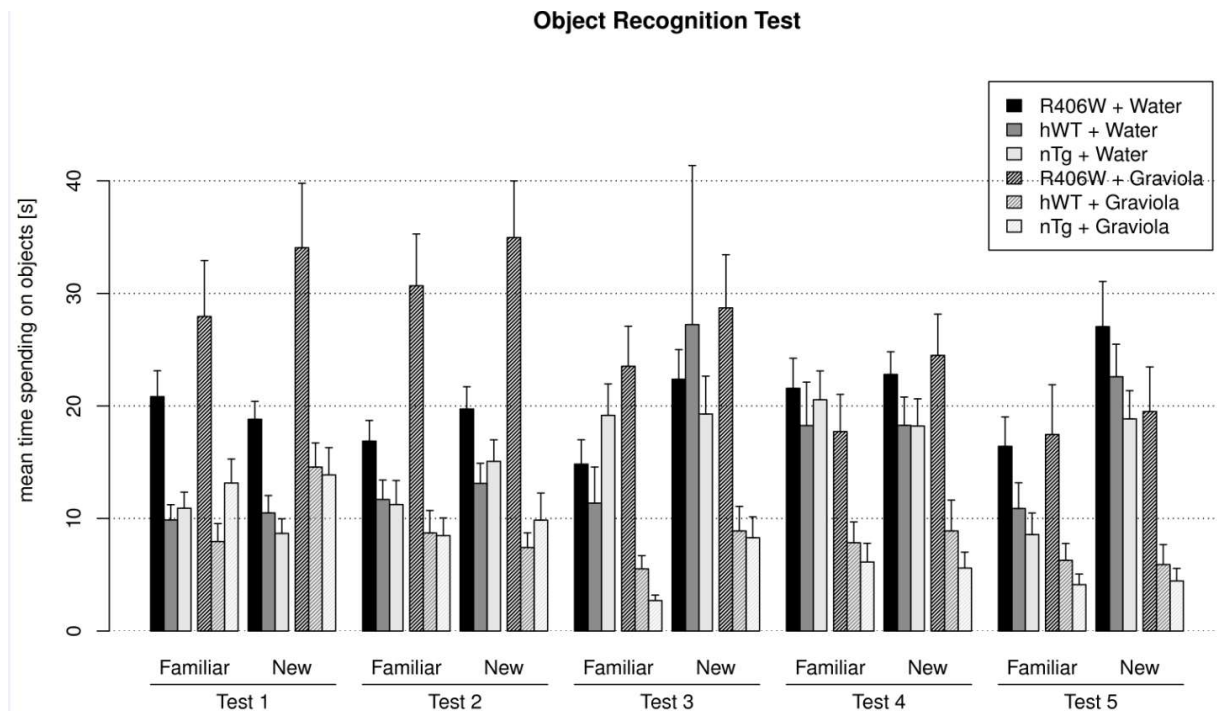


Abb. 3.9: Zeit in der Objektzone (s) im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte
 x-Achse Test 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte, familiar = bekanntes Objekt, new = unbekanntes Objekt
 Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.5.2 Anzahl der Objektbesuche im OWT

Die Anzahl der Objektbesuche im OWT der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.10 und Abbildung 3.10 dargestellt. Die 3-way-ANOVA ergab für der Anzahl der Objektbesuche einen signifikanten Effekt des Objektes ($p < 0,001$). Eine Betrachtung der Haupteffekte (Genotyp, Alter und Behandlung) ist beim OWT nicht ohne Beachtung des Objekttyps (bekannt vs. neu) möglich. Es fanden sich signifikante Interaktionen zwischen Objekt / Genotyp, Objekt / Behandlung (jeweils $p < 0,001$), Objekt / Alter ($p < 0,01$) sowie zwischen Objekt / Alter / Behandlung ($p < 0,01$).

Tab. 3.10: Anzahl der Objektbesuche im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotyp (Behandlungsarm)	Objekt	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
		1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	bekannt	12,33±1,45 (43)	13,22±1,62 (46)	13,55±1,20 (22)	11,61±1,58 (18)	9,60±2,20 (10)
	neu	10,07±1,12 (43)	16,72±2,31 (46)	14,45±2,11 (22)	14,44±1,88 (18)	12,10±1,88 (10)
hWT (Wasser)	bekannt	9,75±1,13 (40)	14,33±1,81 (39)	9,42±2,29 (12)	11,44±1,30 (16)	9,90±1,57 (10)
	neu	11,88±1,74 (40)	15,33±2,29 (39)	20,75±9,94 (12)	14,31±1,58 (16)	14,60±2,22 (10)
R406W (Wasser)	bekannt	18,82±1,59 (45)	19,46±1,86 (39)	13,63±1,79 (19)	15,56±1,32 (16)	10,30±2,15 (10)
	neu	18,78±1,54 (45)	21,51±2,08 (39)	18,00±1,63 (19)	17,19±1,49 (16)	15,20±2,14 (10)
nTg (Saft)	bekannt	6,24±0,72 (45)	4,34±0,60 (44)	2,71±0,46 (34)	3,41±0,74 (34)	3,48±0,86 (33)
	neu	6,67±0,75 (45)	5,11±0,76 (44)	3,79±0,67 (34)	3,38±0,65 (34)	3,06±0,88 (33)
hWT (Saft)	bekannt	4,51±0,60 (35)	4,94±0,77 (34)	4,25±0,79 (24)	4,29±0,74 (24)	4,45±0,94 (24)
	neu	6,86±0,72 (35)	5,12±0,81 (34)	5,38±0,92 (24)	4,63±0,72 (24)	3,42±0,62 (24)
R406W (Saft)	bekannt	9,32±1,12 (22)	12,27±1,68 (22)	10,17±1,24 (12)	8,08±1,23 (12)	9,5±1,36 (12)
	neu	12,82±1,19 (22)	13,05±1,37 (22)	11,00±1,67 (12)	9,75±1,65 (12)	10,50±2,05 (12)

Während der Testreihe wiesen die R406W-Mäuse der Wasser-Kohorte die höchste Anzahl der Objektbesuche beim bekannten und neuen Objekt auf ($p < 0,01$). Eine Ausnahme bildeten die Werte im Alter von 6 Monaten; zu diesem Zeitpunkt suchten die hWT-Mäuse der Wasser-Kohorte das neue Objekt häufiger auf. Die R406W-Mäuse der Saft-Kohorte suchten ebenfalls das neue und bekannte Objekt häufiger auf als die hWT- und nTg-Mäuse der gleichen Kohorte (Effekt des Genotyps). Zu Beginn der Testreihe zeigten die R406W-Mäuse der Wasser-Kohorte eine höhere Anzahl von Objektbesuchen beim neuen und beim bekannten Objekt als am Ende der Testreihe (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Mäuse / bekanntes Objekt 18,82±1,59 vs. 10,30±2,15; R406W-Mäuse / neues Objekt 18,78±1,54 vs. 15,20±2,14). Dieser Effekt war bei den anderen Genotypen der Wasser-Kohorte (2 Monate vs. 12 Monate: hWT-Mäuse / bekanntes Objekt 9,75±1,13 vs. 9,90±1,57; hWT-Mäuse neues Objekt 11,88±1,74 vs. 14,60±2,22; nTg-Mäuse / bekanntes Objekt 12,33±1,45 vs. 9,60±2,20; nTg-Mäuse neues Objekt 10,07±1,12 vs. 12,10±1,88) und bei den Genotypen der Saft-Kohorte (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Mäuse / bekanntes Objekt 9,32±1,12 vs. 9,50±1,4; R406W-Mäuse / neues Objekt 12,82±1,19 vs. 10,50±2,05; hWT-Mäuse / bekanntes Objekt 4,51±0,60 vs. 4,45±0,94; hWT-Mäuse / neues Objekt 6,86±0,72 vs. 3,42±0,62; nTg-Mäuse / bekanntes Objekt 6,24±0,72 vs. 3,48±0,86; nTg-Mäuse / neues Objekt 6,67±0,75 vs. 3,06±0,88) weniger deutlich. Mit wenigen Ausnahmen zeigten alle Genotypen in beiden Behandlungsarmen eine höhere Anzahl an Besuchen beim

neuen im Vergleich zum bekannten Objekt (Ausnahme Wasser-Kohorte: 2 Monate / nTg- und R406W-Mäuse, Saft-Kohorte: 8 Monate / R406W-Mäuse, 12 Monate / hWT- und nTg-Mäuse).

Die Saft-Kohorte zeigte insgesamt eine niedrigere Anzahl an Objektbesuchen (neues / bekanntes Objekt) als die Wasser-Kohorte (Ausnahme: 2 Monate, Saft-Kohorte / R406W-Mäuse vs. Wasser-Kohorte / hWT-Mäuse, neue Objekte, 6 Monate Saft-Kohorte / R406W-Mäuse vs. Wasser-Kohorte / hWT-Mäuse, bekannte Objekte). Dieser Befund bildet einen Behandlungseffekt ab.

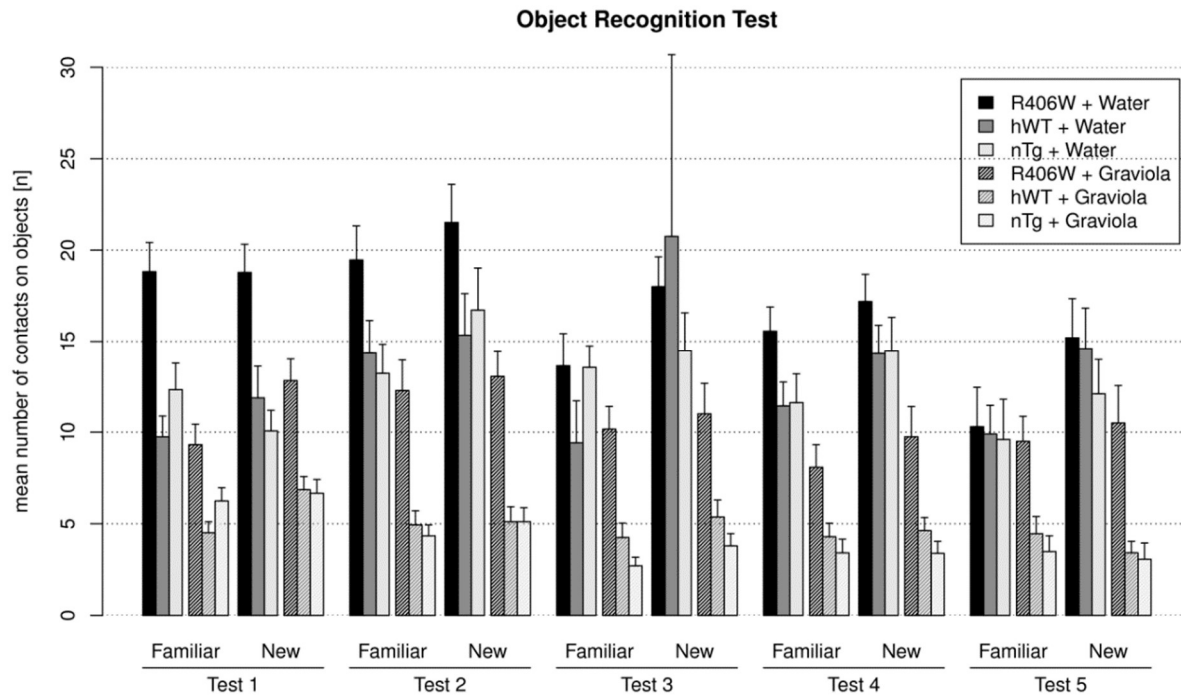


Abb. 3.10: Durchschnittliche Anzahl der Objektbesuche im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte
 x-Achse Test 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte, familiar = bekannte Objekte, new = unbekannte Objekte
 Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.5.3 Durchschnittliche Zeit pro Objektbesuch im OWT

Die durchschnittliche Zeit pro Objektbesuch im OWT der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Die durchschnittliche Zeit pro Objektbesuch wurde aus der durchschnittlichen Aufenthaltszeit beim bekannten bzw. neuen Objekt dividiert durch die durchschnittliche Anzahl der Objektbesuche errechnet.

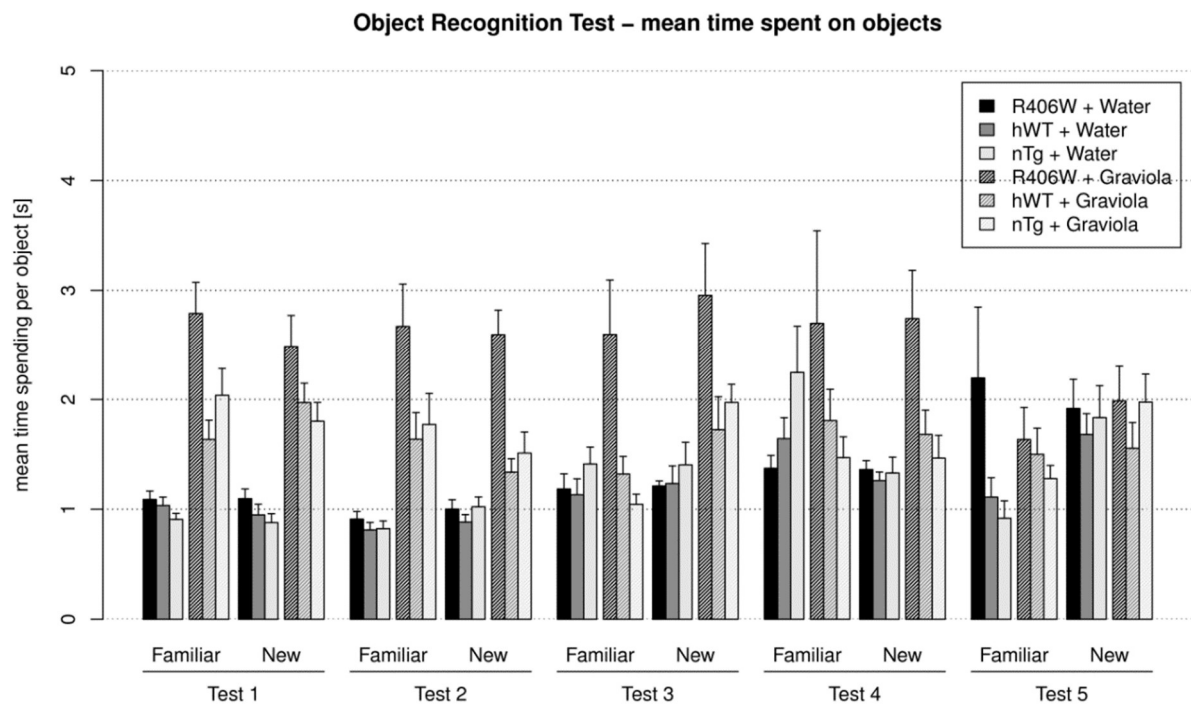


Abb. 3.11: Zeit pro Objektbesuch (s) im Objektwiedererkennungstest (OWT) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse Test 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte, familiar = bekannte Objekte, new = unbekannte Objekte

Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

In der Saft-Kohorte hielten sich R406W-Mäuse im Alter von 2–8 Monaten pro Objektbesuch deutlich länger beim bekannten und neuen Objekt auf als hWT- oder nTg-Mäuse. Dieser Genotyp-Effekt war bei den R406W-Tieren der Wasser-Kohorte weniger ausgeprägt. Im Alter von 2–6 Monaten zeigte die Saft-Kohorte zudem eine längere durchschnittliche Kontaktzeit pro Objektbesuch als die Wasser-Kohorte. Während die durchschnittliche Zeit pro Objektbesuch in der Saft-Kohorte am Ende der Versuchsreihe im Vergleich zu Beginn der Versuchsreihe abnahm, stieg diese in der Wasser-Kohorte an.

Insgesamt zeigten R406W-Mäuse der Saft-Kohorte eine längere durchschnittliche Zeit pro Objektbesuch und dadurch längere Aufenthaltszeiten im Objektbereich im OWT, während die Mäuse der Wasser-Kohorte (insbesondere R406W-Mäuse) eine höhere Anzahl an Kontakten aufwiesen. Beide Verhaltensweisen nahmen im Verlauf der Testreihe ab.

3.6 Sozialer-Interaktions-Test (SIT)

3.6.1 Anzahl der Kontakte im SIT

Die Anzahl der Kontakte im SIT der drei Genotypen (nTg, hWT und R406W) in den beiden Behandlungsarmen zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.11 und Abbildung 3.12 dargestellt. Die Untersuchungsgruppen bestanden aus genetisch veränderten und nTg-Tieren (R406W / nTg bzw. hWT / nTg). In der Saft-Kohorte wurden aufgrund von zu vielen hWT-Tieren auch nTg-Tiere ohne Behandlung mit Saft als Partner im SIT verwendet, diese Gruppe wurde aus der statistischen Analyse nachträglich ausgeschlossen. Die 2-way-ANOVA zeigte signifikante Gruppen- und Behandlungseffekte (jeweils $p < 0,001$). Weiter gab es eine signifikante Interaktion zwischen Alter / Behandlung ($p < 0,05$).

Tab. 3.11: Anzahl der Kontakte der Tiere im Sozialen-Interaktionstest (SIT) der Genotypen-Paare in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte \pm SEM. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotypen-Paare (Behandlungsarm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
hWT / nTg (Wasser)	120,58 \pm 4,88 (31)	121,60 \pm 4,90 (30)	139,00 \pm 10,10 (10)	144,50 \pm 9,89 (8)	145,00 \pm 5,64 (10)
R406W / nTg (Wasser)	148,00 \pm 3,64 (44)	139,17 \pm 4,51 (42)	135,73 \pm 9,25 (15)	149,13 \pm 10,72 (8)	143,10 \pm 5,94 (10)
hWT / nTg (Saft)	90,30 \pm 4,45 (23)	97,82 \pm 6,83 (22)	97,63 \pm 6,58 (24)	90,50 \pm 6,62 (24)	98,96 \pm 7,98 (24)
R406W / nTg (Saft)	114,64 \pm 5,70 (22)	122,14 \pm 6,46 (22)	114,00 \pm 9,48 (12)	109,17 \pm 10,53 (12)	144,67 \pm 12,63 (12)

In der Saft-Kohorte wiesen die Paare R406W / nTg während der gesamten Versuchsreihe eine höhere Anzahl an Kontakten auf als die Paare hWT / nTg ($p < 0,001$); (z. B. Zeitpunkt 6 Monate 114,00 \pm 9,48 vs. 97,63 \pm 6,58). Dieser Genotyp-Effekt war in der Wasser-Kohorte lediglich im Alter von 2–4 Monaten zu beobachten. Eine deutliche Abnahme der Anzahl von Kontakten im Laufe der Versuchsreihe trat in keinem Behandlungsarm auf. Eine annähernd konstante Anzahl von Kontakten zu Beginn und am Ende der Testreihe zeigten die Paare R406W / nTg in der Wasser-Kohorte (2 Monate vs. 12 Monate 148,00 \pm 3,64 vs. 143,10 \pm 5,94) und die Paare hWT / nTg in der Saft-Kohorte (2 Monate vs. 12 Monate: 90,30 \pm 4,45 vs. 98,96 \pm 7,98;). Bei den Paaren R406W / nTg in der Saft-Kohorte (2 Monate vs. 12 Monate: 114,64 \pm 5,70 vs. 144,67 \pm 12,63) und bei den Paaren hWT / nTg in der Wasser-Kohorte (2 Monate vs. 12 Monate: 120,58 \pm 4,88 vs. 145,00 \pm 5,64) stieg die Anzahl der Kontakte sogar deutlich an.

Bei Addition der Anzahl der Kontakte der Gruppen in den Behandlungsarmen (R406W / nTg + hWT / nTg) zeigte die Wasser-Kohorte zu jedem Testzeitpunkt eine höhere Anzahl von Kontakten als die

Saft-Kohorte (z. B. 8 Monate Saft- vs. Wasser Kohorte: R406W / nTg $109,17 \pm 10,53$ + hWT / nTg $90,50 \pm 6,62$ vs. R406W / nTg $149,13 \pm 10,72$ + hWT / nTg $144,50 \pm 9,89$).

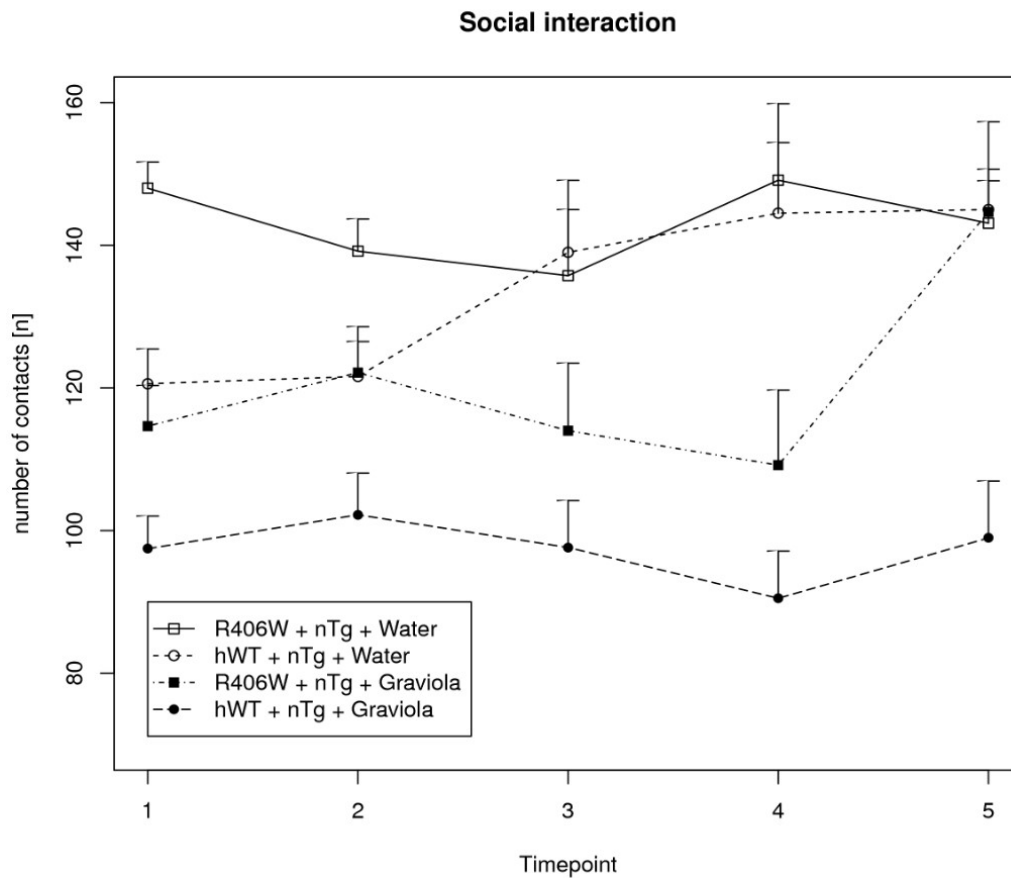


Abb. 3.12: Anzahl der Kontakte der Tiere im Sozialen-Interaktionstest (SIT) der Genotypen-Paare in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
Mittelwerte (*mean*) \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.6.2 Kontaktzeit im SIT

Die Kontaktzeit im SIT der drei Genotypen (nTg, hWT und R406W) in den beiden Behandlungsarmen zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.12 und Abbildung 3.13 dargestellt. Die Untersuchungsgruppen bestanden aus genetisch veränderten und nTg-Tieren (R406W / nTg bzw. hWT / nTg). In der Saft-Kohorte wurden aufgrund von zu vielen hWT-Tieren auch nTg-Tiere ohne Behandlung mit Saft als Partner im SIT verwendet, diese Gruppe wurde aus der statistischen Analyse nachträglich ausgeschlossen. Die 2-way-ANOVA ergab einen signifikanten Alterseffekt ($p < 0,01$). Weiter fanden sich signifikante Interaktionen zwischen Alter / Gruppe ($p < 0,001$). Insgesamt ließ sich kein konstanter Effekt des Genotyps und der Behandlung hinsichtlich der Kontaktzeit feststellen.

Tab. 3.12: Kontaktzeit (s) im Sozialen-Interaktionstest (SIT) der Genotypen-Paare in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM (s) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotypen-Paare (Behandlungs-arm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
hWT / nTg (Wasser)	530,77±21,09 (31)	496,29±25,20 (30)	541,55±36,39 (10)	563,05±38,84 (8)	521,11±29,71 (10)
R406W / nTg (Wasser)	580,67±18,11 (44)	522,81±22,42 (42)	387,79±30,84 (15)	411,57±33,61 (8)	436,85±22,07 (10)
hWT / nTg (Saft)	491,13±24,99 (23)	482,77±38,30 (22)	511,54±42,10 (24)	414,50±33,91 (24)	426,96±35,68 (24)
R406W / nTg (Saft)	516,55±20,17 (22)	530,50±26,91 (22)	427,83±44,61 (12)	398,08±45,12 (12)	494,08±42,71 (12)

Während die Kontaktzeit am Ende im Vergleich zum Beginn der Testreihe (2 Monate vs. 12 Monate) bei den Paaren R406W / nTg der Wasser-Kohorte (580,67±18,11 s vs. 436,85±22,07 s) sowie bei den Paaren hWT / nTg der Saft-Kohorte (491,13±24,99 vs. 426,96±35,68) deutlich abnahm, blieb sie bei den Paaren R406W / nTg der Saft-Kohorte (516,55±20,17 s vs. 494,08±42,71 s) und den Paaren hWT / nTg der Wasser-Kohorte (530,77±21,09 s vs. 521,11±29,71 s) annähernd konstant.

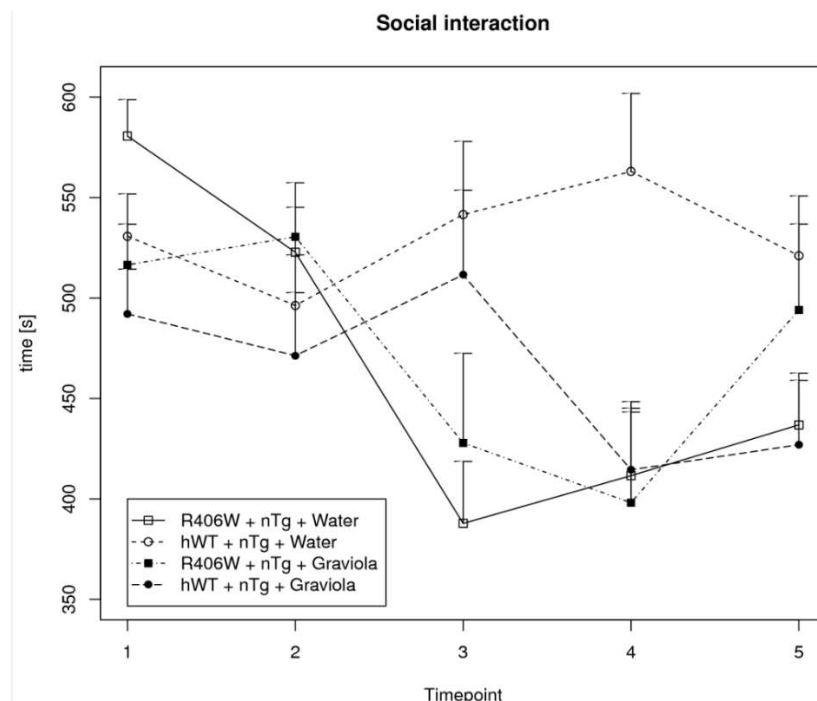


Abb. 3.13: Kontaktzeit (s) im Sozialen-Interaktionstest (SIT) der Genotypen-Paare in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte

Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.6.3 Zeit pro Kontakt im SIT

Die Zeit pro Kontakt im SIT der drei Genotypen (nTg, hWT und R406W) in den beiden Behandlungsarmen zu den fünf Zeitpunkten ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Zeit pro Kontakt wurde durch die Division der durchschnittlichen Kontaktzeit durch die Anzahl der Kontakte errechnet.

Die Paare hWT / nTg der Saft-Kohorte zeigten während der gesamten Versuchsreihe die längsten und die Paare der R406W / nTg der Wasser-Kohorten die kürzesten Zeiten pro Kontakt. Innerhalb des jeweiligen Behandlungsarmes wiesen die Paare R406W / nTg im Vergleich zu den Paaren hWT / nTg stets kürzere Zeiten pro Kontakt auf (Genotyp-Effekt). Im Alter von 2 bis 4 Monaten zeigten die Paare der Saft-Kohorte im Vergleich zu den Paaren der Wasser-Kohorte längere Zeiten pro Kontakt (Behandlungseffekt). Am Ende der Versuchsreihe war bei allen Paaren in beiden Behandlungsarmen eine diskrete Abnahme der Zeit pro Kontakt zu verzeichnen (Alterseffekt).

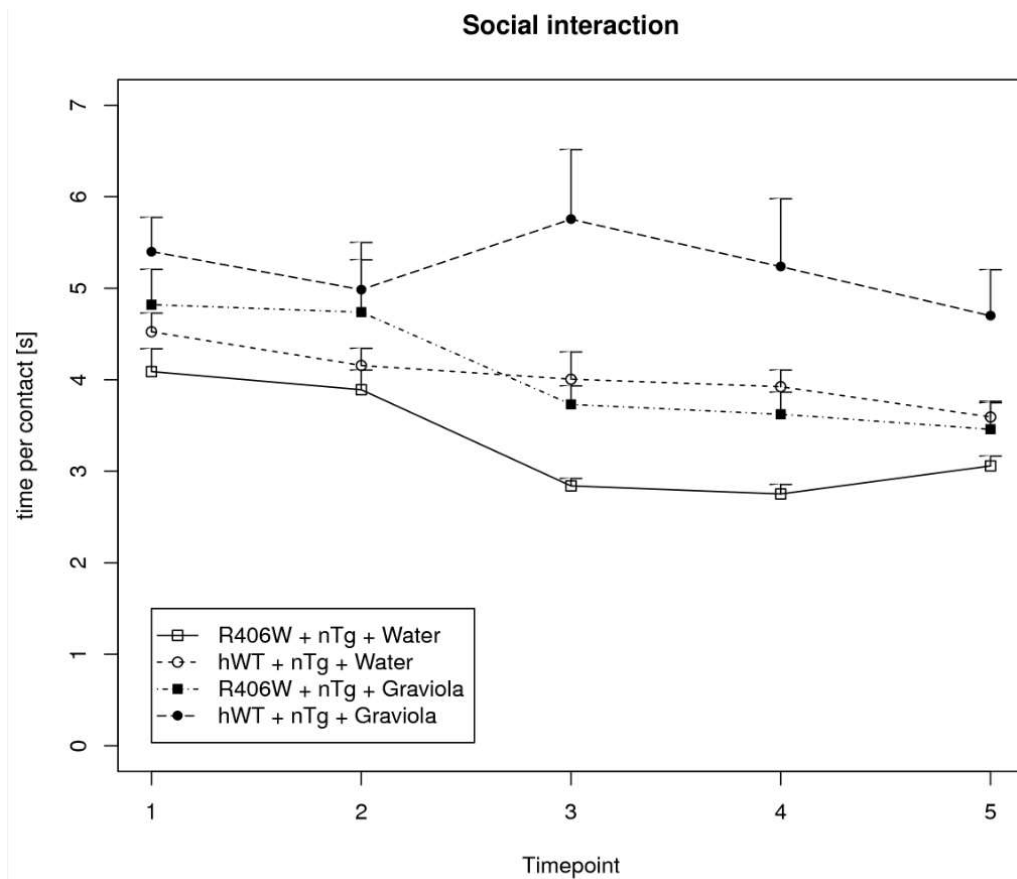


Abb. 3.14: Zeit pro Kontakt (s) im Sozialen-Interaktionstest (SIT) der Genotypen-Paare in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte

Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.7 Forcierter-Schwimm-Test (FST)

3.7.1 Aktive Zeit im FST

Bei der FST-Auswertung wurden die Verhaltensweisen *Struggling* und *Swimming* zur aktiven Zeit zusammengefasst, da die Messung des *Struggling* nicht präzise war und dies in der Literatur häufig so gehandhabt wird (Flaisher-Grinberg und Einat, 2010). Die aktive Zeit im FST der sechs Gruppen (nTg, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Zeitpunkten ist in Tabelle 3.13 und Abbildung 3.15 dargestellt. Die 2-way-ANOVA ergab für die aktive Zeit im FST signifikante Effekte des Alters, des Genotyps und der Behandlung (jeweils $p < 0,001$). Weiter wurden signifikante Interaktionen zwischen Alter / Behandlung aufgezeigt ($p < 0,001$). Bei der Analyse der Haupteffekte bezüglich des Genotyps zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen R406W / hWT, R406W / nTg sowie hWT / nTg (jeweils $p < 0,001$).

Tab. 3.13: Aktive Zeit (%) im Forcierten-Schwimm-Test (FST) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte \pm SEM (%) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.
nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotypen (Behandlungsarm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	23,30 \pm 1,78 (43)	18,21 \pm 2,54 (41)	48,80 \pm 4,32 (22)	46,29 \pm 4,02 (18)	37,84 \pm 7,81 (10)
hWT (Wasser)	23,16 \pm 1,41 (37)	14,72 \pm 1,68 (36)	49,97 \pm 5,16 (16)	44,68 \pm 2,97 (12)	33,83 \pm 7,32 (10)
R406W (Wasser)	31,59 \pm 2,20 (43)	18,09 \pm 1,84 (40)	62,17 \pm 4,51 (19)	59,15 \pm 3,85 (16)	46,33 \pm 7,04 (10)
nTg (Saft)	45,61 \pm 2,76 (45)	34,16 \pm 2,02 (44)	25,46 \pm 2,59 (34)	24,52 \pm 2,44 (34)	29,73 \pm 2,96 (33)
hWT (Saft)	46,38 \pm 2,62 (35)	32,47 \pm 1,94 (34)	21,70 \pm 2,75 (24)	21,90 \pm 2,07 (24)	25,66 \pm 2,27 (23)
R406W (Saft)	53,92 \pm 4,74 (22)	36,40 \pm 2,50 (22)	25,67 \pm 3,63 (12)	31,01 \pm 3,04 (12)	38,91 \pm 5,15 (12)

Im Alter von 2-4 Monaten zeigten die Mäuse der Saft-Kohorte (insbesondere R406W-Mäuse) die höchsten Anteile der aktiven Zeit. In der Wasserkohorte (insbesondere R406W-Mäuse) war dies im Alter von 6–12 Monaten der Fall.

Innerhalb der Behandlungsarme wiesen die R406W-Mäuse die höchsten Anteile an aktiver Zeit auf (z. B. 8 Monate – Saft-Kohorte: R406W-Mäuse 31,01 \pm 3,04 % vs. hWT-Mäuse 21,90 \pm 2,07 % vs. nTg-Mäuse 24,52 \pm 2,44 %; Wasser-Kohorte R406W-Mäuse 59,15 \pm 3,85 % vs. hWT-Mäuse 44,68 \pm 2,97 % vs. nTg-Mäuse 46,29 \pm 4,02 %). Während die Saft-Kohorte während der Versuchsreihe eine Abnahme der aktiven Zeit zeigte (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Mäuse 53,92 \pm 4,74 % vs. 38,91 \pm 5,15 %; hWT-Mäuse 46,38 \pm 2,62 % vs. 25,66 \pm 2,27 %; nTg-Mäuse 45,61 \pm 2,76 % vs. 29,73 \pm 2,96 %), wies die Wasser-Kohorte am Ende der Versuchsreihe im Vergleich zum Beginn einen höheren Anteil an aktiver Zeit auf (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Mäuse 31,59 \pm 2,20 s vs.

46,33±7,04 s; hWT-Mäuse 23,16±1,41 s vs. 33,83±7,32 s; nTg-Mäuse 23,30±1,78 s vs. 37,84±7,81 s). Am Ende der Versuchsreihe in einem Alter von 12 Monaten waren die Anteile an aktiver Zeit bei allen Genotypen vergleichbar.

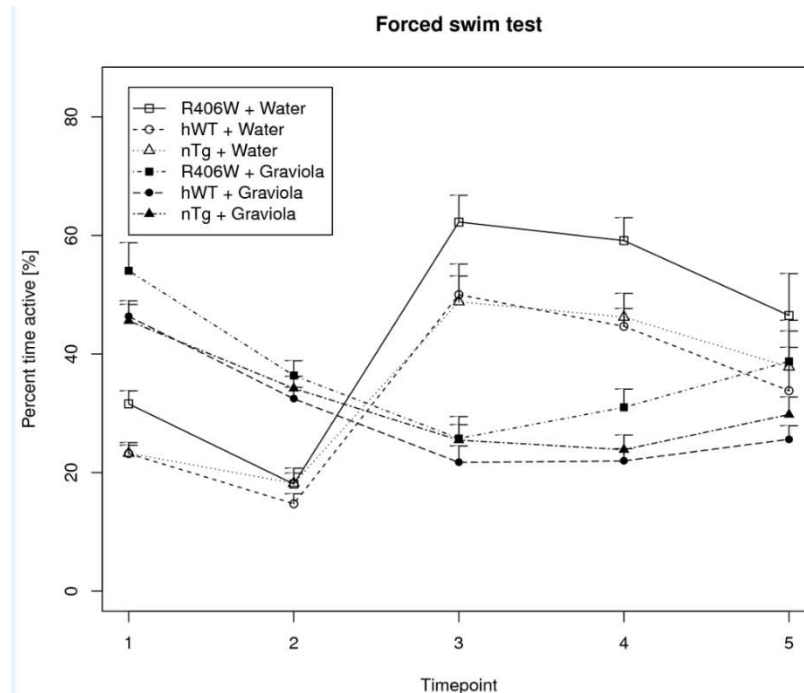


Abb. 3.15: Aktive Zeit (%) im Forcierten-Schwimm-Test (FST) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

3.7.2 Passive Zeit im FST

Die passive Zeit im FST der sechs Gruppen (nTg-, hWT- und R406W-Tiere der Wasser- und Saft-Kohorte) zu den fünf Alterszeitpunkten ist in Tabelle 3.14 und Abbildung 3.16 dargestellt.

Die 2-way-ANOVA ergab für die passive Zeit (*Floating*) im FST signifikante Effekte des Alters, des Genotyps und der Behandlung (jeweils $p < 0,001$). Weiter wurden signifikante Interaktionen zwischen Alter / Behandlung berechnet ($p < 0,001$). Bei der Analyse der Haupteffekte zeigten sich beim Genotyp signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen R406W / hWT, R406W / nTg sowie hWT / nTg (jeweils $p < 0,001$).

Tab. 3.14: Passive Zeit (%) im Forcierten-Schwimm-Test (FST) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

Mittelwerte±SEM (%) Die Anzahl der untersuchten Tiere ist in Klammern dargestellt.

nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W

= transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen

Genotypen (Behandlungsarm)	Zeitpunkte (Alter der Tiere)				
	1 (2 Monate)	2 (4 Monate)	3 (6 Monate)	4 (8 Monate)	5 (12 Monate)
nTg (Wasser)	76,69±1,78 (43)	81,52±2,64 (41)	51,20±4,32 (22)	53,71±4,02 (18)	62,16±7,81 (10)
hWT (Wasser)	76,84±1,41 (37)	85,28±1,68 (36)	50,03±5,16 (16)	55,32±2,97 (12)	66,17±7,32 (10)
R406W (Wasser)	68,41±2,20 (43)	81,91±1,84 (40)	37,83±4,51 (19)	40,85±3,85 (16)	53,67±7,04 (10)
nTg (Saft)	54,39±2,76 (45)	65,85±2,02 (44)	74,54±2,59 (34)	75,48±2,44 (34)	70,27±2,96 (33)
hWT (Saft)	53,62±2,62 (35)	67,53±1,94 (34)	78,30±2,75 (24)	78,10±2,07 (24)	74,34±2,27 (23)
R406W (Saft)	46,08±4,74 (22)	63,60±2,50 (22)	74,33±3,63 (12)	68,99±3,04 (12)	61,09±5,15 (12)

Mit 2-4 Monaten zeigte die Wasser-Kohorte und mit 6-12 Monaten die Saft-Kohorte die höchsten Anteile an passiver Zeit. Innerhalb der Behandlungsarme wiesen die R406W-Mäuse die niedrigsten Anteile an passiver Zeit auf (z. B. 8 Monate – Saft-Kohorte: R406W-Tiere 68,99±3,04% vs. hWT-Tiere 78,10±2,07% vs. nTg-Tiere 75,48±2,44%; Wasser-Kohorte: R406W-Tiere 40,85±3,85% vs. hWT-Tiere 55,32±2,97% vs. nTg-Tiere 53,71±4,02%). Während in der Saft-Kohorte im Laufe der Versuchsreihe der Anteil an passiver Zeit zunahm (2 Monate vs. 12 Monate: R406W-Tiere 46,08±4,74% vs. 61,09±5,15%; hWT-Tiere 53,62±2,62% vs. 74,34±2,27%; nTg-Tiere 54,39±2,76% vs. 70,27±2,96%), verbrachten die Tiere der Wasser-Kohorte am Ende der Versuchsreihe weniger Zeit passiv (R406W-Tiere 68,41±2,20% vs. 53,67±7,04%; hWT-Tiere 76,84±1,41% vs. 66,17±7,32%; nTg-Tiere 76,69±1,78% vs. 62,16±7,81%).

Am Ende der Versuchsreihe, im Alter von 12 Monaten, waren die Anteile an passiver Zeit bei allen Genotypen in beiden Behandlungsarmen vergleichbar.

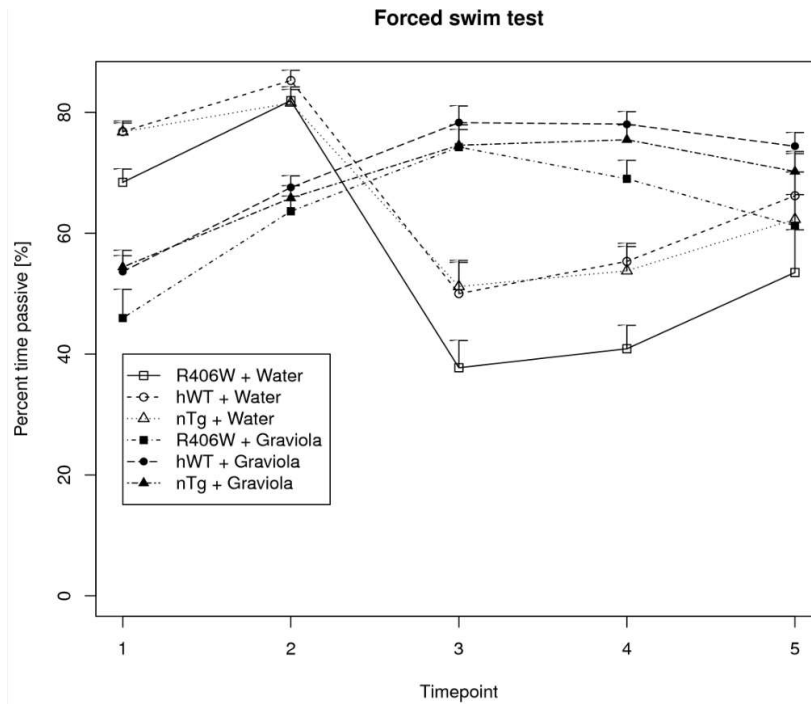


Abb. 3.16: Passive Zeit (%) im Forcierten-Schwimm-Test (FST) der drei Genotypen in den beiden Behandlungsarmen für die fünf Alterszeitpunkte

x-Achse 1–5: Alterszeitpunkte (2, 4, 6, 8, 12 Monate), nTg = nicht-transgene Tiere, hWT = transgene Tiere mit dem humanen Wildtyp-Tau, R406W = transgene Tiere mit humanem mutiertem Tau-Gen, Water = Wasser-Kohorte, Graviola = Saft-Kohorte
Mittelwerte (*mean*) ± Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM)

4 Diskussion

4.1 Körpergewicht

Die Messung des Körpergewichtes erfolgte bei der Saft- bzw. Wasser-Kohorte jeweils am gleichen Tag mit derselben Waage. Technisch bedingte Messwertdifferenzen sind daher weitgehend auszuschließen. Alle Genotypen in beiden Behandlungsarmen zeigten unter identischen Haltungsbedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Flüssigkeit (Saft aus *A. muricata* bzw. Wasser) mit zunehmendem Alter einen kontinuierlichen physiologischen Gewichtsanstieg.

Das Gewicht der R406W-Mäuse nahm in beiden Behandlungsarmen über den Versuchszeitraum im Vergleich zu den hWT- und nTg-Tieren weniger deutlich zu. In jedem Alter zeigten die R406W-Mäuse in beiden Behandlungsarmen ein signifikant niedrigeres Körpergewicht. Das signifikant niedrigere Körpergewicht der R406W-Mäuse ist am ehesten durch einen erhöhten Grundumsatz bei gesteigerter lokomotorischer Aktivität erklärbar. Diese These wird durch die erhöhte Streckenlänge und Geschwindigkeit der R406W-Mäuse im OFT gestützt (siehe Kap. 3.4).

Signifikante Unterschiede zwischen den hWT-Mäusen und den nTg-Kontrolltieren bestanden nur in der Saft-Kohorte im Alter von 2 Monaten. Daher ist ein Effekt der Expression des hWT-Tau-Proteins auf das Gewicht unwahrscheinlich.

Konsistent mit den vorliegenden Befunden wiesen 5 Monate alte Mäuse, die das humane Tau mit der Mutation P301L überexprimierten, im Vergleich zu nTg-Kontrolltieren ebenfalls ein signifikant niedrigeres Gewicht auf (Pennanen et al., 2004).

Ein signifikanter Behandlungseffekt (Saft aus *A. muricata* vs. Wasser) auf das Körpergewicht bestand nicht.

4.2 Rotarod-(ROD)-Test

Ein Parkinson-Syndrom wird durch die Kombination verschiedener Symptome (Bradykinese und mindestens eines der Symptome Tremor, Rigidity und posturale Instabilität) definiert (Calne et al., 1992). Motorische Einschränkungen im Sinne eines akinetisch-rigiden Syndroms und eine posturale Instabilität können auch bei genetisch bedingten Tauopathien (z. B. FTLT-Tau assoziiert mit MAPT-Mutationen) nachgewiesen werden (van Swieten et al., 1999; Reed et al., 1997).

Auch bei den vermutlich durch Konsum von Produkten aus *A. muricata* bedingten atypischen Parkinson-Syndromen von Guadeloupe treten regelmäßig Symptome einer Bradykinese, Rigor und eine posturale Instabilität auf (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Caparros-Lefebvre et al., 2002; Lanuzel et al., 2007).

In der vorliegenden Studie wurden Tau-transgene und nTg-Mäuse der Saft- und Wasser-Kohorte mittels ROD auf das Vorhandensein von motorischen Defiziten und Einschränkungen der posturalen Stabilität untersucht. Die im ROD erfassten Merkmale motorische Aktivität, muskulärer Tonus, Koordination und motorisches Lernen basieren auf dem Zusammenwirken von Hippocampus, motorischen Zentren und Kleinhirn (Takeuchi et al., 2011).

Für den ROD-Test wurden die Mäuse beider Behandlungsarme (Saft aus *A. muricata* bzw. Wasser) jeweils am selben Tag zur selben Tageszeit und mit derselben Testapparatur untersucht. Die maximal auf der Stange der ROD-Apparatur verbrachte Zeit wurde automatisch ermittelt, sodass Fehlerquellen durch den Beobachter auszuschließen sind.

Die Tiere der Saft-Kohorte hielten sich insgesamt länger auf der Stange als die Tiere der Wasser-Kohorte; signifikant waren die Unterschiede aber lediglich zum Testzeitpunkt 1. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die Wasser-Kohorte mit dem ROD-Test in einem jüngeren Alter begann (Wasser-Kohorte 6 Wochen vs. Saftkohorte 11 Wochen). Der verzögerte Beginn der Testreihe in der Saft-Kohorte ergab sich aus Behandlung mit dem Saft aus *A. muricata*.

Im Untersuchungsverlauf (Testzeitpunkt 1–5) blieb die maximal auf dem Stab verbrachte Zeit in der Saft-Kohorte annähernd konstant und nahm in der Wasser-Kohorte sogar zu. Dieses Ergebnis lässt sich am ehesten auf einen Trainingseffekt der Tiere zurückführen.

Innerhalb der Wasser- und Saft-Kohorte wiesen die R406W-Mäuse zu fast allen Testzeitpunkten die geringste Anzahl notwendiger Versuche beim ROD auf (Ausnahme Test-Zeitpunkt 3, Saft-Kohorte). Auch dieser Befund steht möglicherweise mit der erhöhten lokomotorischen Aktivität der R406W-Mäuse im Zusammenhang.

Im Verlauf der Versuche zeigten die Mäuse der Wasser-Kohorte und die R406W-Mäuse der Saft-Kohorte eine Abnahme der Anzahl der notwendigen Versuche beim ROD. Auch dieser Befund spricht für einen Trainingseffekt.

Zusammenfassend ergab die Analyse der ROD-Daten in beiden Behandlungsarmen keine Hinweise auf motorische Defizite oder eine posturale Instabilität bei hWT- oder R406W-Mäusen. Auch bei den anderen Tests (OFT, FST, s. Kap. 3.4, 3.7) zeigten die transgenen Tiere im Vergleich zu den nTg-Kontrollen keine motorischen Einschränkungen.

Übereinstimmend mit den vorliegenden Beobachtungen fehlten bei 16–23 Monate alten Tau-transgenen Mäusen (2N4R-Tau-Isoform mit R406W-Mutation unter der Kontrolle des Promotors der Alpha-Calmodulin-Kinase) ebenfalls motorische Defizite im ROD (Tatebayashi et al., 2002). Auch transgene Mäuse mit der doppelmutierten 4R-Tau-Isoform (G272V, P301S) unter der Kontrolle des Promotors Thy-1.2 zeigten im ROD-Test unter erschwerten Bedingungen (Zunahme der Drehgeschwindigkeit der Stange) keine Anzeichen motorischer Defizite (Schindowski et al., 2006).

Abweichend von den vorliegenden Befunden wiesen R406W-Mäuse (2N4R-Tau-Isoform unter der Kontrolle des PrP Promotors des syrischen Hamsters) im Alter von 10 und 12 Monaten stark reduzierte Zeiten auf der ROD-Stange auf (Ikeda et al., 2005). In einer anderen Untersuchung zeigten R406W-Mäuse im höheren Alter (12–18 Monate) mit dem auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten murinen PrP Promotors motorische Schwächen der hinteren Extremitäten (Zhang et al., 2004). Möglicherweise wären auch bei den Tau-transgenen Mäusen der vorliegenden Studie bei längerer Beobachtung motorische Defizite aufgetreten.

Im Unterschied zu der vorliegenden Analyse beobachteten verschiedene Studien Merkmale eines akinetisch-rigiden Syndroms bzw. einer Paraparese der Hinterläufe in anderen Tau-transgenen Mausmodellen (z. B. P301S) (Allen et al., 2002). Tau-transgene Mäuse mit einer P301S-Mutation zeigten bereits im Alter von 3 Monaten Störungen der Motorik und Koordination im ROD (Scattoni et al., 2010). Bei P301L-Mäusen wurden mit dem ROD Defizite schon im Alter von 9 Wochen beobachtet (Boekhoorn et al., 2006). P301L-Mäuse besitzen mit 7–12 Monaten zudem eine verkürzte Lebensdauer sowie motorische Defizite durch eine Paraparese der Hinterläufe im höheren Lebensalter (Allen et al., 2002; Pennanen et al., 2004). Die Entwicklung von motorischen Defiziten bei Tau-transgenen Mäusen wird von einigen Autoren auf die promotorabhängige (Thy-1.2, PrP) Transgen-Expression im Bereich des Rückenmarks zurückgeführt (Lewis et al., 2000; Terwel et al., 2005).

Interessanterweise zeigten in einer anderen Untersuchung P301L-Mäuse im Alter von 5 Monaten eine bessere Leistung auf dem ROD (Morgan et al., 2008). Dieser Befund stimmt mit dem vorliegenden Ergebnis überein, dass R406W-Tiere eine geringere Anzahl an Versuchen im ROD-Test benötigten.

In der vorliegenden Analyse führte eine Behandlung mit Saft aus *A. muricata*, der ein Toxin der mitochondrialen Atmungskette enthält, zu keinem konstanten Effekt im ROD-Test. Im Gegensatz hierzu zeigten mit dem pflanzlichen Komplex-I-Inhibitor Rotenone behandelte Ratten motorische Defizite im ROD (Swarnkar et al., 2011; Shin et al., 2017; Palle and Neerati, 2018, Garabadu and Agrawal, 2020). Die Abnahme der motorischen Fähigkeiten war in den oben genannten Untersuchungen von einer histopathologisch nachweisbaren neuronalen Degeneration begleitet. In der histologischen Aufarbeitung der in dieser Arbeit untersuchten nTg Tiere der Saft-Kohorte von Rottscholl et al. wurde hingegen kein Verlust an Neuronen oder Gliazellen beobachtet. Jedoch wurde durch die Behandlung mit Saft aus *A. muricata* eine Umverteilung von hyperphosphoryliertem Tau-Protein von den Axonen zu somatodendritischen Kompartimenten, im Sinne einer neuronalen Dysfunktion als eine frühe Stufe von neuronaler Degeneration, nachgewiesen (Rottscholl et al., 2016).

Weiter fanden sich in diversen Arbeiten, welche Effekte des pflanzlichen Komplex-I-Inhibitors Rotenone analysierten, Hinweise auf eine mitochondriale Dysfunktion und vermehrten oxidativen

Stress (Palle and Neerati, 2018, Garabadu and Agrawal, 2020). Im Rahmen der histopathologischen Untersuchung der mit Saft aus *A. muricata* behandelten Tiere dieser Analyse wurden ebenfalls indirekte Zeichen eines defekten Energiemetabolismus durch Nachweis von Immunreaktivität für 3-Nitrotyrosin (3NT) festgestellt (Rottscholl et al., 2016).

Vergleichbar mit den Effekten von Rotenone induzierte auch der synthetische Komplex-I-Inhibitor MPTP bei C57BL/6-Mäusen eine im ROD-Test nachweisbare motorische Dysfunktion (Kadoguchi et al., 2014).

4.3 Offenfeld-Test (OFT)

Verhaltensauffälligkeiten wie eine Veränderung des Antriebs, Ängstlichkeit oder eine Disinhibition treten bei genetisch bedingten Tauopathien (z. B. FTLD-Tau assoziiert mit Mutationen im MAPT) häufig auf. Bei betroffenen Patienten sind Störungen des Verhaltens (z. B. Verlust der sozialen Inhibition, inadäquate soziale Antworten, Ruhelosigkeit) oft die ersten Anzeichen (Wilhelmsen et al., 1994; Lynch et al., 1994; Yamaoka et al., 1996; Spillantini et al., 1997) und werden als klinische Ausprägung einer Dysfunktion der Amygdala diskutiert (Cook et al., 2014). Auch bei Patienten mit R406W-Mutation wurden diese Charakteristika beschrieben (Saito et al., 2002; Ostojic et al., 2004; Lindquist et al., 2008).

Parkinson-Syndrome werden häufig von neuropsychiatrischen Symptomen wie Impulskontrollstörung, Angst oder Apathie begleitet (Weintraub und Burn, 2011). Auch bei den Tauopathien der atypischen Parkinson-Syndrome von Guadeloupe sind Zeichen einer Frontallappendysfunktion mit Antriebsstörung und Disinhibition regelmäßig festzustellen (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Caparros-Lefebvre et al., 2002; Lannuzel et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden bei Tau-transgenen und nTg-Tieren unter Exposition mit Saft aus *A. muricata* bzw. Wasser potenzielle Anzeichen einer erhöhten lokomotorischen Aktivität im Sinne einer psychomotorischen Disinhibition bzw. eines ängstlichen Verhaltens mittels OFT überprüft. Die im OFT untersuchten Verhaltensweisen (Ängstlichkeit, exploratorische Lokomotion) gelten als Funktionen des Gyrus cinguli (Takeuchi et al., 2011).

Beim OFT wurden die Mäuse im jeweiligen Behandlungsarm am selben Tag, zur selben Tageszeit und mit derselben Testapparatur untersucht. Die Erfassung und Bearbeitung der Parameter erfolgten automatisch, sodass Fehler durch den Untersucher auszuschließen sind. Da die verschiedenen Genotypen beider Behandlungsarme im ROD keine motorischen Defizite zeigten, ist eine Beeinflussung der Leistung im OFT durch eine eingeschränkte Beweglichkeit unwahrscheinlich.

In beiden Behandlungsarmen legten die R406W-Mäuse zu allen Untersuchungszeitpunkten die längste Strecke zurück, wiesen die höchste Geschwindigkeit auf und zeigten allgemein eine höhere

Aktivität. Durchschnittlich legten R406W-Tiere im Vergleich zu den anderen Tieren des Behandlungsarms die zwei- bis dreifache Strecke mit doppelter Geschwindigkeit zurück. Die konsistenten Unterschiede bezüglich der zurückgelegten Strecke, Geschwindigkeit und Aktivität der R406W-Mäuse in beiden Behandlungsarmen sprechen für eine erhöhte lokomotorische Aktivität bzw. ein erhöhtes exploratives Verhalten dieses Genotyps. Diese Beobachtung ist mit einem niedrigeren Körpergewicht der R406W-Tiere, am ehesten bedingt durch einen erhöhten Energieverbrauch, verbunden.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kam eine andere Studie mit R406W-Mäusen (2N4R-Tau-Isoform unter der Kontrolle des Promotors Alpha-Calmodulin-Kinase), die im Alter von 16–23 Monate eine erhöhte lokomotorische Aktivität aufwiesen. Die Autoren interpretierten die Befunde als Disinhibition des R406W-Genotyps (Tatebayashi et al., 2002).

Tau-transgene Mäuse mit einer P301S-Mutation zeigten übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen im OFT ebenfalls ein hyperaktives Verhalten mit Zunahme der zurückgelegten Strecke sowie der Geschwindigkeit, aber ohne Veränderungen im Aufrichtverhalten (Scattoni et al., 2010). Weiterführende OFT-Analysen bestätigen für P301S-Mäuse eine Hyperaktivität und reduzierte Ängstlichkeit (Takeuchi et al., 2011). Andere Autoren brachten das veränderte Verhalten der P301S-Mäuse mit ausgeprägten Tau-Ablagerungen in der Amygdala in Zusammenhang (Przybyla et al., 2016).

Bei P301L-Mäusen fand sich im OFT bereits im Alter von 9 Wochen eine erhöhte lokomotorische Aktivität (Zunahme der zurückgelegten Strecke) ohne Veränderungen des Angst-assoziierten Verhaltens (Boekhoorn et al., 2006). Laut einer weiteren Studie zeigen P301L-Mäuse ab einem Alter von 6 Monaten eine progredient fortschreitende Disinhibition des explorativen Verhaltens. Die vermehrten Eintritte in das Zentrum der Arena (verminderte *Thigmotaxis*) wurden als verminderte Ängstlichkeit gewertet (Pennanen et al., 2004; 2006). Auch P301L-Mäuse (Tau-Gen unter der Kontrolle des CaMKIIAlpha-Promotors) zeichneten sich im Alter von 6 und 10 Monaten durch eine vergleichbare Hyperaktivität (zurückgelegte Strecke, Geschwindigkeit, allgemeine Aktivität) aus (Cook et al., 2014). Neuropathologisch zeigten diese Mäuse Tau-Ablagerungen im Hippocampus und in der Amygdala. Bei P301L-Mäusen mit einem Knock-out des murinen Tau-Gens tritt im Alter ebenfalls eine erhöhte spontane lokomotorische Aktivität auf, die mit altersabhängigen Veränderungen beim axonalen Transport der Mitochondrien verknüpft ist (Gilley et al., 2012)

Bei N279K-Mäusen (4R-Tau-Isoform) betraf die Hyperaktivität nicht nur die Lokomotion, sondern auch das Aufrichtverhalten (*Rearing*) (Taniguchi et al., 2005). Bei Expression aller humaner Tau-Isoformen zeigten Mäuse mit N296H-Mutation im Vergleich zu Mäusen ohne Mutation einen hyperaktiven Phänotyp in einer unbekanntenen Umgebung ohne signifikante Auffälligkeiten im ROD

(Wobst et al., 2017). Auch Tau-transgene Mäuse mit der kürzesten Tau-Isoform (0N3R) wiesen im OFT eine im Vergleich zu nTg-Tieren signifikant höhere Lokomotion auf (Shiryaev et al., 2010).

Dagegen zeigten P301L-Mäuse in anderen Untersuchungen trotz regelrechter Leistungen im ROD eine Abnahme des exploratorischen Verhaltens im OFT (Terwel et al., 2005; Samaey et al., 2019). Ähnlich zeigten Tau-transgene Mäuse mit der Deletions-Mutation K280 (humane 2N4R-Isoform) im Vergleich zu nTg-Mäusen eine reduzierte Aktivität im OFT trotz fehlender motorischer Defizite bei vergleichbarer Aufenthaltszeit in der zentralen Zone (Hochgräfe et al., 2015).

In der vorliegenden Studie legten die R406W-Mäuse in beiden Behandlungsarmen zu Beginn und am Ende des Versuchszeitraumes etwa die gleiche Strecke mit vergleichbarer Geschwindigkeit zurück. Bei hWT- und nTg-Tieren reduzierten sich dagegen die zurückgelegte Strecke und die Geschwindigkeit im Testverlauf. Dieser Befund kann als Verlust der physiologischen Habituation beim Genotyp R406W im Vergleich zu den anderen Genotypen interpretiert werden.

Korrelierend hierzu zeigte eine andere Untersuchung bei Tau-transgenen Mäusen (3R-Isoform unter der Kontrolle des neuronalen Promotors mThy-1) mit L266V- und G272V-Mutationen eine kontinuierlich hohe Aktivität mit Verlust der Habituation, welche die Autoren auf eine Störung des Lernverhaltens bzw. des Gedächtnisses zurückführten. Neben Tau-Aggregaten ließen sich bei den Mäusen pathologisch veränderte Mitochondrien (Vergrößerung, Elongation, desorganisierte Cristae) sowie gestörte Axone, Synapsen und Dendriten nachweisen (Rockenstein et al., 2015). Die Befunde verdeutlichen das pathologische Zusammenspiel von Tau-Ablagerungen, Dysfunktion der Mitochondrien und Verhaltensstörungen.

Zusammenfassend lässt sich die in der Literatur mehrfach beschriebene erhöhte lokomotorische Aktivität bei Tau-transgenen Mäusen als psychomotorische Disinhibition bzw. erhöhten Antrieb interpretieren. Bei der fehlenden Habituation der R406W-Mäuse hinsichtlich der zurückgelegten Streckenlänge und der Geschwindigkeit in der vorliegenden Versuchsreihe spielt laut Literaturbefunden möglicherweise sowohl eine generell erhöhte lokomotorische Aktivität im Sinne einer psychomotorischen Disinhibition als auch eine Störung des Lernverhaltens bzw. des Gedächtnisses eine Rolle.

Alle Genotypen der Saft-Kohorte hielten sich im Verlauf der Testreihe immer seltener in der zentralen Zone (im Sinne einer *Thigmotaxis*) auf, was als ängstliches Verhalten mit zunehmendem Alter gedeutet werden kann. Die in der zentralen Zone verbrachte Zeit wird in der Literatur als Angst-assoziiertes Parameter gewertet (Schwartz et al., 1993; Simon et al., 1994; Prut und Belzung, 2003). Die Eignung einer vermehrten lokomotorischen Aktivität in der Nähe der Arenawände als Parameter der Ängstlichkeit wurde durch pharmakologische und genetische Studien belegt (Lipkind et al., 2004, Simon et al., 1994).

In der Saft-Kohorte nahm die Aktivität der Tiere im Verlauf der Testreihe deutlich ab, während die Tiere der Wasser-Kohorte ein konstantes Aktivitätsniveau zeigten. Die Abnahme der Aktivität der

hWT- und nTg-Mäuse der Saft-Kohorte betrug bis zum Ende der Versuchsreihe die Hälfte bis zwei Drittel und war bei den R406W-Tieren mit etwa 30 % weniger ausgeprägt. Die Abnahme der Aktivität im OFT korrelierte möglicherweise mit einer ängstlichen Verhaltensweise, da die Mäuse der Saft-Kohorte im Verlauf der Testreihe parallel hierzu immer seltener die zentrale Zone aufsuchten und sich tendenziell vermehrt in der Nähe der Wände (im Sinne einer *Thigmotaxis*) aufhielten.

Die Saft-Kohorte (alle Genotypen) und die hWT-Tau- und nTg-Mäuse der Wasser-Kohorte zeigten im Verlauf der Testreihe eine abnehmende Anzahl von *Rearings*. Das verminderte Aufrichtverhalten korrelierte bei den hWT- und nTg-Tieren in beiden Behandlungsarmen mit der Abnahme der lokomotorischen Aktivität. Bei den R406W-Mäusen der Saft-Kohorte ist diese Verhaltensweise aufgrund der fehlenden Abnahme der lokomotorischen Aktivität eher als Indikator für die Emotionalität bzw. Ängstlichkeit der Tiere zu werten (Borta und Schwarting, 2005). Das Aufrichtverhalten von Nagetieren, insbesondere ohne Abstützen an den Wänden der Arena des OFT, kann als zusätzlicher Parameter zur Messung einer ängstlichen Verhaltensweise dienen (Sturman et al., 2018). Auch chronischer Stress führt bei Mäusen zu einem reduzierten Aufrichtverhalten und verminderten Aufenthalt in der zentralen Zone als Ausdruck eines erniedrigten exploratorischen Verhaltens und von Ängstlichkeit (Zhang et al., 2012). Die abnehmende Anzahl der *Rearings* ohne Abnahme der lokomotorischen Aktivität bei den R406W-Mäusen der Saft-Kohorte könnte auf einen synergistischen Effekt zwischen Genotyp und der Behandlung mit Saft aus *A. muricata* hinweisen. Auch mit dem pflanzlichen Komplex-I-Inhibitor Rotenone behandelte Ratten wiesen ein vermindertes Aufrichtverhalten (Palle and Neerati, 2018) bzw. eine depressive Verhaltensweise im OFT auf (Madiha and Haider, 2019).

Die hWT- und nTg-Mäuse der Saft-Kohorte legten im Vergleich zu den Tieren desselben Genotyps in der Wasser-Kohorte zu allen Zeitpunkten signifikant kürzere Strecken mit geringerer Geschwindigkeit zurück. Diese Befunde sind hinweisend auf eine Interaktion zwischen Genotyp und Behandlung. Beim R406W-Genotyp ließ sich dagegen kein Behandlungseffekt erkennen. Diese Auswirkungen des Verzehrs von Saft aus *A. muricata* auf nTg- und hWT-Mäuse passen zu Untersuchungen, bei denen mit Rotenone behandelten Ratten motorische Einschränkungen im OFT (reduzierte Geschwindigkeit und zurückgelegte Strecke) festgestellt werden konnten (Nie et al., 2019).

Zusammenfassend belegen die vorliegenden OFT-Ergebnisse verschiedene Effekte einer Behandlung mit Saft aus *A. muricata* sowie Interaktionen zwischen Genotyp und Behandlung. Alle Genotypen der Saft-Kohorte zeigten im gesamten Verlauf eine erhöhte *Thigmotaxis* im Vergleich zu den gleichen Genotypen der Wasser-Kohorte sowie weitere Anzeichen einer zunehmend ängstlichen Verhaltensweise. Diese Charakteristika könnten den psychopathologischen Veränderungen bei den atypischen Parkinson-Syndromen von Guadeloupe, die mit dem Konsum von Saft aus *A. muricata* in Verbindung gebracht werden, entsprechen.

4.4 Objektwiedererkennungstest (OWT)

Im Vergleich zu Störungen des Verhaltens und der Sprache sind Beeinträchtigungen der mnestischen Funktionen bei der neurodegenerativen Demenz mit FTL-D-Tau meist weniger dominant (Rabinovici und Miller, 2010; Bahia et al., 2013). Phänotypisch zeigen Patienten mit einer R406W-Mutation im Unterschied zu Patienten mit anderen MAPT-Mutationen aber initial oft einen langsam progressiven Gedächtnisverlust, klinisch der AD ähnelnd (Reed et al., 1997; van Swieten et al., 1999; Rademakers et al., 2003; Ostojic et al., 2004) mit eher später auftretenden Frontallappen-Symptomen und Sprachproblemen (Ostojic et al., 2004; Lindquist et al., 2008).

Die Klinik des atypischen Parkinson-Syndroms auf Guadeloupe beinhaltet einen charakteristischen kognitiven Verfall mit Zeichen einer Frontallappendysfunktion (Caparros-Lefebvre und Elbaz, 1999; Caparros-Lefebvre et al., 2002; Lannuzel et al., 2007). Gd-PSP- und Gd-PDC-Patienten zeigen in neuropsychologischen Tests, die exekutive Funktionen bei Verhaltensplanung und Adaptation prüfen, Defizite (Pillon et al., 1995), die auf eine fronto-subcortikale Demenz hinweisen (Pillon et al., 1991).

Der als Standardmethode zur Überprüfung der kognitiven Fähigkeiten in Mausmodellen verwendete Morris-Water-Maze (MWM)-Test prüft ausschließlich das räumliche Gedächtnis (Morris et al., 1984; Morris 1990; Weitzner et al., 2015). Durch kaltes Wasser verursachter Stress sowie die Anforderungen an die motorischen Fähigkeiten der Mäuse können die Ergebnisse des MWM-Tests beeinflussen. Im Gegensatz hierzu vermeidet der OWT Stress für die Versuchstiere und die Ergebnisse werden nicht durch ihre Schwimmfähigkeit beeinflusst (Huber et al., 2018). Der OWT dient der Beurteilung der Funktion des deklarativen Gedächtnisses (d. h. der Erinnerung an Gesichter und Objekte), die hauptsächlich vom Hippocampus abhängt (Broadbent et al., 2004; Hammond et al., 2004).

In der vorliegenden Versuchsreihe wurden mit dem OWT bei Tau-transgenen und nTg-Mäusen der Saft- und Wasser-Kohorte das Vorhandensein und die Ausprägung mnestischer Defizite insbesondere des deklarativen Gedächtnisses erfasst.

Wie auch beim OFT wurden die Mäuse im jeweiligen Behandlungsarm am selben Tag zur selben Tageszeit und mit derselben Apparatur untersucht. Die automatische Erfassung und Berechnung der Parameter schließen Fehler durch den Untersucher weitestgehend aus. Die Tiere im jeweiligen Behandlungsarm erhielten die gleichen Objekte, um den Einfluss einer potenziellen Objektpräferenz (Farbe, Material) zu minimieren. Da im ROD-Test Hinweise auf motorische Defizite bei den Genotypen beider Behandlungsarme fehlten, ist eine Beeinflussung der Leistung im OWT durch eine eingeschränkte Beweglichkeit unwahrscheinlich.

Bei der Analyse der Aufenthaltszeit im Bereich bekannter / neuer Objekte zeigten R406W-Mäuse in beiden Behandlungsarmen die höchsten Werte, was im Kontext der OFT-Befunde als gesteigertes exploratives Verhalten gewertet werden kann (R406W-Genotyp-Effekt).

In beiden Behandlungsarmen verbrachten die R406W-Mäuse während der gesamten Testreihe mehr Zeit im Bereich des neuen Objektes als im Bereich des bekannten Objektes, was der physiologischen Verhaltensweise „*novelty seeking*“ entspricht. Diese Präferenz für neue Objekte zeigten auch die Genotypen hWT und nTg in beiden Behandlungsarmen. Die Auswertung der Aufenthaltszeiten im Bereich des bekannten / neuen Objektes lieferte daher keine Hinweise auf eine Abnahme der Gedächtnisfunktion bei Tau-transgenen im Vergleich zu nTg-Tieren oder durch eine Behandlung mit Saft aus *A. muricata* im Vergleich zu einer Wasserbehandlung.

R406W-Mäuse der Saft-Kohorte zeigten im Alter von 2–8 Monaten im Vergleich zu den anderen Genotypen der Saft- und allen Genotypen der Wasser-Kohorte die längsten Zeiten pro Objektbesuch (sowohl des bekannten als auch des neuen Objektes). Dies spricht für ein stärker ausgeprägtes exploratives Verhalten in jüngerem Alter durch den synergistischen Effekt des R406W-Genotyps und der Behandlung mit Saft aus *A. muricata*. In höherem Alter nahm dieses Verhalten auch in dieser Gruppe deutlich ab.

Am Ende der Versuchsreihe hielten sich im Vergleich zum Beginn der Testreihe fast alle Genotypen in beiden Behandlungsarmen kürzer beim bekannten Objekt auf, was als Habituation (Lerneffekt) oder Abnahme des explorativen Verhaltens interpretiert werden kann.

R406W-Mäuse der Wasser-Kohorte wiesen die höchste Anzahl an Besuchen beim bekannten / neuen Objekt auf. In der Saft-Kohorte zeigten R406W-Mäuse im Vergleich zu hWT- und nTg-Mäusen ebenfalls eine höhere Anzahl von Besuchen sowohl des bekannten als auch des neuen Objektes, was als weiterer Hinweis auf ein erhöhtes exploratives Verhalten des R406W-Genotyps gedeutet werden kann. Passend zu diesen Befunden zeigten Tau-transgene Mäuse mit einer P301S-Mutation im OWT ein hyperaktives Profil im Sinne einer verstärkten Lokomotion und Exploration neuer Objekte (Scattoni et al., 2010).

Alle Genotypen beider Behandlungsarme besuchten neue Objekte häufiger als bekannte Objekte, was der physiologischen Verhaltensweise „*novelty seeking*“ entspricht (Aggleton, 1985). Der Vergleich der Anzahl der Objektbesuche von Tau-transgenen Tieren und nTg-Tieren bzw. von Tieren der Saft- oder Wasser-Kohorte lieferte keine Hinweise auf eine Abnahme deklarativer Gedächtnisfunktionen.

Die hohe Anzahl an Objektkontakten der R406W-Mäuse der Wasser-Kohorte nahm im Verlauf der Testreihe ab, was als Habituation bzw. Abnahme des explorativen Verhaltens gedeutet werden kann.

Die Tiere der Saft-Kohorte zeigten eine geringere Anzahl von Kontakten mit neuen / bekannten Objekten als die Tiere der Wasser-Kohorte. Dieser Behandlungseffekt ist im Kontext der verminderten

Aufenthaltszeit in der zentralen Zone (*Thigmotaxis*), wo sich die Objekte befanden, zu interpretieren (siehe Kap. 3.4).

Die durchschnittliche Zeit pro Objektbesuch stieg bei der Wasser-Kohorte im Verlauf an und nahm dagegen in der Saft-Kohorte ab. Auch diese Befunde der Saft-Kohorte deuten auf eine Habituation oder auf eine zunehmende *Thigmotaxis* hin (siehe oben).

Insgesamt zeigten die R406W-Mäuse der Saft-Kohorte eine längere durchschnittliche Zeit pro Objektbesuch und dadurch längere durchschnittliche Aufenthaltszeiten im Objektbereich als die anderen Genotypen der Saft-Kohorte. Dieser Befund spricht möglicherweise für ein verstärktes exploratives Verhalten durch einen synergistischen Effekt des R406W-Genotyps und der Behandlung mit Saft aus *A. muricata*. Das Verhalten nahm allerdings im Verlauf der Testreihe ab.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse des OWT beim Vergleich Tau-transgener und nTg-Tiere bzw. beim Vergleich der Behandlungsgruppen nicht auf Defizite im deklarativen Gedächtnis hin.

Im Gegensatz dazu ergab der Angst-Konditionierungstest bei 16–23 Monate alten R406W-Mäusen (2N4R-Isoform unter der Kontrolle des Alpha-Calmodulin-Kinase-Promotors) deutliche Beeinträchtigungen des assoziativen Gedächtnisses ohne offensichtliche sensomotorische Defizite (Tatebayashi et al., 2002). Bei R406W-Mäusen (2N4R-Isoform unter der Kontrolle des PrP des syrischen Hamsters) zeigte der Test der passiven Vermeidung eine deutliche altersabhängige Einschränkung des Hippocampus-anhängigen Lernverhaltens (Ikeda et al., 2005).

MWM-Analysen bei P301L-Mäusen im Alter von 6–11 Monaten wiesen Defizite des räumlichen Gedächtnisses nach (Arendash et al., 2004; Pennanen et al., 2004). OWT belegten bei 5 Wochen alten P301L-Mäusen hingegen eine Verbesserung der Langzeitpotenzierung und des Gedächtnisses (Boekhoorn et al., 2006). Zu diesem Zeitpunkt war bei den untersuchten Tieren keine Hyperphosphorylierung nachzuweisen. Eine neuere OWT-Studie fand bei P301L-Mäusen (2N4R-Isoform) bis zu einem Alter von 17 Monaten weder eine Störung der exekutiven Funktionen oder der Aufmerksamkeit noch der Funktionen des Kortex oder des Temporallappens (Kent et al., 2017). Erst ab einem Alter von 18–21 Monaten waren bei diesen Mäusen Einschränkungen des räumlichen und des deklarativen Gedächtnisses nachzuweisen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden anderer Untersuchungen überein, in denen P301L-Mäuse bis zu einem Alter von 17 Monaten ebenfalls keine Einschränkungen des räumlichen Gedächtnisses wohl aber des Arbeitsgedächtnisses (ab einem Alter von 12 Monaten) zeigten (Murakami et al., 2006). Möglicherweise hätten auch die Tau-transgenen Mäuse der vorliegenden Studie im Vergleich zu den nTg-Kontrolltieren im höheren Alter Gedächtnisdefizite aufgewiesen, Daten jenseits des Alters von 12 Monaten wurden jedoch nicht erhoben.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Befunden zeigten Tau-transgene Mäuse mit einer K369I-Mutation bereits im Alter von 4 Monaten eine Störung der Gedächtnisfunktionen im OWT (Ittner et al.,

2008). Auch im P301S-Mausmodell traten bereits im Alter von 2,5 Monaten und vor der Manifestation lokomotorischer Störungen Gedächtnisdefizite auf. Parallel dazu wurden ultrastrukturelle Veränderungen im Hippocampusbereich vor dem Auftreten eines Nervenzellverlustes detektiert (Xu et al., 2014a). Tau-transgene Mäuse mit P301S-Mutation zeigten zudem Defizite der exekutiven Funktionen, die zunächst das räumliche Arbeitsgedächtnis, später jedoch auch das Kurzzeitgedächtnis betrafen (Van der Jeugd et al., 2016). Die intracerebrale Injektion von synthetischen Tau-Fibrillen in Tau-transgene Mäuse mit P301S-Mutation (1N4R-Isoform unter der Kontrolle des murinen PrP Promotors) induzierte eine Tau-Aggregation mit resultierender Prionen-artiger Ausbreitung der Tau-Pathologie über funktionell verbundene neuroanatomische Bahnen. Diese Entwicklung führte 6 Monate nach Injektion nicht nur zu einer beeinträchtigten synaptischen Plastizität im Hippocampusbereich, sondern auch zu eingeschränkten kognitiven Funktionen im OWT (Stancu et al., 2015).

Doppel-transgene Mäuse mit den Tau-Mutationen G272V und P301S litten bereits im Alter von 10 Monaten an Gedächtnisdefiziten (Schindowski et al., 2006). Tau-transgene Mäuse mit den Tau-Mutationen G272V und P301S zeigten zudem Defizite des räumlichen, sozialen und kontextabhängigen Lernens, die mit einer prominenten abnormen Hyperphosphorylierung im Bereich des Hippocampus und einer Einschränkung der synaptischen Funktion und Plastizität im Bereich des Hippocampus einhergingen (Van der Jeugd et al., 2011)

12 Monate alte Maus-Tau-*Knock-out* Mäuse, die alle sechs Isoformen des humanen Tau-Proteins exprimierten, zeigten kognitive Defizite hinsichtlich der Erkennung neuer Objekte im OWT und Störungen des räumlichen Gedächtnisses im MWM (Polydoro et al., 2009). Diese Symptome gingen mit einer synaptischen Dysfunktion im Bereich des Hippocampus im Sinne einer Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung der synaptischen Übertragung einher. Verschiedene Arbeiten bestätigen die enge Beziehung zwischen dem kognitiven Leistungsabbau bei Tau-transgenen Mäusen und der Expression des pro-aggregatorischen transgenen Tau-Proteins mit Störungen der Funktion der Synapsen im Hippocampusbereich (Sydow et al., 2011; Van der Jeugd et al., 2012).

Dass Tau jedoch in physiologischen Zuständen essentiell für die Gedächtnisfunktion ist, zeigt sich bei dem Tau *Knock-out* Mausmodell, welche im OWT mit zunehmendem Alter progrediente Störungen des Kurzzeitgedächtnisses in Kombination mit erhöhter lokomotorischer Aktivität im OFT zeigte (Biundo et al., 2018).

Die Bedeutung einer pathologischen Veränderung von Tau für eine kognitive Beeinträchtigung zeigt eine neuere Untersuchung, bei der in einem dreifach transgenen AD-Mausmodell (u.a. mit der Tau-P301L-Mutation) der Abbau der kognitiven Leistung (im OWT und MWM) zu präklinischen Alzheimer-Stadien entsprechenden Zeitpunkten stärker mit erhöhten Phospho-Tau-Spiegeln als mit Amyloid-Beta-Ablagerungen korrelierte (Huber et al., 2018).

Bei den Versuchstieren der vorliegenden Studie führte eine Behandlung mit Saft aus *A. muricata* nicht zu einer Abnahme der kognitiven Fähigkeiten, die bei den vermutlich durch den Konsum von *A. muricata* Produkten verursachten atypischen Parkinson-Syndromen auf Guadeloupe regelhaft festzustellen sind.

Dagegen kam es bei einer Intoxikation von Mäusen mit MPTP (synthetischer Inhibitor des Komplex-I der Atmungskette) 3 Wochen nach der Behandlung zu einer Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen im OWT und im Test der passiven Vermeidung. Parallel dazu trat eine gestörte Langzeitpotenzierung im Hippocampus, eine reduzierte Aktivität der Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinase sowie eine Dysfunktion der AMPA-Typ Glutamat-Rezeptoren im Hippocampus auf (Moriguchi et al., 2012).

4.5 Sozialer-Interaktionstest (SIT)

Charakteristisch für eine FTLD-Tau mit MAPT-Mutationen sind eine frühzeitige Enthemmung der Betroffenen im sozialen Umgang (Disinhibition), oder aber eine Reduktion von zwischenmenschlichen Kontakten durch sozialen Rückzug und Antriebsmangel (Rabinovici und Miller, 2010; Bahia et al., 2013). Auch bei der wahrscheinlich durch Umweltfaktoren bedingten Tauopathie der atypischen Parkinson-Syndrome von Guadeloupe sind Beeinträchtigungen der sozialen Interaktion durch die fronto-subcortikale Demenz möglich (Caparros-Lefebvre et al., 2002; Lannuzel et al., 2007). Zudem werden Parkinson-Syndrome häufig durch neuropsychiatrische Merkmale (z. B. Impulskontrollstörung, Angst, Apathie) begleitet (Weintraub und Burn, 2011).

Die im SIT untersuchten Verhaltensmerkmale (z. B. Ängstlichkeit in neuen Situationen, soziales Verhalten) werden z. T. mit dem Hippocampus in Verbindung gebracht (Takeuchi et al., 2011). Bei Nagetieren trat eine Disinhibition auch bei Läsionen des medialen prä-frontalen Kortex auf (de Bruin et al., 1983).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausprägung und die Veränderung der sozialen Interaktion bei transgenen und nTg-Mäusen in der Saft- und Kontrollgruppe mittels SIT verglichen.

Beim SIT wurden die Testpaare der Saft- und Wasser-Kohorte im jeweiligen Behandlungsarm am gleichen Tag und mit demselben Testapparat untersucht. Die automatische Erfassung und Berechnung der Parameter schließen Fehler durch den Untersucher weitgehend aus. Aufgrund der fehlenden Hinweise auf motorische Defizite bei den Genotypen in beiden Behandlungsarmen (ROD-Ergebnisse) ist eine Beeinflussung der Leistung im SIT durch eine Einschränkung der Beweglichkeit der Tiere unwahrscheinlich. Um die Einflüsse der Haltungsbedingungen auf die Untersuchung zu minimieren, wurden die Tiere der Saft- und Wasser-Kohorte mit soweit möglich genetisch identischen Geschwistertieren gehalten. Bei spontanem Tod oder Eliminierung der Käfigpartner trat teilweise

eine Einzelhaltung ein. Ein Einfluss dieser Einzelhaltung auf die soziale Interaktion im Sinne einer erhöhten Interaktion ist nicht ausgeschlossen (Niesink und van Ree, 1982).

Im der Saft-Kohorte wiesen die R406W / nTg Paare im gesamten Versuchsverlauf eine höhere Anzahl an Kontakten auf als die hWT / nTg Paare. Dieser Genotyp-Effekt war in der Wasser-Kohorte lediglich im Alter von 2–4 Monaten zu beobachten. Eine automatische Erfassung der Kontaktinitiation war technisch nicht möglich. Visuelle Beobachtungen zeigten jedoch, dass die Kontaktinitiation überwiegend von den R406W-Mäusen ausging. Die höhere Anzahl an Kontakten der R406W / nTg Paare im Vergleich zu den hWT / nTg Paaren in der Saft-Kohorte und in jüngerem Alter auch in der Wasser-Kohorte kann als Disinhibition des R406W-Genotyps gedeutet werden (s. Kap. 4.3).

Eine deutliche Abnahme der Anzahl der Kontakte im Laufe der Versuchsreihe im Sinne einer Habituation bzw. Rückzugstendenz ließ sich in keinem der Behandlungsarme nachweisen; die Zahl der Kontakte zu Beginn und am Ende der Testreihe blieb bei den R406W / nTg Paaren in der Wasser-Kohorte und bei den hWT / nTg Paaren in der Saft-Kohorte weitgehend konstant. Bei den Testpaaren R406W / nTg in der Saft-Kohorte und hWT / nTg in der Wasser-Kohorte stieg die Zahl der Kontakte sogar deutlich an.

Bei einer gemeinsamen Betrachtung der Anzahl der Kontakte in den Behandlungsarmen (R406W / nTg + hWT / nTg) zeigte die Wasser-Kohorte zu jedem Testzeitpunkt eine höhere Anzahl an Kontakten als die Saft-Kohorte. Dieser Befund könnte auf ein ängstlicheres Verhalten der Tiere bei Konsum von Saft aus *A. muricata* hindeuten.

Die Analyse der Kontaktzeit im SIT ergab keine konstanten Genotyp- oder Behandlungseffekte. Während die Kontaktzeit am Ende im Vergleich zum Beginn der Testreihe bei den Testpaaren R406W / nTg in der Wasser-Kohorte und hWT / nTg in der Saft-Kohorte abnahm, blieb sie bei den Testpaaren R406W / nTg in der Saft-Kohorte und hWT / nTg in der Wasser-Kohorte annähernd konstant.

Innerhalb eines Behandlungsarmes waren die Zeiten pro Kontakt für die Testpaare R406W / nTg im Vergleich zu den Testpaaren hWT / nTg stets kürzer, was für einen R406W-Genotyp-Effekt in beiden Behandlungsarmen spricht.

Im Alter von 2–4 Monaten zeigten die Testpaare der Saft-Kohorte im Vergleich zu den Testpaaren der Wasser-Kohorte längere Zeiten pro Kontakt, was auf einen Behandlungseffekt im jüngeren Alter hindeutet. Im Laufe der Versuchsreihe kam es bei beiden Testpaaren in beiden Behandlungsarmen zu einer leichten Abnahme der Zeit pro Kontakt, was als Effekt des Alters bzw. als Habituation interpretiert werden kann.

Zusammenfassend ließ sich der R406W-Genotyp-Effekt bei der sozialen Interaktion an einer höheren Anzahl der Kontakte mit den Testpartnern zu allen Untersuchungszeitpunkten in der Saft-Kohorte und in jüngerem Alter auch in der Wasser-Kohorte feststellen; zudem zeigten R406W-Mäuse

innerhalb der Behandlungsarme stets kürzere Zeiten pro Kontakt mit ihren Testpartnern. Diese Beobachtungen können als Disinhibition des R406W-Genotyps bei der sozialen Interaktion entsprechend der charakteristischen Verhaltensweise bei genetischen Tauopathien der FTLD-Tau mit MAPT-Mutationen interpretiert werden.

Ein Vergleich der vorliegenden SIT-Ergebnisse mit Literaturdaten war aufgrund der fehlenden Studien mit Tau-transgenen Mäusen zu dieser Thematik nicht möglich. Die soziale Interaktion dieser Tiere wurde im Vergleich zum exploratorischen Verhalten und zu kognitiven Fähigkeiten seltener untersucht. Tau-transgene Mäuse mit der P301S-Mutation zeigten in einer Batterie von Verhaltens-tests FTD-typische Merkmale (erhöhte Impulsivität, reduzierte soziale Exploration, exekutive Dysfunktion) (Van der Jeugd et al., 2016). Mäuse mit der P301L-Mutation legten im Drei-Kammer-Test der Sozialen Präferenz, der die Kontaktfreudigkeit und die Präferenz für einen neuen sozialen Reiz erfasst (Moy et al., 2004), eine kürzere Strecke im Vergleich zu nTg-Mäusen zurück (Samaey et al., 2019). Bei Mäusen mit der P301S-Mutation ergab der Soziale Präferenz Test eine verminderte Exploration, Hinweise auf Ängstlichkeit und eine reduzierte Sozialität (Watt et al., 2020). Als Abwandlung des SIT basiert der Soziale Wiedererkennungstest (Macbeth et al., 2009) darauf, dass erwachsene Mäuse weniger mit bekannten Mäusen interagieren, als mit unbekanntem gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Mäusen (Kaidanovich-Beilin et al., 2011). Der Soziale Wiedererkennungstest wird häufiger als der SIT zur Untersuchung des Verhaltens von dreifach-transgenen Mäusen des Alzheimer-Mausmodells verwendet (Arsenault et al., 2013).

Zusammenfassend war als Effekt der Behandlung mit Saft aus *A. muricata* eine insgesamt niedrigere Anzahl von Kontakten in der Saft-Kohorte zu allen Untersuchungszeitpunkten feststellbar. Mit zunehmendem Alter war die Zeit pro Kontakt kürzer. Die niedrigere Anzahl von Kontakten in der Saft-Kohorte spricht für ein ängstlicheres Verhalten bzw. Rückzugstendenzen, was auch bei den atypischen Parkinson-Syndromen von Guadeloupe beobachtet wurde. Ähnlich zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten mit Rotenone (pflanzlicher Inhibitor des Komplex-I der Atmungskette) behandelte Ratten im SIT ein depressives Verhalten (Madiha and Haider, 2019).

4.6 Forcierter-Schwimm-Test (FST)

Mit dem FST wurden in der vorliegenden Studie das Vorhandensein und die Ausprägung depressiver Affektveränderungen bei den Tau-transgenen Mäusen bzw. unter Behandlung mit Saft aus *A. muricata* analysiert. Die Apathie gehört zu den häufigsten frühen Symptomen einer FTLD bzw. genetischer Tauopathien (z. B. FTLD-Tau mit MAPT-Mutationen) (Perry et al., 2017). Eine erhöhte Depressivität ist vor allem bei der temporalen Variante der FTD häufig (Liu et al., 2004; Bozeat et al., 2000).

Parkinson-Syndrome werden häufig durch neuropsychiatrische Merkmale, wie Depression, Schlafstörung und Apathie, begleitet (Weintraub und Burn, 2011). Auch bei den möglicherweise durch den Konsum von *A. muricata* Produkten ausgelösten Tauopathien der atypischen Parkinson-Syndromen von Guadeloupe tritt eine Apathie als Zeichen einer Frontallappendysfunktion gehäuft auf (Caparros-Lefebvre et al., 2002; Lannuzel et al., 2007).

Beim FST wurden die Mäuse der Saft- bzw. Wasser-Kohorte am selben Tag zur selben Tageszeit und mit derselben Testapparatur untersucht. Die automatische Erfassung und Berechnung der Parameter schließen Fehler durch den Untersucher weitgehend aus. Da im ROD-Test Hinweise auf motorische Defizite bei den Genotypen beider Behandlungsarme fehlten, ist eine Beeinflussung der Leistung im FST durch Einschränkungen der Beweglichkeit nicht anzunehmen.

Im Alter von 2–4 Monaten zeigten die Tiere der Saft-Kohorte im FST die höchsten Anteile an aktiver Zeit und im Alter von 6–12 Monaten die höchsten Anteile an passiver Zeit. Bei der Wasser-Kohorte waren dagegen in einem Alter von 2–4 Monaten die Anteile an aktiver Zeit und im Alter von 6–12 Monaten die Anteile an passiver Zeit am geringsten.

Innerhalb der Behandlungsarme wiesen die R406W-Mäuse die höchsten Anteile an aktiver Zeit und die niedrigsten Anteile an passiver Zeit auf. Dieser Genotyp-Effekt ist am ehesten auf die in den anderen Verhaltenstest festgestellte erhöhte lokomotorische Aktivität bzw. Disinhibition zurückzuführen. Auch bei P301L-Tau-transgenen Mäusen trat eine alters-abhängige Hyperaktivität im FST auf (Xu et al., 2018).

Im Gegensatz zu den vorliegenden Befunden zeigten ältere (12–14 Monate) R406W-Tau-transgene Mäuse (gleiche Tau-Isoform, Promotor CaMKII) einen erhöhten Anteil an passiver Zeit im Vergleich zu nTg-Kontrolltieren und somit ein verstärktes depressives Verhalten im FST (Egashira et al., 2005). Die motorischen Funktionen und die Ängstlichkeit-assoziierten Parameter dieser Tiere waren hingegen normal. Die Veränderung der Depressivität war mit reduzierten Spiegeln von 5-Hydroxytryptamin verbunden. Der erhöhte Anteil an passiver Zeit im FST konnte durch eine Behandlung mit Fluvoxamin reduziert werden (Egashira et al., 2005). In einer weiteren Studie ging die Zunahme des depressiven Verhaltens im FST bei Mäusen, die das humane Tau-Gen mit MAPT-Mutationen exprimierten, mit einer Erhöhung der GABA-ergen Neurotransmission im Bereich des dorsalen Gyrus dentatus des Hippocampus einher (Llorens-Martín et al., 2011). Es ist nicht auszuschließen, dass auch die in der vorliegenden Studie untersuchten Tau-transgenen Mäuse im höheren Alter eine Zunahme der passiven Zeit im FST aufgrund eines verstärkten depressiven Verhaltens gezeigt hätten.

Zusammenfassend lieferte der FST zusätzliche Hinweise auf eine für genetische Tauopathien (z. B. FTLD-Tau mit MAPT-Mutationen) charakteristische erhöhte lokomotorische Aktivität bzw. Disinhibition des R406W-Genotyps. Weiter deuten die Befunde auf ein mit zunehmendem Alter steigendes depressives Verhalten aller Genotypen der Saft-Kohorte hin. Ein solches Verhalten wird auch

bei den mit dem Verzehr von *A. muricata* Produkten in Zusammenhang gebrachten, atypischen Parkinson-Syndromen von Guadeloupe beobachtet.

Korrelierend zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten mit Rotenone (pflanzlicher Komplex-I-Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette) behandelte Ratten ein depressives Verhalten im FST (Madiha and Haider, 2019). Weiter war auch bei mit MPTP (synthetischer Komplex-I-Inhibitor der Atmungskette) behandelten Mäusen ein verstärktes depressives Verhalten im FST sowie ein reduzierter Dopamin-Spiegel und eine verminderte Tyrosin-Hydroxylase-Expression bei verstärkter Tau-Expression nachweisbar (Amin et al., 2018). In einer weiteren Studie führte eine Intoxikation von Mäusen mit MPTP zu Anhedonie und Depressivität im FST bei gleichzeitiger Neutrophin-Depletion im präfrontalen Kortex und Hippocampus (Schamne et al., 2018). Auch bei Ratten verstärkte die Gabe von MPTP das depressive Verhalten im FST (Barbiero et al., 2014). Niedrige MPTP-Dosen bewirkten bei Mäusen eine erhöhte Depressivität im FST, eine erhöhte Ängstlichkeit und führten zu Defiziten im Kurzzeitgedächtnis; hohe Dosen hatten dagegen motorische Defizite zur Folge (Cunha et al., 2017).

In einem Ratten-Modell wurde der Zusammenhang zwischen einer Mikrotubuli-Instabilität und einer erhöhten Depressivität aufgezeigt (Wang et al., 2020). Chronischer Stress führte zudem im Maus-Modell zu einer erhöhten Tau-Phosphorylierung und einem verstärkten axonalen Transport von Mitochondrien (Zhang et al., 2012).

4.7 Schlussfolgerung

Im vorliegenden Untersuchungszeitraum von 2–12 Monaten wurden bei den Tau-transgenen Mäusen (hWT und R406W) und nTg-Mäusen weder unter Behandlung mit Wasser noch mit Saft aus *A. muricata* motorische Defizite im ROD-Test beobachtet. Die Mäuse in beiden Behandlungsarmen entwickelten kein akinetisch-rigides Syndrom wie bei der genetischen Tauopathie FTLT-Tau mit MAPT-Mutationen bzw. den atypischen Parkinson-Syndromen von Guadeloupe. Obwohl bei Patienten mit R406W-Mutation Parkinson-Symptome in unterschiedlicher Ausprägung beschrieben wurden (Reed et al., 1997; van Swieten et al., 1999), zeigten R406W-Mäuse bis zu einem Alter von 19 Monaten keine Beeinträchtigung der motorischen Koordination (Tatebayashi et al., 2002; Egashira et al., 2005). Allerdings zeigten R406W-transgene Mäuse (unter der Kontrolle des murinen PrP) im höheren Alter (12–18 Monate) eine motorische Schwäche der hinteren Extremitäten (Zhang et al., 2004). Möglicherweise wären solche Veränderungen bei einer längeren Beobachtung auch bei den hier untersuchten Tau-transgenen Mäusen aufgetreten oder die Defizite hätte sich bei Verwendung eines anderen Promotors (z. B. PrP des syrischen Hamsters) (Ikeda et al., 2005) schon im jüngeren Alter manifestiert.

Eine Tau-Pathologie ist auch ohne motorische Defizite, beispielsweise bei präferentiellen Tau-Ablagerungen in nicht-motorischen Arealen, möglich. Laut einer Studie mit Mäusen, die mutiertes 4R-Tau mit drei Punktmutationen (R406W, P301L, G272V) überexprimierten, traten filamentöse Tau-Ablagerungen vor allem im Kortex und Hippocampus und weniger stark im Striatum und Rückenmark auf (Lim et al., 2001). Auch bei diesen Mäusen fehlten bis zu einem Alter von 12 Monaten motorische Defizite.

Die in der Wasser-Kohorte stets und innerhalb der Saft-Kohorte überwiegend geringere Anzahl an Versuchen der R406W-Mäuse beim ROD-Test lässt sich am ehesten als erhöhte lokomotorische Aktivität dieses Genotyps und nicht als Steigerung der motorischen Fähigkeiten durch Überexpression des humanen mutierten MAPT-Gens interpretieren. Bessere motorische Leistungen beim ROD-Test traten auch bei 5 Monate alten P301L-Mäusen auf (Pennanen et al., 2004).

Eine Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten durch die Gabe von Saft aus *A. muricata* wurde nicht beobachtet. Dagegen zeigten mit dem pflanzlichen Komplex-I-Inhibitor Rotenone behandelte Ratten motorische Defizite im ROD (Swarnkar et al., 2011; Shin et al., 2017; Palle and Neerati, 2018, Garabadu and Agrawal, 2020). Möglicherweise beruhen die unterschiedlichen Befunde auf einem Dosisseffekt. Bei Verabreichung des synthetischen Komplex-I-Inhibitors MPTP zeigten sich motorische Defizite erst bei hohen Dosen, während niedrige Dosen zu affektiven Veränderungen, einer erhöhten Ängstlichkeit sowie Defiziten des Kurzzeitgedächtnisses führten (Cunha et al., 2017).

Bei allen Verhaltenstests fanden sich in beiden Behandlungsarmen Hinweise auf eine erhöhte lokomotorische Aktivität bzw. ein verstärktes exploratives Verhalten des R406W-Genotyps (geringere Anzahl an Versuchen im ROD-Test; längere zurückgelegte Strecken, höhere Geschwindigkeit und höhere Aktivität ohne altersabhängige Abnahme (Habituation) im OFT; längere Aufenthaltszeiten im Objektbereich und höhere Anzahl an Objektbesuchen (bekannten und neue Objekte) im OWT; höhere Anzahl von Kontakten ohne Habituation im Verlauf im SIT; höheren Anteil an aktiver bzw. niedrigerer Anteil an passiver Zeit im FST).

Auch in einer weiteren Studie zeigten R406W-Mäuse (2N4R-Isoform, Promotor Alpha-Calmodulin-Kinase) im Alter von 16–23 Monaten eine erhöhte lokomotorische Aktivität, die als Disinhibition interpretiert wurde (Tatebayashi et al., 2002). Ein erhöhtes exploratives Verhalten ohne altersabhängige Abnahme tritt auch bei anderen Tau-Mutationen (P301S (Scattoni et al., 2010, Takeuchi et al., 2011, Przybyla et al., 2016), P301L (Pennanen et al., 2004; 2006; Boekhoorn et al., 2006; Cook et al., 2014)) auf.

Zusammenfassend belegen die verstärkte lokomotorische Aktivität bzw. das erhöhte explorative Verhalten der R406W-Mäuse eine psychomotorische Disinhibition bzw. frontale Enthemmung. Diese Eigenschaften sind für genetische Tauopathien der FTL-D-Tau mit MAPT-Mutationen charakteristisch.

In der vorliegenden Studie wurde mit dem OWT bei keinem der Tau-Genotypen (hWT, R406W) weder in der Wasser- noch in der Saft-Kohorte eine beeinträchtigte Gedächtnisleistung festgestellt. Bei älteren R406W-Tau-transgenen Mäusen (16–23 Monate, 2N4R-Isoform, Promotor Alpha-Calmodulin-Kinase) und bei anderen Tau-transgenen Mausmodellen (z. B. P301L) wurden hingegen mittels MWM bzw. Angst-Konditionierungstest Gedächtnisdefizite nachgewiesen (Tatebayashi et al., 2002; Pennanen et al., 2004). Die verwendeten Tests sind alle an die Funktionalität des Hippocampus gebunden, prüfen aber unterschiedliche Gedächtnisfunktionen, der OWT das deklarative Gedächtnis (Erinnerung an Objekte und Gesichter), der MWM das spatiale Gedächtnis (räumliches Gedächtnis, Ortsgedächtnis) (Hammond et al., 2004) und der Angst-Konditionierungstest das kontextuale Gedächtnis (Anagnostaras et al., 2001). Letzterer ist zusätzlich an die Funktion der Amygdala gebunden (Adhikari et al., 2015). Ein Vergleich der Befunde der Gedächtnistests ist daher nur eingeschränkt möglich. Allerdings kann der Verlust der Habituation im OFT, OWT und SIT beim R406W-Genotyp als Hinweis auf eine Störung des Lernverhaltens bzw. des Gedächtnisses gewertet werden (Rockenstein et al., 2015). Nicht auszuschließen ist, dass bei den untersuchten R406W-Mäusen im höheren Alter eine Abnahme der Gedächtnisfunktion entsprechend der Symptomatik genetischer Tauopathien (FTLD-Tau mit MAPT-Mutationen) eingetreten wäre. Weiter wären bei einer längeren Exposition gegenüber Saft aus *A. muricata* Störungen des Gedächtnisses entsprechend der dementiellen Entwicklung der atypischen Parkinson-Syndrome von Guadeloupe möglich.

Im Vergleich zum Angst-Konditionierungstest ist die mit dem OFT erfasste *Thigmotaxis* eine allgemeinere Methode zur Messung des angstbezogenen Verhaltens. Bei allen Genotypen der Saft-Kohorte trat im Verlauf der Testreihe eine erhöhte *Thigmotaxis* (kürzere Aufenthaltszeit in der zentralen Zone) auf. Bei den nTg- und hWT-Tieren der Saft-Kohorte nahm die in der zentralen Zone verbrachte Zeit im Untersuchungsverlauf um mehr als 50 % ab, bei den R406W-Tieren dagegen nur um ca. 30 %. Die Abnahme der in der zentralen Zone verbrachten Zeit entspricht einer Zunahme des ängstlichen Verhaltens (Simon et al., 1994; Schwarting et al., 1993; Prut und Belzung, 2003, Lipkind et al., 2004).

Im FST nahm in der Saft-Kohorte mit zunehmendem Alter der Anteil an aktiver Zeit ab bzw. der Anteil an passiver Zeit zu, was als Zunahme eines depressiven Verhaltens interpretiert werden kann. Bei den transgenen Tieren der Wasser-Kohorte fanden sich keine Hinweise auf ein depressives Verhalten. Somit schien im untersuchten Alterszeitraum weder die Überexpression des hWT-Tau noch des R406W-Tau einen negativen Einfluss auf das affektive Verhalten der Tiere zu haben. Ältere R406W-Mäuse (12–14 Monate, 2N4R-Isoform, Promotor CaMKII) wiesen hingegen im FST einen erhöhten Anteil an passiver Zeit im Vergleich zu nTg-Kontrolltieren und somit ein verstärktes depressives Verhalten auf (Egashira et al., 2005). Es ist nicht auszuschließen, dass auch die Tau-transgenen Mäuse der Wasser-Kohorte der vorliegenden Analyse im höheren Alter eine Zunahme der passiven Zeit im FST im Sinne einer depressiven Verhaltensweise gezeigt hätten.

Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen zeigten auch mit dem pflanzlichen Komplex-I-Inhibitor Rotenone behandelte Ratten (Madiha and Haider, 2019) und mit dem synthetischen Komplex I-Inhibitor MPTP behandelte Nagetiere (Barbiero et al., 2014; Cunha et al., 2017; Amin et al., 2018, Schamne et al., 2018) im FST ein depressives Verhalten. Weiter wurde eine mit diesem Befund korrelierende verstärkte Tau-Expression gezeigt (Amin et al., 2018).

In den Verhaltenstests der vorliegenden Studie zeigten die mit Saft aus *A. muricata* behandelten Tau-transgenen Tiere Anzeichen für eine Interaktion des Transgens mit dem Toxin Annonacin. Beispielsweise wiesen R406W-Tiere der Saft-Kohorte ein vermindertes Aufrichtverhalten trotz erhöhter lokomotorischer Aktivität und hWT-Tiere der Saft-Kohorte eine geringere Strecke und Geschwindigkeit jeweils im Vergleich zu den mit Wasser behandelten Tieren desselben Genotyps auf. Diese Veränderungen des Verhaltens weisen auf mögliche Interaktionen zwischen der genetischen Veranlagung und der Exposition gegenüber Umwelttoxinen bei der Entwicklung von Tauopathien hin.

Die gemeinsamen pathomechanistischen Schnittstellen für genetische (Tau-Mutationen) und umweltbedingte (Exposition zu Annonacin) Tauopathien scheinen einerseits die Störungen der Mitochondrienfunktion und andererseits die Beeinträchtigung des axonalen Transports zu sein. Bei Überexpression der P301L-Mutation wurde *in vitro* ein Defizit des Komplex-I der mitochondrialen Atmungskette mit reduzierten ATP-Spiegeln, einer verstärkten Empfindlichkeit gegen oxidativen Stress und eine Störung der Morphologie und Dynamik der Mitochondrien nachgewiesen (Schulz et al., 2012); ähnliche Befunde wurden auch bei einer Intoxikation mit Annonacin detektiert (Escobar-Khondiker et al., 2007). Weiter führte eine Behandlung mit Annonacin *in vitro* zu einer Tau- und Mitochondrien-Umverteilung von den Axonen zu somatodendritischen Kompartimenten (Escobar-Khondiker et al., 2007). Die erhöhte Expression von Tau führte in Zellkulturen zu einer Störung des anterograden axonalen Transports von Vesikeln und intrazellulären Organellen (z. B. Mitochondrien) und dadurch zu einer relativen Zunahme des retrograden Transports in den Axonen (Stamer et al., 2002). Da sich die Auswirkungen genetischer und umweltbedingter Faktoren ähneln, führt auf neurophysiologischer Ebene deren Interaktion zu verstärkten pathologischen Verhaltensmerkmalen.

Korrelierend hierzu fanden sich in der histologischen Aufarbeitung der in der vorliegenden Studie untersuchten Tiere der Saft-Kohorte indirekte Zeichen eines defekten Energiemetabolismus durch Nachweis von Immunreaktivität für 3NT (Rottscholl et al., 2016). Weiterhin ergaben sich durch die Reduktion der Synaptophysin-Immunreaktivität Hinweise auf eine Abnahme der synaptischen Dichte, welche Folge eines gestörten axonalen Transports sein kann (Rottscholl et al., 2016). Ein für die unphysiologischen Verhaltensänderungen ursächlicher Verlust an Neuronen oder Gliazellen wurde jedoch bei den untersuchten Tieren der Saft-Kohorte histopathologisch nicht beobachtet (Rottscholl et al., 2016). In Zusammenschau beruhen die oben beschriebenen Verhaltensauffälligkeiten der untersuchten Mäuse möglicherweise auf einer Änderung der Mitochondrien- und Synapsenfunktion sowie des axonalen Transportes.

Die vorliegende Analyse bestätigt die bereits mehrfach in *in vitro* bzw. *in vivo* Versuchen beschriebene Neurotoxizität von in Pflanzen der *Annonaceae*-Familie enthaltenen Alkaloiden (Lannuzel et al., 2002, 2003; Nagatsu, 2002) und insbesondere von Annonacin (Lannuzel et al., 2002, 2003; Champy et al., 2004, Escobar-Khondiker et al., 2007, Höllerhage et al., 2009, Yamada et al., 2014, Rottscholl et al., 2016; Salama et al., 2019). Aufgrund der Datenlage inklusive der vorliegenden Studie sollte von dem Verzehr von Produkten aus *Annonaceae* (hauptsächlich aus *A. muricata*) vor allem in Bevölkerungsgruppen mit traditionell erhöhtem Konsum abgeraten werden.

Da bisher alle klinischen Ansätze zur Behandlung der Amyloid-Pathologie scheiterten, rücken Tau-gerichtete Therapien der AD zunehmend in den Fokus der Wissenschaft (Jadhav et al., 2019). Tau-gerichtete Therapien besitzen das Potenzial, die Abnahme kognitiver Funktionen auch in präklinischen Alzheimer-Stadien (MCI) abzumildern bzw. den Verlauf der Erkrankung zu verbessern, da die Tau-Pathologie (Lokalisation und Menge der Tau-Aggregate) im Gegensatz zur Amyloid-Pathologie sowohl mit dem Ausmaß des neuronalen Zellverlustes als auch mit den kognitiven Funktionseinschränkungen korreliert (Nelson et al., 2012). Zudem sind Tau-gerichtete Interventionen mögliche therapeutische Ansätze bei anderen Tau-assoziierten Erkrankungen, z. B. den atypischen Parkinson-Syndromen PSP, CBD und weiteren Formen der FTLD-Tau.

Als therapeutisches Ziel kommen verschiedene Ebenen der Tau-Pathophysiologie in Frage oder sind bereits in klinischer Erprobung (Jadhav et al., 2019). Hierzu gehören Inhibitoren der Tau-Phosphorylierung (Kinase-Inhibitoren), Inhibitoren der Tau-Aggregation (Aggregationshemmer) sowie Mikrotubuli-Stabilisatoren. Weiter werden Anti-Tau-Antikörper (passive Anti-Tau-Immuntherapie), die gegen das vorwiegend extrazelluläre neurotoxische Tau und gegen dessen Prionen-artige Ausbreitung gerichtet sind, sowie diverse Modelle einer aktiven Immunisierung gegen Tau-Aggregate entwickelt. Antisense-Oligonukleotide (ASOs) erscheinen ebenfalls als vielversprechende Option, indem sie in die Translation von Tau auf prä-mRNA oder mRNA-Ebene eingreifen und so die Menge an neu synthetisiertem Tau-Protein vermindern. Effektive Therapien auf der Basis von ASOs existieren bereits für Formen der spinalen Muskelatrophie und der Muskeldystrophie Typ Duchenne und werden bei der neurodegenerativen Huntington-Erkrankung erprobt (Jadhav et al., 2019).

In diesem Kontext sind Tau-transgene Mausmodelle von großer Bedeutung, da sie den funktionellen Einfluss der Tau-gerichteten Therapien auf die Tau-induzierte Neurodegeneration darstellen und die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Anti-Tau-Therapien *in vivo* prüfen können. Verhaltensanalysen von Tau-transgenen Mäusen sind in der Lage die Effekte solcher Therapien auf spezifische klinische Aspekte der Tauopathie-assoziierten Erkrankungen aufzuzeigen. Mit dem OWT und MWM ließen sich Funktionsverbesserungen des deklarativen bzw. räumlichen Gedächtnisses insbesondere bei Mausmodellen der AD dokumentieren. Mittels ROD-Test könnte eine mögliche Abnahme der motorischen Defizite vor allem bei Mausmodellen der o.g. atypischen Parkinson-Syndrome und Formen der FTLD-Tau mit MAPT-Mutationen mit dominantem Parkinsonoid nachgewiesen werden. Im SIT

und OFT ließe sich die potenzielle Regredienz von FTD-typischen Verhaltensauffälligkeiten (psychomotorische Disinhibition, frontale Enthemmung, sozialer Rückzug, Ängstlichkeit) veranschaulichen. Über den FST könnte im Mausmodell eine Abnahme der bei der AD (Lyketsos et al., 2011) und bei FTD-Formen häufig anzutreffenden Depressivität (Chakrabarty et al., 2015) aufgezeigt werden.

5 Zusammenfassung

Tauopathien sind eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch pathologische Veränderungen des Tau-Proteins im Sinne einer Dysfunktion und Akkumulation charakterisiert sind. Tau spielt als Mikrotubuli-assoziiertes Protein im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle bei dem Erhalt der Zellform und der Zellstruktur, beim axonalen Transport von intrazellulären Komponenten sowie beim Wachstum und bei der Stabilisierung von Axonen während der Entwicklung der Neurone.

Sowohl Mutationen als auch Umweltfaktoren können eine pathologische Veränderung des Tau-Proteins hervorrufen. Eine Reihe von Punktmutationen im Tau-Gen ist mit einer Frontotemporalen Lobärdegeneration mit Tau-Ablagerungen assoziiert. Das in Pflanzen der *Annonaceae*-Familie enthaltene Neurotoxin Annonacin ist ein potenter Komplex-I-Inhibitor der Atmungskette der Mitochondrien und gilt als Ursache für die zu den Tauopathien zählenden atypischen Parkinson-Syndrome auf Guadeloupe. Eine Interaktion zwischen genetischen und Umweltfaktoren bei pathologischen Veränderungen des Tau-Proteins wurde im Vorfeld der vorliegenden Studie über eine parenterale Annonacin-Infusion in transgene Mäuse mit mutiertem humanen Tau-Gen mit der Punktmutation R406W, welche den Austausch einer Aminosäure Arginin gegen Tryptophan bewirkt, nachgewiesen. Die kurzfristige Exposition gegenüber Annonacin verstärkte die Dysfunktion und Akkumulation des Tau-Proteins bei den transgenen Mäusen *in vivo*.

Ziel dieser Arbeit war es, langfristige Effekte beider Faktoren unter physiologischen Bedingungen durch eine enterale Gabe von Fruchtsaft aus *Annona (A.) muricata*, einem Hauptvertreter der *Annonaceae*-Pflanzenfamilie, im Mausmodell zu analysieren. Hierzu wurden die Verhaltenscharakteristika zweier transgener Mauslinien, die humanes Wildtyp-Tau (hWT) oder humanes R406W-Tau exprimierten, und einer nicht-transgenen Kontrollgruppe (nTg) während einer Intoxikation mit Fruchtsaft von *A. muricata* ein Jahr lang untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den Resultaten einer Verhaltensanalyse genetisch identischer Mauslinien ohne Verabreichung von Saft aus *A. muricata* verglichen. Die Verhaltenstests sollten Aufschluss darüber geben, ob die Mausmodelle phänotypische Merkmale einer genetisch bedingten Tauopathie (z. B. Frontotemporale Lobärdegeneration mit Tau-Ablagerungen assoziiert mit Tau-Mutationen) aufweisen. Weiter sollte geklärt werden, ob nicht-transgene Mäuse durch die Verabreichung von Saft aus *A. muricata* klinische Charakteristika der atypischen Parkinson-Syndrome von Guadeloupe entwickeln. Zudem wurde untersucht, ob die Umweltexposition mit dem Saft aus *A. muricata* die Verhaltensmerkmale von Tau-transgenen Mäusen verstärkt. Die Verhaltensmerkmale der Versuchstiere wurden mit Hilfe von jeweils fünf Verhaltenstests zu fünf Zeitpunkten geprüft. Der Rotarod-Test (ROD) untersuchte motorische Funktionen und die Koordination. Der Offenfeld-Test (OFT) analysierte die lokomotorische Aktivität sowie das ex-

ploratorische Verhalten und detektierte potenzielle ängstliche Verhaltensweisen. Der Objektwiedererkennungstest (OWT) prüfte das deklarative Gedächtnis. Mittels dem Sozialen-Interaktionstest (SIT) ließ sich eine Enthemmung des sozialen Verhaltens oder ein sozialer Rückzug identifizieren. Der Forcierte-Schwimm-Test (FST) deckte eine mögliche depressive Verhaltensweise der Versuchstiere auf.

Die in den Verhaltenstests nachweisbare erhöhte lokomotorische Aktivität und das verstärkte explorative Verhalten der transgenen R406W-Mäuse entspricht den psychopathologischen Merkmalen einer genetischen Tauopathie im Sinne einer psychomotorischen Disinhibition oder frontalen Enthemmung. Die mit der Dauer der Behandlung mit Saft aus *A. muricata* zunehmende Veränderung des affektiven und angstbezogenen Verhaltens der Mäuse (verstärktes depressives Verhalten, verstärkte Ängstlichkeit) werden auch bei den atypischen Parkinson-Syndromen von Guadeloupe, die mit dem Verzehr von *A. muricata* Produkten in Verbindung gebracht werden, beobachtet. Einschränkungen des deklarativen Gedächtnisses traten bei den Mäusen im untersuchten Zeitraum nicht auf. Der Verlust der Habituation des R406W-Genotyps hinsichtlich der lokomotorischen Aktivität deutet aber möglicherweise auf eine Störung des Lernverhaltens und auf diskrete Gedächtnisdefizite hin. Motorische Einschränkungen traten bei keinem Genotyp in keinem Behandlungsarm auf, möglicherweise aufgrund des auf 12 Monate begrenzten Beobachtungszeitraumes. In der Literatur wurden solche Defizite in dem auch in der vorliegenden Studie verwendeten R406W-Mausmodell (gleiche Tau-Isoform, gleicher Promotor) erst in einem höheren Alter der Versuchstiere nachgewiesen.

In verschiedenen Tests zeigten die Tau-transgenen Tiere unter Behandlung mit Saft aus *A. muricata* verstärkte pathologische Verhaltensmerkmale, was auf eine Interaktion der genetischen Prädisposition und des Umwelteinflusses hindeutet. Beispielweise wiesen die mit Saft aus *A. muricata* behandelten transgenen R406W-Tiere ein vermindertes Aufrichtverhalten trotz erhöhter lokomotorischer Aktivität auf und hWT-Tiere legten im OFT eine geringere Strecke mit geringerer Geschwindigkeit zurück als die mit Wasser behandelten Tiere desselben Genotyps. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Befunde früherer *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen. Aufgrund der toxischen Effekte von Annonacin auf das zentrale Nervensystem sollte von dem Konsum von Früchten und Saft aus *A. muricata* abgeraten werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass Fehlfunktionen und pathologische Ablagerungen des Tau-Proteins bei der neurodegenerativen Alzheimer-Erkrankung eine wesentliche Rolle spielen, sind auf das Tau-Protein abzielende Therapien vor allem nach Versagen diverser Therapieansätze gegen Beta-Amyloid von enormem wissenschaftlichen Interesse. In diesem Kontext können Mausmodelle Zusammenhänge zwischen dem Tau-vermittelten pathologischen Geschehen und einer Neurodegeneration *in vivo* aufzeigen. Therapieansätze, die auf pathologische Veränderungen durch das Tau-Protein ausgerichtet sind, lassen sich in Tau-transgenen Mausmodellen mittels Verhaltensanalyse auf Wirksamkeit und Verträglichkeit prüfen.

6 Summary

Tauopathies are a group of neurodegenerative diseases characterized by pathological changes in the Tau protein in the sense of dysfunction and accumulation. As a microtubule-associated protein in the central nervous system, Tau plays an important role in the maintenance of cell shape and structure, axonal transport of intracellular components, and growth and stabilization of axons during neuronal development.

Both mutations and environmental factors can cause a pathological change in the Tau protein. A number of point mutations in the Tau gene are associated with frontotemporal lobar degeneration with Tau deposits. The neurotoxin annonacin contained in plants of the *Annonaceae* family is a potent complex-I inhibitor of the respiratory chain of the mitochondria and is considered to be the cause of the atypical Parkinson's syndromes in Guadeloupe, which are classified as tauopathies. An interaction between genetic and environmental factors in pathological alterations of the Tau protein was demonstrated in advance of the present study by a parenteral annonacin infusion into transgenic mice with mutated human Tau gene with the point mutation R406W, which causes the exchange of an amino acid arginine for tryptophan. The short-term exposure to annonacin increased the dysfunction and accumulation of the Tau protein in the transgenic mice *in vivo*.

The aim of this work was to analyze the long-term effects of both factors under physiological conditions by enteral administration of fruit juice from *Annona (A.) muricata*, a major representative of the *Annonaceae* plant family, in a mouse model. To this end, the behavioral characteristics of two transgenic mouse lines expressing human Wild-type Tau (hWT) or human R406W Tau and a non-transgenic control group (nTg) were investigated during intoxication with fruit juice from *A. muricata* for one year. The results were compared with the results of a behavioral analysis of genetically identical mouse lines without the administration of juice from *A. muricata*. The behavioral tests should provide information on whether the mouse models show phenotypic characteristics of a genetically determined tauopathy (e.g. Frontotemporal lobar degeneration with Tau deposits associated with Tau mutations). Further, it should be clarified whether non-transgenic mice develop clinical characteristics of atypical Parkinson's syndromes of Guadeloupe by the administration of juice from *A. muricata*. In addition, it was investigated whether environmental exposure to the juice from *A. muricata* enhances the behavioral traits of Tau-transgenic mice.

The behavioral traits of the test animals were examined by means of five behavioral tests at five points in time. The Rotarod Test (ROD) examined motor functions and coordination. The Open Field Test (OFT) analyzed locomotor activity and exploratory behavior and detected potential anxious behavior. The Object Recognition Test (ORT) tested the declarative memory. The Social Interaction Test (SIT) was used to identify the disinhibition of social behavior or social withdrawal. The Forced Swimming Test (FST) revealed a possible depressive behavior of the test animals.

The increased locomotor activity and exploratory behavior of the transgenic R406W mice demonstrated in the behavioral tests corresponds to the psychopathological characteristics of a genetic tauopathy in terms of psychomotor disinhibition or loss of frontal inhibition. The increasing change in affective and anxiety-related behavior of the mice with the duration of treatment with juice from *A. muricata* (increased depressive behavior, increased anxiety) are also observed in the atypical Parkinson's syndrome of Guadeloupe, which is associated with the consumption of *A. muricata* products. Limitations of declarative memory did not occur in the mice during the investigated period. However, the loss of the habituation of the R406W genotype with regard to locomotor activity may indicate a disruption of learning behavior and discrete memory deficits. Motor impairment did not occur in any genotype in any treatment arm, possibly due to the limited observation period of 12 months. In the literature, such deficits in the R406W mouse model used in the present study (same Tau isoform, same promoter) were only detected at an older age of the test animals.

In various tests, the Tau-transgenic animals showed enhanced pathological behavioral traits when treated with juice from *A. muricata*, suggesting an interaction of genetic predisposition and environmental influence. For example, the transgenic R406W animals treated with juice from *A. muricata* showed reduced erection behavior despite the increased locomotor activity, and hWT animals covered in the OFT a shorter distance at a slower speed than water-treated animals of the same genotype.

The results of this work confirm the findings of earlier *in vitro* and *in vivo* studies. Due to the toxic effects of annonacin on the central nervous system, the consumption of fruits and juice from *A. muricata* should be avoided.

Considering that malfunctions and pathological deposits of the Tau protein play a major role in neurodegenerative Alzheimer's disease, therapies targeting the Tau protein are of considerable scientific interest, especially after the failure of various therapeutic approaches against beta-amyloid. In this context, mouse models can show correlations between the Tau-mediated pathological event and neurodegeneration *in vivo*. Therapeutic approaches, which focus on pathological changes caused by the Tau protein, can be tested for effectiveness and tolerability in Tau-transgenic mouse models using behavioral analysis.

7 Literaturverzeichnis

- Adhikari A, Lerner TN, Finkelstein J, Pak S, Jennings JH, Davidson TJ (2015) Basomedial amygdala mediates top-down control of anxiety and fear. *Nature* 527 179–185.
- Aggleton JP (1985) One-trial object recognition by rats. *Q J Exp Psychol.* 37:279-94.
- Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod.* 62:504-40.
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M. (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.* 22:9340-51.
- Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med.* 2:783-7.
- Alonso AC, Mederlyova A, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2004) Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem.* 279:34873-81.
- Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:5562-6.
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych Gerichl Med.* 64:146-8.
- Amin SN, Hassan SS, Rashed LA (2018) Effects of chronic aspartame consumption on MPTP-induced Parkinsonism in male and female mice. *Arch Physiol Biochem.* 124:292-9.
- Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P (2005) Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci.* 25:5446-54.
- Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11 8–17.
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P (2003) Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem.* 86:582-90.
- Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS (1995) Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res.* 23:3585-93.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry.* 31:10626-33.
- Angibaud G, Gaultier C, Rascol O (2004) Atypical parkinsonism and Annonaceae consumption in New Caledonia. *Mov Disord.* 19:603-4.
- Arendash GW, Lewis J, Leighty RE, McGowan E, Cracchiolo JR, Hutton M, Garcia MF (2004) Multi-metric behavioral comparison of APP^{sw} and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain Res.* 1012:29-41.
- Arrasate M, Pérez M, Armas-Portela R, Avila J (1999) Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations. *FEBS Lett.* 446:199-202.
- Arriagada PV, Marzloff K, Hyman BT (1992) Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 42:1681-8.
- Arsenault D, Dal-Pan A, Tremblay C, Bennett DA, Guitton MJ, De Koninck Y, Tonegawa S, Calon F (2013) PAK inactivation impairs social recognition in 3xTg-AD Mice without increasing brain deposition of tau and A β . *J Neurosci.* 33:10729-40.

- Bahia VS, Takada LT, Deramecourt V (2013) Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration: a review. *Dement Neuropsychol.* 7:19-26.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick AD, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey CA, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M (2006) Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature.* 442:916-9.
- Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, Seitelberger F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wisniewski HM (1989) Accumulation of abnormally phosphorylated tau precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 477:90-9.
- Barbiero JK, Santiago R, Tonin FS, Boschen S, da Silva LM, Werner MF, da Cunha C, Lima MM, Vital MA (2014) PPAR-alpha agonist fenofibrate protects against the damaging effects of MPTP in a rat model of Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 53:35-44.
- Barghorn S, Zheng-Fischhöfer Q, Ackmann M, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E (2000) Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry.* 39:11714-21.
- Belzung C (1999) Measuring exploratory behavior. in Crusio W, Gerlai Re (eds): *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research.* Amsterdam: Elsevier, 739-749.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-63
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 101:1371-8.
- Bird TD, Wijsman EM, Nochlin D, Leehey M, Sumi SM, Payami H, Poorkaj P, Nemens E, Rafkind M, Schellenberg GD (1997) Chromosome 17 and hereditary dementia: linkage studies in three non- Alzheimer families and kindreds with late-onset FAD. *Neurology.* 48:949-54.
- Bird TD, Nochlin D, Poorkaj P, Cherrier M, Kaye J, Payami H, Peskind E, Lampe TH, Nemens E, Boyer PJ, Schellenberg GD (1999) A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain-* 122:741-56.
- Biundo F, Del Prete D, Zhang H, Arancio O, D'Adamio L (2018) A role for tau in learning, memory and synaptic plasticity. *Sci Rep.* 8:3184.
- Blennow K, Wallin A, Agren H, Spenger C, Siegfried J, Vanmechelen E (1995) Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol Chem Neuropathol.* 26:231-45.
- Blennow K, Zetterberg H (2018) Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J Intern Med.* 284:643-63.
- Boekhoorn K, Terwel D, Biemans B, Borghgraef P, Wiegert O, Ramakers GJ, de Vos K, Krugers H, Tomiyama T, Mori H, Joels M, van Leuven F, Lucassen PJ (2006) Improved long-term potentiation and memory in young tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy. *J Neurosci.* 26:3514-23.
- Bodea LG, Eckert A, Ittner LM, Piguet O, Götz J (2016) Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration. *J Neurochem.* 138 Suppl 1(Suppl Suppl 1):71-94.
- Bordet T, Lesbordes J, Rouhani S, Castelnau-Ptakhine L, Schmalbruch H, Haase G, Kahn A (2001) Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene. *Hum Mol Genet.* 10:1925-33.
- Borta A, Schwarting R (2005) Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiol Behav.* 84:87-396.

- Bozeat S, Gregory CA, Ralph MA, Hodges JR (2000) Which neuropsychiatric and behavioural features distinguish frontal and temporal variants of frontotemporal dementia from Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 69:178-86.
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*. 112:389-404.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82:239-59.
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron*. 10:1089-99.
- Brandt J, Leger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol*. 131:1327-40.
- Brion JP, Tremp G, Octave JN (1999) Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 154:255-70.
- Brion, J., Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J (1985) Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol (Brux)*. 95:229-35.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE (2004) Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:14515-20.
- Bronikowski AM, Carter PA, Swallow JG, Girard IA, Rhodes JS, Garland T (2001) Open-field behavior of house mice selectively bred for high voluntary wheel-running. *Behav Genet*. 31:309-16.
- Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol*. 115:717-30.
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ, White CL 3rd, Schneider JA, Grinberg LT, Halliday G, Duyckaerts C, Lowe JS, Holm IE, Tolnay M, Okamoto K, Yokoo H, Murayama S, Woulfe J, Munoz DG, Dickson DW, Ince PG, Trojanowski JQ, Mann DM (2007) Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol*. 114:5-22.
- Calne DB, Snow BJ, Lee C (1992) Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 32 Suppl:S125-7.
- Caparros-Lefebvre D, Elbaz A (1999) Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *Caribbean Parkinsonism Study Group. Lancet*. 354:281-6.
- Caparros-Lefebvre D, Sergeant N, Lees A, Camuzat A, Daniel S, Lannuzel A, Brice A, Tolosa E, Delacourte A, Duyckaerts C (2002) Guadeloupean parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. *Brain*. 125:801-11.
- Caparros-Lefebvre D (2004) Atypical parkinsonism in New Caledonia: comparison with Guadeloupe and association with Annonaceae consumption. *Mov Disord*. 19:604.
- Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA (1984) Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie*. 66:305-11.
- Cavé A, Figadère B, Laurens A, Cortes D (1997) Acetogenins from Annonaceae. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Hertz W, Kirby GW, More RE, Steglich W, Tamm C (Eds.) Wien New York: Springer, 81-288.

- Chakrabarty T, Sepehry A, A, Jacova C, Hsiung G, -Y, R: The Prevalence of Depressive Symptoms in Frontotemporal Dementia: A Meta-Analysis (2015) *Dement Geriatr Cogn Disord*. 39:257-271.
- Champy P, Höglinger GU, Feger J, Gleye C, Hocquemiller R, Laurens A, Guerineau V, Laprevote O, Medja F, Lombes A, Michel PP, Lannuzel A, Hirsch EC, Ruberg M (2004) Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J Neurochem*. 88:63-9.
- Champy P, Melot A, Guerineau Eng V, Gleye C, Fall D, Höglinger GU, Ruberg M, Lannuzel A, Laprevote O, Laurens A, Hocquemiller R (2005) Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. *Mov Disord*. 20:1629-33.
- Chaudhuri KR, Hu MT, Brooks DJ (2000) Atypical parkinsonism in Afro-Caribbean and Indian origin immigrants to the UK. *Mov Disord*. 15:18-23.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 360:674-7.
- Clark LN, Poorkaj P, Wszolek Z, Geschwind D H, Nasreddine ZS, Miller B, Li D, Payami H, Awert F, Markopoulou K, Andreadis A, D'Souza I, Lee VM, Reed L, Trojanowski JQ, Zhukareva V, Bird T, Schellenberg G, Wilhelmsen KC (1998) Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:13103-7.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol*. 116:227-47.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b.) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol*. 116:207-25.
- Cook C, Dunmore JH, Murray ME, Scheffel K, Shukoor N, Tong J, Castanedes-Casey M, Phillips V, Rousseau L, Penuliar MS, Kurti A, Dickson DW, Petrucelli L, Fryer JD (2014) Severe amygdala dysfunction in a MAPT transgenic mouse model of frontotemporal dementia. *Neurobiol Aging*. 35:1769-77.
- Cools AR, Gingras MA (1998) Nijmegen high and low responders to novelty: a new tool in the search after the neurobiology of drug abuse liability. *Pharmacol Biochem Behav*. 60:151-9.
- Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, Abisambra JF, Abner EL, Alafuzoff I, Arnold SE, Attems J, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, Gearing M, Grinberg LT, Hof PR, Hyman BT, Jellinger K, Jicha GA, Kovacs GG, Knopman DS, Kofler J, Kukull WA, Mackenzie IR, Masliah E, McKee A, Montine TJ, Murray ME, Neltner JH, Santa-Maria I, Seeley WW, Serrano-Pozo A, Shelanski ML, Stein T, Takao M, Thal DR, Toledo JB, Troncoso JC, Vonsattel JP, White CL 3rd, Wisniewski T, Woltjer RL, Yamada M, Nelson PT (2014) Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol*. 128:755-66.
- Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghe R, Dermaut B, Martin JJ, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, De Pooter T, Mattheijssens M, Van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, De Deyn PP, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C (2006) Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature*. 442:920-4.
- Cunha MP, Pazini FL, Lieberknecht V, Budni J, Oliveira Á, Rosa JM, Mancini G, Mazzardo L, Colla AR, Leite MC, Santos ARS, Martins DF, de Bem AF, Goncalves CAS, Farina M, Rodrigues ALS (2017) MPP(+)-lesioned mice: an experimental model of motor, emotional, memory/learning, and striatal neurochemical dysfunctions. *Mol Neurobiol*. 54:6356-77.
- D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD, Schellenberg GD (1999) Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome

- 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:5598-603.
- de Bruin JP, van Oyen HG, Van de Poll N (1983) Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats. *Behav Brain Res*. 10:209-32.
- De Cock VC, Lannuzel A, Verhaeghe S, Roze E, Ruberg M, Derenne JP, Willer JC, Vidailhet M, Arnulf I (2007) REM sleep behavior disorder in patients with guadeloupean parkinsonism, a tauopathy. *Sleep*. 30:1026-32.
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA (1997) Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 62:10-5.
- Degli Esposti M (1998) Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta*. 1364:222-35.
- Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*. 31:673-704.
- Deters N, Ittner LM, Götz J (2009) Substrate-specific reduction of PP2A activity exaggerates tau pathology. *Biochem Biophys Res Commun*. 379:400-5.
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*. 319:1086-9.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*. 3:1141-54.
- Duff K, Knight H, Refolo LM, Sanders S, Yu X, Picciano M, Malester B, Hutton M, Adamson J, Goedert M, Burki K, Davies P (2000) Characterization of pathology in transgenic mice overexpressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis*. 7:87-98
- Egashira N, Iwasaki K, Takashima A, Watanabe T, Kawabe H, Matsuda T, Mishima K, Chidori S, Nishimura R, Fujiwara M (2005) Altered depression-related behavior and neurochemical changes in serotonergic neurons in mutant R406W human tau transgenic mice. *Brain Res*. 1059:7-12.
- Egashira N, Tanoue A, Higashihara F, Mishima K, Fukue Y, Takano Y, Tsujimoto G, Iwasaki K, Fujiwara M (2004) V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci Lett*. 356:195-8.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31:47-59.
- Escobar-Khondiker M, Höllerhage M, Muriel M, Champy P, Bach A, Depienne C, Respondek G, Yamada ES, Lannuzel A, Yagi T, Hirsch EC, Oertel WH, Jacob R, Michel PP, Ruberg M, Höglinger GU (2007) Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J Neurosci*. 27:7827-37.
- Esmaeli-Azad B, McCarty JH, Feinstein SC (1994) Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J Cell Sci*. 107: 869-79.
- File SE, Hyde JR (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol*. 62:19-24.
- File SE, Seth P (2003) A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 463:35-53.
- Flaisher-Grinberg S, Einat H (2010) Strain-specific battery of tests for domains of mania: effects of valproate, lithium and imipramine. *Front Psychiatry*. 1:10.

- Forrest SL, Kril JJ, Stevens CH, Kwok JB, Hallupp M, Kim WS, Huang Y, McGinley CV, Werka H, Kiernan MC, Götz J, Spillantini MG, Hodges JR, Ittner LM, Halliday GM (2018) Retiring the term FTDP-17 as MAPT mutations are genetic forms of sporadic frontotemporal tauopathies. *Brain*. 141:521-34.
- Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA, Jones MZ, D'Amato CJ, Gilman S (1997) Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Ann Neurol*. 41:706-15.
- Frank S, Clavaguera F, Tolnay M (2008) Tauopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 115:39-53.
- Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT (2018) Tau in neurodegenerative disease. *Ann Transl Med*.6(10):175
- Garabadu D, Agrawal N (2020) Naringin Exhibits Neuroprotection Against Rotenone-Induced Neurotoxicity in Experimental Rodents. *Neuromolecular Med*. doi: 10.1007/s12017-019-08590-2
- Gauthier-Kemper A, Weissmann C, Golovyashkina N, Sebö-Lemke Z, Drewes G, Gerke V, Heinisch JJ, Brandt R (2011) The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *J Cell Biol*. 192:647-61.
- Ghetti B, Oblak AL, Boeve BF, Johnson KA, Dickerson BC, Goedert M (2015) Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 41:24-46.
- Gilley J, Seereeram A, Ando K, Mosely S, Andrews S, Kerschensteiner M, Misgeld T, Brion JP, Anderton B, Hanger DP, Coleman MP (2012) Age-dependent axonal transport and locomotor changes and tau hypophosphorylation in a "P301L" tau knockin mouse. *Neurobiol Aging* 33:621.e1-5.
- Giulian D, Silverman G (1975) Solid-state animal detection system: its application to open field activity and freezing behavior. *Physiol Behav*. 14:109-12.
- Gleye C (1998) Acetogenines des racines et des graines d'*Annona muricata* L. (Annonaceae); Etude particuliere des precurseurs biogenetiques. PhD Thesis, Universite Paris XI.
- Goedert M (2004) Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 15:45-9.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA (1999) Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Lett* 450:306-11.
- Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*. 9:4225-30.
- Goedert M, Satumtira S, Jakes R, Smith MJ, Kamibayashi C, White CL 3rd, Sontag E (2000) Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations. *J Neurochem*. 75:2155-62.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-26
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*. 8:393-9.
- Goedert M, Spillantini MG (2017) Propagation of Tau aggregates. *Mol Brain*. 10:18.
- Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4051-5.

- Götz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM (2001a) Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem.* 276:529-34.
- Götz J, Götz NN (2009) Animal models for Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: a perspective. *ASN Neuro.* 1:e00019.
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R, Burki K, Goedert M (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *Embo J.* 14:1304-13.
- Götz J, Tolnay M, Barmettler R, Chen F, Probst A, Nitsch RM (2001b) Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur J Neurosci.* 13:2131-40.
- Götz J, Xia D, Leinenga G, Chew YL, Nicholas H (2013) What Renders TAU Toxic. *Front Neurol.* 4:72.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 261:6084-9.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4913-7.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Wisniewski HM (1984) Alzheimer paired helical filaments: immunochemical identification of polypeptides. *Acta Neuropathol.* 62:259-67.
- Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM (2003) Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 60:729-36.
- Guo JL, Lee VM (2014) Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med.* 20:130-8.
- Hammond RS, Tull LE, Stackman RW (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 82:26-34.
- Heutink P, Stevens M, Rizzu P, Bakker E, Kros JM, Tibben A, Niermeijer MF, van Duijn CM, Oostra BA, van Swieten JC (1997) Hereditary frontotemporal dementia is linked to chromosome 17q21-q22: a genetic and clinicopathologic study of three Dutch families. *Ann Neurol.* 41:150-9.
- Higuchi M, Ishihara T, Zhang B, Hong M, Andreadis A, Trojanowski J, Lee VM (2002) Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration. *Neuron.* 35:433-46.
- Higuchi M, Zhang B, Forman MS, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM (2005) Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies. *J Neurosci.* 25:9434-43.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW Jr (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol.* 9:1381-8.
- Hirano A, Malamud N, Kurland LT (1961) Parkinsonism-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. II. Pathological features. *Brain.* 84:662-79.
- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol.* 107:1449-59.
- Hochgräfe K, Sydow A, Matenia D, Cadinu D, Könen S, Petrova O, Pickhardt M, Goll P, Morellini F, Mandelkow E, Mandelkow EM (2015) Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau. *Acta Neuropathol Commun.* 3:25.

- Höglinger GU, Feger J, Prigent A, Michel PP, Parain K, Champy P, Ruberg M, Oertel WH, Hirsch EC (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem.* 84:491-502.
- Höglinger GU, Lannuzel A, Khondiker ME, Michel PP, Duyckaerts C, Féger J, Champy P, Prigent A, Medja F, Lombes A, Oertel WH, Ruberg M (2005a) The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J Neurochem.* 95:930-9.
- Höglinger GU, Michel PP, Champy P, Feger J, Hirsch EC, Ruberg M, Lannuzel A (2005b) Experimental evidence for a toxic etiology of tropical parkinsonism. *Mov Disord.* 20:118-9.
- Höllerhage M, Matusch A, Champy P, Lombes A, Ruberg M, Oertel WH, Höglinger GU (2009) Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies. *Exp Neurol.* 220:133-42.
- Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, Geschwind DH, Bird TD, McKeel D, Goate A, Morris JC, Wilhelmsen KC, Schellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee VM (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science.* 282:1914-7.
- Huber CM, Yee C, May T, Dhanala A, Mitchell CS (2018) Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy. *J Alzheimers Dis.* 61:265-81.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature.* 393:702-5.
- Ikeda M, Shoji M, Kawarai T, Kawarabayashi T, Matsubara E, Murakami T, Sasaki A, Tomidokoro Y, Ikarashi Y, Kuribara H, Ishiguro K, Hasegawa M, Yen SH, Chishti MA, Harigaya Y, Abe K, Okamoto K, St George-Hyslop P, Westaway D (2005) Accumulation of filamentous tau in the cerebral cortex of human tau R406W transgenic mice. *Am J Pathol.* 166:521-31.
- Ikeuchi T, Kaneko H, Miyashita A, Nozaki H, Kasuga K, Tsukie T, Tsuchiya M, Imamura T, Ishizu H, Aoki K, Ishikawa A, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M (2008) Mutational analysis in early-onset familial dementia in the Japanese population. The role of PSEN1 and MAPT R406W mutations. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 26:43-9.
- Irwin DJ (2016) Tauopathies as clinicopathological entities. *Parkinsonism Relat Disord* 22 Suppl 1:S29-33.
- Ishihara T, Higuchi M, Zhang B, Yoshiyama Y, Hong M, Trojanowski JQ, Lee VM (2001a) Attenuated neurodegenerative disease phenotype in tau transgenic mouse lacking neurofilaments. *J Neurosci.* 21:6026-35.
- Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron.* 24:751-62.
- Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VM (2001b) Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol.* 158:555-62.
- Ittner LM, Fath T, Ke YD, Bi M, van Eersel J, Li KM, Gunning P, Götz J (2008) Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:15997-6002.

- Jadhav S, Avila J, Schöll M, Kovacs GG, Kövari E, Skrabana R, Evans LD, Kontsekova E, Malawska B, de Silva R, Buee L, Zilka N (2019) A walk through tau therapeutic strategies. *Acta Neuropathol Commun.* 15;7(1):22
- Jicha GA, O'Donnell A, Weaver C, Angeletti R, Davies P (1999) Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem.* 72:214-24.
- Kadoguchi N, Okabe S, Yamamura Y, Shono M, Fukano T, Tanabe A, Yokoyama H, Kasahara J (2014) Mirtazapine has a therapeutic potency in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mice model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* 15:79.
- Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett J (2011) Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp.* 48:2473.
- Kent BA, Heath CJ, Kim CH, Ahrens R, Fraser PE, St George-Hyslop P, Bussey TJ, Saksida LM (2017) Longitudinal evaluation of Tau-P301L transgenic mice reveals no cognitive impairments at 17 months of age. *Brain Behav.* 8:e00896.
- Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1992) Brain levels of microtubule associated protein tau are elevated in Alzheimer's disease brain: a radioimmunoslot-blot assay for nanograms of the protein. *J Neurochem.* 59:750-3.
- Khatoon S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett.* 351:80-4.
- Khurana V, Lu Y, Steinhilb ML, Oldham S, Shulman JM, Feany MB (2006) TOR mediated cell-cycle activation causes neurodegeneration in a *Drosophila* tauopathy model. *Curr Biol.* 16:230-41.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197:192-3.
- Kobayashi T, Ota S, Tanaka K, Ito Y, Hasegawa M, Umeda Y, Motoi Y, Takanashi M, Yasuhara M, Anno M, Mizuno Y, Mori H (2003) A novel L266V mutation of the tau gene causes frontotemporal dementia with a unique tau pathology. *Ann Neurol.* 53:133-7.
- Koob AO, Cirillo J, Babbs CF (2006) A novel open field activity detector to determine spatial and temporal movement of laboratory animals after injury and disease. *J Neurosci Methods.* 157:330-6.
- Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993) Microtubule associated protein tau: abnormal phosphorylation of a nonpaired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 268:24374-84.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4044-8.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-97.
- Kotake Y, Okuda K, Kamizono M, Matsumoto N, Tanahashi T, Hara H, Caparros-Lefebvre D, Ohta S (2004) Detection and determination of reticuline and N-methylcoculaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 806:75-8.
- Kowall NW, Kosik KS (1987) Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 22:639-43.
- Kurtuncu M, Luka LJ, Dimitrijevic N, Uz T, Manev H (2005) Reliability assessment of an automated forced swim test device using two mouse strains. *J Neurosci Methods.* 149:26-30.

- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219:979-98.
- Lannuzel A, Hoglinger GU, Verhaeghe S, Gire L, Belson S, Escobar-Khondiker M, Poullain P, Oertel WH, Hirsch EC, Dubois B, Ruberg M (2007) Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain*. 130:816-27.
- Lannuzel A, Michel PP, Caparros-Lefebvre D, Abaul J, Hocquemiller R, Ruberg M (2002) Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov Disord*. 17:84-90.
- Lannuzel A, Michel PP, Höglinger GU, Champy P, Jousset A, Medja F, Lombes A, Darios F, Gleye C, Laurens A, Hocquemiller R, Hirsch EC, Ruberg M (2003) The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience*. 121:287-96.
- Laprévôte O, Girard C, Das BC, Laurens A, Cave A (1993) Desorption of lithium complexes of acetogenins by fast atom bombardment: application to semi-quantitative analysis of crude plant extracts. *Analysis*. 21:207-10.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Clos AL, Jackson GR, Kaye R (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener*. 6:39.
- Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik P, Mukherjee B, Mukherjee R (1980) The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry*. 21:2783-813.
- Lee EB, Porta S, Baer GM, Xu Y, Suh E, Kwong LK, Elman L, Grossman M, Lee VMY, Irwin DJ, Van Deerlin VM, Trojanowski JQ (2017) Expansion of the classification of FTLTDP: distinct pathology associated with rapidly progressive frontotemporal degeneration. *Acta Neuropathol*. 134:65-78.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 293:1487-91
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet*. 25:402-5.
- Li XH, Hui YH, Rupprecht JK, Liu YM, Wood KV, Smith DL, Chang CJ, McLaughlin JL (1990) Bullatacin, bullatacinone, and squamone, a new bioactive acetogenin, from the bark of *Annona squamosa*. *J Nat Prod*. 53:81-6.
- Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J (2001) FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci*. 18:702-14.
- Lindquist SG, Holm IE, Schwartz M, Law I, Stokholm J, Batbayli M, Waldemar G, Nielsen JE (2008) Alzheimer disease-like clinical phenotype in a family with FTDP-17 caused by a MAPT R406W mutation. *Eur J Neurol*. 215:377-85.
- Lindquist SG, Schwartz M, Batbayli M, Waldemar G, Nielsen JE (2009) Genetic testing in familial AD and FTD: mutation and phenotype spectrum in a Danish cohort. *Clin Genet*. 76:205-9.
- Lipkind D, Sakov A, Kafkafi N, Elmer GI, Benjamini Y, Golani I (2004) New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. *J Appl Physiol*. 97:347-59.
- Liu Q, Smith MA, Avila J, DeBernardis J, Kansal M, Takeda A, Zhu X, Nnomura A, Honda K, Oreira PI, liveira CR, Sntos MS, Shimohama S, Aliev G, Torre J, Ghanbari HA, Siedlak SL,

- Harris PL, Sayre LM, Perry G (2005) Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic Biol Med.* 38:746-54.
- Liu W, Miller BL, Kramer JH, Rankin K, Wyss-Coray C, Gearhart R, Phengrasamy L, Weiner M, Rosen HJ (2004) Behavioral disorders in the frontal and temporal variants of frontotemporal dementia. *Neurology.* 62:742-8.
- Llorens-Martín M, Hernández F, Avila J (2011) Expression of frontotemporal dementia with parkinsonism associated to chromosome 17 tau induces specific degeneration of the ventral dentate gyrus and depressive-like behavior in mice. *Neuroscience* 196:215-27.
- Longuefosse JL, Nossin E (1996) Medical ethnobotany survey in Martinique. *J Ethnopharmacol.* 53:117-42.
- Lyketsos CG, Carrillo MC, Ryan JM, Khachaturian AS, Trzepacz P, Amatniek J, Cedarbaum J, Brashear R, Miller DS (2011) Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 7(5):532-9.
- Lynch T, Sano M, Marder KS, Bell KL, Foster NL, Defendini RF, Sima AA, Keohane C, Nygaard TG, Fahn S (1994) Clinical characteristics of a family with chromosome 17-linked disinhibition-dementia- parkinsonism-amyotrophy complex. *Neurology.* 44:1878–84.
- Macbeth AH, Edds JS, Young WS 3rd (2009) Housing conditions and stimulus females: a robust social discrimination task for studying male rodent social recognition. *Nat Protoc.* 4:1574-81.
- Madiha, S, Haider S (2019) Curcumin restores rotenone induced depressive-like symptoms in animal model of neurotoxicity: assessment by social interaction test and sucrose preference test. *Metab Brain Dis* 34:297-308.
- Maeda S, Sato Y, Takashima A (2018) Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome-17 mutations enhance tau oligomer formation. *Neurobiol Aging.* 69:26-32.
- Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E (1996) Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci.* 777:96-106.
- Marino MJ, Williams Jr DL, O'Brien JA, Valenti O, McDonald TP, Clements MK, Wang R, DiLella AG, Hess JF, Kinney GG, Conn PJ (2003) Allosteric modulation of group III metabotropic glutamate receptor 4: a potential approach to Parkinson's disease treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13668-73.
- Montejo de Garcini E, Serrano L, Avila J (1986) Self-assembly of microtubule associated protein tau into filaments resembling those found in Alzheimer disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 141:790-6.
- Morgan D, Munireddy S, Alamed J, DeLeon J, Diamond DM, Bickford P, Hutton M, Lewis J, McGowan E, Gordon MN (2008) Apparent behavioral benefits of tau overexpression in P301L tau transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* 15:605-14.
- Moriguchi S, Yabuki Y, Fukunaga K (2012) Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. *J Neurochem.* 120:541-51
- Morris HR, Perez-Tur J, Janssen JC, Brown J, Lees AJ, Wood NW, Hardy J, Hutton M, Rossor MN (1999) Mutation in the tau exon 10 splice site region in familial frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 45:270-1.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11:47-60.
- Morris RG, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE (1990) Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: Dissociating components of allocentric spatial learning. *Eur J Neurosci.* 2:1016-28.

- Motoyama T, Yabunaka H, Miyoshi H (2002) Essential structural factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. *Bioorg Med Chem Lett.* 12:2089-92.
- Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN (2004) Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3:287-302.
- Murakami T, Paitel E, Kawarabayashi T, Ikeda M, Chishti MA, Janus C, Matsubara E, Sasaki A, Kawarai T, Phinney AL, Harigaya Y, Horne P, Egashira N, Mishima K, Hanna A, Yang J, Iwasaki K, Takahashi M, Fujiwara M, Ishiguro K, Bergeron C, Carlson GA, Abe K, Westaway D, St George-Hyslop P, Shoji M (2006) Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice: neuronal degeneration, memory disturbance, and phenotypic variation. *Am J Pathol.* 169:1365-75.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA (2004) A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:12228-31.
- Murrell JR, Koller D, Foroud T, Goedert M, Spillantini MG, Edenberg HJ, Farlow MR, Ghetti B (1997) Familial multiple-system tauopathy with presenile dementia is localized to chromosome 17. *Am J Hum Genet.* 61:1131-8.
- Murrell JR, Spillantini MG, Zolo P, Guazzelli M, Smith MJ, Hasegawa M, Redi F, Crowther RA, Pietrini P, Ghetti B, Goedert M (1999) Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits, *J Neuropathol Exp Neurol.* 58:1207-26.
- Nacharaju P, Lewis J, Easson C, Yen S, Hackett J, Hutton M, Yen SH (1999) Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett.* 447:195-9.
- Nagatsu T (2002) Amine-related neurotoxins in Parkinson's disease: past, present, and future. *Neurotoxicol Teratol.* 24:565-69.
- Nakagawa Y, Ishibashi Y, Yoshii T, Tagashira E (1995) Involvement of cholinergic systems in the deficit of place learning in Morris water maze task induced by baclofen in rats. *Brain Res.* 683:209-14.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71(5):362-81
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387:271-80.
- Nie S, Ma K, Sun M, Lee M, Tan Y, Chen G, Zhang Z, Zhang Z, Cao X (2019) 7,8-Dihydroxyflavone Protects Nigrostriatal Dopaminergic Neurons from Rotenone-Induced Neurotoxicity in Rodents. *Parkinsons Dis.* 2019:9193534.
- Niesink RJ, Van Ree JM (1982) Antidepressant drugs normalize the increased social behaviour of pairs of male rats induced by short term isolation. *Neuropharmacology.* 21:1343-8.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple- transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 39:409-21.
- Olsson A, Vanderstichele H, Andreasen N, De Meyer G, Wallin A, Holmberg B, Rosengren L, Vanmechelen E, Blennow K (2005) Simultaneous measurement of beta-amyloid (1-42), total

- tau, and phosphorylated tau (Thr181) in cerebrospinal fluid by the xMAP technology. *Clin Chem.* 51:336-45.
- Ostojic J, Elfgren C, Passant U, Nilsson K, Gustafson L, Lannfelt L, Froelich Fabre S (2004) The tau R406W mutation causes progressive presenile dementia with bitemporal atrophy. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 17:298-301.
- Palle S., Neerati P (2018) Improved neuroprotective effect of resveratrol nanoparticles as evinced by abrogation of rotenone-induced behavioral deficits and oxidative and mitochondrial dysfunctions in rat model of Parkinson's disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 391:445-53.
- Passant U, Ostojic J, Froelich Fabre S, Gustafson L, Lannfelt L, Larsson EM, Nilsson K, Rosén I, Elfgren C (2004) Familial presenile dementia with bitemporal atrophy. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 17:287-92.
- Pawlak CR, Schwarting RKW (2002) Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field. *Pharmacol Biochem Behav.* 73:679-87.
- Pennanen L, Welzl H, D Adamo P, Nitsch RM, Götz J (2004) Accelerated extinction of conditioned taste aversion in P301L tau transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 15:500-9.
- Pennanen L, Wolfer DP, Nitsch RM, Götz J (2006) Impaired spatial reference memory and increased exploratory behavior in P301L tau transgenic mice. *Genes Brain Behav.* 5:369-79
- Perez M, Lim F, Arrasate M, Avila J (2000) The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules, *J Neurochem.* 74:2583-9.
- Perry DC, Brown JA, Possin KL, Datta S, Trujillo A, Radke A, Karydas A, Kornak J, Sias AC, Rabinovici GD, Gorno-Tempini ML, Boxer AL, De May M, Rankin KP, Sturm VE, Lee SE, Matthews BR, Kao AW, Vossel KA, Tartaglia MC, Miller ZA, Seo SW, Sidhu M, Gaus SE, Nana AL, Vargas JNS, Hwang JL, Ossenkoppele R, Brown AB, Huang EJ, Coppola G, Rosen HJ, Geschwind D, Trojanowski JQ, Grinberg LT, Kramer JH, Miller BL, Seeley WW (2017) Clinicopathological correlations in behavioural variant frontotemporal dementia. *Brain.* 140:3329-45.
- Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology.* 177:245-55.
- Pillon B, Blin J, Vidailhet M, Deweer B, Sirigu A, Dubois B, Agid Y (1995) The neuropsychological pattern of corticobasal degeneration: comparison with progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Neurology.* 45:1477-83.
- Pillon B, Dubois B, Ploska A, Agid Y (1991) Severity and specificity of cognitive impairment in Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases and progressive supranuclear palsy. *Neurology.* 41:634-43.
- Polydoro M, Acker CM, Duff K, Castillo PE, Davies P (2009) Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J Neurosci.* 29:10741-9.
- Pooler AM, Noble W, Hanger DP (2014) A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology.* 76:1-8.
- Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 43:815-25. Erratum in *Ann Neurol.* 44:428
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 266:730-2.
- Preuss U, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) The 'jaws' model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells. *J Cell Sci.* 110:789-800.

- Probst A, Götz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Bürki K, Goedert M (2000) Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol* 99:469-81.
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 463:3-33.
- Przybyla M, Stevens CH, van der Hoven J, Harasta A, Bi M, Ittner A, van Hummel A, Hodges JR, Piguet O, Karl T, Kassiou M, Housley GD, Ke YD, Ittner LM, van Eersel J (2016) Disinhibition-like behavior in a P301S mutant tau transgenic mouse model of frontotemporal dementia. *Neurosci Lett* 631:24-9.
- R Development Core Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna
- Rabinovici GD, Miller BL (2010) Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*. 24:375-98.
- Rademakers R, Dermaut B, Peeters K, Cruts M, Heutink P, Goate A, Van Broeckhoven C (2003) Tau (MAPT) mutation Arg406Trp presenting clinically with Alzheimer Disease does not share a common founder in Western Europe. *Hum Mutat*. 22:409-11.
- Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR (2012) Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol*. 8:423-34.
- Reed LA, Grabowski TJ, Schmidt ML, Morris JC, Goate A, Solodkin A, Van Hoesen GW, Schelper RL, Talbot CJ, Wragg MA, Trojanowski JQ (1997) Autosomal dominant dementia with widespread neurofibrillary tangles. *Ann Neurol*. 42:564-72.
- Reed LA, Wszolek ZK, Hutton M (2001) Phenotypic correlations in FTDP-17. *Neurobiol Aging*. 22:89-107.
- Rendon A, Jung D, Jancsik V (1990) Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria, *Biochem J*. 269:555-6.
- Rizzu P, van Swieten JC, Joosse M, Hasegawa M, Stevens M, Tibben A, Niermeijer MF, Hillebrand M, Ravid R, Oostra BA, Goedert M, van Duijn CM, Heutink P (1999) High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands. *Am J Hum Genet*. 64:414-21.
- Rockenstein E, Overk CR, Ubhi K, Mante M, Patrick C, Adame A, Bisquert A, Trejo-Morales M, Spencer B, Masliah E (2015) A novel triple repeat mutant tau transgenic model that mimics aspects of pick's disease and fronto-temporal tauopathies. *PLoS One*. 10:e0121570.
- Rottscholl R, Haegele M, Jainsch B, Xu H, Respondek G, Höllerhage M, Rosler TW, Bony E, Le Ven J, Guerineau V, Schmitz-Afonso I, Champy P, Oertel WH, Yamada ES, Höglinger GU (2016) Chronic consumption of Annonamuricata juice triggers and aggravates cerebral tau phosphorylation in wild-type and MAPT transgenic mice. *J Neurochem*. 139:624-39.
- Sacks OW (1997) *The island of the colorblind*. New York: Alfred A. Knopf.
- Saito Y, Geyer A, Sasaki R, Kuzuhara S, Nanba E, Miyasaka T, Suzuki K, Murayama S (2002) Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation. *Neurology*. 58:811-3.
- Salama M, El-Desouky S, Alsayed A, El-Hussiny M, Magdy K, Fekry E, Shabka O, El-Khodery SA, Youssef MA, Sobh M, Mohamed W (2019) siRNA Blocking of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Attenuates Pathology in Annonacin-Induced Tauopathy in Mice. *Neurotox Res*. 35:987-92.
- Samaey C, Schreurs A, Stroobants S, Balschun D (2019) Early Cognitive and Behavioral Deficits in Mouse Models for Tauopathy and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. 11:335.

- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Youe M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowsk M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 309:476-81.
- Sato C, Barthelemy NR, Mawuenyega KG, Patterson BW, Gordon BA, Jockel-Balsarotti J, Sullivan M, Crisp MJ, Kasten T, Kirmess KM, Kanaan NM, Yarasheski KE, Baker-Nigh A, Benzinger TLS, Miller TM, Karch CM, Bateman RJ (2018) Tau kinetics in neurons and the human central nervous system. *Neuron*. 97:1284-98.
- Scattoni ML, Gasparini L, Alleva E, Goedert M, Calamandrei G, Spillantini MG (2010) Early behavioural markers of disease in P301S tau transgenic mice. *Behav Brain Res*. 208:250-7.
- Schamne MG, Mack JM, Moretti M, Matheus FC, Walz R, Lanfumey L, Prediger RD (2018) The gender-biased effects of intranasal MPTP administration on anhedonic- and depressive-like behaviors in C57BL/6 mice: the role of neurotrophic factors. *Neurotox Res*. 34:808-19.
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, Hamdane M, Buée L (2006) Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol*. 169:599-616.
- Schulz KL, Eckert A, Rhein V, Mai S, Haase W, Reichert AS, Jendrach M, Müller WE, Leuner K (2012) A new link to mitochondrial impairment in tauopathies. *Mol Neurobiol*. 46:205-16.
- Schwartz RK, Goldenberg R, Steiner H, Fornaguera J, Huston JP (1993) A video image analyzing system for open-field behavior in the rat focusing on behavioral asymmetries. *J Neurosci Methods*. 49:199-210.
- Schwarz S, Hofmann MH, Gutzen C, Schlax S, von der Emde G (2002) VIEWER: a program for visualizing, recording, and analyzing animal behavior. *Comput Methods Programs Biomed*. 67:55-66.
- Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh J (1997) Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem*. 167:99-105.
- Shin MS, Kim TW, Lee JM, Ji ES, Lim BV (2017) Treadmill exercise alleviates nigrostriatal dopaminergic loss of neurons and fibers in rotenone-induced Parkinson rats. *J Exerc Rehabil*. 13:30-5.
- Shiryaev N, Jouroukhin Y, Gozes I (2010) 3R tau expression modifies behavior in transgenic mice. *J Neurosci Res*. 88:2727-35.
- Simon P, Dupuis R, Costentin J (1994) Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res*. 61:59-64.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL 3rd, Mumby G, Bloom GS (1999) Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem*. 274:25490-8.
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC (1987) Guam amyotrophic lateral sclerosis Parkinsonism dementia linked to a plant excitotoxin. *Science*. 237:517-22.
- Spillantini MG, Crowther RA, Goedert M (1996) Comparison of the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease and familial presenile dementia with tangles. *Acta Neuropathol*. 92:42-8.
- Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Murrell JR, Farlow MR, Ghetti B (1997) Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4113-8

- Spillantini MG, Murrell J, Goedert M, Farlow M, Klug A, Ghetti B (1998) Mutation in the tau gene in familial multisystem tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7737-41.
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F (1999) Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol.* 155:2153-65.
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol.* 156:1051-63.
- Stancu IC, Vasconcelos B, Ris L, Wang P, Villers A, Peeraer E, Buist A, Terwel D, Baatsen P, Oyelami T, Pierrot N, Casteels C, Bormans G, Kienlen-Campard P, Octave JN, Moechars D, Dewachter I (2015) Templated misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathol.* 129:875-94.
- Stanford PM, Shepherd CE, Halliday GM, Brooks WS, Schofield PW, Brodaty H, Martins RN, Kwok JB, Schofield PR (2003) Mutations in the tau gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain.* 126:814-26.
- Steele JC, Caparros-Lefebvre D, Lees AJ, Sacks OW (2002) Progressive supranuclear palsy and its relation to pacific foci of the parkinsonism- dementia complex and Guadeloupean parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 9:39-54.
- Steele JC, McGeer PL (2008) The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. *Neurology.* 70:1984-90.
- Sturman O, Germain PL, Bohacek J (2018) Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress.* 21:443-52.
- Swarnkar S, Singh S, Sharma S, Mathur R, Patro IK, Nath C (2011) Rotenone induced neurotoxicity in rat brain areas: a histopathological study. *Neurosci Lett.* 501:123-7.
- Sydow A, Van der Jeugd A, Zheng F, Ahmed T, Balschun D, Petrova O, Drexler D, Zhou L, Rune G, Mandelkow E, D'Hooge R, Alzheimer C, Mandelkow EM (2011) Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci.* 31:2511-25.
- Takahashi LK, Kalin NH, Vanden Burt JA, Sherman JE (1989) Corticotropin-releasing factor modulates defensive-withdrawal and exploratory behavior in rats. *Behav Neurosci.* 103:648-54.
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B (1998) Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:9637-41.
- Takeda A, Perry G, Abraham NG, Dwyer BE, Kutty RK, Laitinen JT, Petersen RB, Smith MA (2000a) Overexpression of heme oxygenase in neuronal cells, the possible interaction with tau. *J Biol Chem.* 275:5395-9.
- Takeda A, Smith MA, Avila J, Nunomura A, Siedlak SL, Zhu X, Perry G, Sayre LM (2000b) In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J Neurochem.* 75:1234-41.
- Takeuchi H, Iba M, Inoue H, Higuchi M, Takao K, Tsukita K, Karatsu Y, Iwamoto Y, Miyakawa T, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM, Takahashi R (2011) P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS One.* 6:e21050.

- Tanemura K, Akagi T, Murayama M, Kikuchi N, Murayama O, Hashikawa T, Yoshiike Y, Park JM, Matsuda K, Nakao S, Sun X, Sato S, Yamaguchi H, Takashima A (2001) Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol Dis.* 8:1036-45.
- Tanemura K, Murayama M, Akagi T, Hashikawa T, Tominaga T, Ichikawa M, Yamaguchi H, Takashima A (2002) Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci.* 22:133-41.
- Taniguchi T, Doe N, Matsuyama S, Kitamura Y, Mori H, Saito N, Tanaka C (2005) Transgenic mice expressing mutant (N279K) human tau show mutation dependent cognitive deficits without neurofibrillary tangle formation. *FEBS Lett.* 579:5704-12.
- Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A (2002) Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:13896-901.
- Terwel D, Lasrado R, Snauwaert J, Vandeweert E, Van Haesendonck C, Borghgraef P, Van Leuven F (2005) Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2 N transgenic mice. *J Biol Chem.* 280:3963-73.
- Thiel C, Müller C, Huston J, Schwarting R (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience.* 93:243-51.
- Tormo JR, Gallardo T, Aragon R, Cortes D, Estornell E (1999) Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. *Chem Biol Interact.* 122:171-83.
- Van der Jeugd A, Ahmed T, Burnouf S, Belarbi K, Hamdame M, Grosjean ME, Humez S, Balschun D, Blum D, Buee L, D'Hooge R (2011) Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol Learn Mem.* 95:296-304.
- Van der Jeugd A, Hochgräfe K, Ahmed T, Decker JM, Sydow A, Hofmann A, Wu D, Messing L, Balschun D, D'Hooge R, Mandelkow EM (2012) Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau. *Acta Neuropathol.* 123:787-805.
- Van der Jeugd A, Vermaercke B, Halliday GM, Staufenbiel M, Götz J (2016) Impulsivity, decreased social exploration, and executive dysfunction in a mouse model of frontotemporal dementia. *Neurobiol Learn Mem.* 130:34-43.
- van der Zee J, van Broeckhoven C (2014) Dementia in 2013: frontotemporal lobar degeneration—building on breakthroughs. *Nat Rev Neurol.* 10:70-2.
- van Swieten JC, Stevens M, Rosso SM, Rizzu P, Joosse M, de Koning I, Kamphorst W, Ravid R, Spillantini MG, Niermeijer, Heutink P (1999) Phenotypic variation in hereditary frontotemporal dementia with tau mutations. *Ann Neurol.* 46:617-26.
- Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104:87-92.
- Vogelsberg-Ragaglia V, Bruce J, Richter-Landsberg C, Zhang B, Hong M, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Distinct FTDP-17 missense mutations in tau produce tau aggregates and other pathological phenotypes in transfected CHO cells. *Mol Biol Cell.* 11:4093-104.
- Wang H, Xiao L, Wang H, Wang G (2020) Involvement of chronic unpredictable mild stress-induced hippocampal LRP1 up-regulation in microtubule instability and depressive-like behavior in a depressive-like adult male rat model. *Physiol Behav.* 215:112749.

- Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem.* 270:4854-60.
- Wang JZ, Wu Q, Smith I, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1998) Tau is phosphorylated by GSK-3 at several sites found in AD and its biological activity markedly inhibited only after it is prephosphorylated by A-kinase. *FEBS Lett.* 436: 28-34.
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated tau by dephosphorylation with protein phosphatase, -2A, -2B and -1. *Mol. Brain Res Mol Brain Res.* 38:200-8.
- Watt G, Przybyla M, Zak V, van Eersel J, Ittner A, Ittner LM, Karl T (2020) Novel Behavioural Characteristics of Male Human P301S Mutant Tau Transgenic Mice – A Model for Tauopathy. *Neuroscience.* 431:166-75.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:1858-62.
- Weintraub D, Burn DJ (2011) Parkinson's disease: the quintessential neuropsychiatric disorder. *Mov Disord.* 26:1022-31.
- Weitzner DS, Engler-Chiurazzi EB, Kotilinek LA, Ashe KH, Reed MN (2015) Morris water maze test: Optimization for mouse strain and testing environment. *J Vis Exp.* (100):e52706.
- Wen Y, Yang S, Liu R, Brun-Zinkernagel AM, Koulen P, Simpkins JW (2004) Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-entry and Alzheimer's disease-like tauopathy in female rats. *J Biol Chem.* 279:22684-92.
- Whishaw IQ, Haun F, Kolb B (1999) Analysis of behavior in laboratory rodents, modern techniques in neuroscience research. New York, NY: Springer; 1243-75.
- Wiener J (2005) Annals of medicine: the tangle. Searching for the cause of a brain disease. *The New Yorker.* 42-51.
- Wijker M, Wszolek ZK, Wolters EC, Roimans MA, Pals G, Pfeiffer RF, Lynch T, Rodnitzky RL, Wilhelmsen KC, Arwert F (1996) Localization of the gene for rapidly progressive autosomal dominant parkinsonism and dementia with pallido-ponto-nigral degeneration to chromosome 17q21. *Hum Mol Genet.* 5:151-4.
- Wilhelmsen KC, Lynch T, Pavlou E, Higgins M, Nygaard TG (1994) Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21–22. *Am J Hum Genet.* 55:1159-65.
- Wobst HJ, Denk F, Oliver PL, Livieratos A, Taylor TN, Knudsen MH, Bengoa-Vergniory N, Bannerman D, Wade-Martins R (2017) Increased 4R tau expression and behavioural changes in a novel MAPT-N296H genomic mouse model of tauopathy. *Sci Rep.* 7:43198.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4040-3 (erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:9773).
- Xu H, Rösler TW, Carlsson T, de Andrade A, Bruch J, Höllerhage M, Oertel WH, Höglinger GU (2014a) Memory deficits correlate with tau and spine pathology in P301S MAPT transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 40:833-43.
- Xu H, Rosler TW, Carlsson T, de Andrade A, Fiala O, Hollerhage M, Oertel WH, Goedert M, Aigner A, Höglinger GU (2014b) Tau silencing by siRNA in the P301S mouse model of tauopathy. *Curr Gene Ther.* 14:343-51.
- Xu NZ, Ernst M, Treven M, Cerne R, Wakulchik M, Li X, Jones TM, Gleason SD, Morrow D, Schkeryantz JM, Rahman MT, Li G, Poe MM, Cook JM, Witkin JM (2018) Negative allosteric modulation of alpha 5-containing GABAA receptors engenders antidepressant-like effects and selectively prevents age-associated hyperactivity in tau-depositing mice. *Psychopharmacology.* 235:1151-61.

- Yamada ES, Respondek G, Müssner S, de Andrade A, Höllerhage M, Depienne C, Rastetter A, Tarze A, Friguet B, Salama M, Champy P, Oertel WH, Höglinger GU (2014) Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. *Exp Neurol.* 253:113-25.
- Yamada K, Cirrito JR, Stewart FR, Jiang H, Finn MB, Holmes BB, Binder LI, Mandelkow EM, Diamond MI, Lee VM, Holtzman DM (2011) In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J Neurosci.* 31:13110-7.
- Yamaoka LH, Welsh-Bohmer KA, Hulette CM, Gaskell PC, Jr, Murray M, Rimmler JL, Helms BR, Guerra M, Roses AD, Schmechel DE, Pericak-Vance MA (1996) Linkage of frontotemporal dementia to chromosome 17: clinical and neuropathological characterization of phenotype. *Am J Hum Genet.* 59:1306-12.
- Yang Y, Yang XF, Wang YP, Tian Q, Wang XC, Li HL, Wang Q, Wang JZ (2007) Inhibition of protein phosphatases induces transport deficits and axonopathy. *J Neurochem.* 102:878-86.
- Ygland E, van Westen D, Englund E, Rademakers R, Wszolek ZK, Nilsson K, Nilsson C, Landqvist Waldö M, Alafuzoff I, Hansson O, Gustafson L, Puschmann A (2018) Slowly progressive dementia caused by MAPT R406W mutations: longitudinal report on a new kindred and systematic review. *Alzheimers Res Ther.* 10:2.
- Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Ishihara T, Forman MS, Martinez D, Joyce S, Trojanowski JQ, Lee VM (2004) Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J Neurosci.* 24:4657-67.
- Zhang LF, Shi L, Liu H, Meng FT, Liu YJ, Wu HM, Du X, Zhou JN (2012) Increased hippocampal tau phosphorylation and axonal mitochondrial transport in a mouse model of chronic stress. *Int J Neuropsychopharmacol.* 15:337-48.
- Zheng-Fischhöfer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkow E (1998) Sequential phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filamentlike conformation. *Eur J Biochem.* 252:542-55.
- Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q, Wang XC, Wang Q, Chen JG, Wang JZ (2007) Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci.* 27:12211-20

a. Lebenslauf

b. Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer in Marburg und während der Ausbildung in meinem Praktischen Jahr in Pécs, Ungarn und in Thun, Schweiz waren die nachfolgenden Damen und Herren:

In Marburg: Aumüller, Barth, Basler, Baum, Berger, Bertalanffy, Cetin, Culmsee, Czubayko, Daut, DonnerBanzhoff, Eilers, Feuser, Funck, Gerdes, Görg C., Görg K., Grau, Grimm, Grundmann, Grzeschik, Hasilik, Hermann-Lingen, Hilt, Hofmann, Holst, Klenk, Klaus, Klose, Koolman, Krause, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Lohoff, Löffler, Maier, Maisch, Mandrek, Moll, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Plant, Richter, Roeper, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Sesterhenn, Renz, Rothmund, Seitz, Steiniger, Vogt, Voigt, von Löw, Wagner, Weihe, Weiler, Wenne-muth, Werner, Westermann, Wulf, Wündisch, Zemlin.

In Pécs, Ungarn:
Beró, Schnell, Solt

In Thun, Schweiz:
Hess, Mouton, Wagner

c. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Hermann Oertel möchte ich für die Gelegenheit, die Dissertationsarbeit in seiner Klinik durchführen und nach langer Latenzphase abschließen zu können sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit ganz herzlich danken.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Günter U. Höglinger möchte ich für die Aufnahme als Doktorandin für das Projekt sowie die engagierte Betreuung und Beratung während der Durchführung der Experimente danken.

Weiterhin danke ich Dr. rer. nat. Andreas Borta, der mich bei den Verhaltenstests tatkräftig und geduldig unterstützte, sowie Elizabeth Yamada, die mich bei den Experimenten im Labor mit ihrer freundlichen Art und Expertise begleitete.

Ich danke allen Beteiligten unserer Arbeitsgruppe für die fachlichen Diskussionen, guten Gespräche und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Vor allem danke ich Marlen Hägele (geb. Lunow) und Robert Rottscholl, ohne deren wertvolle Zusammenarbeit, Freundschaft und jahrelange unerlässliche Unterstützung dieses Projekt nie zustande gekommen wäre.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann, meinen Eltern und Schwiegereltern, die mich bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt haben, und meinen Kindern, die auf mich während der letzten Phase der Arbeit verzichten mussten, damit diese Dissertation nach jahrelanger Arbeit abgeschlossen werden kann. Mein Dank gilt ganz besonders meinem Ehemann, der mich jahrelang motiviert und sowohl emotional als auch tatkräftig bei der Kinderbetreuung unterstützt hat und verständnisvoll zur Seite stand.

d. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Verhaltensanalyse bei Tau-transgenen Mäusen unter Intoxikation mit Saft aus *Annona muricata*“ in der Klinik für Neurologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel, der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Günter U. Höglinger und der Unterstützung durch Frau Dr. Elizabeth Yamada und Herrn Dr. rer. nat. Andreas Borta, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in dieser Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- als wissenschaftliche Publikation:

Rottscholl R, Haegele M, **Jainsch B**, Xu H, Respondek G, Höllerhage M, Rösler TW, Bony E, Le Ven J, Guérineau V, Schmitz-Afonso I, Champy P, Oertel WH, Yamada ES, Höglinger GU (2016) Chronic consumption of *Annona muricata* juice triggers and aggravates cerebral tau phosphorylation in wild-type and *MAPT* transgenic mice. J Neurochem. 139:624-39.

- als Vortrag:

Rottscholl R, Lunow M, **Jainsch B**, Respondek G, Höllerhage M, Champy P, Oertel WH, Yamada ES, Höglinger GU (2011) Gene-environment interaction in mice expressing mutant (R406W) Tau. 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Wiesbaden, Oktober 2011

- als Poster:

Rottscholl R, Lunow M, **Jainsch B**, Xu H, Respondek G, Höllerhage M, Rösler TW, Bony E, Le Ven J, Guérineau V, Schmitz-Afonso I, Champy P, Oertel WH, Yamada ES, Höglinger GU (2016) Chronic consumption of *Annona muricata* juice triggers and aggravates cerebral tau pathology in wild-type and *MAPT* transgenic mice. 10th International Conference on Frontotemporal Dementias, München, August/September 2016.

Rottscholl R, Lunow M, **Jainsch B**, Respondek G, Höllerhage M, Champy P, Oertel WH, Yamada ES, Höglinger GU (2014) Gene-environment interaction in FTDP-17 mice expressing mutant R406W Tau. 87. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, München, September 2014.

Rottscholl R, **Jainsch B**, Lunow M, Respondek G, Höllerhage M, Champy P, Oertel WH, Yamada ES, Höglinger GU (2011) The R406W Tau mutation in a gene-environment interaction model. 41st Annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA, November 2011.

Rottscholl R, Lunow M, **Jainsch B**, de Andrade A, Respondek G, Höllerhage M, Champy P, Oertel WH, Yamada ES, Höglinger GU (2011) Gene-environment interaction in a mouse tauopathy model. 7. Deutscher Parkinson Kongress, Kiel, März 2011.

Borta, A, Yamada ES, Lunow M, **Jainsch B**, Rottscholl R, Oertel WH, Höglinger GU (2009) Frontal-type behavioural alterations in R406W-Tau transgenic mice. 6. Deutscher Parkinson Kongress, Marburg, März 2009.

Erlangen, den 28.07.2020

Britta Jainsch

„Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.“

Marburg, den

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel