

**Mütterliche Adipositas während Schwangerschaft und  
Säugezeit als Risiko für die Entwicklung kognitiver  
Defizite beim Nachwuchs**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Carmen-Raphaella Schneider  
aus Karlsruhe**

**2018**

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Heneka
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Müller

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.03.2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Klockgether

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>- 6 -</b>
1.1	Morbus Alzheimer .....	- 6 -
1.1.1	Epidemiologie.....	- 6 -
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren .....	- 7 -
1.1.3	Makroskopische Veränderungen .....	- 8 -
1.1.4	Molekularbiologische Merkmale.....	- 8 -
1.1.4.1	β-Amyloid-Plaques .....	- 9 -
1.1.4.2	Neurofibrilläre Veränderungen.....	- 11 -
1.1.4.3	Weitere pathophysiologischen Merkmale des Morbus Alzheimer .....	- 11 -
1.2	Neuroinflammation bei neurodegenerativen Erkrankungen .....	- 12 -
1.2.1	Mikroglia.....	- 12 -
1.2.2	Astroglia .....	- 13 -
1.2.3	Neurone .....	- 14 -
1.2.4	Inflammatorische Botenstoffe .....	- 14 -
1.3	Adipositas.....	- 15 -
1.3.1	Epidemiologie.....	- 15 -
1.3.2	Gründe / Auswirkungen / Risiken.....	- 15 -
1.3.3	Übergewicht und das metabolische Syndrom als Demenzrisiko / Risiko für ZNS-Dysfunktion .....	- 16 -
1.4	Komplikationen übergewichtiger Mütter während der Schwangerschaft und langfristige Auswirkungen der Überernährung auf den Nachwuchs.....	- 17 -
1.4.1	Komplikationen vor und während der Schwangerschaft .....	- 18 -
1.4.2	Langfristige Folgen von Adipositas während der Schwangerschaft für die Nachkommen.....	- 18 -
1.5	Nicht-publizierte Daten der AG Heneka: Mütterliche Adipositas als Risikofaktor für kognitive Defizite und Demenz beim Nachwuchs .....	- 20 -
1.5.1	Versuchsaufbau .....	- 20 -

1.5.2	Ergebnisse: Mütterliche Adipositas als Risikofaktor für kognitive Defizite und Demenz beim Nachwuchs.....	- 21 -
1.5.2.1	Gewichtszunahme Muttertiere .....	- 21 -
1.5.2.2	Gewichtszunahme Nachwuchs.....	- 22 -
1.5.2.3	Lernverhalten des Nachwuchses im Morris-Water-Maze .....	- 23 -
1.5.2.4	Plaqueload / Neuroinflammation / periphere Inflammation im Nachwuchs.....	- 24 -
1.5.2.5	Grundlage der Hypothese.....	- 25 -
<b>2</b>	<b>Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit.....</b>	<b>- 26 -</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>- 27 -</b>
3.1	Tiere.....	- 27 -
3.1.1	Allgemeine Tierhaltung.....	- 27 -
3.1.2	Wildtyp-Tiere .....	- 28 -
3.1.3	Verpaarung .....	- 28 -
3.2	Versuchsaufbau .....	- 28 -
3.2.1	Ammenexperiment .....	- 28 -
3.2.2	Material und Gewebe des vorangegangenen Experimentes der Arbeitsgruppe Heneka	- 29 -
3.3	Monitoring von Gewicht .....	- 30 -
3.4	Fütterung.....	- 31 -
3.5	Blutzuckermessung .....	- 31 -
3.6	Verhaltensexperimente.....	- 31 -
3.6.1	Open field.....	- 31 -
3.6.2	Morris-water-maze-Experiment.....	- 32 -
3.7	Narkose, Blutentnahme, Perfusion und Gewebepräparation .....	- 33 -
3.8	Histologische Untersuchungen .....	- 34 -
3.8.1	Konservierung / Schneiden.....	- 34 -
3.8.2	Immunhistochemie: CD11b und GFAP-Kofärbung .....	- 34 -
3.8.3	Thioflavin-S-Färbung .....	- 35 -

3.9	Homogenisierung .....	- 35 -
3.10	Untersuchung auf RNA-Ebene .....	- 35 -
3.11	Untersuchung auf Protein-Ebene / RIPA / BCA / Western Blot .....	- 37 -
3.12	Statistische Analysen .....	- 38 -
3.13	Tierversuchsgenehmigung .....	- 38 -
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>- 39 -</b>
4.1	Ergänzende Auswertungen aus dem Vor-Experiment .....	- 39 -
4.1.1	Thioflavin-S-Färbungen .....	- 39 -
4.1.2	GFAP-Färbung .....	- 43 -
4.1.2.1	GFAP-Auswertung des männlichen APP/PS1 <sup>+/-</sup> - Nachwuchs .....	- 44 -
4.1.2.2	GFAP-Auswertung der Wildtyp-Männchen .....	- 48 -
4.1.3	Quantitative real-time-PCR .....	- 51 -
4.2	Ammenexperiment .....	- 56 -
4.2.1	Gewichtsverläufe .....	- 56 -
4.2.2	Foodintake .....	- 57 -
4.2.3	Blutzucker-Messungen .....	- 58 -
4.2.4	Verhaltensbiologische Untersuchungen .....	- 60 -
4.2.4.1	Open-field-Test .....	- 60 -
4.2.4.2	Morris-Water-Maze-Experiment .....	- 63 -
4.2.5	Untersuchungen auf RNA-Ebene .....	- 66 -
4.2.6	Untersuchungen auf Protein-Ebene .....	- 71 -
<b>5</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>- 73 -</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>- 83 -</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>- 85 -</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>- 85 -</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 92 -</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>- 100 -</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Alzheimer

1907 beschrieb Alois Alzheimer erstmals eine progressive Demenzerkrankung, die mit typischen pathologischen Befunden einhergeht und daraufhin nach ihm benannt wurde (Alzheimer, 1907). Morbus Alzheimer ist eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung. Klinisch charakteristisch sind progressive mnestiche Störungen, kognitive Defizite sowie Verhaltens- und neuropsychiatrische Änderungen, wie eine veränderte Affektkontrolle, welche die Tätigkeiten des täglichen Lebens signifikant beeinträchtigen. Typisch sind eine lange präklinische Phase und ein schleichender Beginn. Mittlerweile sind auch atypische Formen der Alzheimer-Demenz bekannt, die klinisch im Rahmen nicht-mnesticher fokal-kortikaler Defizite manifest werden. Zu nennen wäre hier die progressive nicht-flüssige Aphasie oder die posteriore kortikale Atrophie. Der früher strikt vertretene Ansatz der dualen klinisch-biologischen Befundkonstellation, der zusätzlich den Nachweis typischer histopathologischer Merkmale post mortem erforderte, wird zunehmend aufgeweicht (Dubois et al., 2010). Inzwischen ist die Diagnose auch in vivo mittels neuropsychologischer Test, Biomarker im Liquor oder Amyloid-Positronenemissionstomogramm zu stellen und einzuteilen in mögliche, wahrscheinliche und definitive Alzheimer-Erkrankung (Reitz et al., 2014).

### 1.1.1 Epidemiologie

Weltweit leiden mehr als 24 Millionen Menschen an Morbus Alzheimer. Die Alzheimer-Erkrankung hat einen Anteil von circa 60 % an allen diagnostizierten Demenzen und ist vor der vaskulären Demenz die häufigste Demenzursache. Aufgrund des demografischen Wandels werden die Zahlen in Zukunft noch steigen und die Erkrankung auch volkswirtschaftlich zunehmend in den Fokus geraten (Querfurth et al., 2010). Daten aus den Vereinigten Staaten zufolge könnte sich bis 2050 die Zahl der über 85-Jährigen vervierfachen und die Anzahl Alzheimer-Demenz-Erkrankten sich somit fast verdreifachen (Hebert et al., 2003).

### 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Prinzipiell wird zwischen einer rein genetischen Variante, die in aller Regel früh manifest wird, und einer multifaktoriell bedingten, sporadischen Form unterschieden, die eher am Lebensende auftritt. Nur circa 5 % der Erkrankungen sind auf einen bekannten Gendefekt zurückzuführen. Es sind unter anderem folgende autosomal-dominant vererbten Mutationen bekannt, die mit einer familiären Alzheimer-Demenz einhergehen: eine heterozygote Mutation im Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) und eine in Presenilin 1 und 2 (PS1, PS2). Ein weiterer genetischer Faktor für die Entstehung einer Alzheimer-Erkrankung ist die Trisomie 21, dies ist auf eine Überproduktion von APP zurückzuführen, welches sich auf Chromosom 21 befindet. Die genaue Ursache der deutlich häufigeren sporadischen Alzheimer-Demenz ist unbekannt und solange sie unbekannt bleibt, ist es umso wichtiger Risikofaktoren zu identifizieren und zu vermeiden (Richter, 2004). Es sind bereits viele Risikofaktoren bekannt.

Auch bei der sich spät manifestierenden sporadischen Alzheimer-Erkrankung gibt es erbliche Prädispositionen, diese folgen jedoch nicht den Mendelschen Gesetzen, sondern werden multifaktoriell vererbt. So haben erstgradig Verwandte von Betroffenen ein doppelt so hohes Risiko an Alzheimer zu erkranken wie die Normalbevölkerung (Reitz et al., 2014). Auch das Gen Apolipoprotein E4 (ApoE4) ist ein genetischer Risikofaktor für die sporadische Alzheimer Erkrankung (Richter, 2004). Die Prävalenz von ApoE4 unter Patienten, die an Alzheimer leiden ist über 50 % (Bu, 2009).

Der wichtigste nicht-genetische Risikofaktor ist das Alter: Ab dem 65ten Lebensjahr wird die Inzidenz auf 1275/100.000/Jahr geschätzt und verdoppelt sich ab einem Alter von 65 alle 5 Jahre (Querfurth et al., 2010). Unter den 85-Jährigen sind aktuell bis zu 30 % betroffen. Unter den zahlreichen nicht-genetischen Risikofaktoren spielen nach dem Faktor Lebensalter auch allgemeine kardiovaskuläre Risikofaktoren eine sehr bedeutende Rolle. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Adipositas, Dyslipidämie, häufig zusammengefasst als metabolisches Syndrom, verursachen unter anderem mittels einer Störung der Blut-Hirnschranke, Hyperinsulinämie, Adipokinen und Zytokinen eine vermehrte A $\beta$ -Ablagerung. Hieraus resultiert letztendlich die Alzheimer-Erkrankung. Dieselben Risikofaktoren verursachen aber auch zerebrovaskuläre Erkrankungen wie territoriale Hirninfarkte oder lakunäre Infarkte. Hierdurch kommt es

dann zu einer vaskulären Demenz und folglich zu deutlichen Überschneidungen der beiden Demenzformen. Aufgrund der steigenden Inzidenz dieser vaskulären Risikofaktoren steigt auch die Inzidenz der Mischformen von Alzheimer- und vaskulärer Demenz (Reitz et al., 2014). Wegen der besonderen Relevanz für die vorliegende Arbeit wird auf den Risikofaktor Adipositas und hochkalorische Ernährung nochmals in Kapitel 1.3.3 genauer eingegangen.

Überdies sind verschiedene Erkrankungen im mittleren Lebensalter, wie eine überlebte Sepsis oder ein Schädelhirntrauma, ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Demenz (Richter, 2004; Widmann et al., 2014). Auch neurologische Vorerkrankungen wie beispielsweise eine Migräne oder schwere Depressionen können die Manifestation einer Alzheimer-Demenz beeinflussen (Richter, 2004). Ferner haben der Grad der Schulbildung und der sozioökonomische Status einen Einfluss auf das individuelle Erkrankungsrisiko. Überdies gibt es eine positive Korrelation zwischen der Alzheimer-Erkrankung und sozialer Isolation sowie einem Mangel an körperlicher Betätigung (Richter, 2004).

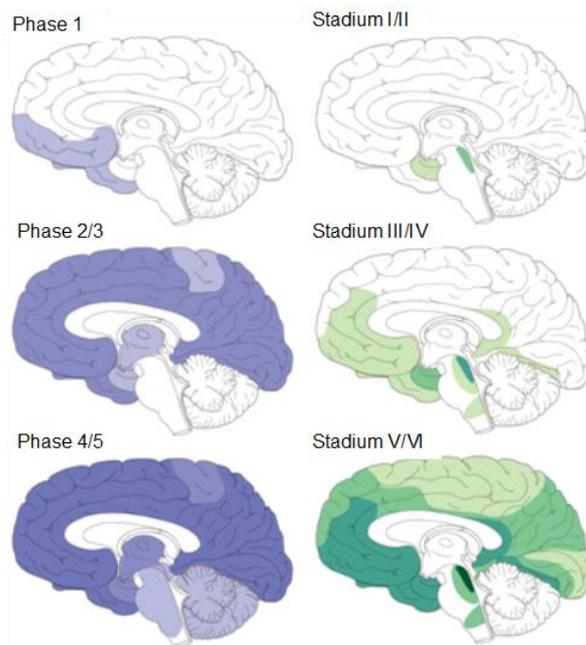
#### 1.1.3 Makroskopische Veränderungen

Makroskopisch kommt es bei Fortschreiten der Erkrankung zu einer Atrophie der Hippocampi sowie des Kortex, dies ist zurückzuführen auf die große Anzahl untergehender Neuronen im Krankheitsverlauf. Hierdurch kommt es konsekutiv zu einer symmetrischen Erweiterung der intracerebralen Liquorräume. All diese Veränderungen sind jedoch nicht spezifisch für die Alzheimer-Erkrankung und können auch im Rahmen natürlicher Alterungsprozesse vorkommen (Perl, 2010).

#### 1.1.4 Molekularbiologische Merkmale

Die neuropathologischen und klinischen Merkmale der familiären Alzheimer-Erkrankung lassen sich nicht von der sporadischen Form unterscheiden. Die zwei klassischen pathologischen Eigenschaften der Alzheimer-Erkrankung sind extrazelluläre zerebrale Plaques, bestehend aus  $\beta$ -Amyloid-Peptiden und dystrophischen Neuriten im Neocortex sowie intrazelluläre neurofibrilläre Tangles im mesialen Temporallappen. Eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt aber auch der Verlust von Neuronen und weißer

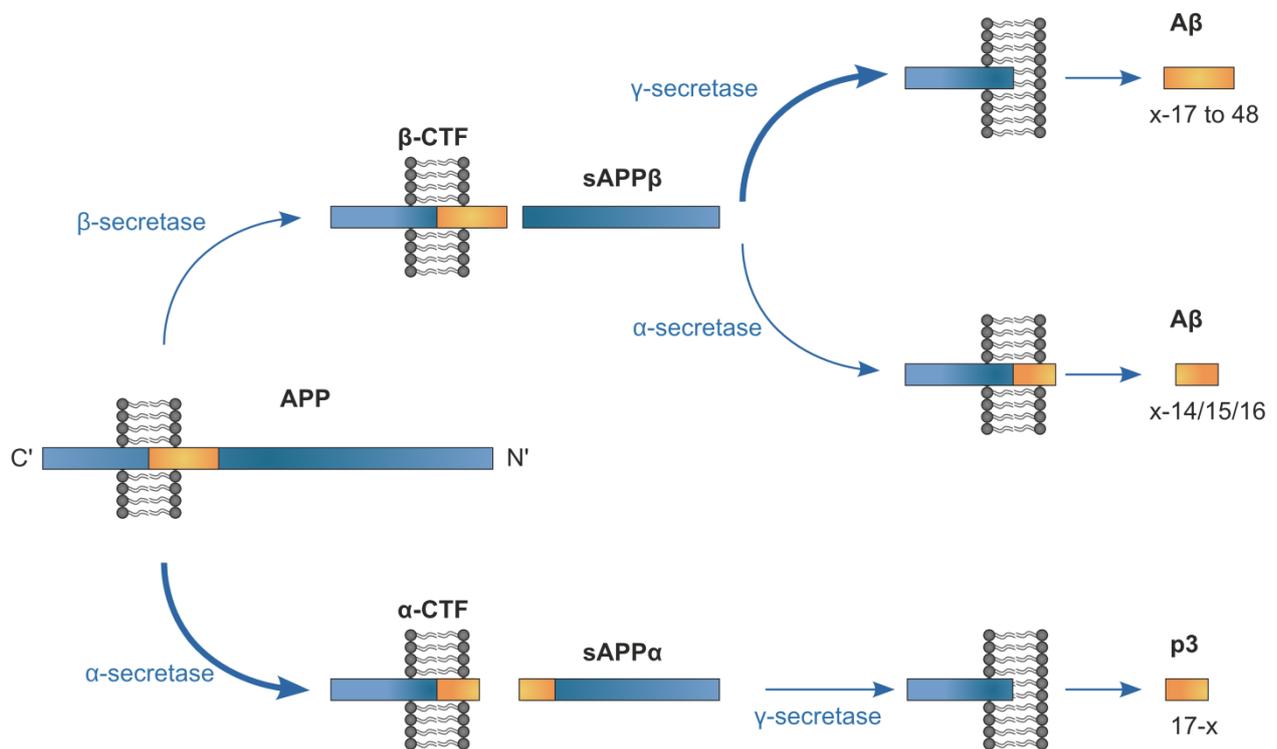
Substanz, Amyloid-Angiopathie, Neuroinflammation und oxidativer Stress (Querfurth et al., 2010). Während die Amyloid-Ablagerungen ein interindividuell sehr unspezifisches Verteilungsmuster haben, ist bei den neurofibrillären Tangles ein ganz charakteristisches zu erkennen (Braak et al., 1991). Die typischen neuropathologischen Merkmale sind in Abbildung 1 dargestellt und werden im Folgenden gesondert genauer beschrieben.



**Abb. 1:** (Links) (Blau) Verteilungsmuster der A $\beta$ -Plaques (Rechts) (Grün) Die 6 Stadien nach Braak. Verteilungsmuster neurofibrillärer Tangles. Stadien I und II sind die transentorhinalen Stadien, Stadien III und IV die limbischen Stadien und Stadium V und VI die kortikalen Stadien. (Modifiziert nach Braak&Braak 1991 und Goedert 2015)

#### 1.1.4.1 $\beta$ -Amyloid-Plaques

A $\beta$ -Peptide bestehen aus 36 bis 43 Aminosäuren und sind natürlich vorkommende Stoffwechselprodukte. A $\beta_{40}$ -Monomere kommen deutlich häufiger vor als die wesentlich aggregationsfreudigere A $\beta_{42}$ -Form. Die  $\beta$ -Amyloid-Peptide entstehen durch Proteolyse und weitere enzymatische Prozessierung aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein (Amyloid-Precursor-Protein), wie in Abbildung 2 gezeigt. Hieran sind die folgenden Enzyme maßgeblich beteiligt: beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE 1),  $\beta$ -Sekretase und  $\gamma$ -Sekretase sowie ein Proteinkomplex, dessen katalytisches Zentrum Presenilin 1 ist (Querfurth et al., 2010).



**Abb. 2:** Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins

Ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau führt zu einer Aggregation von A $\beta$ , woraus eine vermehrte Akkumulation resultiert. Das könnte der Auslöser der Alzheimer-Erkrankung sein. Dieses Konzept wird auch „Amyloid-Hypothese“ genannt und beruht auf Studien an genetischen Formen der Alzheimer-Demenz und der Tatsache, dass A $\beta_{42}$  zytotoxisch ist (Querfurth et al., 2010). Auch wenn es kein typisches Verteilungsmuster dieser Plaques gibt, ist insbesondere der Isocortex eine Prädilektionsstelle. Auch Größe und Form der Plaques sind sehr unterschiedlich und korrelieren nicht mit dem klinischen Ausmaß der Erkrankung (Braak et al., 1991). Dennoch kann man, wie in Abbildung 1 gezeigt, im Verlauf ein Verteilungsmuster erkennen. A $\beta$ -Plaques entstehen zuerst an einer oder mehreren Stellen im basaltemporalen oder orbitofrontalen Neokortex (Phase 1). Später sind sie im gesamten Neokortex, der Hippocampusformation und der Amygdala, sowie im Diencephalon und den Basalganglien (Phase 2 und 3). Im fortgeschrittenen Stadium sind sie ebenfalls im Mesencephalon, unteren Hirnstamm und Kleinhirnkortex zu finden (Phase 4 und 5) (Goedert, 2015).

#### 1.1.4.2 Neurofibrilläre Veränderungen

Neurofibrilläres Protein Tau dient in gesunden Neuronen der Stabilisierung des Zytoskeletts und ist in den Transport von zellulären Komponenten eingebunden. Neurofibrilläre Tangles sind intrazelluläre Einschlüsse von neurofibrillärem Tau in Pyramidenbahn-Neuronen. Sie sind namensgebend für die Taupathien, eine Gruppe von Erkrankungen, zu denen auch der hier beschriebene Morbus Alzheimer zählt. Zu diesen Ablagerungen kommt es durch Hyperphosphorylierung des Proteins (Querfurth et al., 2010). Histologisch werden drei verschiedene Läsionsarten unterschieden: neuritische Plaques, neurofibrilläre Tangles und Neuropil threads. Neurofibrilläre Tangles entstehen im Zellkörper von Neuronen, von wo aus sie sich in die Dendriten ausbreiten, nach dem Untergang der Zelle werden sie zu sogenannten „ghost tangles“, die sich extrazellulär befinden. Im Endstadium werden sie von Astroglia verstoffwechselt und es entsteht eine gliale Narbe (Braak et al., 1991). Entsprechend der Verteilung werden verschiedene Stadien *nach Braak* eingeteilt, diese sind auch in Abbildung 1 dargestellt: Stadium 1 und 2 sind die transentorhinalen Stadien, hier beginnen die neurofibrillären Veränderungen. Die ersten kortikalen Beteiligungen betreffen den rhinalen Sulcus. Es handelt sich hierbei um das Korrelat der subklinischen Phase A der Erkrankung. Stadien 3 und 4 sind die sogenannten limbischen Stadien, Phase B. Ihr zentraler Bestandteil ist die schwere Beteiligung der transentorhinalen und entorhinalen Regionen des Cortex sowie leichtere Veränderungen in Hippocampus sowie temporalen und insulären neocorticalen Regionen und einiger subcortikaler Nuclei. Die limbischen Stadien sind das morphologische Korrelat einer beginnenden Alzheimer-Erkrankung. Stadium 5 und 6 sind die neocorticalen Stadien, Phase C, deren Hauptmerkmal ist die großflächige Verwüstung des Neocortex. Lediglich das Hörzentrum, das primäre motorische und sensorische Feld sowie die sekundären Felder werden bis auf milde Veränderungen verschont. Es handelt sich hierbei um das Endstadium der Erkrankung, das klinisch mit einer schweren Demenz einhergeht (Braak et al., 1991; Christian Schultz, 2004).

#### 1.1.4.3 Weitere pathophysiologischen Merkmale des Morbus Alzheimer

Bereits bei Patienten mit milden kognitiven Defiziten kommt es zu einem synaptischen Defekt. Hippocampale Synapsen gehen unter und die verbleibenden Synapsen müssen

sich kompensatorisch vergrößern. Schon zu Beginn der Erkrankung kommt es zu einem Verlust von 25 % an Synaptophysin, das in präsynaptischen Vesikeln vorkommt. Der Verlust von Synapsen wird im Alter, insbesondere im Bereich des Gyrus dentatus des Hippocampus, auch unabhängig von Morbus Alzheimer beobachtet. Intraneuronales A $\beta$  kann diesen Vorgang jedoch beschleunigen. Der Verlust von Synapsen korreliert am besten mit der Verschlechterung im Krankheitsverlauf. Des Weiteren ist A $\beta$ -Amyloid für Mitochondrien toxisch. Daher kommt es zu einer mitochondrialen Dysfunktion, die in der Freisetzung freier Radikale resultiert. Dies wiederum führt zu oxidativem Stress und Apoptose, was einen weiteren Untergang von Neuronen bedeutet (Querfurth et al., 2010).

## 1.2 Neuroinflammation bei neurodegenerativen Erkrankungen

Neuroinflammation wird durch ganz unterschiedliche Dinge ausgelöst, wie zum Beispiel bakterielle oder virale Infektionen, Schädel-Hirn-Traumata, Autoimmunprozesse, Neurodegeneration und viele andere Erkrankungen (Gendelman, 2002). Mikroglia, Astrozyten und Neurone sind die Zellen des zentralen Immunsystems, die maßgeblich an chronischer Neuroinflammation im Rahmen von Morbus Alzheimer beziehungsweise neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sind (Heneka et al., 2010). Die Rolle der einzelnen Zelllinien und ihrer inflammatorischer Botenstoffe bei der Alzheimer-Erkrankung wird im Folgenden genauer betrachtet.

### 1.2.1 Mikroglia

Mikrogliazellen sind die wichtigsten Vertreter des angeborenen Immunsystems im zentralen Nervensystem und haben einen Anteil von 10 % an glialen Zellen (Heneka et al., 2010; Heneka et al., 2014). Während der Embryonalzeit wandern sie, vor Schluss der Blut-Hirn-Schranke, aus dem Yolk-Sack in das zentrale Nervensystem ein (Ginhoux et al., 2010; Heneka et al., 2014). Sie bilden die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Bakterien, Viren und Pilze, können aber ebenso durch endogene Proteine aktiviert werden und so zum Verlust an Neuronen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen beitragen. Einmal aktiviert, wandern sie in Areale mit untergegangenen Zellen, umringen sie und reinigen sie von den Zellresten, vergleichbar mit aktivierten Makrophagen im peripheren Immunsystem (Heneka et al., 2010). Durch die Aktivierung

produziert Mikroglia nicht nur plötzlich eine Vielzahl potenziell neurotoxischer Mediatoren, sie ändert auch die eigene Morphologie. Im Ruhezustand sind Mikrogliazellen verästelt und haben große Pseudopoden. Der verästelte Phänotyp ist durch eine hohe Anzahl an Fortsätzen gekennzeichnet, die ununterbrochen mit benachbarten Neuronen, Astrozyten und Blutgefäßen interagieren und so ständig ihre Umgebung scannen. An der Zelloberfläche befinden sich zahlreiche Rezeptoren für Neurotransmitter, neuroendokrine Stoffe, Zytokine und Chemokine. Im Normalzustand ist Mikroglia ganz allgemein gesprochen verantwortlich für die Aufrechterhaltung der neuronalen Integrität, synaptische Plastizität und die Sekretion neurotroper Stoffe. Werden sie aktiviert, verändert sich zum einen ihr Äußeres in eine amöbenartige Form, wodurch Migration und Phagozytose möglich werden, zum anderen erhöht sich auch die Rezeptordichte an der Zelloberfläche (Wood, 2003; Heneka et al., 2010; Heneka et al., 2014). Im Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen sind sie in pathologischem Ausmaß dauerhaft Immunstimulatoren ausgesetzt und werden mittels verschiedener Rezeptoren aktiviert und sezernieren proinflammatorische Mediatoren (Heneka et al., 2014). Mit zunehmendem Fortschreiten der Erkrankung nimmt die absolute Anzahl an Mikrogliazellen im Gehirn zu. Jedoch ist unklar, ob periphere Zellen in das zentrale Nervensystem einwandern oder sich Mikroglia lokal vermehrt (Heneka et al., 2010).

### 1.2.2 Astroglia

Astrogliazellen bilden den größten Anteil unter den glialen Zellen im zentralen Nervensystem. Sie kommen sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz vor und tragen maßgeblich zur Homöostase im Gehirn bei, da sie für die Nutrition verschiedener Zellen verantwortlich sind, Ionen- und Neurotransmitter-Konzentrationen kontrollieren sowie die Blut-Hirn-Schranke regulieren. Ferner sind sie in zahlreiche Signalkaskaden eingebunden und interagieren direkt mit Neuronen und Blutgefäßen, wodurch sie den Blutfluss und die neuronale Aktivität steuern. Sie sind in jeden neuropathologischen Prozess verwickelt und von ihnen hängt maßgeblich ab, wie sich Krankheiten entwickeln. Reaktive Astroglieose ist eine Reaktion des Gehirns auf lokale Schädigung und Veränderung, die mehrere Ziele erfüllen soll. Erstens kann so ein geschädigtes Areal isoliert werden, zweitens kann so die Blut-Hirn-Schranke wieder aufgebaut werden und außerdem wird auf diese Weise das Remodeling in der

Umgebung erleichtert (Rodriguez et al., 2009). Schon Alois Alzheimer selbst erkannte, dass Astroglia eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung spielt. Insbesondere in der Umgebung von senilen Plaques findet sich in Alzheimer-Gehirnen eine prominente Astroglie, gebildet durch aktivierte Astrozyten (Rodriguez et al., 2009; Heneka et al., 2010). Astrogliazellen werden auch durch Amyloid- $\beta$ -Peptide aktiviert (Heneka et al., 2010). Aktivierte Astrozyten sind aber auch in der Lage große Mengen an Amyloid- $\beta$  zu akkumulieren. Später nehmen sie es dann zusammen mit den untergegangenen Neuronen auf (Rodriguez et al., 2009).

### 1.2.3 Neurone

Lange Zeit dachte man, Neuronen würde in neuroinflammatorischen Prozessen nur eine passive Rolle zukommen. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass Neurone selbst auch inflammatorische Mediatoren produzieren und freisetzen können (Heneka et al., 2010).

### 1.2.4 Inflammatorische Botenstoffe

Inflammatorische Zytokine gehören zu den wichtigsten inflammatorischen Mediatoren. Sie aktivieren und deaktivieren verschiedene Signalkaskaden, unter anderem durch Interleukin-1 $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-18 und den Tumornekrosefaktor  $\alpha$ . Weitere inflammatorische Zytokine, die insbesondere von Mikroglia produziert werden, sind das Macrophagen-Inflammatorische Protein 1 $\alpha$  (MIP 1 $\alpha$ ), Interleukin-5 und Interleukin-8. Durch die Aktivierung erhöhen Mikrogliazellen aber auch die Produktion verschiedener Proteasen, darunter Cathepsine, Matrix-Metalloproteasen und Plasminogen. Überdies sind sie auch wichtiger Entstehungsort für Prostaglandine (Wood, 2003).

Viele der proinflammatorischen Mediatoren sind inaktive Vorläufer, die durch enzymatische Spaltung aktiviert werden. Wichtige Vertreter dieser Enzyme sind Caspase 1 und Caspase 8. Deren Aktivität wird wiederum durch sogenannte Inflammasomen gesteuert. Eine besondere Rolle in der Steuerung aktiver und chronischer Entzündung spielt das NOD-like receptor (NLR), LRR- und Pyrin-domain-containing 3 (*NLRP3*) Inflammasom (Heneka et al., 2014). Durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems und hierdurch in letzter Konsequenz zu einem Verlust an Neuronen (Wood, 2003).

### 1.3 Adipositas

Übergewicht und Adipositas sind definiert als eine pathologische Ansammlung von Körperfett, die potenziell gesundheitsschädigend ist. Eine sehr einfache Variante zur Definierung von Adipositas ist der Body-Mass-Index (BMI). Er errechnet sich als Quotient aus Körpergewicht in Kilogramm und der Körpergröße in Metern zum Quadrat. Seine Einheit ist somit  $\text{kg/m}^2$ . Ab einem BMI von größer  $25,0 \text{ kg/m}^2$  wird von Übergewicht gesprochen, ab einem BMI von über  $30 \text{ kg/m}^2$  von Adipositas (WHO, 2014). Unabhängig vom Body-Mass-Index kann periphere von zentraler bzw. viszeraler Adipositas zu unterscheiden werden. Zentrale Adipositas ist definiert durch einen sagittalen Bauchdurchmesser von über 25 cm und ist auch bei einem normalen BMI mit einem höheren Risiko für viele Erkrankungen verbunden (Whitmer et al., 2008).

#### 1.3.1 Epidemiologie

Laut Weltgesundheitsorganisation hat sich seit 1980 die Zahl an Übergewichtigen und Fettleibigen weltweit circa verdoppelt. Über 1,4 Milliarden Menschen leiden an Übergewicht, 500 Millionen von ihnen sind adipös. Alles in allem sind 35 % der Weltbevölkerung übergewichtig (WHO, 2014). Zwar wurden die steigenden Zahlen zunächst nur in den Vereinigten Staaten von Amerika bemerkt, inzwischen hat sich das Problem aber über alle industrialisierten Staaten ausgebreitet und betrifft mittlerweile zum Teil sogar Entwicklungsländer (Bruce-Keller et al., 2009).

#### 1.3.2 Gründe / Auswirkungen / Risiken

Grund für eine Zunahme an Körpergewicht ist eine Dysbalance zwischen der Anzahl aufgenommener Kalorien und derer, die verbrannt werden. Hierfür gibt es zwei Ursachen: erstens eine höhere Aufnahme von hochkalorischen Nahrungsmitteln und solchen mit hohem Fettanteil und zweitens eine Zunahme an körperlicher Inaktivität, verursacht durch einen Zuwachs an vorwiegend sitzend ausgeführten Tätigkeiten, Veränderungen in der Fortbewegung und einer zunehmenden Urbanisierung. Genetische Faktoren sind bekannt, jedoch nicht für die immer höhere Prävalenz verantwortlich (WHO, 2014).

Übergewicht und Fettleibigkeit führen zu einer Vielzahl an Komorbiditäten, sodass sie die Lebenserwartung um bis zu sieben Jahre verringern. Viele der Folgeerkrankungen resultieren aus einem metabolischen Syndrom, definiert durch eine periphere Insulinresistenz, eine Dyslipidämie und arterielle Hypertonie. Am häufigsten kommt es zu kardiovaskulären Erkrankungen wie beispielsweise arterielle Hypertonie, ischämische Herzerkrankungen, Arteriosklerose und Schlaganfälle, gefolgt von Diabetes mellitus Typ II, Tumorerkrankungen wie Kolonkarzinom, Endometriumkarzinom oder Mammakarzinom, Steatosis hepatis, Schlafapnoe-Syndrom mit seinen potentiellen Folgen und Arthritis. Im weiteren Verlauf leiden die Patienten häufig auch an Depressionen und Angststörungen, nicht zuletzt als Folge möglicher Diskriminierung (Haslam et al., 2005; Bruce-Keller et al., 2009).

### 1.3.3 Übergewicht und das metabolische Syndrom als Demenzrisiko / Risiko für ZNS-Dysfunktion

Der Zusammenhang zwischen Übergewichtigkeit und Demenzerkrankungen im höheren Alter ist schon seit längerem bekannt und in mehreren klinischen und tierexperimentellen Studien belegt (Elias et al., 2003; Pasinetti et al., 2008; Whitmer et al., 2008; Bruce-Keller et al., 2009). Da es aktuell keine Heilung für die Alzheimer-Demenz gibt und die Krankheit erst am Ende des Lebens auftritt, könnte das Hinauszögern des Verlaufs durch Meidung oder Verhinderung von Risikofaktoren die Prävalenz der Erkrankung bereits deutlich senken und somit in einigen Fällen einer Heilung gleichkommen. Dieser Fakt veranschaulicht die Relevanz des Themenkomplexes (Pasinetti et al., 2008). Zunehmend zeigt sich, dass die Ernährung die Alzheimer-Pathologie mittels eines geänderten Metabolismus von Leptin direkt beeinflusst. Leptin ist ein Hormon, das von Adipozyten sezerniert wird und vielfältige zentrale und periphere Funktionen hat. Bei Adipositas kommt es zu einer sogenannten Leptinresistenz und einem verminderten Transport über die Blut-Hirn-Schranke (Pasinetti et al., 2008). Leptin hemmt die Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins durch die  $\beta$ -Sekretase in Neuronen und senkt in Mausexperimenten bei dauerhafter Applikation das cerebrale Plaqueload. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Höhe der Plasma A $\beta$ -Spiegel mit dem BMI assoziiert ist. Ebenso hat ein gestörter Insulinstoffwechsel einen Einfluss auf den Verlauf der Alzheimer-Erkrankung mittels

Einflussnahme auf die Bildung und den Abbau von Amyloid- $\beta$ -Peptiden. Es kommt insulin-vermittelt zu einer Hochregulierung des APP-Gens und hierdurch zu einer erhöhten A $\beta$ -Akkumulation (Fewlass et al., 2004). Tierexperimentell konnten aber auch andere Mechanismen gefunden werden, durch welche Adipositas neurodegenerative Prozesse beschleunigt. Eine Möglichkeit ist über eine cholesterin-induzierte Arteriosklerose, aber auch durch das Auslösen von oxidativem Stress und einer Insulinresistenz werden neurodegenerative Vorgänge beschleunigt (Bruce-Keller et al., 2009).

Whitmer und Kollegen zeigen in klinischen Studien, dass Übergewicht und stammbetonte Adipositas im mittleren Lebensalter mit einem 2,3 bzw. 3,6fach erhöhtem Risiko für die Entwicklung einer Demenz vergesellschaftet sind. Dieser Effekt ließ sich unabhängig von anderen Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus und Koronarer Herzkrankheit zeigen (Whitmer et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in mehreren anderen Studien erzielt (Elias et al., 2003; Bruce-Keller et al., 2009; Singh-Manoux et al., 2012). Ebenso konnte Adipositas aber auch mit morphologischen ZNS-Veränderungen korreliert werden: es kommt zu einem Verlust an grauer Substanz im Frontalhirn und Veränderungen in der Zusammensetzung der weißen Substanz. Da im Alter physiologischerweise die Atrophie im Frontallappen besonders eindrücklich ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Adipositas den physiologischen Alterungsprozess beschleunigt und verschlimmert. Alles in allem deutet momentan sehr vieles darauf hin, dass Adipositas und damit assoziierte Folgeerkrankungen wie beispielsweise das metabolische Syndrom einen signifikanten Beitrag zu kognitiver Verschlechterung und Beschleunigung von Demenz beisteuern, die genauen Pathomechanismen dahinter sind jedoch nicht abschließend geklärt (Bruce-Keller et al., 2009).

#### 1.4 Komplikationen übergewichtiger Mütter während der Schwangerschaft und langfristige Auswirkungen der Überernährung auf den Nachwuchs

Komplikationen übergewichtiger und adipöser Mütter sind mannigfaltig. Sie beginnen bereits beim Versuch schwanger zu werden, sind während der Schwangerschaft selbst häufig und wirken sich bis ins hohe Alter des Nachwuchses aus (Haslam et al., 2005).

#### 1.4.1 Komplikationen vor und während der Schwangerschaft

Durch die stark erhöhten Östrogenspiegel im Blut kommt es bei Adipösen häufig zu Zyklusanomalien, da es zu einer Beeinträchtigung des hypothalamisch-hypophysären Systems kommt. Hieraus resultiert ein unregelmäßiger und häufig anovulatorischer Zyklus. Sechs Prozent der primären Unfruchtbarkeit sind auf Adipositas zurückzuführen. Aus der Beeinträchtigung der Sexualhormone resultiert häufig auch ein polyzystisches Ovar-Syndrom. Insgesamt ist es daher für adipöse Frauen häufig schwierig überhaupt schwanger zu werden (Pasquali et al., 1997). Analog kommt es auch bei Männern mit steigendem Übergewicht zu erektiler Dysfunktion und Unfruchtbarkeit (Esposito et al., 2004).

Kommt es zur Schwangerschaft, haben adipöse Schwangere ein fünffach erhöhtes Risiko eine Präeklampsie zu erleiden und ein deutlich erhöhtes Risiko für Gestationsdiabetes (Cedergren, 2004; Haslam et al., 2005). Bei morbidem Adipositas erhöht sich zudem die Rate an Totgeburten und es kommt gehäuft sowohl zu Früh- als auch Spätgeburten, Kaiserschnitten und Zangengeburt (Cedergren, 2004). Die Kinder haben zudem ein erhöhtes Risiko für Neuralrohrdefekte und Makrosomie (Haslam et al., 2005).

#### 1.4.2 Langfristige Folgen von Adipositas während der Schwangerschaft für die Nachkommen

Neben den offensichtlichen und direkten Auswirkungen und Risiken hat Adipositas während der Schwangerschaft und Säuge- beziehungsweise Stillzeit auch weniger offenkundige, langfristige Auswirkungen auf die Nachkommen.

So konnte beispielsweise mehrfach gezeigt werden, dass der Nachwuchs adipöser Muttertiere für Adipositas und hiermit assoziierte metabolische Störungen wie der Insulinresistenz prädisponiert ist (Grattan, 2008; Shankar et al., 2008; White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; McGuire et al., 2010). Aber es kommt auch zu vielen weiteren Veränderungen wie strukturelle Veränderungen am Herzen und in den Blutgefäßen sowie einer nicht-alkoholischen Fett-Leber-Erkrankung und einem erhöhten Anteil an viszeralem Fett (Mischke et al., 2013; Williams et al., 2014). Überdies wirken Adipositas und fettreiche Ernährung während der Schwangerschaft sich jedoch auch direkt auf

zentrale biochemische Prozesse aus. So konnten Bilbo et al (2010) zeigen, dass im Nachwuchs besagter Muttertiere sowohl mikrogliale Marker wie CD11b und TLR4 erhöht sind als auch deutlich erhöhte Konzentrationen von IL1 $\beta$  zu verzeichnen waren. Dies ließ sich nicht nur direkt nach Geburt, sondern auch in fortgeschrittenem Alter zeigen. Ebenso waren Biomarker der peripheren Entzündung nachhaltig erhöht.

Mögliche Pathomechanismen hierfür sind epigenetische Veränderungen während der pränatalen Phase, die zu persistierenden metabolischen Veränderungen führen können (Barker, 1995). Ebenso ist davon auszugehen, dass Veränderungen in der Adipokinkonzentration und erhöhte mütterliche Leptinspiegel die Entwicklung des Gehirns beeinflussen (White et al., 2009). Hatanaka und Kollegen (2016) konnten zudem zeigen, dass die synaptische Instabilität im Nachwuchs von fettreich ernährten Mäusen bis ins Erwachsenenalter unabhängig von der eigenen Diät persistiert. Interessanterweise war dies auch der Fall, wenn der Kontakt zu hochkalorischer Diät nur in der Säugephase stattfand. Sie konnten zudem zeigen, dass die Behandlung mit Antioxidantien während der Säugephase die Auswirkungen abmildern kann, eine Assoziation mit oxidativem Stress durch peroxidisierte Lipidakkumulationen ist daher wahrscheinlich (Williams et al., 2014; Hatanaka et al., 2016). Die Thematik ist sehr umfangreich und es gibt bereits zahlreiche wertvolle Erkenntnisse, jedoch sind noch viele Fragen offen und weitere Untersuchungen müssen folgen.

## 1.5 Nicht-publizierte Daten der AG Heneka: Mütterliche Adipositas als Risikofaktor für kognitive Defizite und Demenz beim Nachwuchs

Die vorliegende Arbeit baut auf bislang nicht veröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Heneka auf. Die Ergebnisse werden zum verbesserten Verständnis der vorliegenden Arbeit in diesem Abschnitt kurz vorgestellt.

### 1.5.1 Versuchsaufbau

Weibliche C57/BL6-Wildtyp-Mäuse wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe bekam ab einem Alter von 8 Wochen eine fettreiche, hochkalorische Diät, die andere Gruppe wurde mit Kontrollfutter gefüttert. Nach weiteren zwei Monaten wurden sie mit normalgefütterten, gleichaltrigen heterozygoten APP/PS1<sup>+/-</sup>-C57/BL6-Männchen verpaart. Im Alter von 21 Tagen wurde der Nachwuchs abgesetzt und bis zum vollendeten zweiten Lebensmonat normal gefüttert. Danach wurde jeweils die Hälfte hochkalorisch fettreich ernährt und die andere Hälfte bekam das Kontrollfutter. Auf diese Weise wurden die folgenden acht Gruppen, je beider Geschlechter, generiert:

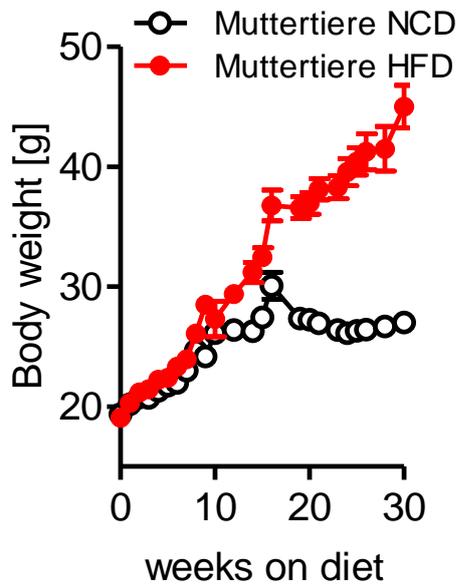
Genotyp	Diät der Mutter	Eigene Diät
APP/PS1 <sup>+/-</sup>	NCD	NCD
APP/PS1 <sup>+/-</sup>	NCD	HFD
APP/PS1 <sup>+/-</sup>	HFD	NCD
APP/PS1 <sup>+/-</sup>	HFD	HFD
Wildtyp	NCD	NCD
Wildtyp	NCD	HFD
Wildtyp	HFD	NCD
Wildtyp	HFD	HFD

**Abb. 3:** Versuchsgruppenbildung des Vor-Experiments. NCD = normal chow diet. HFD = high fat diet

Im Alter von sechs Monaten wurden mit dem Nachwuchs Verhaltensexperimente (open field und Morris-Water-Maze) durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Tiere präpariert und die Gewebe molekularbiologisch und histologisch aufgearbeitet.

## 1.5.2 Ergebnisse: Mütterliche Adipositas als Risikofaktor für kognitive Defizite und Demenz beim Nachwuchs

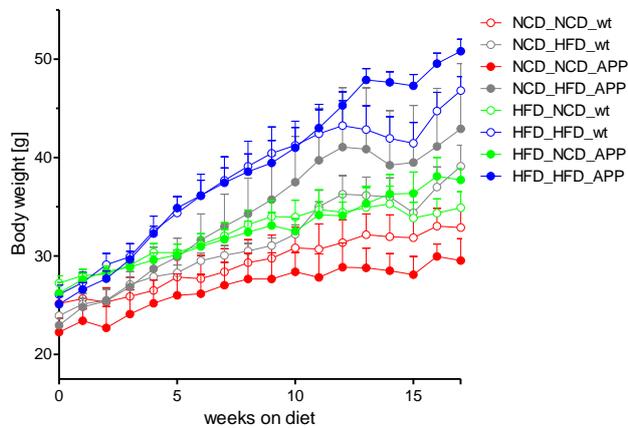
### 1.5.2.1 Gewichtszunahme Muttertiere



**Abb. 4:** Gewichtsverlauf Muttertiere nach Beginn der Futterphase im Alter von 8 Wochen. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet.

Das Körpergewicht der fettreich gefütterten Muttertiere steigt deutlich stärker an, als das Gewicht der Tiere aus der Kontrollgruppe.

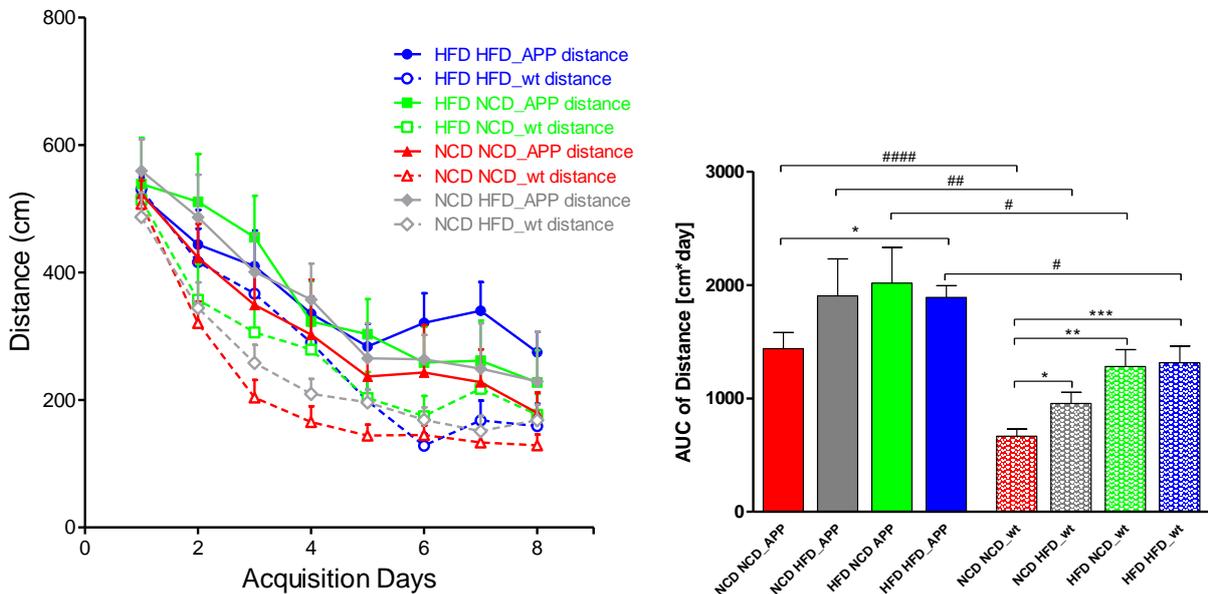
### 1.5.2.2 Gewichtszunahme Nachwuchs



**Abb. 5:** Gewichtsverlauf der Nachkommenschaft. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, app = APP/PS1<sup>+/-</sup>, wt = Wildtyp, die Ernährung an erster Position ist die der Mutter, die an zweiter Stelle die des Nachwuchses.

Auffallend an den Gewichtskurven des Nachwuchses ist, dass das diätinduzierte Übergewicht sich durch mütterliche *high fat diet* vor und während Schwangerschaft und der Säugezeit noch verschlimmert. Dieser Effekt ist sowohl in den APP/PS1<sup>+/-</sup>-Tieren als auch in den Wildtyp-Tieren zu finden.

### 1.5.2.3 Lernverhalten des Nachwuchses im Morris-Water-Maze

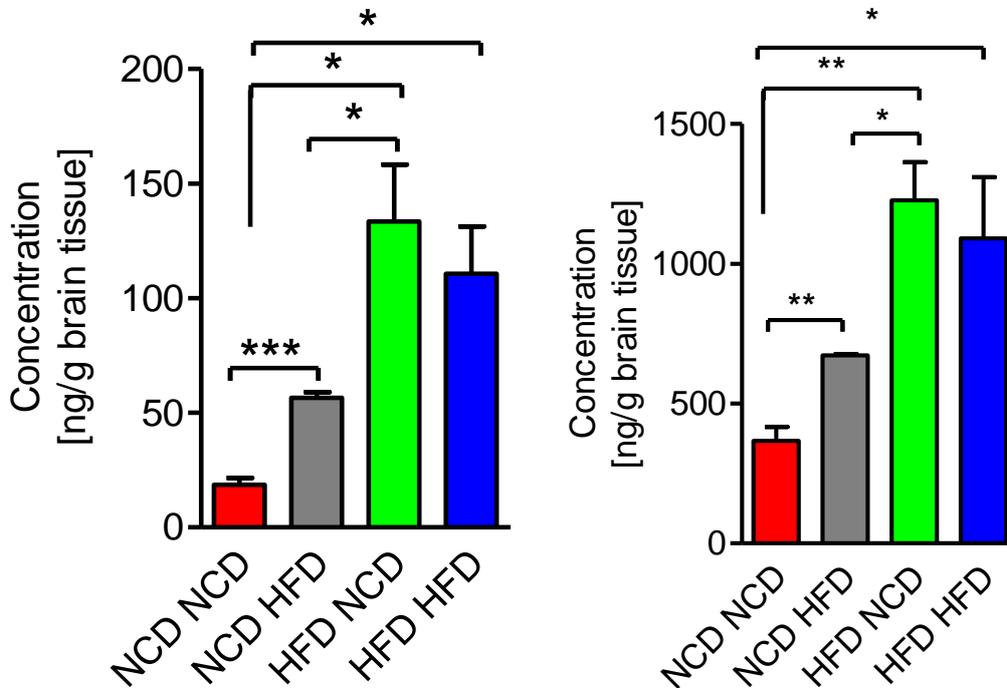


**Abb. 6:** Räumliche Gedächtnisbildung analysiert mit dem Morris-Water-Maze-Versuchs bei Nachkommen normal ernährter Mütter (1. Position NCD) oder fettreich hochkalorisch ernährter Mütter (1. Position HFD), wobei die Nachkommen entweder normal ernährt (2. Position NCD) oder fettreich hochkalorisch ernährt wurden (2. Position HFD). (n = 10-15 Tiere pro Gruppe, ANOVA, pos-hoc TUKEY-test, Vergleich innerhalb der Wildtyp- oder APP/PS1<sup>+/-</sup> Gruppen: \* <0.05, \*\* <0.01, \*\*\* <0.001; Vergleich zwischen APP/PS1<sup>+/-</sup> und Wildtyp Gruppen, # <0.05, ## <0.01, ### <0.001, #### <0.0001)

Fettreiche Ernährung während Schwangerschaft und Säugezeit hat, ebenso wie eine fettreiche Ernährung von Jungtieren, einen negativen Einfluss auf das räumliche Lernvermögen der Tiere im Morris-Water-Maze-Experiment. Dieser Effekt ist insbesondere bei Wildtyp-Tieren signifikant messbar. Dies ist besonders bemerkenswert, da bislang die Daten bezüglich räumlicher Merkfähigkeit von Tieren in diesem Zusammenhang eher heterogen waren und nicht mit den Beobachtungen am Menschen übereinstimmten (Whitmer et al., 2008; White et al., 2009; Bilbo et al., 2010).

### 1.5.2.4 Plaqueload / Neuroinflammation / periphere Inflammation im Nachwuchs

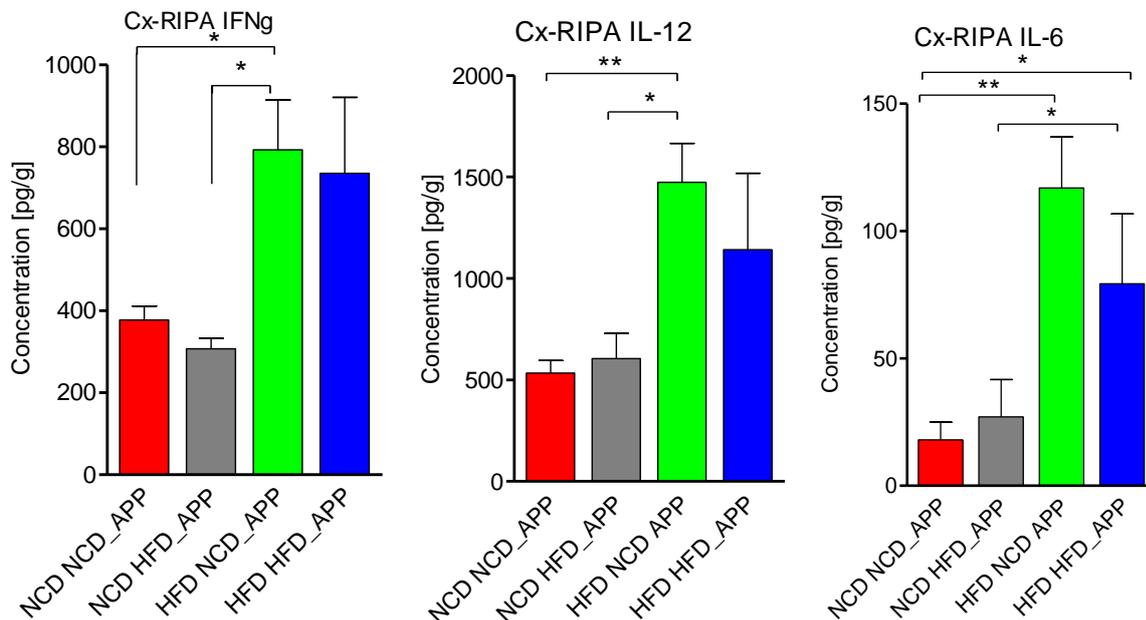
#### Plaqueload



**Abb. 7:** SDS-fraction Aβ1-38 (links) und Aβ 1-40 im Hippocampus bei Nachkommen normal ernährter Mütter (1. Position NCD) oder hochkalorisch fettreich ernährter adipöser Mütter (1. Position HFD), wobei die Nachkommen entweder normal ernährt (2. Position NCD) oder hochkalorisch fettreich ernährt worden (2. Position HFD). (n = 10 - 15 Tiere pro Gruppe, ANOVA, pos-hoc TUKEY-test, Vergleich innerhalb der Wildtyp oder APP/PS1<sup>+/-</sup>-Gruppen : \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001)

In den APP/PS1<sup>+/-</sup>-Tieren zeigten sich deutlich höhere Aβ-Konzentrationen im Bereich des Hippocampus beim Nachwuchs adipöser und fettreich ernährter Mütter. Dieser Effekt war signifikant und unabhängig vom eigenen Lebensstil.

## Neuroinflammation



**Abb. 8:** Entzündungsmarker werden durch maternale hochkalorische Ernährung bzw. Adipositas verstärkt. Kennzeichnung 1. Maternale Diät 2. Nachkommen-Diät (NCD: Normaldiät, HFD: Hochkalorisch fettreiche Diät). Analyse for Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL-4) (n = 10 Hirnhomogenate unterschiedlicher Tiere, ANOVA, pos-hoc TUKEY-test, \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ )

Auch neuroinflammatorische Marker wie IL6, 10 und 12, Cxcl 1 waren im Nachwuchs adipöser Muttertiere signifikant hochreguliert im Vergleich zur Nachkommenschaft der Kontrollgruppe. Auch hier zeigte sich, dass die eigene Ernährung keine entscheidende Rolle auf das Ausmaß hat.

### 1.5.2.5 Grundlage der Hypothese

Die bislang erhobenen Daten zeigen, dass mütterliche Adipositas während Schwangerschaft und Säugezeit die räumliche Merkfähigkeit im erwachsenen Nachwuchs beeinflusst und in transgenen APP/PS1<sup>+/+</sup>-Tieren den Krankheitsverlauf der Alzheimerdemenz signifikant verschlimmert. Es konnten außerdem Effekte auf neuroinflammatorische Parameter im Cortex und Hippocampus gesehen werden. Das Beeindruckende an diesen Daten ist insbesondere, dass diese Veränderungen auch eine Generation später, unabhängig vom eigenen Lebensstil, gefunden werden konnten.

Um die bisherigen Erkenntnisse zu vertiefen, sind weitere Untersuchungen notwendig. So müssen weitere neuroinflammatorische Parameter auf Protein- und RNA-Ebene untersucht werden. Außerdem gilt es immunhistochemisch astrogliale und mikrogliale Aktivierung zu untersuchen. Viele der bisher vorliegenden Untersuchungen wurden nur in den APP/PS1<sup>+/-</sup>-Tieren vorgenommen, die Wildtyp-Mäuse müssen ebenfalls den gleichen Experimenten unterzogen werden.

Des Weiteren muss die genaue Rolle der Säugezeit in einem separaten Experiment untersucht werden.

Ebenso interessant und wichtig wäre es im Anschluss hieran, epigenetische Untersuchungen durchzuführen, um den zugrundeliegenden Pathomechanismus tiefer zu ergründen.

## **2 Fragestellungen und Zielsetzungen der Arbeit**

In der Literatur werden, wie in der Einleitung dargelegt, negative Effekte mütterlicher Adipositas während Schwangerschaft und Säugezeit auf die kognitiven Fähigkeiten des Nachwuchses beschrieben.

Die daraus abgeleiteten Fragestellungen und Zielsetzungen waren im Einzelnen:

- 1) Lassen sich Zeitpunkte oder Zeiträume in der Entwicklung definieren, an denen negative Effekte durch mütterliche Adipositas während Schwangerschaft und Säugezeit auf die kognitiven Fähigkeiten des Nachwuchses übertragen werden?
- 2) Welche Pathomechanismen liegen den in der Literatur beschriebenen negativen Effekten mütterlicher Adipositas während Schwangerschaft und Säugezeit auf die kognitiven Fähigkeiten im Nachwuchs zu Grunde?

Zur Beantwortung der hier genannten Fragestellungen erfolgte zunächst die Weiterführung des unter Kapitel 1.5 beschriebenen Experimentes. Zu diesem Zweck erfolgt die Verwendung der bereits vorhandenen und verarbeiteten Gewebe der in Kapitel 1.5 beschriebener Mäuse. Im Speziellen wurden histochemische Untersuchungen bezüglich der cerebralen Plaquebildung an den weiblichen APP/PS1<sup>+/-</sup>-Tieren zu den bereits beschriebenen Experimenten ergänzt. Zusätzlich erfolgte

immunhistochemisch und auf RNA-Ebene die Untersuchung von Unterschieden glialer Immunreaktion und anderer proinflammatorischer Marker in Mäusen beider Geschlechter. Diese Experimente wurden sowohl an den transgenen APP/PS1<sup>+/-</sup>-Tieren, als auch den Wildtyp-Tieren in den unterschiedlich Versuchsgruppen durchgeführt (vergleiche auch Abbildung 3).

Um die gefundenen Effekte mütterlicher Adipositas besser einordnen zu können und um festzustellen, ob die beschriebenen negativen Auswirkungen auf den Nachwuchs in der frühen postnatalen Phase, sprich während der Säugezeit, oder bereits intrauterin übertragen werden, wurde zudem ein Ammenexperiment durchgeführt. In einem komplexen Versuchsaufbau soll erneut mittels verhaltens- und molekularbiologischer Methoden untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt die negativen Effekte der Adipositas übertragen werden und welcher Pathomechanismus zugrunde liegt. Zu diesem Zweck erfolgt bei der Versuchsgruppenbildung eine Einteilung, die eine Gruppenbildung in Abhängigkeit der mütterlichen Ernährung sowie nach früher postnataler Trennung der Ernährung der Amme beinhaltet. Hierzu werden ausschließlich Wildtypiere (C57/BL6-Mäuse) verwendet (siehe auch Abbildung 9).

### **3 Material und Methoden**

#### 3.1 Tiere

##### 3.1.1 Allgemeine Tierhaltung

Die Tiere wurden unter Standardbedingungen in einzeln belüfteten Käfigen, sogenannten IVC („individually ventilated cages“), der Firma Techniplast gehalten, bei einer Temperatur von 22°C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden. Sie hatten stets freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Tierhaltung erfolgte gemäß der Grundsätze der Deklaration von Helsinki.

### 3.1.2 Wildtyp-Tiere

Die Wildtypiere stammen von Charles River, Sulzfeld. Es handelt sich um C57BL/6J-Mäuse.

### 3.1.3 Verpaarung

Es wurden immer zwei acht Wochen alte C57/BL6-Weibchen (Wildtyp) mit einem gleichaltrigen C57/BL6-Männchen (Wildtyp) verpaart.

## 3.2 Versuchsaufbau

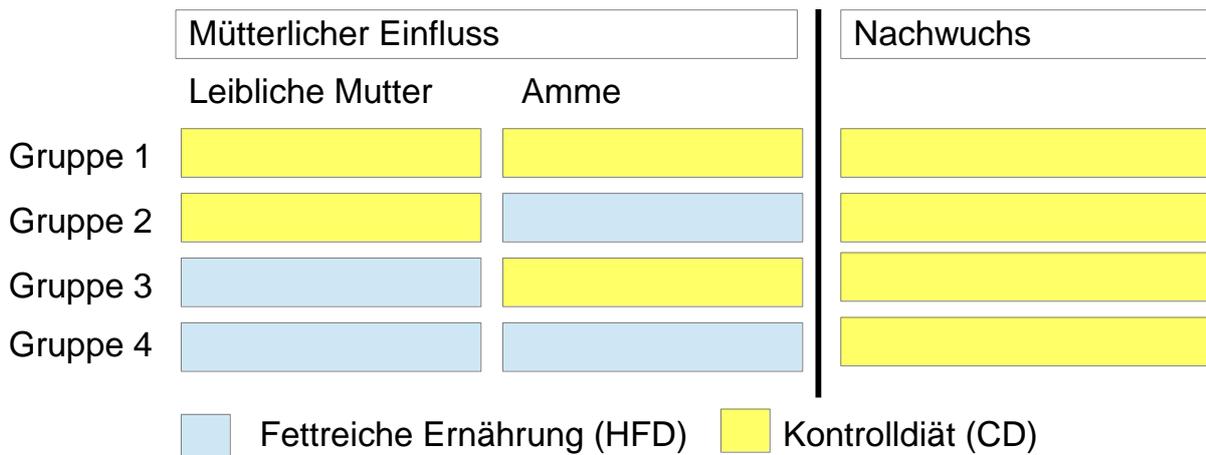
### 3.2.1 Ammenexperiment

#### *Versuchsgruppenbildung*

Sechs Wochen alte C57BL/6J weibliche Wildtyp-Mäuse werden 10 Wochen lang vor der Verpaarung und darüber hinaus während Schwangerschaft und Säugezeit bis ans Ende der verhaltensbiologischen Untersuchungen mit einer 60% Fett enthaltenden ad libitum-Diät beziehungsweise der entsprechenden Kontrolldiät gefüttert. Im Alter von 16 Wochen werden sie mit C57BL/6J Wildtyp-Männchen für eine Woche verpaart. Nach der Geburt wird der Nachwuchs entsprechend dem oben gezeigten Schema von Ammenmüttern gesäugt. Im Alter von 21 Tagen wird er abgesetzt und mit normalem Futter bis zum 6. Monat gehalten.

In der Nachkommenschaft wurden vier verschiedene Versuchsgruppen je beider Geschlechter gebildet. Der Nachwuchs normalgewichtiger, mit Kontrolldiät gefütterter Mütter oder fettreich ernährter, adipöser Mütter wurde entweder von normalgewichtigen oder von fettreich ernährten, adipösen Ammen gesäugt. In diesem Versuch wurden ausschließlich die mütterlichen Konditionen variiert. Kumulativ wurden 40 Weibchen mit 20 Männchen verpaart. Hieraus resultierte am Ende eine Gruppenstärke in der Nachkommenschaft von 29 Weibchen einer mit Kontrolldiät gefütterten Mutter. Von diesen wurden 24 von einer mit Kontrolldiät gefütterten Amme gesäugt und fünf von einer mit hochkalorischer Diät gefütterten Amme. Darüber hinaus wurden 10 Weibchen einer hochkalorisch ernährten Mutter erhalten. Hiervon wurden jeweils fünf von einer Amme mit Kontrolldiät und fünf von einer hochkalorisch ernährten Amme gesäugt.

Beim männlichen Nachwuchs gab es 21 Tiere von Muttertieren, die die Kontrolldiät erhielten. Hiervon wurden 20 deren Amme ebenfalls die Kontrolldiät erhielt und einer von einer hochkalorisch ernährten Amme gesäugt. 12 Männchen entstammten hochkalorisch ernährten Muttertieren, wovon fünf von einer Amme mit Kontrolldiät und sieben von einer Highfat-Diät gefütterten Amme gesäugt werden. Die Nachkommen wurden alle mit dem Kontrollfutter gefüttert. Somit entstehen die folgenden vier Gruppen:



**Abb. 9:** Versuchsgruppenbildung Ammenexperiment.

### 3.2.2 Material und Gewebe des vorangegangenen Experimentes der Arbeitsgruppe Heneka

Wie bereits in Kapitel 2 unter „Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit“ beschrieben, wurden in dieser Arbeit auch Gewebe aus einem bereits zuvor in der Arbeitsgruppe Heneka am Institut für klinische Neurowissenschaften durchgeführten und in Kapitel 1.5 beschriebenen Experiment verwendet. Die Aufzucht der Mäuse, Blutzuckermessung, Fütterung und die Konservierung bzw. Homogenisierung der Gewebe erfolgte analog zu den hier beschriebenen Experimenten, jedoch durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe zu einem früheren Zeitpunkt. Teile des erhaltenen Gewebes wurden bereits vorab bearbeitet. Die Ergebnisse sind bislang nicht publiziert und daher in Kapitel 1.5 kurz dargestellt. Zur Verfügung standen folgende Gruppennzahlen:

**Tab. 1:** Verfügbare Tierzahlen aus dem Vorexperiment

Method	Geschlecht	Genotyp	Diät Mutter	Diät Nachwuchs	Anzahl (n)
Histologie	Weiblich	APP/PS1 <sup>+/-</sup>	Kontrolldiät	Kontrolldiät	5
			Kontrolldiät	Highfat Diät	3
			Highfat Diät	Kontrolldiät	5
			Highfat Diät	Highfat Diät	6
Histologie	Männlich	APP/PS1 <sup>+/-</sup>	Kontrolldiät	Kontrolldiät	3
			Kontrolldiät	Highfat Diät	3
			Highfat Diät	Kontrolldiät	5
			Highfat Diät	Highfat Diät	6
Histologie	Männlich	Wildtyp	Kontrolldiät	Kontrolldiät	5
			Kontrolldiät	Highfat Diät	5
			Highfat Diät	Kontrolldiät	5
			Highfat Diät	Highfat Diät	5
Real time PCR	Männlich	APP/PS1 <sup>+/-</sup>	Kontrolldiät	Kontrolldiät	3
			Kontrolldiät	Highfat Diät	3
			Highfat Diät	Kontrolldiät	5
			Highfat Diät	Highfat Diät	5
Real time PCR	Männlich	Wildtyp	Kontrolldiät	Kontrolldiät	6
			Kontrolldiät	Highfat Diät	6
			Highfat Diät	Kontrolldiät	6
			Highfat Diät	Highfat Diät	7

### 3.3 Monitoring von Gewicht

Ab dem Beginn der zehnwöchigen Fütterungsphase werden die Muttertiere einmal pro Woche, jeweils am gleichen Wochentag zur selben Uhrzeit, bis zum Projektende gewogen. Der Nachwuchs wird ab dem Absetzen einmal wöchentlich bis zum Ende der Projektdauer gewogen.

### 3.4 Fütterung

Die Tiere der Kontrollgruppen wurden mit einer speziellen Kontrolldiät von der Firma Research Diets Inc. gefüttert. Der Kaloriengehalt beträgt 3,85 kcal/g und wird zu 20% von Proteinen, zu 70% durch Kohlehydrate und zu 10% durch Fett erzielt (Produktnummer: D12450B).

Die Tiere, die eine fettreiche Ernährung erhielten, wurden ebenfalls mit speziellem Futter der Firma Research Diets Inc. gefüttert. Es hat einen Kaloriengehalt von 5,24 kcal/g, der sich zu 20% aus Proteinen, zu 20% aus Kohlehydraten und 60% aus Fetten zusammensetzt (Produktnummer: D12492).

Das Futter wurde mindestens alle drei Tage erneuert. Sowohl das frische als auch das zu entsorgende Futter wurde stets gewogen und die Futteraufnahme der Tiere somit sorgfältig dokumentiert.

### 3.5 Blutzuckermessung

Zur Blutzuckermessung wurde ein Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen und mit dem Accu-Check® Aviva-Blutzuckermessgerät in mg/dl ermittelt.

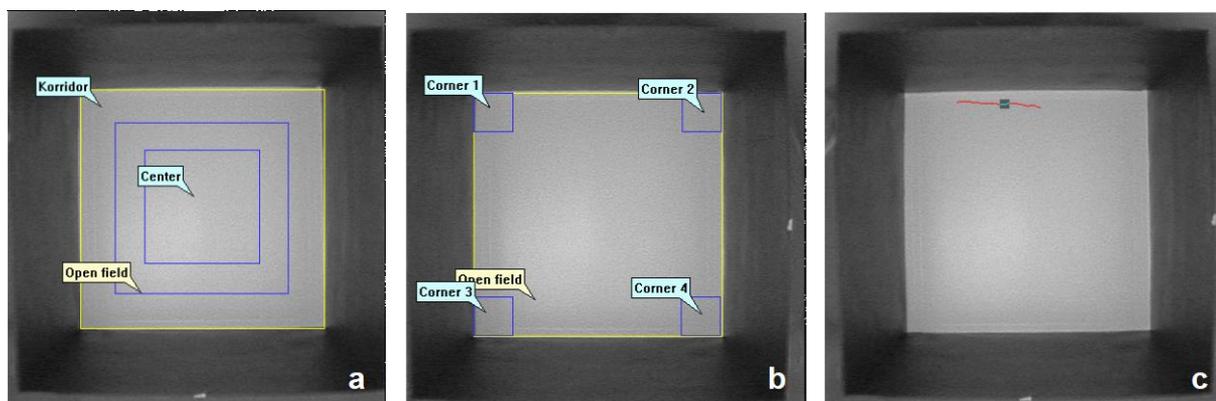
### 3.6 Verhaltensexperimente

Zur Bestimmung kognitiver Fähigkeiten wurden verhaltensbiologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde der Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere 14 Tage vor Beginn der Experimente geändert. Sie waren von 20 Uhr bis 8 Uhr im Hellen und von 8 Uhr bis 20 Uhr im Dunkeln. Mit den Experimenten wurde immer um 10 Uhr begonnen, damit die Tiere während des Experiments in ihrer aktiven Phase waren. Der Nachwuchs hatte zu Beginn der Verhaltensexperimente den sechsten Lebensmonat vollendet. Die Muttertiere waren zu Beginn der verhaltensbiologischen Untersuchungen 11,5 Monate alt.

#### 3.6.1 Open field

Das Open-field-Experiment dient der Untersuchung von Angst- und Explorationsverhalten der Mäuse. Sie werden hierzu für 5 Minuten an drei aufeinanderfolgenden Tagen in eine 60 cm x 60 cm große Holzkiste gesetzt. Der Boden

der Kiste war weiß und von oben schwach erleuchtet, die Wände schwarz. Sie war durch einen Vorhang von der restlichen Umgebung abgetrennt. Das Verhalten der Maus wurde gefilmt und die Daten mittels der Software Ethovision 3.1. von Noldus Information Technology aufgenommen und analysiert. Die Fläche der Kiste wurde virtuell eingeteilt in ein Zentrum, einen Korridor und die 4 Ecken (siehe Abbildung 10). Ermittelt wurden folgende Daten: zurückgelegte Strecke, Zeit im Korridor, Zeit im Zentrum, Zeit in den einzelnen Ecken. Nach jeder Maus wurde die Kiste mit 70 % Ethanol gereinigt und gewartet bis sie wieder trocken war.



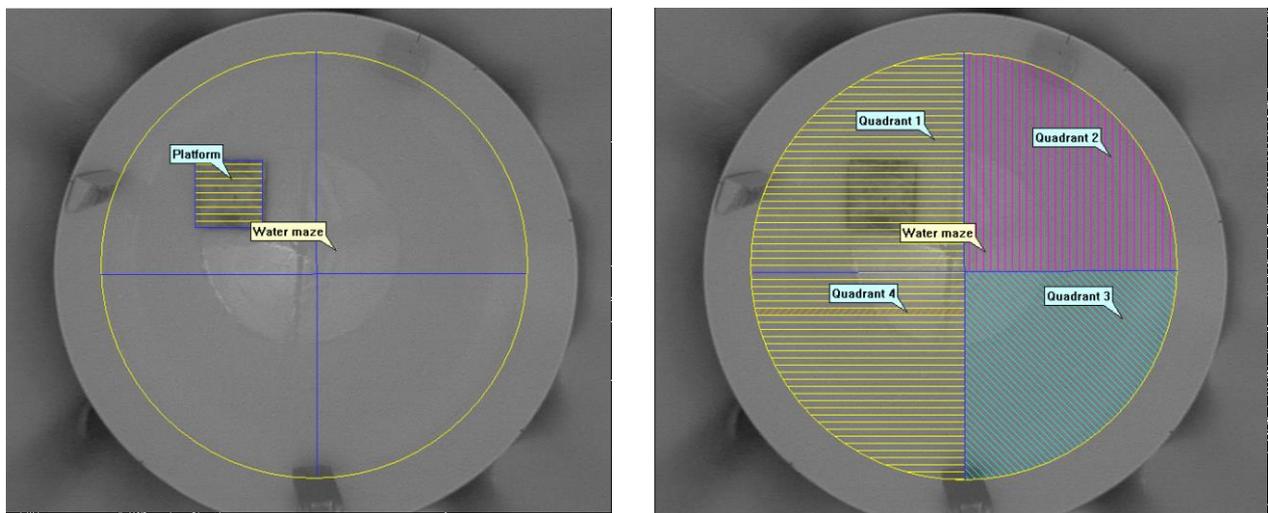
**Abb. 10:** Aufnahme des Open field Versuchssettings in EthoVision 3.1. a: Auswertungszone "center" und "corridor". b: Auswertungszone der "corner 1-4". c: Projektion der Mausbewegung innerhalb eines 10-s-Intervalls

### 3.6.2 Morris-water-maze-Experiment

Das Morris-water-maze-Experiment dient der Untersuchung räumlicher Merkfähigkeit von Mäusen. Hierzu wurde ein Wasserbad mit 1 m Durchmesser verwendet. Es war mit getrübbtem 24 °C warmem Wasser gefüllt, schwach erleuchtet und von einem weißen Vorhang umgeben. Das Becken wurde virtuell in vier Quadranten geteilt, von denen einer eine 15 x 15 cm große Plattform, circa 1,5 cm unterhalb der Wasseroberfläche enthielt. Die Mäuse wurden über insgesamt 6 Tage trainiert die Plattform zu finden. Zur räumlichen Orientierung dienten asymmetrisch am Beckenrand angebrachte Hinweisgegenstände. Die Mäuse hatten pro Lauf 40 s Zeit die Plattform zu finden. Schafften sie es in dieser Zeit nicht, wurden sie danach von Hand auf die Plattform gesetzt und dort für 15 s belassen, bevor der nächste Lauf losging. Insgesamt wurden 4 Läufe pro Tag durchgeführt. Die Mäuse machten 6 Tage lang 4 Läufe, am 7. Tag, 24 h

nach dem letzten Trainingslauf, fand der sogenannte *Probe-Trial* statt. Hier wird die Plattform entfernt und die Maus 30 s schwimmen gelassen. Die Maus wurde mit dem Kopf zur Wand zwischen den dritten und vierten Quadranten ins Becken gesetzt. Die relevanten Daten sind die Zeit, die die Maus prozentual in Quadrant 1 verbringt, also dem, in dem die anderen Tage die Plattform stand. Am Nachmittag des selben Tages werden alle räumlichen Hinweise am Beckenrand entfernt und die Plattform sichtbar mit einem optischen Hinweis versehen in einen anderen Quadranten (Quadrant 4) positioniert und die Zeit gemessen, die die Maus braucht, um die Plattform zu erreichen.

Alle Mausbewegungen werden mithilfe der Software EthoVision 3.1 (Noldus) aufgezeichnet, die zurückgelegten Entfernungen berechnet und analysiert.



**Abb. 11:** Quadranteneinteilung des Morris-Water-Maze und Position der Plattform.

### 3.7 Narkose, Blutentnahme, Perfusion und Gewebepreparation

Nach Abschluss der Verhaltensexperimente wurden die Tiere präpariert.

Zunächst wurden die Mäuse einzeln mit Isofluran tief sediert. In Narkose wurde ihnen 1 - 2 ml Blut aus der Vena cava inferior entnommen. Danach wurden 15 ml 4 °C kaltes PBS zur Perfusion der Gewebe in den linken Ventrikel mit möglichst niedrigem Druck infundiert, zum Druckausgleich wurde das rechte Atrium inzidiert. Nach der Perfusion wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn auf Eis aus dem Schädelknochen präpariert. Eine Hemisphäre wurde in 4 % Paraformaldehyd zur histologischen

Weiterbearbeitung fixiert, bei der anderen Hälfte wurde je nach Experiment entweder Hippocampus und Cortex präpariert und separat in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.8 Histologische Untersuchungen

#### 3.8.1 Konservierung / Schneiden

Nach 24 Stunden wurden die Hemisphären vom 4 % Paraformaldehyd in PBS + 0,02 %  $\text{NaN}_3$  überführt. Für die histologischen Untersuchungen wurden von den Hemisphären dann 40  $\mu\text{m}$  dünne sagittale Schnitte mit einem Leica VT1000S Vibratom angefertigt, welche wiederum in PBS + 0,02 %  $\text{NaN}_3$  bei 4 °C gelagert wurden.

#### 3.8.2 Immunhistochemie: CD11b und GFAP-Kofärbung

Für immunhistochemische Färbungen wurden vier Schnitte pro Tier verwendet. Zuerst wurden sie zehn Minuten lang mit 50 % Methanol zur Fixierung behandelt, im Anschluss daran zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und einmal 5 min in PBST (PBS + 0,1 % Triton X 100) zur Permeabilisierung. Danach wurde für 60 Minuten mit 20 % Goatserum geblockt. Im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht mit den primären Antikörpern gegen CD11b und GFAP inkubiert. Der CD11b-Antikörper stammt von der Firma Serotec, sein Host ist Ratte und er wurde 1:200 in 5 % Goatserum verdünnt. Der GFAP-Antikörper wurde von der Firma Dako bezogen, sein Host ist Kaninchen. GFAP wurde in einer 1:800 (in 5 % Goatserum) Verdünnung eingesetzt. Es wurde eine Ko-Färbung durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte dreimal für zehn Minuten in PBST gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper (594-Goat-anti-rabbit, 1:400 in 5 % Goatserum, Invitrogen; 488-Goat-anti-rat, 1:400 in 5 % Goatserum, Invitrogen) versehen und für 90 Minuten inkubiert. Als nächstes wurden die Schnitte dann erneut drei Mal für 10 Minuten in PBST gewaschen und einmal für 5 Minuten in PBS. Im Anschluss wurden sie auf Objektträger gezogen, getrocknet und mit Immumount plus Hoechst (5  $\mu\text{g/ml}$  Bisbenzimid H33342) eingedeckelt.

Die Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte mit einem Olympus BX61-Mikroskop. Die Aufnahmen erfolgten in 4x und 20x Vergrößerung vom parietalen und frontalen Cortex sowie dem Hippocampus.

Die Bildbearbeitung wurde mit Cell-P (Olympus) durchgeführt und zur Quantifizierung wurde ImageJ von Mac Biophotonics verwendet.

### 3.8.3 Thioflavin-S-Färbung

Pro Tier wurden drei Schnitte verwendet. Zunächst wurden sie für fünf Minuten in PBS gewaschen, danach 15 Minuten mit 50 % Methanol und 5 Minuten mit 50 % Ethanol behandelt. Im Anschluss daran erfolgte die 10minütige Inkubation mit 0,015 % Thioflavin-S Lösung. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten lang mit 50 % Ethanol und einmal 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und für einige Stunden getrocknet und dann sofort mikroskopiert. Die Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte wieder mit einem Olympus BX61 Mikroskop und es wurden Aufnahmen in 4x Vergrößerung von parietalem und frontalem Cortex sowie dem Hippocampus gemacht. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software Cell-P von Olympus und die Quantifizierung der Plaques mit ImageJ von Mac Biophotonics.

### 3.9 Homogenisierung

Schockgefrorene Hemi-Cortices und Hemi-Hippocampi wurden auf der Feinwaage gewogen. Pro 150 mg Gewebe wurde 1 ml Homogenisationspuffer (PBS, 5 mM NaF, 20 mM Sodumpyrophosphat, 1 mM AEBSF) hinzugegeben. Dann wurde das Gewebe mit einem PeqLab Precellys©24 Homogenisator homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde abpipettiert und schockgefroren in flüssigem Stickstoff. Danach wurde es wie unter 2.11 beschrieben weiter bearbeitet. Auf den Rest wurden 500 µl TRIzol® Reagent (Life Technologies) gegeben und er wurde bei – 80 °C tiefgefroren. Danach wurde er wie unter 2.10 beschrieben weiter verarbeitet.

### 3.10 Untersuchung auf RNA-Ebene

#### *RNA-Isolation*

Die RNA wurde mit der Trizol-Methode isoliert, erstmals beschrieben durch Chomczynski und Sacchi 1987 (Chomczynski et al., 1987), gemäß dem von Invitrogen / Life Technologies bereit gestelltem Protokoll. Die RNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop 1000 (PeqLab) spektrophotometrisch bestimmt.

#### *Umschreibung in cDNA*

Es wurden 2 µg RNA zu cDNA umgesetzt. Für die Proben aus dem Vor-Experiment wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit von Fermentas verwendet, für die Proben aus dem Ammenexperiment wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (#1642) von Thermo Scientific verwendet. Die Umschreibung erfolgte gemäß der Anleitung des jeweiligen Herstellers.

#### *GAPDH-PCR*

Zur Qualitätskontrolle wurde eine einfache GAPDH-PCR durchgeführt, um zu sehen, dass in allen Proben cDNA vorhanden ist.

#### *Präamplifikation*

Präamplifikation ist die gleichwertige Amplifizierung von Targets im Vorfeld der eigentlichen real-time PCR. Sie ermöglicht es geringe Mengen von RNA zu untersuchen. Wir führten sie mit dem TaqMan PreAmp MasterMix Kit (Applied Biosystems) gemäß dem von der Firma bereit gestellten Protokoll durch. Der Pooled Assay Mix setzte sich aus folgenden TaqMan™ GeneExpression Assays von Applied Biosystems zusammen: GAPDH, Ptsg1, Ptsg2, IL-1β, IL-6, Ccl2, Ccl3, TNFα, NOS2, TLR6, TLR4, Cxcl1, CD36, IL-18, IL-12, INFγ und GFAP (nur im Ammenexperiment). Es wurden 250 ng cDNA eingesetzt und 14 Präamplifizierungs-Zyklen durchgeführt.

#### *Quantitative real-time-PCR*

Die Real-time-quantitative PCR wurde mit dem StepOnePlus Real-Time-PCR System (Applied Biosystems) unter Verwendung des GeneExpression MasterMix (Applied Biosystems) durchgeführt. Die präamplifizierte cDNA wurde 1:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und dann 5 µl pro Reaktion zugegeben. Pro Reaktion wurden außerdem 7,5 µl MasterMix, 1,75 µl RNase-free H<sub>2</sub>O und 0,75 µl der TaqMan™ GeneExpression Assays (Applied

Biosystems) für GAPDH, Ptsg1, Ptsg2, IL-1 $\beta$ , IL-6, Ccl2, Ccl3, TNF $\alpha$ , NOS2, TLR6, TLR4, Cxcl1, CD36, IL-18, IL-12, INF $\gamma$  und GFAP (nur im Ammenexperiment). Die Targets wurden simultan bestimmt. Die mRNA Expressions-Werte wurden mit dem Level der GAPDH-Expression normalisiert. Die Analyse erfolgte mit der StepOne 2.2 Software von Applied Biosystems.

### 3.11 Untersuchung auf Protein-Ebene / RIPA / BCA / Western Blot

#### *RIPA-Fraktion*

Zur Untersuchung auf Proteinebene wurde zunächst aus dem Homogenat die RIPA-Fraktion erstellt. Hierzu wurden je 50  $\mu$ l Homogenat und 50  $\mu$ l 2x RIPA zusammen gegeben, kräftig gevortext und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde es in der Ultrazentrifuge bei 100000 xg und 10 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde als RIPA-Fraktion abpipetiert und das Pellet verworfen.

#### *Bestimmung der Protein-Konzentration*

Die Protein-Konzentration der RIPA-Fraktion wurde mittels BCA („bichinonic acid“-Protein-Assay (Pierce® BCA Protein Assay Kit) bestimmt und mit dem Magellan© gemessen.

#### *Western Blot (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)*

Pro Lane wurden 30 ng Protein und 3,6  $\mu$ l SDS-Ladepuffer (Invitrogen) eingesetzt, das Ganze wurde mit Millipore-Wasser auf 12  $\mu$ l Volumen aufgefüllt und gevortext. Es wurden NuPage-Bis-Tris-Gele selbst in Gelkammern der Firma Invitrogen gegossen. Da alle zu detektierenden Proteine ein Molekulargewicht kleiner 100 kDa hatten, wurde als Laufpuffer NuPage ©MES gewählt und die Proteine bei 160 V aufgetrennt. Als Protein-Ladder wurden 4  $\mu$ l Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Anschließend wurde das Gel auf eine 0,45  $\mu$ m Nitrocellulose Membran geblottet. Der Blottingpuffer enthielt 25mM Bicine, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA und 15 % Ethanol. Geblottet wurde für 90 Minuten bei 250 mA. Nach dem Blotten wurde die Membran eine Stunde lang mit BSA geblockt und danach mit der Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle). Anschließend wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen. Dann wurden die Membran mit dem Zweitkörper

(goat-anti mouse oder goat-anti-rabbit, 690 oder 800) versehen und für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss daran wurde sie zwei Mal für fünf Minuten mit TBST und einmal mit TBS gewaschen und anschließend mit dem Licor© entwickelt. Die Analyse der optischen Dichte erfolgte mit der Software Image Studio 2.0 (Licor©). Die gemessenen Werte wurden mit  $\alpha$ -Tubulin normalisiert.

**Tab. 2:** Übersicht über die Erstantikörper bei Western Blots

Name	Firma	Host	Verdünnung	Proteingröße
PSD-95	Abcam (7E31B8)	Maus	1:1000	100 kDa
ARC	Cayman (160737)	Kaninchen	1:1000	30 kDa
$\alpha$ -Tubulin	Calbiochem Cat# CP06	Maus	1:1000	50 kDa

### 3.12 Statistische Analysen

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu bestimmen, wurde ein One-way ANOVA, gefolgt von einem Tukey's post hoc-Test, angewendet. Im Falle von nur zwei zu vergleichenden Gruppen wurde ein unpaired t-test durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde mit einem P-Wert von  $p \leq 0,05$  definiert. Alle Daten sind im arithmetischen Mittel  $\pm$  SEM angegeben.

### 3.13 Tierversuchsgenehmigung

Die in der Arbeit durchgeführten Tierversuche erfüllen die Bedingungen des Tierversuchsantrages „Mütterliche Adipositas als Risiko für die Entwicklung einer Alzheimer Demenz“. Aktenzeichen 87-51.04.2010.A242.

## 4 Ergebnisse

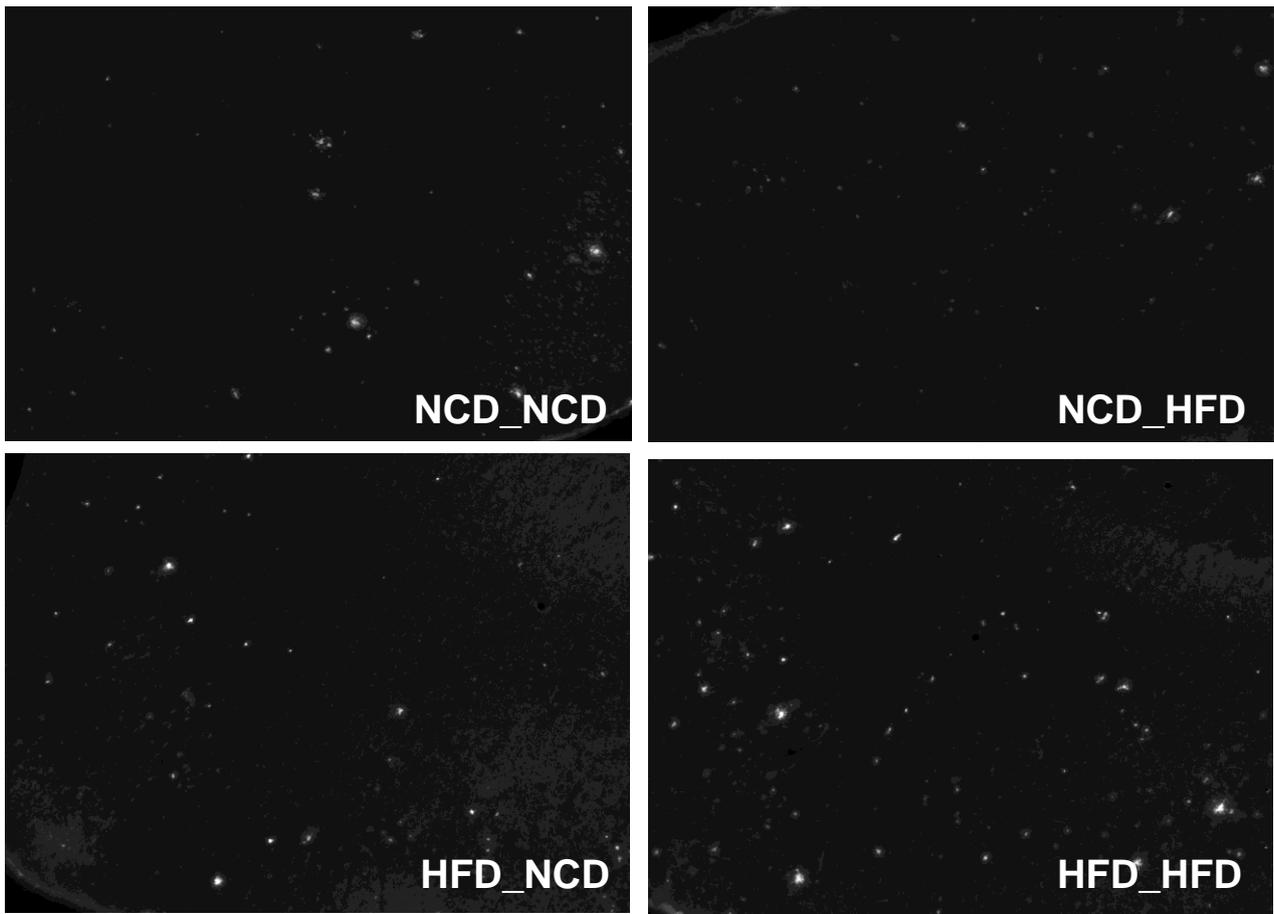
Die Ergebnisse werden in der Reihenfolge der in Kapitel 2 vorgestellten Projekte vorgestellt.

### 4.1 Ergänzende Auswertungen aus dem Vor-Experiment

#### 4.1.1 Thioflavin-S-Färbungen

Zur Evaluation potentieller Unterschiede hinsichtlich cerebraler Amyloid-beta Plaques zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen des weiblichen Nachwuchses der APP/PS1<sup>+/-</sup>- Weibchen (siehe auch Abbildung 3 und Tabelle 1), erfolgte die histochemische Färbung mit Thioflavin-S von Hippocampus und frontalem Cortex im Alter von 6 Monaten. Hierzu wurden 40µm dicke Paraformaldehydschnitte in 4x Vergrößerung verwendet. Pro Tier wurden jeweils drei Schnitte gefärbt, untersucht und ausgewertet.

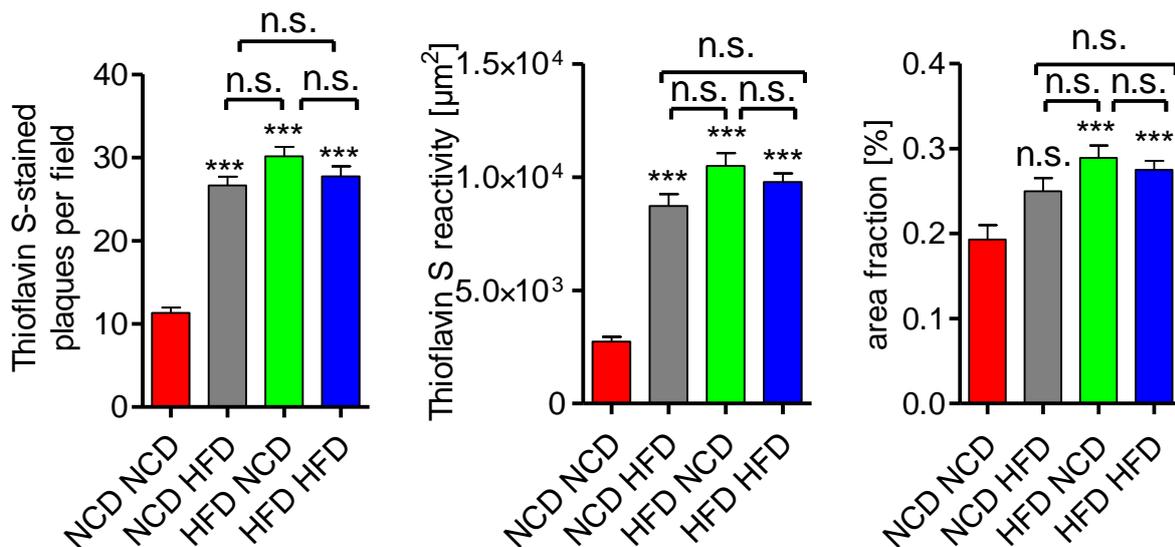
Eine repräsentative Auswahl von Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen des Kortex des weiblichen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchses nach Färbung mit Thioflavin-S ist in Abbildung 12 zu sehen. In Abbildung 14 ist eine exemplarische Auswahl von Aufnahmen der gleichen Färbung des Hippocampus derselben Tiere dargestellt. Die Thioflavin-S-gefärbten Anteile sind die weiß aufleuchtenden Elemente innerhalb der in Graustufen dargestellten Hirnstrukturen. Es zeigt sich sowohl in Abbildung 12, als auch in Abbildung 14 bereits visuell eine vermehrte Darstellung Thioflavin-S gefärbter Anteile in den Gruppen, die entweder bei der mütterlichen Diät und/ oder in der eigenen Ernährung highfat-Diät erhielten (NCD\_HFD, HFD\_NCD, HFD\_HFD).



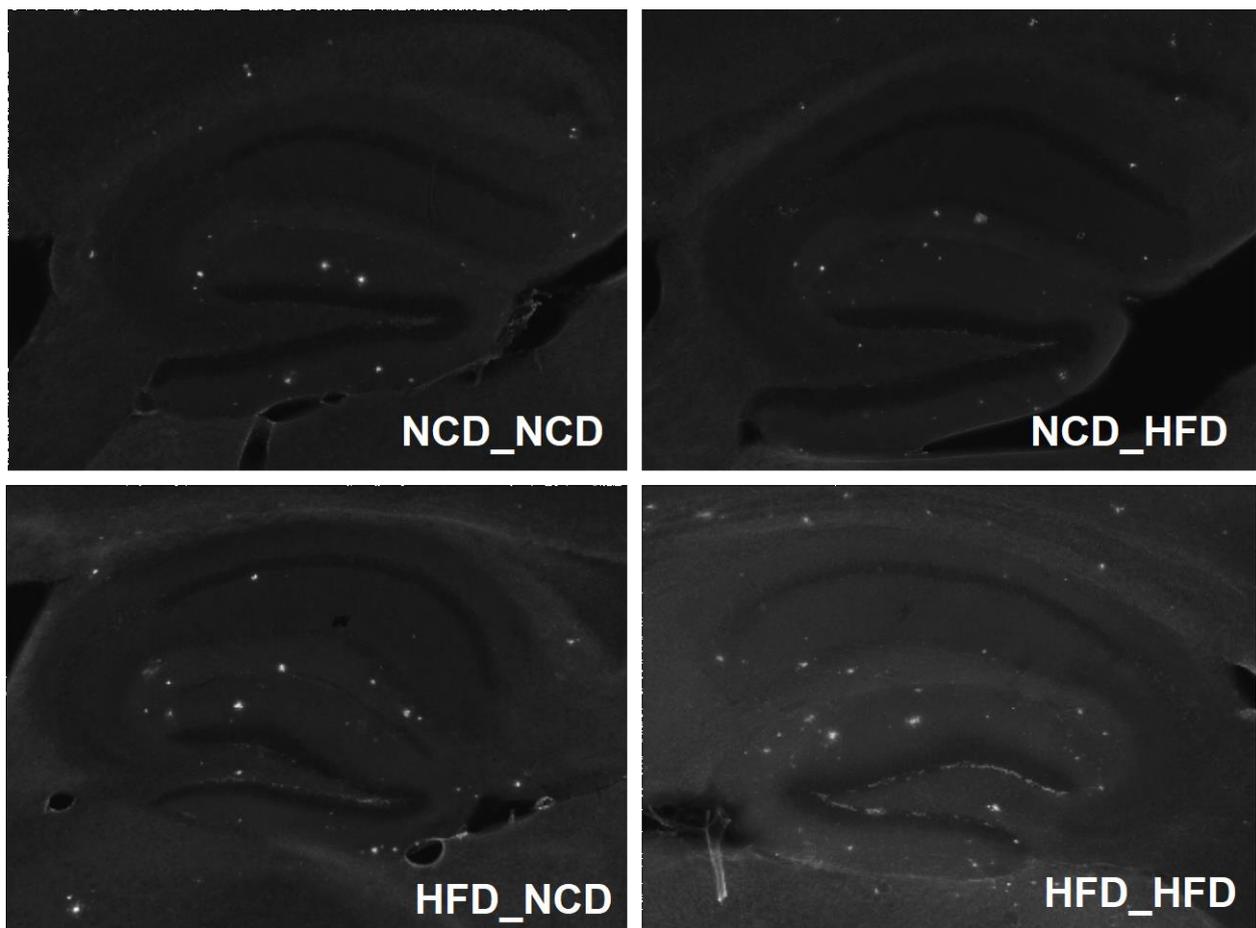
**Abb. 12:** Repräsentative Abbildung der Thioflavin-S Färbung des Kortex des weiblichen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchs. Aufgenommen in 10x Vergrößerung. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet; erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6. Bildbearbeitung mit cell P (Olympus, Tokio, Japan) und Quantifizierung mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Es zeigt sich visuell eine vermehrte Darstellung Thioflavin-S gefärbter Anteile in den Gruppen, die entweder bei der mütterlichen Diät und/ oder in der eigenen Ernährung highfat-Diet erhalten haben.

Der bereits in Abbildung 12 erhaltene subjektive Eindruck, der vermehrten Amyloid-beta Plaquebildung in den Gruppen, die hochkalorische Diät bei der Mutter beziehungsweise in der eigenen Ernährung hatten, bestätigt sich in der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Thioflavin-S der Kortizes. Diese findet sich in Abbildung 13. Auf der X-Achse sind jeweils die Versuchsgruppen innerhalb des weiblichen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchs aufgetragen, auf der Y-Achse die Thioflavin-S-gefärbten Amyloid-beta-Plaques, die Reaktivität und die prozentualen Oberflächenanteile pro Gesichtsfeld. Hier zeigt sich nach Bildung der Mittelwerte  $\pm$  SEM in der einfaktoriellen Varianzanalyse und dem Tukey's post-hoc-Test, dass sowohl die

Anzahl der Plaques als auch die Signalstärke pro Gesichtsfeld in den beiden Gruppen mit adipösen Muttertieren signifikant erhöht ist im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch in der Gruppe mit normal ernährten Muttertieren und eigener fettreicher Diät sind die Anzahl der Plaques und die Signalstärke pro Gesichtsfeld im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei den prozentualen Oberflächenanteilen bestehen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, deren Muttertiere die hochkalorische Diät erhalten haben (HFD\_NCD; HFD\_HFD) im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Gruppe, deren Muttertiere Kontrolldiät erhielt und die eigene Ernährung fettreich war (NCD\_HFD) ist im Vergleich zu allen anderen Gruppen in dieser Analyse nicht signifikant unterschiedlich. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit fettreich ernährten Muttertieren finden sich hinsichtlich der drei untersuchten Merkmale Anzahl der Plaques, Signalstärke und prozentualer Oberflächenanteile nicht.



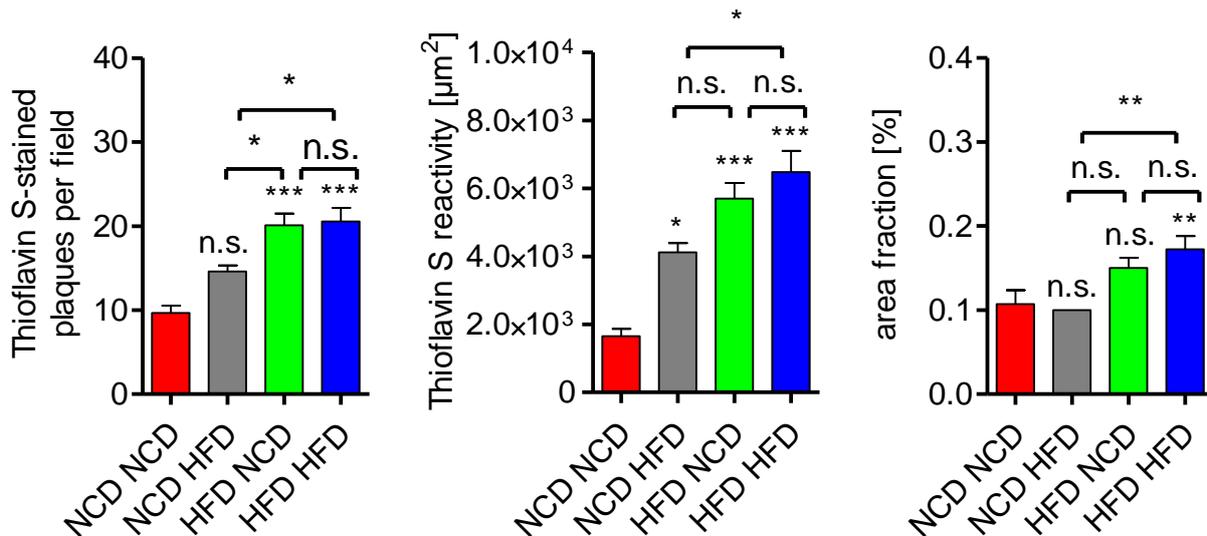
**Abb. 13:** Kortex, weiblicher APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchs. Plaque Anzahl-pro-Gesichtsfeld links, Thioflavin-S-Signalstärke mittig, prozentuale Oberflächenanteile rechts. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet. One-way ANOVA und Tukey's post hoc-Test,  $p < 0,0001$  \*\*\*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6.



**Abb. 14:** Repräsentative Abbildung der Thioflavin-S Färbung des Hippocampus des weiblichen APP/PS1<sup>+/-</sup> Nachwuchs Aufgenommen in 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet; erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit cell P (Olympus, Tokio, Japan) und Quantifizierung mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Das Bild zeigt visuell eine deutlich vermehrte Darstellung Thioflavin-S-gefärbter Anteile für die NCD-HFD, HFD\_NCD, HFD\_HFD-Gruppe gegenüber der NCD\_NCD-Gruppe.

Die statistische Auswertung der Thioflavin S-Färbung der Hippocampi des weiblichen APP/PS1<sup>+/-</sup> Nachwuchs ist in Abbildung 15 grafisch dargestellt. Auf der X-Achse sind die verschiedenen Ernährungsgruppen aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Anzahl der Plaques pro Gewichtsfeld, die Signalstärke in Quadratmikrometern und die prozentualen Oberflächenanteile innerhalb eines Hippocampus. In der statistischen Auswertung der Hippocampi mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Tukey's post hoc Test zeigt sich, dass sowohl die Anzahl der Thioflavin-S-gefärbten Plaques als auch die gefärbte Fläche pro Hippocampus in den beiden Gruppen mit adipösen Muttertieren signifikant erhöht ist im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Gruppe mit normal ernährten Muttertieren und

eigener fettreicher Diät. Signifikante Unterschiede bestehen zudem im Vergleich der beiden Gruppen mit fettreich ernährten Muttertieren und der Gruppe, in der nur der Nachwuchs fettreich ernährt wurde. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit fettreich ernährten Muttertieren zeigen sich nicht.



**Abb. 15:** Hippocampus, APP/PS1<sup>+/-</sup> weiblicher Nachwuchs. Plaque Anzahl pro Hippocampus links, Thioflavin-S-Signalstärke mittig, prozentuale Oberflächenanteile rechts. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchs. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet. One-way ANOVA und Tukey's post hoc-Test,  $p < 0,0001$  \*\*\*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6.

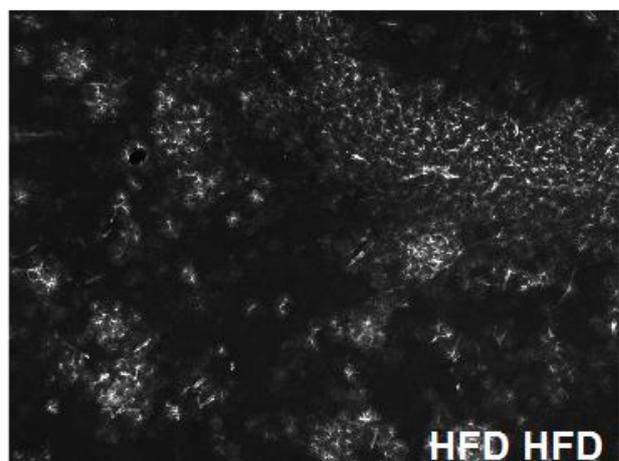
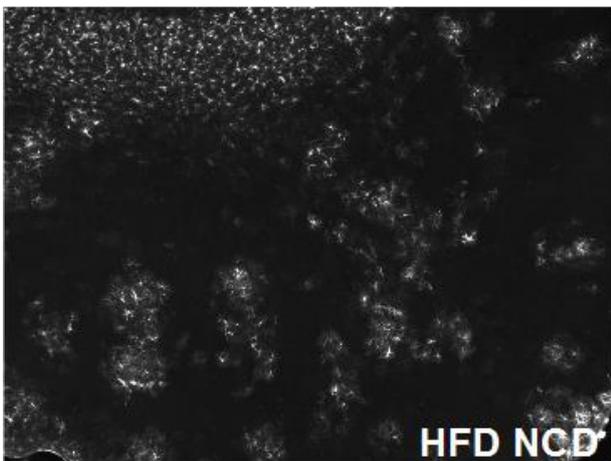
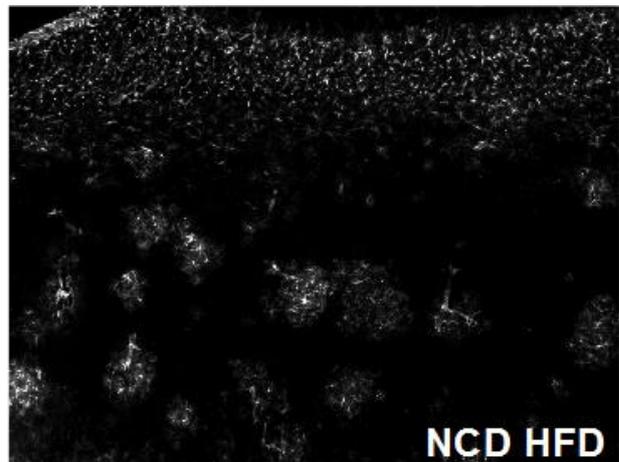
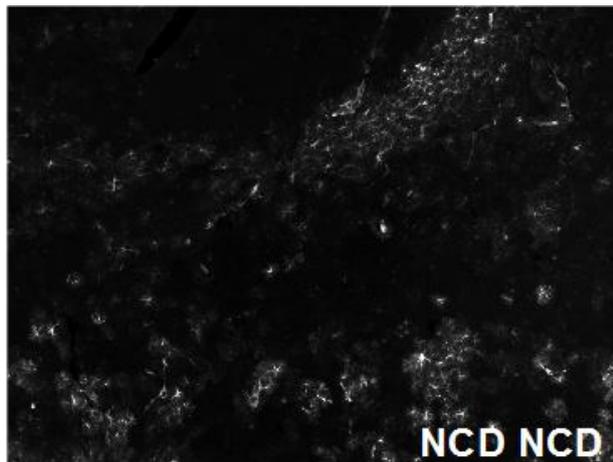
#### 4.1.2 GFAP-Färbung

Ein potentieller Pathomechanismus der Entstehung Adipositas-vermittelter kognitiver Defizite ist die Neuroinflammation, daher erfolgt die Untersuchung möglicher Unterschiede der glialen Immunreaktivität. Hierzu wurden 40 $\mu\text{m}$  Paraformaldehydschnitte des männlichen Nachwuchs im Alter von 6 Monaten (sowohl die Wildtyptiere als auch die APP/PS1<sup>+/-</sup> Tiere), der jeweils vier Versuchsgruppen (normale Diät des Muttertieres und normale bzw. fettreiche Diät des Nachwuchs, fettreiche Diät des Muttertieres und normale bzw. fettreiche Diät des Nachwuchs; siehe auch Abbildung 3) mit Antikörpern gegen das saure Gliafaserprotein (glial fibrillary acidic protein, GFAP) gefärbt, um so Astrogliazellen darzustellen. Es wurden 3 Schnitte

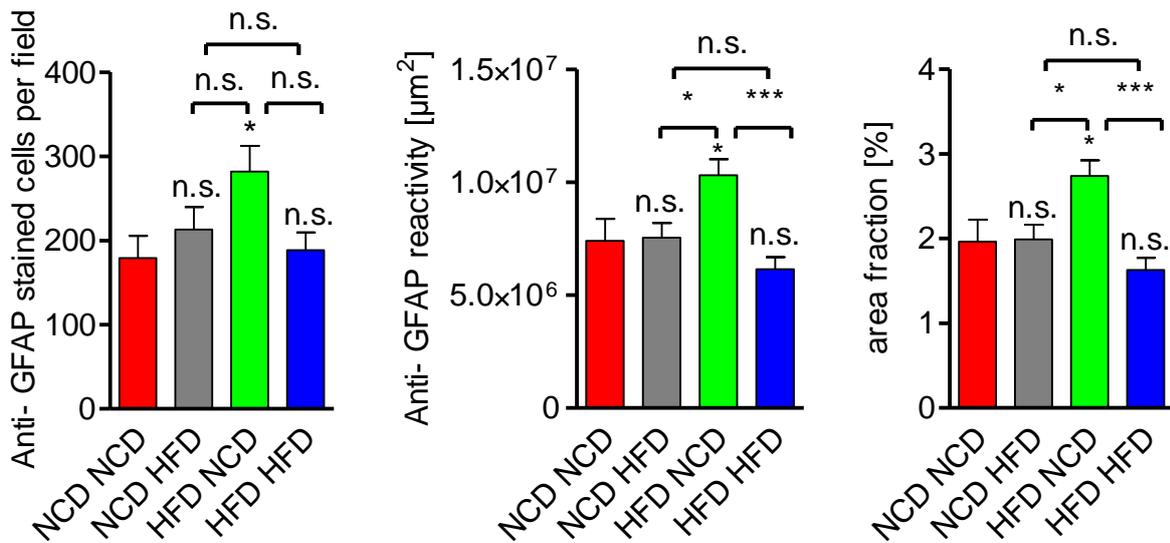
pro Tier in 4x Vergrößerung untersucht. Die Bilder wurden mit der Software von cell P (Olympus, Tokio, Japan) bearbeitet und mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA) quantifiziert. Es erfolgte die Bestimmung der gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld, der Signalstärke und der prozentualen Oberflächenanteile.

#### 4.1.2.1 GFAP-Auswertung des männlichen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchs

Zunächst erfolgt die Darstellung von mikroskopischen Aufnahmen des Kortex des männlichen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchses nach Antikörperfärbung mit anti- GFAP zur Darstellung der glialen Immunreaktion in Abbildung 16. Abbildung 18 ist eine exemplarische Auswahl von Bildern der gleichen Färbung des Hippocampus derselben Tiere zu sehen. Die verästelten weiß aufleuchtenden Strukturen sind die angefärbten Anteile der Astrozyten, das eigentliche Hirnparenchym ist in Graustufen visualisiert. Rein visuell scheint die gliale Aktivität in der Kontrollgruppe geringer, als in den anderen Gruppen.



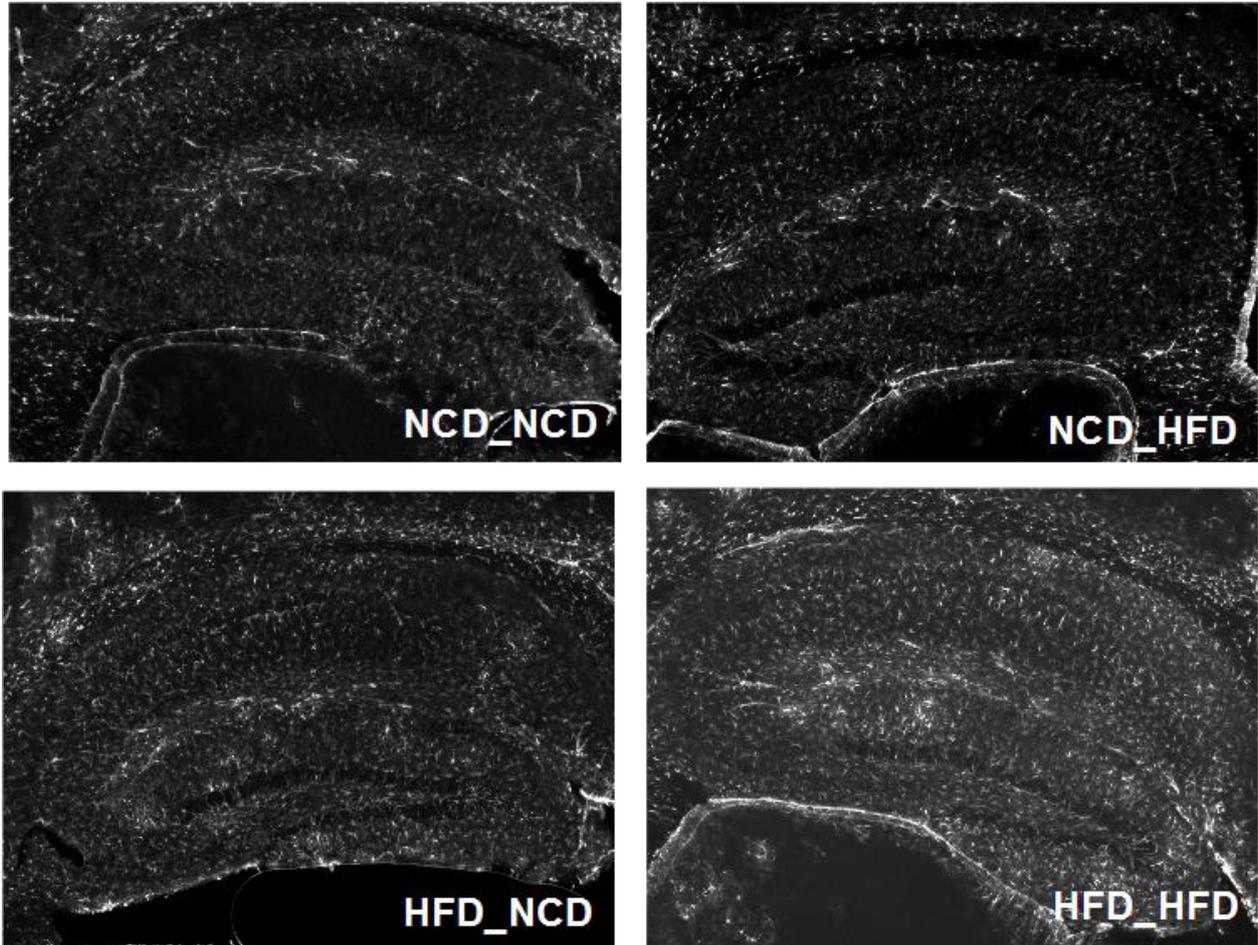
**Abb. 16:** Repräsentative Darstellung Anti-GFAP Färbung der Kortizes der APP/PS1<sup>+/-</sup>-Männchen. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit cell P (Olympus) und Quantifizierung mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Gefärbte Anteile erscheinen weiß, die übrigen Hirnstrukturen sind in Graustufen abgebildet. Rein visuell scheint die gliale Aktivität in der Kontrollgruppe geringer, als in den anderen Gruppen (HFD\_HFD, HFD\_NCD, NCD\_HFD).



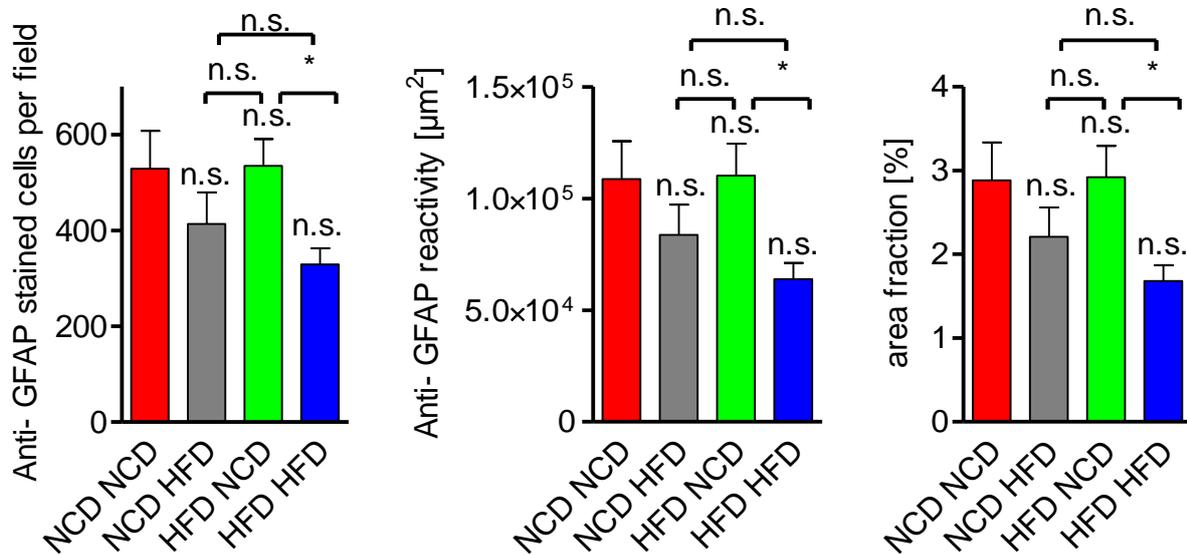
**Abb. 17:** Anti-GFAP gefärbte Zellen im Kortex pro Gesichtsfeld (links), Anti-GFAP-Reaktivität pro Gesichtsfeld (mittig), Anti-GFAP Area-fraction (rechts) bei 10x Vergrößerung. Untersucht wurden die APP/PS1<sup>+/-</sup>-Männchen. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,0001$  \*\*\*,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6.

Die Ergebnisse der GFAP-Färbung der APP/PS1<sup>+/-</sup>-Männchen sind in Abbildung 17 abgebildet. Die Abbildung zeigt auf der X Achse die jeweiligen Gruppen der APP/PS1<sup>+/-</sup>-Männchen, auf der Y-Achse die anti-GFAP gefärbten Zellen, die anti-GFAP Signalstärke in Quadratmikrometer sowie die prozentualen Oberflächenanteile. In der quantitativen Untersuchung zeigt sich nach Bildung der Mittelwerte  $\pm$  SEM in der statistischen Analyse mittels one-way ANOVA und Tukey post hoc-Test eine signifikant erhöhtes Vorkommen Anti-GFAP der HFD\_NCD-Gruppe im Vergleich mit der Referenzgruppe hinsichtlich der Anzahl gefärbter Zellen, der Signalstärke und der prozentualen Oberflächenanteile, sowie hinsichtlich der Anti-GFAP-Signalstärke und der prozentualen

Oberflächenanteile auch im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (NCD\_HFD und HFD\_HFD). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen hinsichtlich der drei untersuchten Parameter Zellen pro Gesichtsfeld, Signalstärke und prozentualer Oberflächenanteile lassen sich nicht feststellen.



**Abb. 18:** Repräsentative Darstellung Anti-GFAP Färbung der Hippocampi der APP/PS1<sup>+/-</sup> Männchen. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit der Software Cell P (Olympus, Tokio, Japan) Quantifizierung der gefärbten Anteile mit Image (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Gefärbte Anteile erscheinen weiß, die übrigen Hirnstrukturen sind in Graustufen abgebildet. Visuell scheint die Expression von GFAP in der NCD\_NCD Gruppe vermindert im Vergleich zu den anderen drei Gruppen (NCD\_HFD; HFD\_NCD; HFD\_HFD).

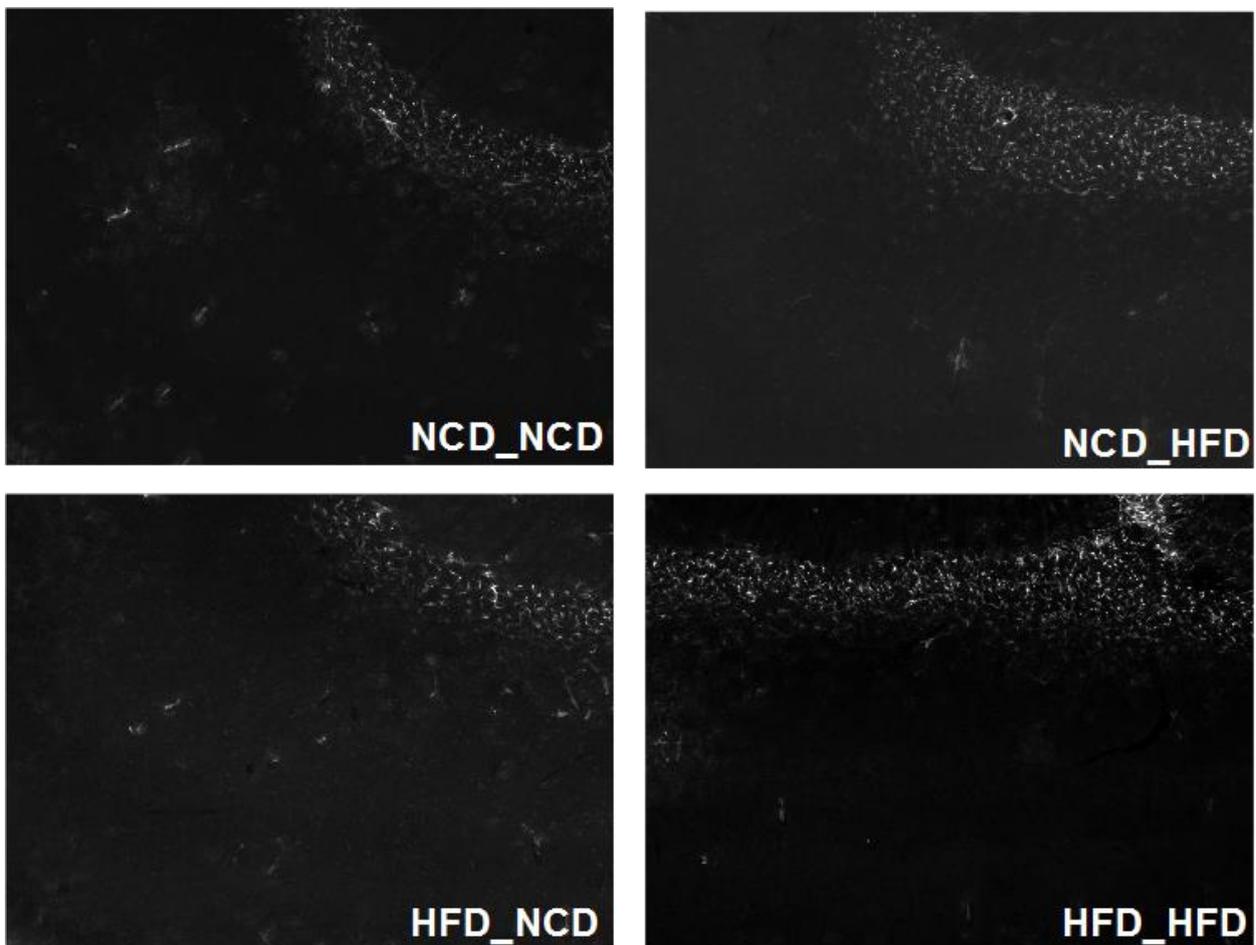


**Abb. 19:** Hippocampus der APP/PS1<sup>+/-</sup> Männchen. Anti-GFAP gefärbte Zellen pro Hippocampus (links), Anti-GFAP-Reaktivität pro Hippocampus (mittig), Anti-GFAP prozentuale Oberflächenanteile (rechts) bei 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,0001$  \*\*\*,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6.

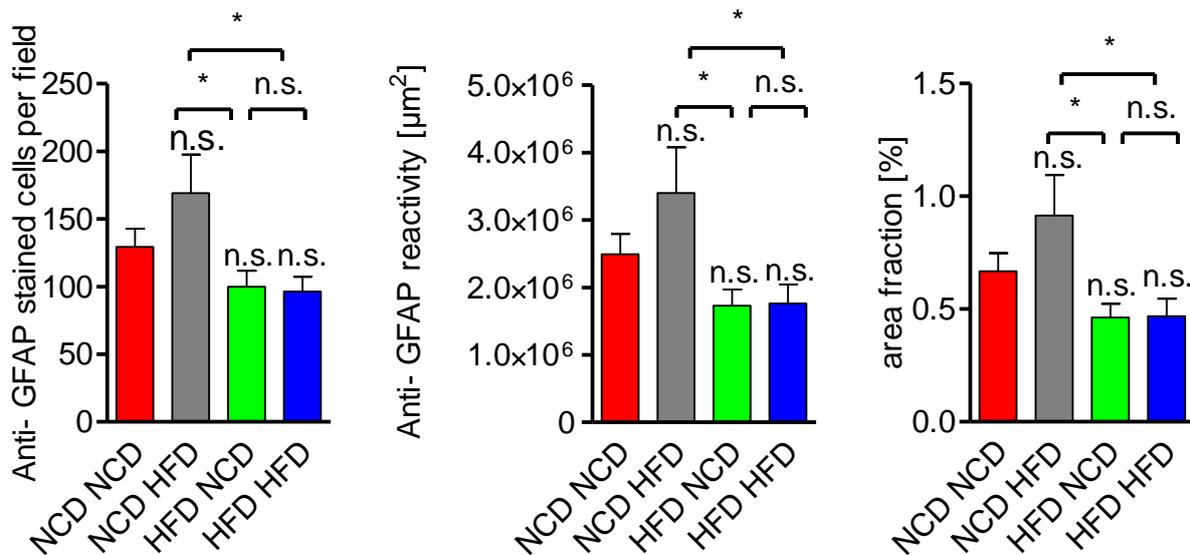
Grafisch dargestellt sind die Ergebnisse der Auswertung der Anti-GFAP-Färbung der Hippocampi im männlichen APP/PS1<sup>+/-</sup> Nachwuchs in Abbildung 19. Hier ist auf den Y-Achsen aufgetragen jeweils die Anzahl der Anti-GFAP gefärbten Zellen pro Hippocampus, die Anti-GFAP Signalstärke und die prozentualen Oberflächenanteile gegen die auf der X-Achse aufgetragenen Versuchsgruppen innerhalb des APP/PS1<sup>+/-</sup> männlichen Nachwuchses. In der statistischen Untersuchung zeigt sich in der Varianzanalyse und dem Tukey's post hoc Test ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit fettreich ernährten Muttertieren hinsichtlich Anzahl gefärbter Zellen, Signalstärke und prozentualem Oberflächenanteil. Hier ist die Gruppe HFD\_NCD in allen Bereichen signifikant höher als die HFD\_HFD-Gruppe. Weitere signifikante Unterschiede zeigen sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe beziehungsweise unter den anderen Versuchsgruppen nicht hinsichtlich der untersuchten Merkmale gefärbter Zellen pro Hippocampus, Signalstärke und prozentualer Oberflächenanteile.

#### 4.1.2.2 GFAP-Auswertung der Wildtyp-Männchen

Eine repräsentative Auswahl von mikroskopischen Aufnahmen des Kortex des männlichen Wildtyp Nachwuchses nach Antikörperfärbung von GFAP zur Darstellung der glialen Immunreaktion zeigt Abbildung 20. In Abbildung 22 ist eine repräsentative Auswahl von Bildern der gleichen Färbung bei denselben Tieren des Hippocampus zu sehen. Rein visuell zeigen sich in beiden Abbildungen keine Unterschiede innerhalb der vier Versuchsgruppen

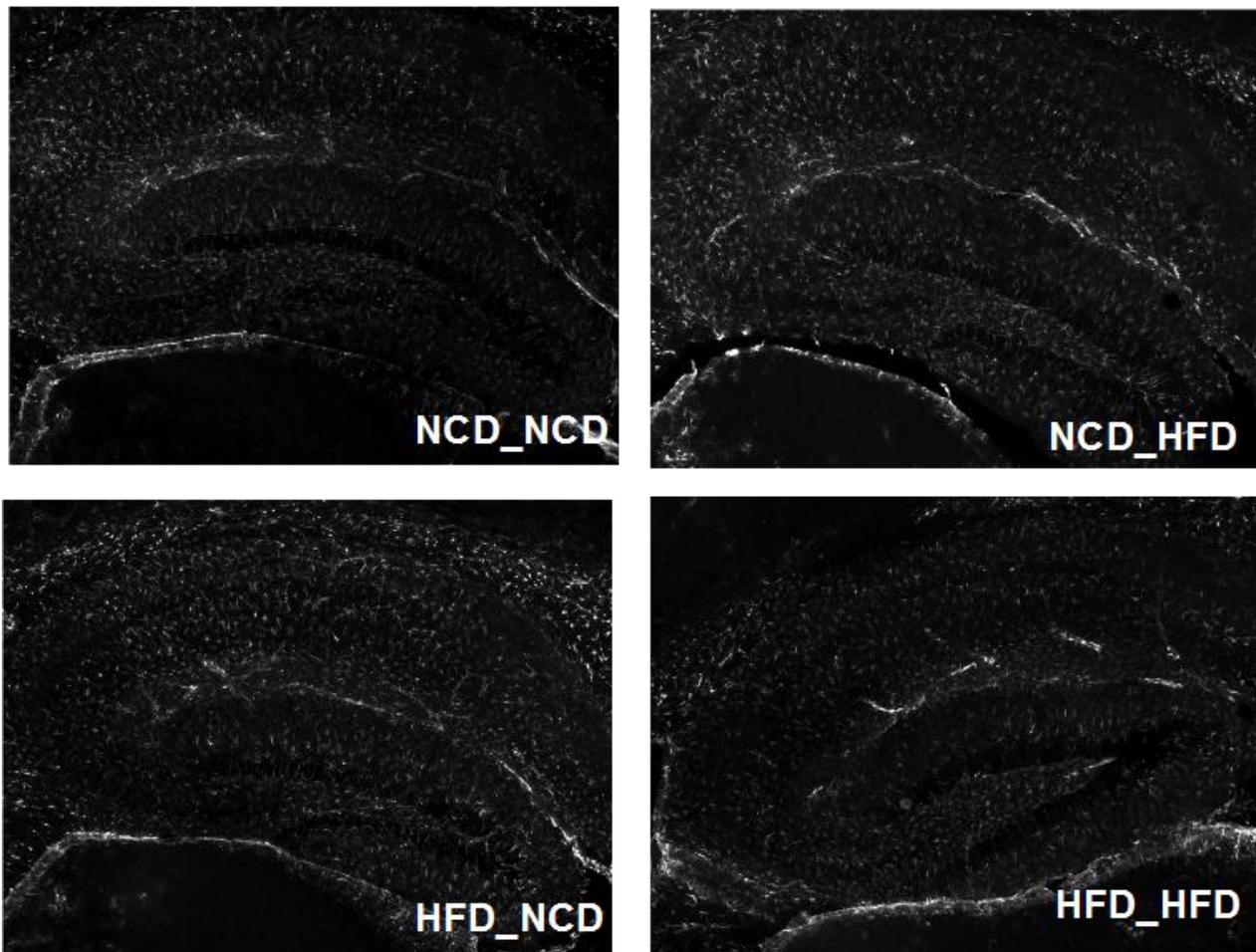


**Abb. 20:** Repräsentative Abbildung der Anti-GFAP des Kortex des Wildtyp-Nachwuchses. Aufgenommen in 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet; erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit Cell P (Olympus, Tokio, Japan) und Quantifizierung mittels Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Gefärbte Anteile erscheinen weiß, die übrigen Hirnstrukturen sind in Graustufen abgebildet. Visuell scheint die Expression von GFAP in den verschiedenen Versuchsgruppen ähnlich zu sein.



**Abb. 21:** Anti-GFAP gefärbte Zellen im Kortex der Wildtyp-Männchen pro Gesichtsfeld (links), Anti-GFAP-Signalstärke pro Gesichtsfeld (mittig), Anti-GFAP prozentualen Oberflächenanteile (rechts) bei 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD:  $n=5$ , NCD\_HFD  $n=5$ , HFD\_NCD  $n=5$ , HFD\_HFD  $n=5$ .

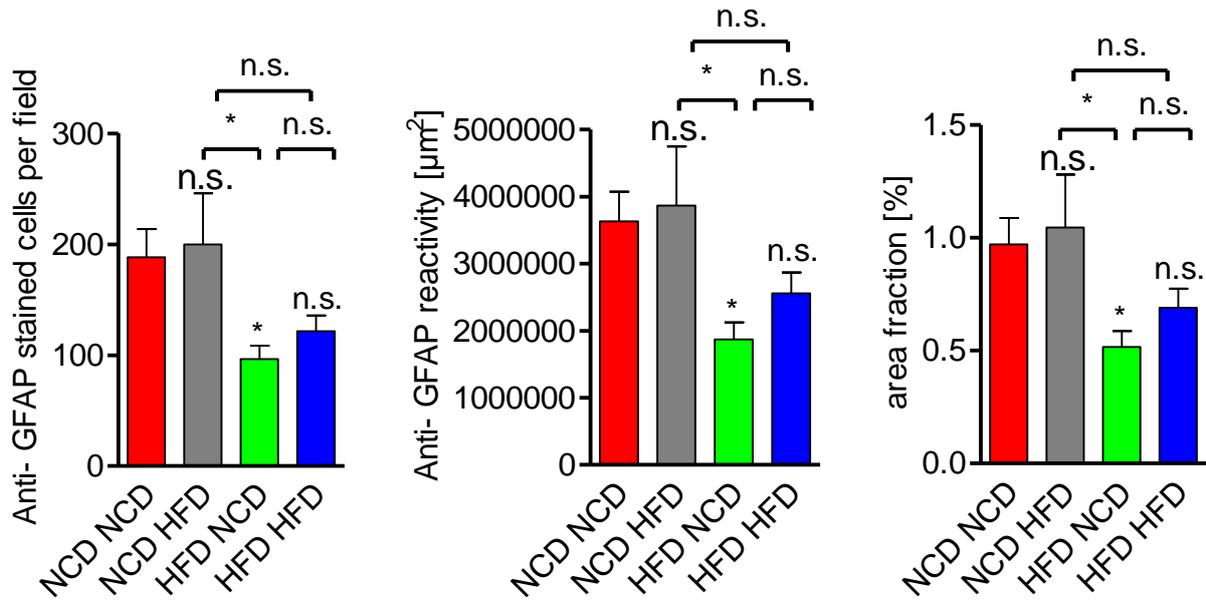
Die Auswertung und grafische Darstellung der anti-GFAP Färbung des Kortex innerhalb der verschiedenen Gruppen des männlichen Wildtyp-Nachwuchses ist in Abbildung 21 zu sehen. Die vier Versuchsgruppen sind auf der X-Achse aufgetragen, die Anzahl der gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld, die Signalstärke pro Gesichtsfeld und die prozentualen Oberflächenanteile auf der Y-Achse. Es erfolgt die Auswertung wie oben geschildert und Bildung von Mittelwerten  $\pm$  SEM. In der statistischen Analyse zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit normal ernährten Muttertieren und fettreich ernährtem Nachwuchs im Vergleich zu den beiden Gruppen mit fettreich ernährten Muttertieren hinsichtlich Anzahl gefärbter Zellen, Signalstärke und prozentualer Oberflächenanteile. Die Gruppe zeigt in allen drei Parametern einen signifikant höheren Anteil im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Weitere signifikante Unterschiede zeigen sich in dieser Untersuchung zwischen den vier Versuchsgruppen hinsichtlich der drei untersuchten Merkmale gefärbte Zellen pro Gesichtsfeld, Signalstärke und prozentualer Oberflächenanteile nicht.



**Abb. 22:** Repräsentative Abbildung der Anti-GFAP-Färbung des Hippocampus des Wildtyp-Nachwuchses. Aufgenommen in 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet; erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit Cell P (Olympus), Quantifizierung mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Gefärbte Anteile erscheinen weiß, die übrigen Hirnstrukturen sind in Graustufen abgebildet. Visuell scheint die Expression von GFAP in den verschiedenen Versuchsgruppen ähnlich zu sein.

Die Quantifizierung der anti-GFAP-Färbung der Hippocampi der verschiedenen Studiengruppen des männlichen Wildtyp-Nachwuchses ist in Abbildung 23 visualisiert. Die Versuchsgruppen sind auf der X-Achse aufgetragen, die Anzahl der gefärbten Zellen, die Signalstärke und die prozentualen Oberflächenanteile auf der Y-Achse. Es erfolgt die Auswertung und Bildung von Mittelwerten  $\pm$  SEM. In der statistischen Analyse mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Tukey's post hoc Analyse zeigt sich in allen drei Darstellungen ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit normal ernährten Muttertieren und fettreich ernährtem Nachwuchs im Vergleich zu der Gruppe mit fettreich ernährten Muttertieren und normal ernährtem Nachwuchs, sowie der

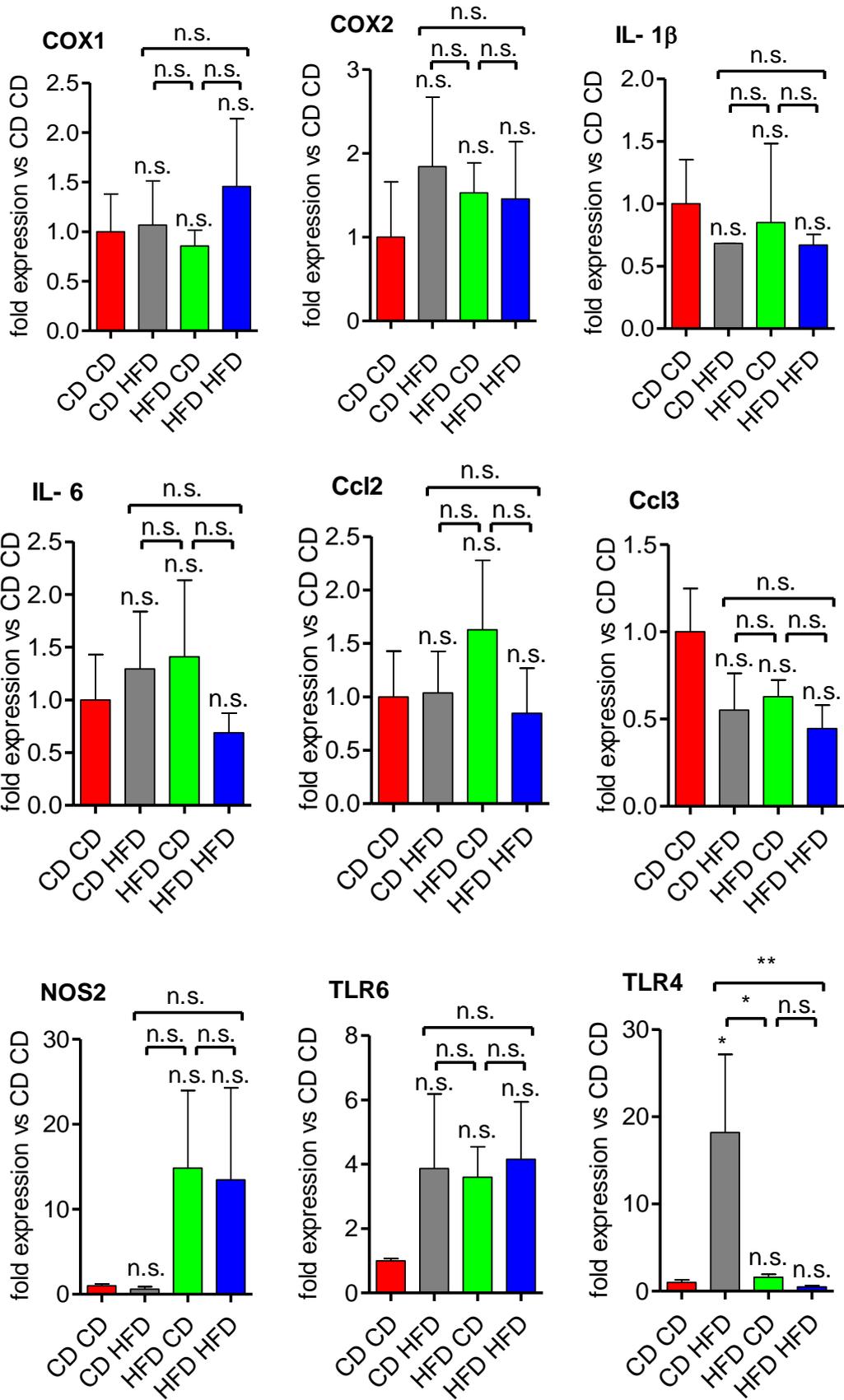
HFD\_NCD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch diese Unterschiede betreffen sowohl die Anzahl der Zellen, die Signalstärke und die prozentualen Oberflächenanteile. Weitere signifikante Unterschiede zeigen sich zwischen den vier Gruppen hinsichtlich der untersuchten Merkmale nicht.

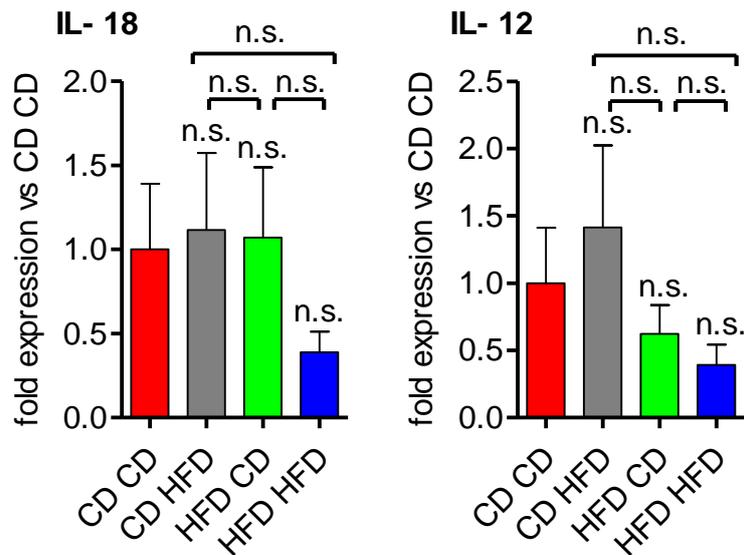


**Abb. 23:** Anti-GFAP-Färbung des Hippocampus im männlichen Wildtyp-Nachwuchs. Anti-GFAP gefärbte Zellen im pro Hippocampus (links), Anti-GFAP-Reaktivität pro Hippocampus (mittig), Anti-GFAP area fraction (rechts) bei 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=5, NCD\_HFD n=5, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=5

#### 4.1.3 Quantitative real-time-PCR

Ausgehend von der Annahme, dass viele Veränderungen aufgrund erhöhter inflammatorischer Chemokine und Zytokine erfolgen, wurden diese auf RNA-Ebene in Wildtyp- und APP/PS1<sup>+/-</sup> Männchen untersucht. Zur Untersuchung möglicher Unterschiede wurden die proinflammatorischen Marker Cyclooxygenase (COX) 1 und 2, Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), Interleukin 6 (IL6), Chemokinligand 2 (CCL 2), Chemokinligand 3 (CCL3), Tumornekrose Faktor (TNF)  $\alpha$ , induzierbare Stickstoffoxidase (NOS) 2, Toll-like-rezeptor (TLR) 6 und 4, Interleukin (IL) 18 und 12 herangezogen.



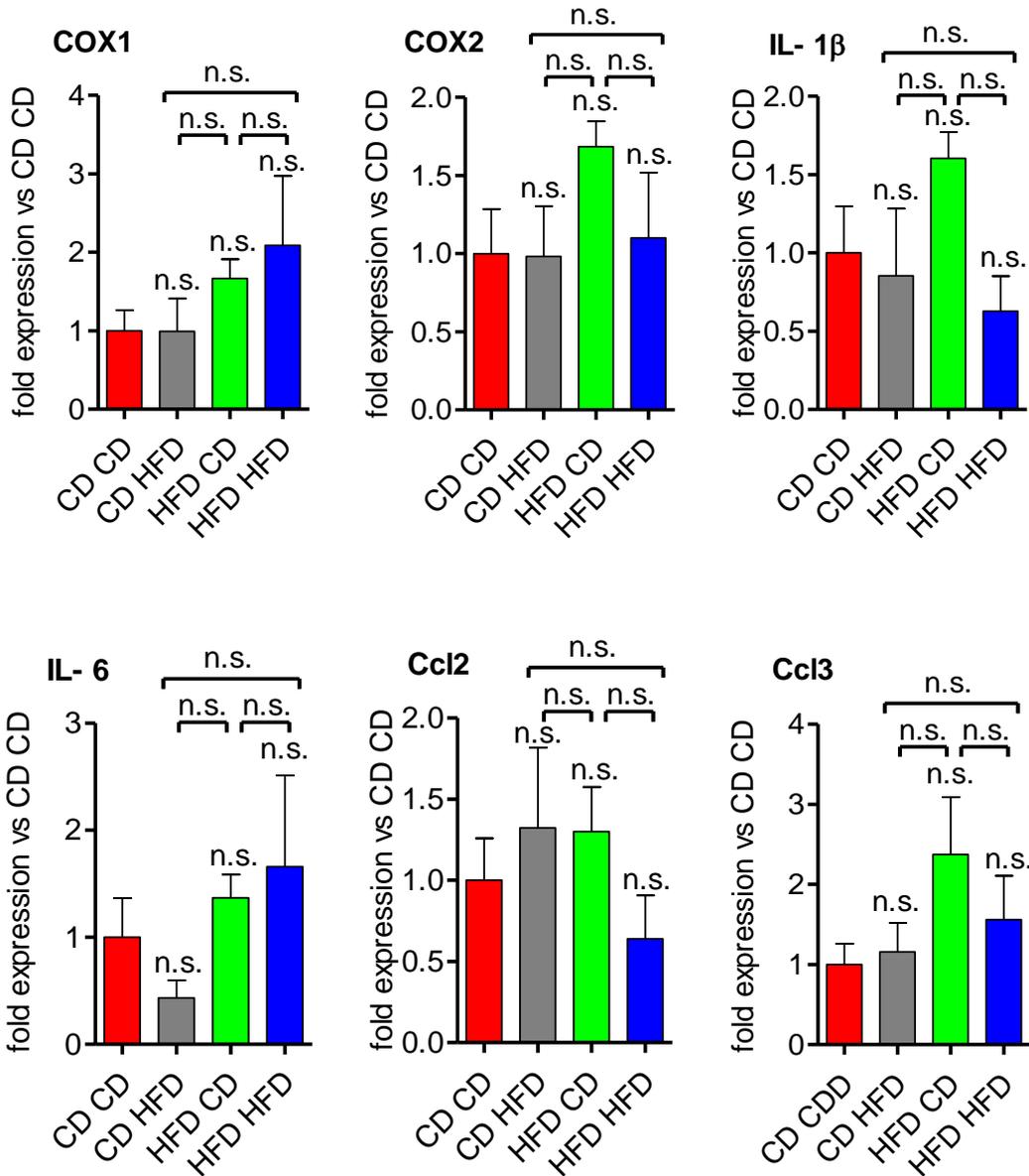


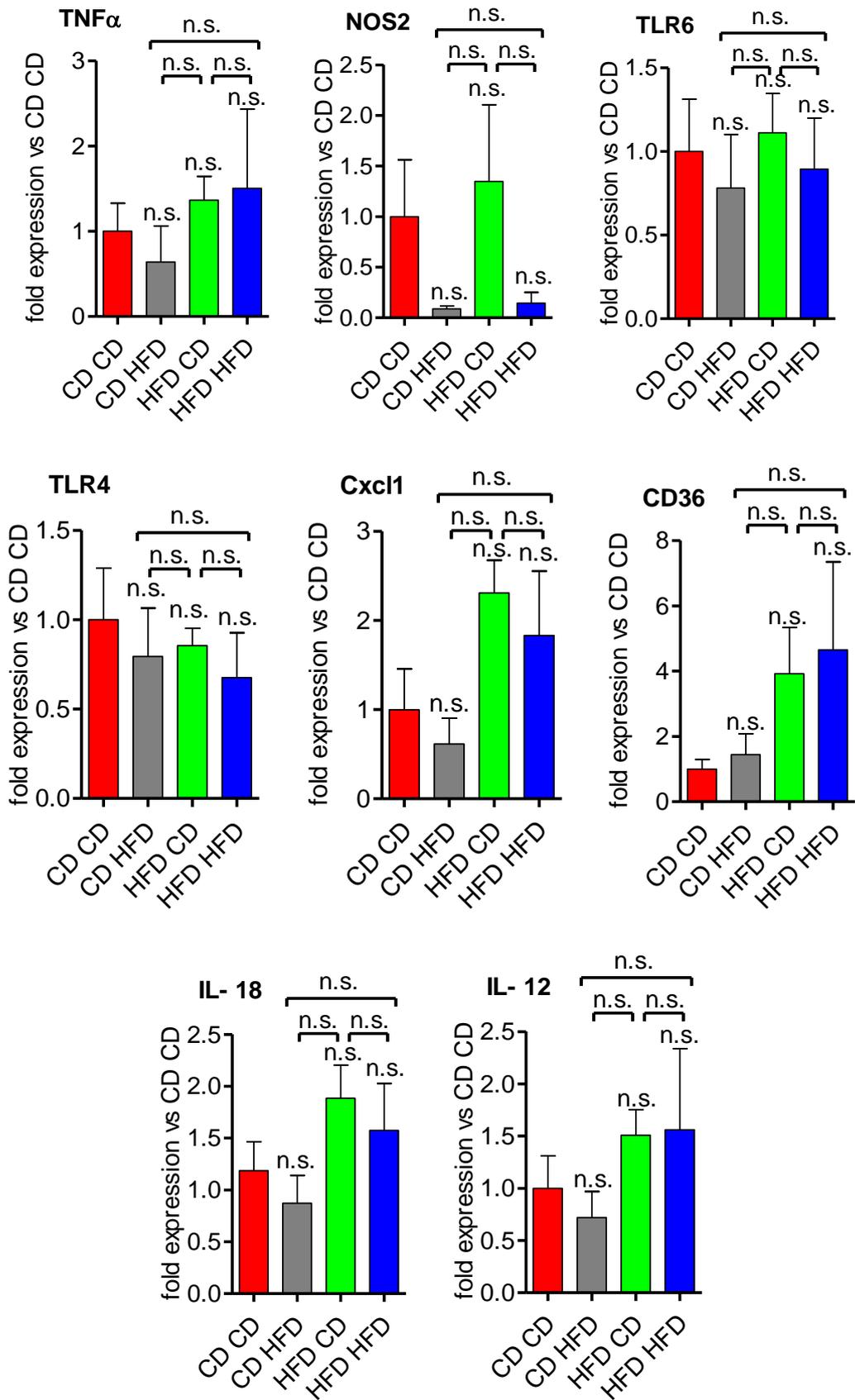
**Abb. 24:** Real-time PCR-Ergebnisse in fold expression vs. CD\_CD der APP/PS1<sup>+/-</sup>-Männchen. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Eigene Ernährung. 1way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD CD: n=3, CD HFD: n=3, HFD CD: n=5, HFD HFD n=5

Die mRNA-Expressionen oben genannter Zytokine innerhalb der verschiedenen Gruppen des männlichen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchses ist in Abbildung 24 dargestellt. Auf der X-Achse sind verschiedenen Studiengruppen CD\_HFD (n=3), HFD\_CD (n=5), HFD\_HFD (n=5) und die Kontrollgruppe CD\_CD (n=3) dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Expression der mRNA, gemessen am Vielfachen der Kontrollgruppe CD\_CD. Es zeigt sich nach one-way ANOVA sowie Tukey's post hoc Test ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,5$ ) für TLR4 in der Versuchsgruppe CD\_HFD gegenüber den Studiengruppen HFD\_CD und CD\_HFD sowie gegenüber der Kontrollgruppe. Die weiteren Gruppen- und Einzelvergleiche zeigten hinsichtlich der untersuchten mRNA bezüglich der anderen untersuchten Marker keine statistisch signifikanten Unterschiede.

In Abbildung 25 sind die mRNA-Expressionen von Cyclooxygenase (COX) 1 und 2, Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), Interleukin 6 (IL6), Chemokinligand 2 (CCL 2), Chemokinligand 3 (CCL3), Tumornekrose Faktor (TNF)  $\alpha$ , induzierbare Stickstoffoxidase (NOS) 2, Toll-like-rezeptor (TLR) 6 und 4, Interleukin (IL) 18 und 12 innerhalb der verschiedenen Gruppen des männlichen Wildtyp-Nachwuchses dargestellt. Auf der X-Achse sind verschiedenen Studiengruppen CD\_HFD (n=6), HFD\_CD (n=6), HFD\_HFD (n=7) und die

Kontrollgruppe CD\_CD (n=6) dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Expression der mRNA, gemessen am Vielfachen der Kontrollgruppe CD CD. Es zeigt sich nach one-way ANOVA sowie Tukey's post hoc Test keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der mRNA Expression oben genannter Marker innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen.

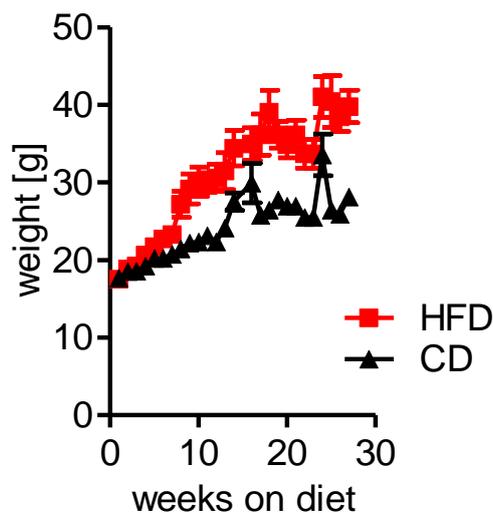




**Abb. 25:** Real-time PCR-Ergebnisse in fold expression vs. CD\_CD der Wildtyp-Männchen. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Eigene Ernährung. One-way ANOVA,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD: n=6, CD\_HFD: n=6, HFD\_CD n= 6, HFD\_HFD: n=7

## 4.2 Ammenexperiment

### 4.2.1 Gewichtsverläufe

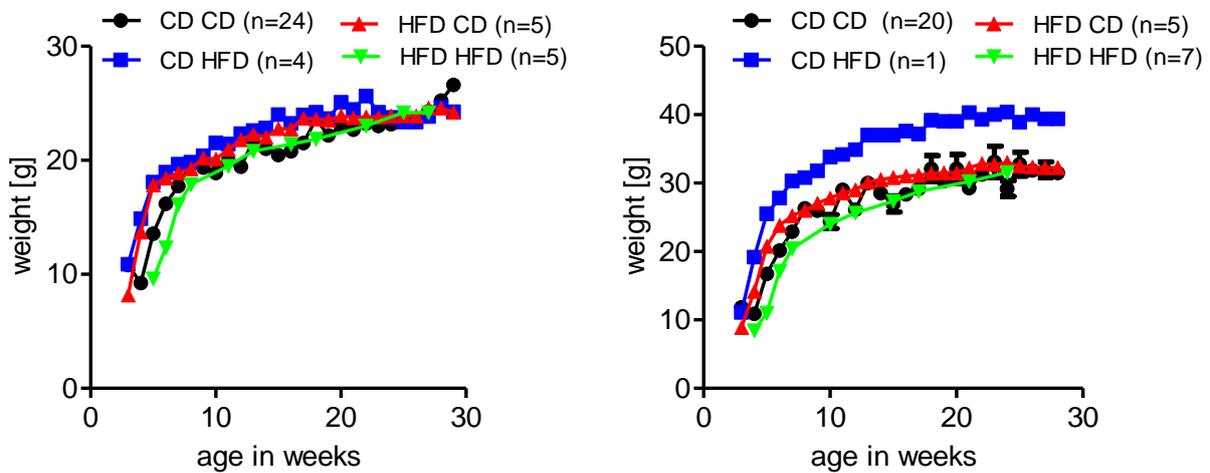


**Abb. 26:** Gewichtsverlauf der Muttertiere im Ammenexperiment nach Beginn der Fütterungsphase. HFD = high fat diet (n=19). CD = Kontrolldiät (n=19).

Das wöchentlich erhobene Gewicht der Muttertiere ist in Abbildung 26 im zeitlichen Verlauf der Fütterungsphase grafisch dargestellt. Das mittlere Gewicht der Tiere ist in Gramm auf der Y-Achse aufgetragen, die Zeit, die die Tiere auf der speziellen Diät waren in Wochen auf der X-Achse. Die rote Kurve ist die der fettreich ernährten Muttertiere, die schwarze die der Muttertiere, die die Kontrolldiät erhalten haben. In der Abbildung zeigt sich in beiden Gruppen ein fast linearer Anstieg des Gewichtes in den ersten 15 Wochen der Fütterungsphase, hiernach flachen die Gewichtskurven langsam ab. Aufgrund des steileren Verlaufs der Kurve der fettreich ernährten Muttertiere, divergieren die Kurven circa ab der achten Woche deutlich als Zeichen der deutlich stärkeren Gewichtszunahme der fettreich ernährten Tiere.

Auch beim Nachwuchs erfolgte die wöchentliche Bestimmung des Gewichtes ab Geburt, diese Verläufe sind in Abbildung 27 aufgetragen. Links abgebildet ist der weibliche

Nachwuchs, rechts der männliche Nachwuchs. Auf der Y-Achse findet sich jeweils das mittlere Gewicht in Gramm der jeweiligen Versuchsgruppen, auf der X-Achse jeweils das Lebensalter. Hier zeigt sich ein steiler Anstieg aller vier Kurven, sowohl im weiblichen, als auch im männlichen Nachwuchs, bis zur zehnten Lebenswoche. Hiernach flachen die Kurven deutlich ab und es kommt zu keiner weiteren relevanten Gewichtszunahme. Die Gewichtsverläufe der unterschiedlichen Gruppen decken sich quast, signifikante Unterschiede bestehen nicht. Beim männlichen Nachwuchs läuft die Kurve der CD\_HFD-Gruppe oberhalb der restlichen Kurven, bei einer Gruppenzahl von 1 ist dies jedoch nicht verwertbar.

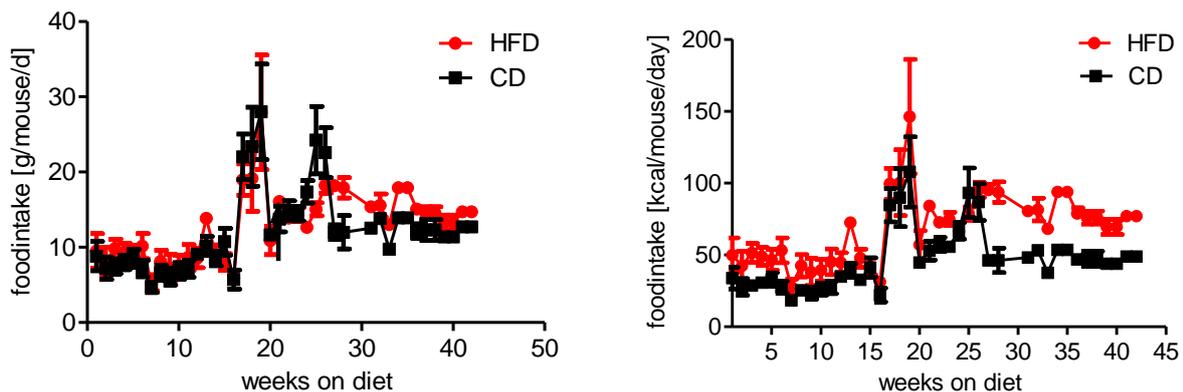


**Abb. 27:** Gewichtsverlauf des weiblichen (links) und männlichen (rechts) Nachwuchses im Ammenexperiment nach Geburt. CD = Kontrolldiät, HFD = high fat diet. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. Gruppenzahlen siehe in der Abbildung.

#### 4.2.2 Foodintake

Die Futtermenge in Gramm pro Tag pro Maus wurde bei jedem Futterwechsel erhoben und ist in Abbildung 28 links gegen die Zeit der Fütterungsphase in Wochen aufgetragen. Rot kommt die Futtermenge der hochkalorisch gefütterten Muttertiere zur Darstellung, schwarz die der Kontrollgruppe. Auf der rechten Seite erfolgte entsprechend der Hersteller-Angaben die Umrechnung in Kilokalorien pro Maus pro Tag. Links zeigt sich, dass hinsichtlich der Futtermenge *per se* die Kurven deckungsgleich sind. Nach Umrechnung hinsichtlich der tatsächlichen Energieaufnahme, zeigt sich in der rechten Abbildung jedoch eine deutlich höhere

Energieaufnahme bei den fettreich ernährten Muttertieren. Zudem zeigt sich in beiden Kurven eine deutlich erhöhte Nahrungs- und Energiezufuhr in beiden Gruppen während den beiden Schwangerschaften in Woche 16 und 24. Die Nahrungs- und Energieaufnahme der Muttertiere korreliert somit mit den Gewichtsverläufen in Abbildung 26.



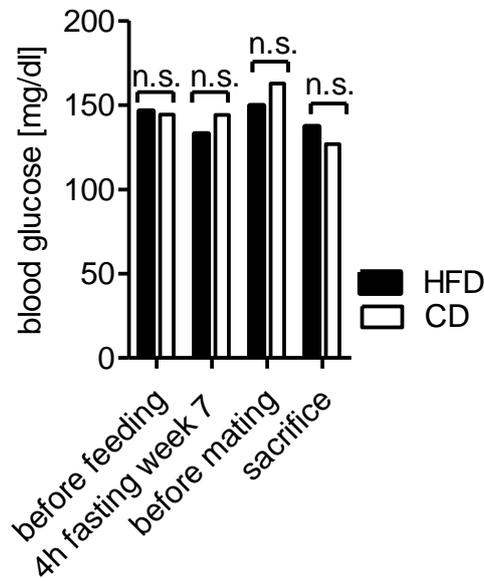
**Abb. 28:** Nahrungs- und Energiezufuhr der Muttertiere während der Fütterungsphase, Schwangerschaft, Säugezeit und danach bis zu den Verhaltensuntersuchungen. Links dargestellt ist die tägliche Nahrungsaufnahme in Gramm pro Maus pro Tag. CD = Kontrolldiät, HFD = high fat diet, rechts die tägliche Energiezufuhr in Kilokalorien pro Maus pro Tag.

#### 4.2.3 Blutzucker-Messungen

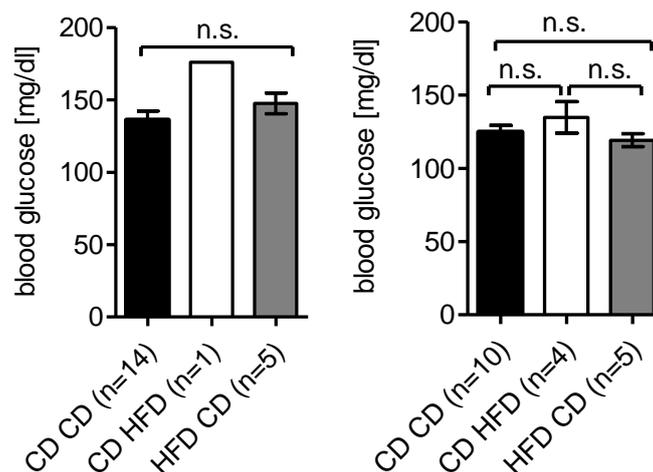
Zur Evaluation weiterer metabolischer Einflussfaktoren der Muttertiere auf den Nachwuchs erfolgte mehrfach die Blutzuckerbestimmung aus der Schwanzvene mittels Punktion selbiger. Die Zeitpunkte waren vor Beginn der Fütterungsphase, sieben Wochen danach nüchtern nach vierstündigem Fasten. Zudem erfolgte eine Gelegenheitsblutzuckermessung unmittelbar vor Verpaarung und am Ende des Experimentes im Rahmen der Präparation. Die grafische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 29. Hier ist zu sehen, dass nach statistischer Analyse mittels unpaired t-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen der Muttertiere zu keinem der gemessenen Zeitpunkte bestehen.

Am Ende des Experimentes erfolgte im Rahmen der Präparation der Tiere auch die Blutzuckermessung des Nachwuchses. Diese ist in Abbildung 30 abgebildet, im linken Teil ist der männliche Nachwuchs dargestellt, im rechten Teil der weibliche Nachwuchs.

In der statistischen Analyse mittels unpaired t-Test beziehungsweise one-way ANOVA und Tukey's post-hoc Analyse zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.



**Abb. 29:** Blutzuckermessungen der Muttertiere zu verschiedenen Zeitpunkten. CD = Kontrolldiät, n=19, HFD = high fat diet, n=19. Unpaired t-test.  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM.

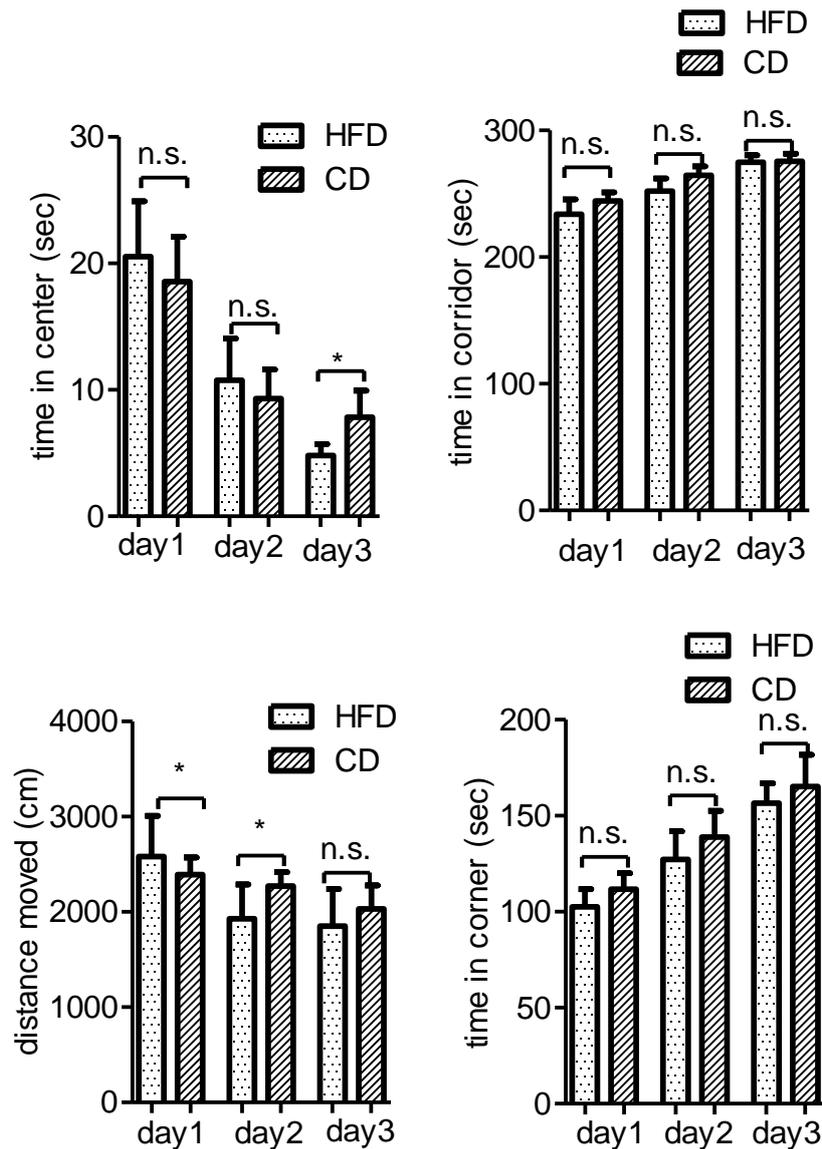


**Abb. 30:** Blutzuckerspiegel im Vollblut bei Sacrifice. Links: männlicher Nachwuchs, rechts: weiblicher Nachwuchs. CD = Kontrolldiät, HFD = high fat diet. Erste Position = Ernährung der Mutter, zweite Position = Ernährung der Amme. (Unpaired t-test links; One-way ANOVA und Tukey's post-hoc Test rechts;  $p \geq 0,05$  n.s.= nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM). Versuchsgruppengröße siehe Abbildung.

#### 4.2.4 Verhaltensbiologische Untersuchungen

##### 4.2.4.1 Open-field-Test

Als erster verhaltensbiologischer Test erfolgte die Durchführung eines Open-field-Tests, sowohl an den Muttertieren, als auch am Nachwuchs des Ammenexperimentes. Ziel dieses Tests ist es das Erkundungsverhalten der Tiere zu untersuchen.



**Abb. 31:** Open-field-Analyse der Muttertiere. HFD=high fat diet (n=19), CD=control diet (n=19). Time in corner, time in center und time in corridor sowie distance moved wurden erhoben. Unpaired t-Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).

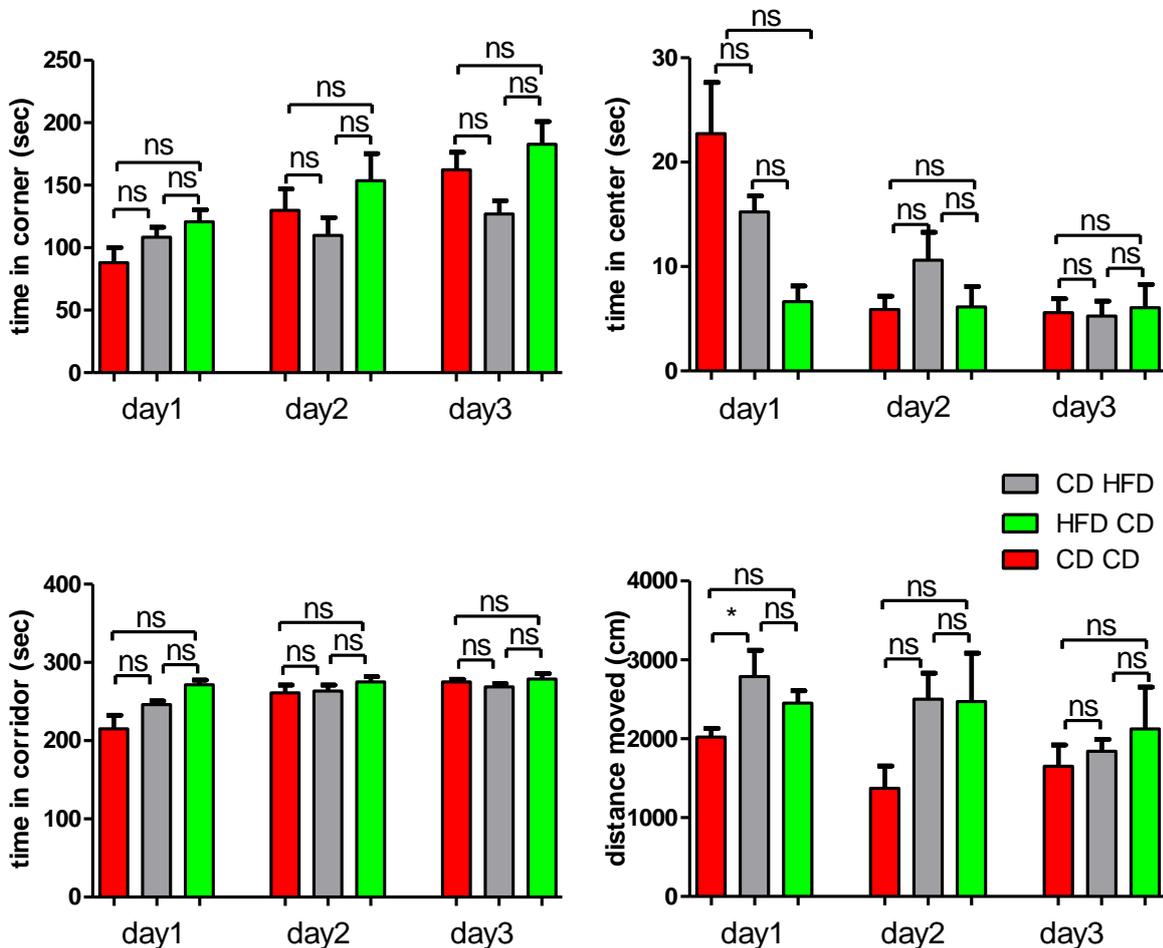
Im Speziellen wurden im Open-field-Versuchsaufbau die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen Muttertiere in Bezug auf Zeit die in den Ecken, Zeit, die im Zentrum und Zeit, die in den Gängen verbracht wird sowie die Gesamtstrecke, die zurückgelegt wurde untersucht (siehe auch Abbildung 10). Die Datenerhebung erfolgte mittels der Software Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).

Die Auswertung des Experimentes der Muttertiere ist in Abbildung 31 dargestellt. Auf der Y-Achse sind jeweils die verschiedenen Messgrößen Zeit im Zentrum in Sekunden, Zeit in den Gängen in Sekunden, Zeit in den Ecken in Sekunden sowie insgesamt zurück gelegte Strecke in Zentimetern. Auf der X-Achse sind die beiden Versuchsgruppen hochkalorisch ernährte Mütter und mit Kontrolldiät ernährte Mütter an den jeweiligen Tagen eins, zwei und drei dargestellt. Im Laufe der drei Tage kommt es in beiden Gruppen zu einer geringeren Aufenthaltsdauer im Zentrum und einem Anstieg der Aufenthaltsdauer in den Ecken. Die Zeit, die im Korridor verbracht wird bleibt ähnlich. Zwischen den beiden Gruppen zeigen sich hinsichtlich der im Zentrum verbrachten Zeit an Tag drei ein signifikant längeres Verbleiben in der Kontrollgruppe, hinsichtlich der Zeit im Korridor und in den Ecken keine signifikanten Unterschiede. Die zurückgelegte Strecke war an Tag eins in der Highfat-Gruppe und an Tag zwei in der Kontrollgruppe signifikant weiter.

Die Ergebnisse der Open-field-Analyse des weiblichen Nachwuchses im Ammenexperiment sind in Abbildung 32 dargestellt. Auf der Y-Achse sind jeweils die verschiedenen Messgrößen Zeit im Zentrum in Sekunden, Zeit in den Gängen in Sekunden, Zeit in den Ecken in Sekunden sowie insgesamt zurück gelegte Strecke in Zentimetern aufgetragen. Auf der X-Achse sind die Versuchsgruppen aufgetragen. Es erfolgte die statistische Auswertung mittels one-way ANOVA und Tukey's post hoc Test. Es zeigte sich eine signifikant weitere zurückgelegte Strecke an Tag eins der Gruppe, deren Mutter Kontrolldiät erhielt und deren Amme hochkalorisch ernährt wurde (CD\_HFD) verglichen mit der Kontrollgruppe (CD\_CD). Alle weiteren untersuchten Parameter erbrachten an allen Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Studiengruppen.

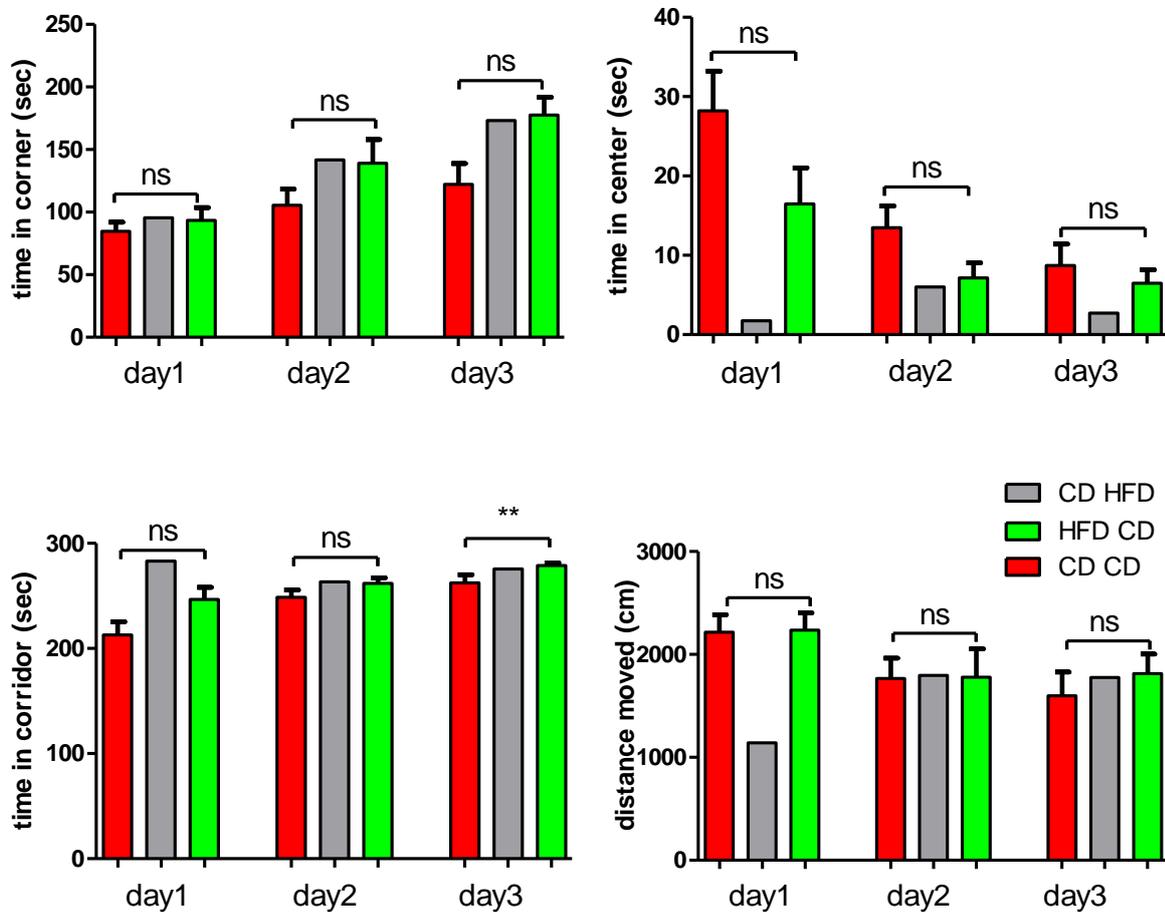
Abbildung 33 zeigt die Open-field-Analyse des männlichen Nachwuchses. Die Beschriftung der Achsen und gemessenen Größen sind die gleichen wie beim

weiblichen Nachwuchs. Im Verlauf der drei Tage zeigt sich eine Zunahme der Zeit, die in den Ecken verbracht wird, wohingegen die Zeit im Zentrum abnimmt. Aufgrund der Tierzahl  $n=1$  in der Gruppe, deren Muttertiere die Kontrolldiät und die Amme die fettreiche Diät erhielt (CD\_HFD) konnten nur die Kontrollgruppe (CD\_CD) und die Gruppe mit den fettreich ernährten Muttertieren und den Ammen, die die Kontrolldiät erhielten (HFD\_CD) mittels unpaired t-Test verglichen werden. Hier zeigt sich an Tag drei ein signifikant längeres Verbleiben im Korridor der HFD\_CD-Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Ansonsten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Verhalten im Openfield-Experiment.



**Abb. 32:** Open-field-Analyse des weiblichen Nachwuchs. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. HFD=high fat diet, CD=control diet. CD\_CD  $n=11$ , CD\_HFD  $n=4$ , HFD\_CD  $n=5$ . Time in corner, time in center und time in corridor sowie distance moved wurden erhoben. One-way ANOVA, Tukey's post hoc

Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).

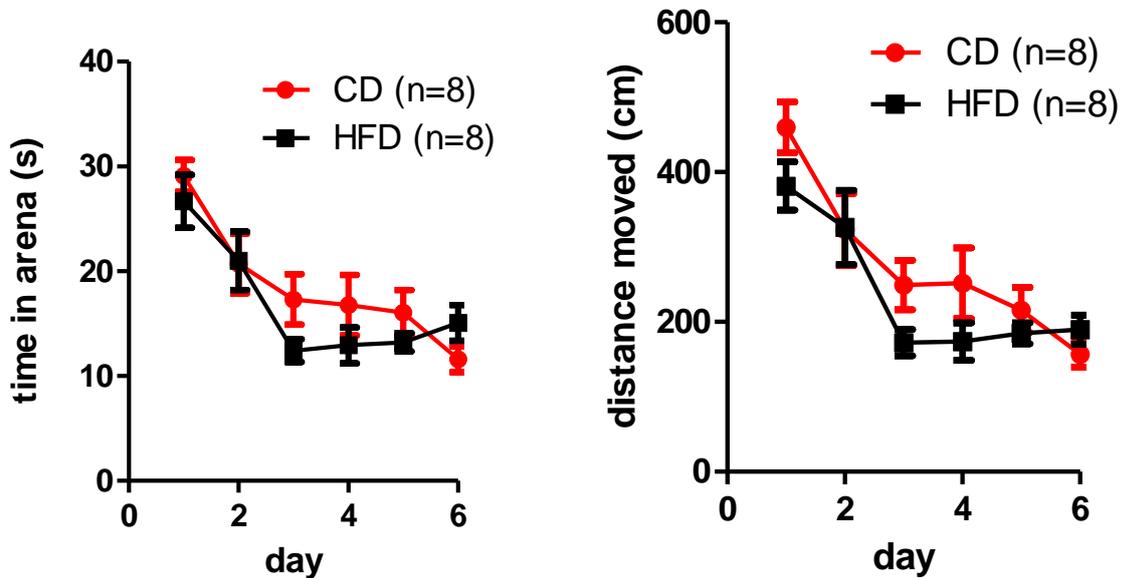


**Abb. 33:** Open-field-Analyse des männlichen Nachwuchses. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position Ernährung: der Amme. HFD=high fat diet, CD=control diet. CD\_CD n= 12, CD\_HFD n=1, HFD\_CD n=5. Time in corner, time in center und time in corridor sowie distance moved wurden erhoben. Aufgrund der Gruppengröße von DC\_HFD konnte nur CD\_CD mit HFD\_CD verglichen werden. (Unpaired-t-test,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).

#### 4.2.4.2 Morris-Water-Maze-Experiment

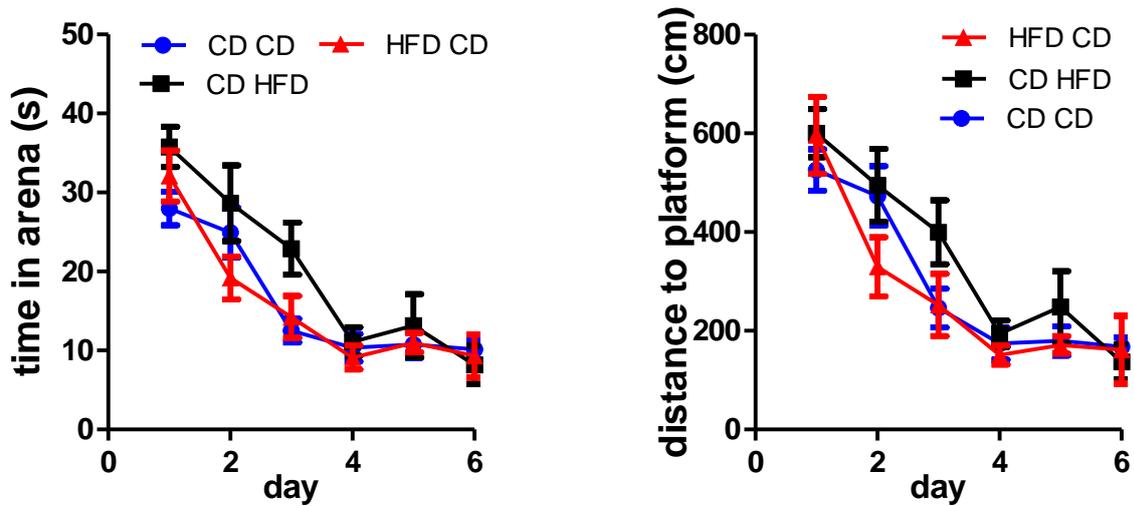
Zur Untersuchung der Einflüsse der fettreichen Ernährung auf die räumliche Gedächtnisbildung erfolgt die Durchführung des Morris-Water-Maze-Experimentes an den mehrere Monate hochkalorisch gefütterten Muttertieren, sowie den Muttertieren, die die Kontrolldiät erhielten. Um die mütterlichen Einflüsse durch hochkalorische Ernährung

während Schwangerschaft und Säugezeit auf den Nachwuchs zu untersuchen, erfolgte die Durchführung des Experimentes an der Nachkommenschaft des Ammenexperimentes.



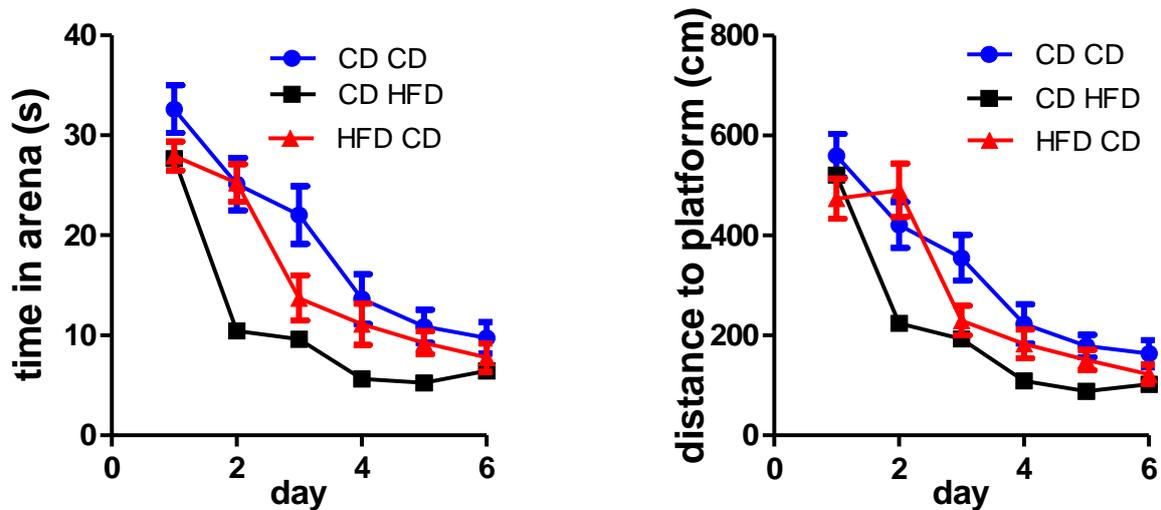
**Abb. 34:** Räumliche Gedächtnisbildung analysiert mit dem Morris-Water-Maze-Versuch bei den Muttertieren, die entweder hochkalorisch gefüttert wurden (HFD) oder die Kontrolldiät erhielten (CD). Untersucht wird die benötigte Zeit die Plattform zu finden in Sekunden, sowie die Distanz, die hierzu erforderlich ist in Zentimetern. Die Darstellung erfolgt über den Zeitraum des Experimentes von 6 Tagen. Versuchsgruppengröße siehe Legende. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).

Die Ergebnisse des Morris-Water-Maze-Versuches der Muttertiere sind in Abbildung 34 grafisch dargestellt. Auf der Y-Achse ist links die benötigte Zeit bis zum Erreichen der Plattform dargestellt und rechts die hierfür benötigte Strecke. Es erfolgt die Darstellung über die Zeit von 6 Tagen. Hier zeigt sich insgesamt ein deutlicher Lernprozess, dadurch erkenntlich, dass beide Gruppen im Verlauf weniger Zeit benötigen die Plattform zu finden und hierfür auch weniger Strecke zurücklegen müssen. Insgesamt kommt es in der Gruppe der fettreich ernährten Muttertiere tendenziell zu einem schnelleren Lernprozess.



**Abb. 35:** Räumliche Gedächtnisbildung analysiert mit dem Morris Water Maze-Versuch bei den weiblichen Nachkommen normal ernährter Mütter (1. Position NCD) oder hochkalorisch fettreich ernährter Mütter (1. Position HFD), wobei die Nachkommen entweder von einer normal ernährten Amme gesäugt wurden (2. Position NCD) oder von einer hochkalorisch fettreich ernährten Amme (2. Position HFD). CD\_CD n= 11, CD\_HFD n=4, HFD\_CD n=5. Untersucht wird die benötigte Zeit die Plattform zu finden in Sekunden, sowie die Distanz, die hierzu erforderlich ist in Zentimetern. Die Darstellung erfolgt über den Zeitraum des Experimentes von 6 Tagen. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).

Die Auswertung des Morris-Water-Maze-Experiments des weiblichen Nachwuchses (Abbildung 35) zeigt wie bei den Muttertieren in Abbildung 34 über den Verlauf der sechs Tage insgesamt einen stetigen Rückgang der benötigten Zeit sowie der benötigten Strecke bis zum Erreichen der Plattform. Auf der Y-Achse sind jeweils wieder die benötigte Zeit in Sekunden beziehungsweise die zurückgelegte Strecke in Zentimetern bis zum Erreichen der Plattform aufgetragen. Auf der X-Achse findet sich der zeitliche Verlauf über die sechs Tage wieder. Die Kurven der verschiedenen Versuchsgruppen decken sich jedoch quasi und weisen untereinander keine signifikanten Unterschiede untereinander auf. Unterschiede im Lernverhalten zwischen den einzelnen Studiengruppen können in diesem Experiment somit nicht festgestellt werden.



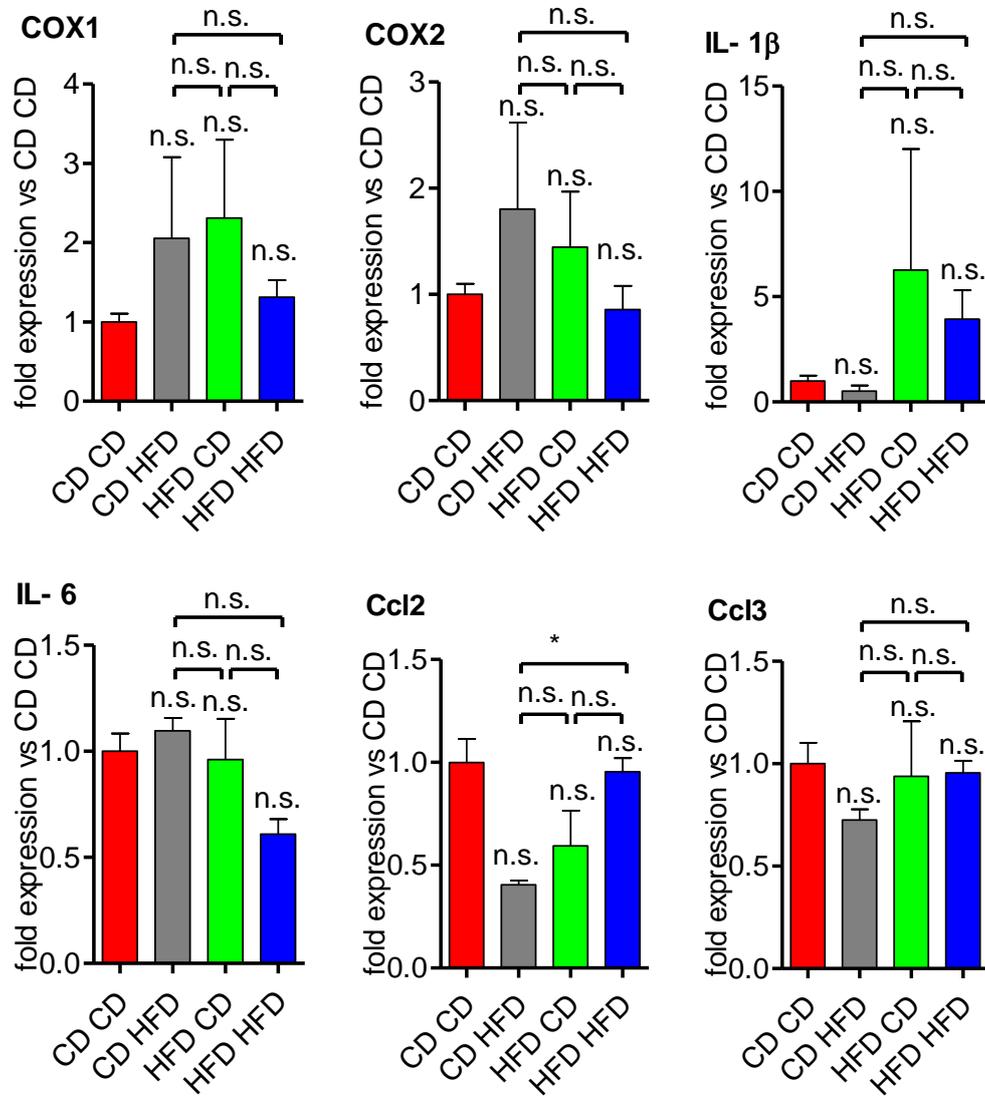
**Abb. 36:** Räumliche Gedächtnisbildung analysiert mit dem Morris-Water-Maze-Versuch bei den männlichen Nachkommen normal ernährter Mütter (1. Position NCD) oder hochkalorisch fettreich ernährter Mütter (1. Position HFD), wobei die Nachkommen entweder von einer normal ernährten Amme gesäugt wurden (2. Position NCD) oder von einer hochkalorisch fettreich ernährten Amme (2. Position HFD). CD\_CD n= 12, CD\_HFD n=1, HFD\_CD n=5. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).

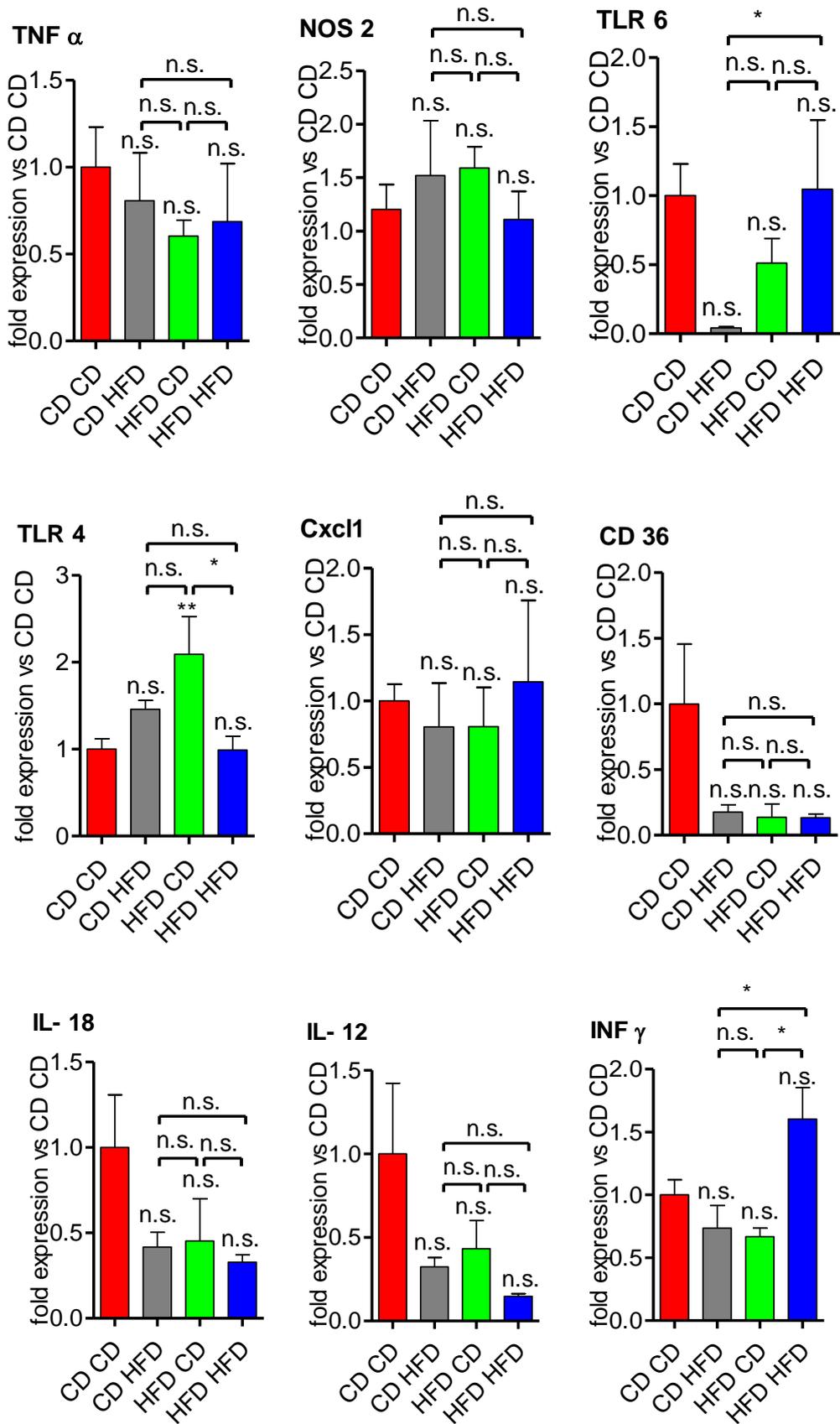
In der grafischen Darstellung der Ergebnisse des Morris-Water-Maze-Experimentes der männlichen Nachkommenschaft (Abbildung 36) zeigt sich insgesamt ein deutlicher Lernprozess, dargestellt durch die stetig fallenden Kurven von benötigter Zeit und Strecke zum Erreichen der Plattform. Auf der Y-Achse sind jeweils wieder die benötigte Zeit in Sekunden beziehungsweise die zurückgelegte Strecke in Zentimetern bis zum Erreichen der Plattform aufgetragen. Auf der X-Achse findet sich der zeitliche Verlauf über die sechs Tage wieder. Bei einer Gruppenzahl von 1 in der CD\_HFD-Gruppe, ist diese statistisch nicht verwertbar. Zwischen den anderen beiden Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die untersuchten Parameter feststellen.

#### 4.2.5 Untersuchungen auf RNA-Ebene

Ausgehend von der Annahme, dass viele Veränderungen aufgrund neuroinflammatorischer Prozesse erfolgt, nachweisbar durch verstärkte Expression

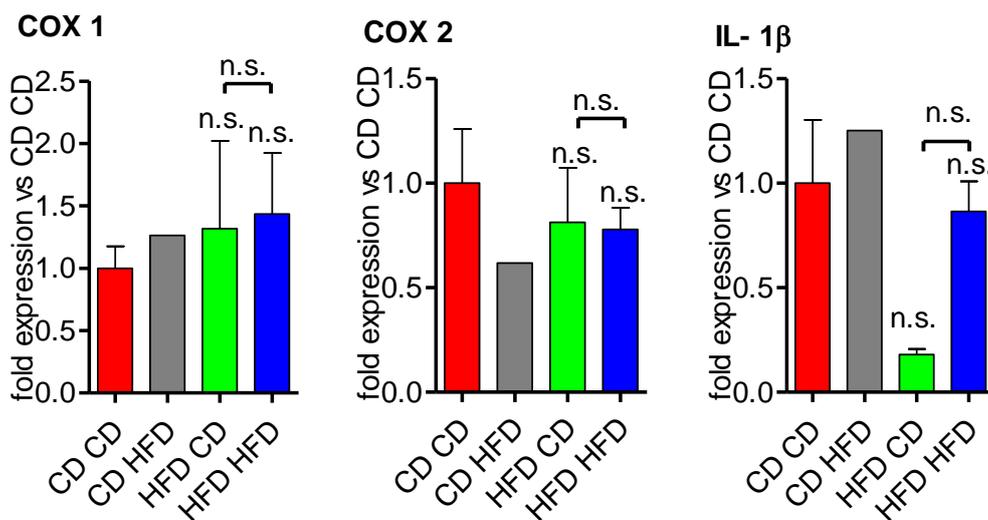
inflammatorischer Chemokine und Cytokine, wurden diese auf RNA-Ebene im Nachwuchs des Ammenexperimentes mittels quantitativer real time PCR untersucht.

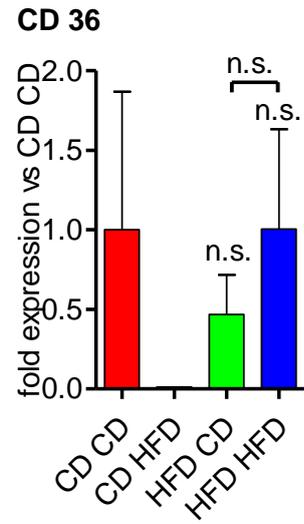
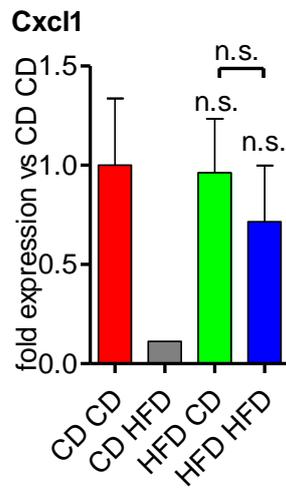
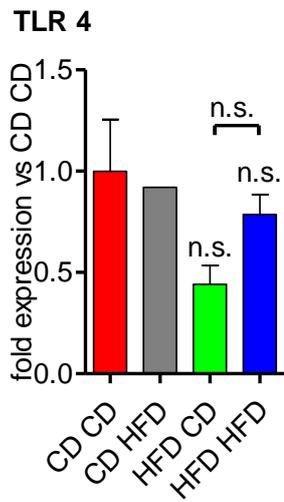
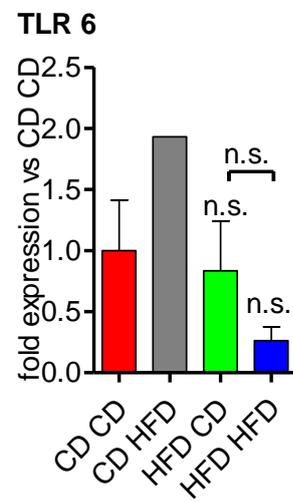
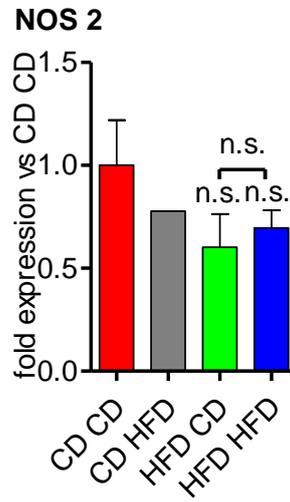
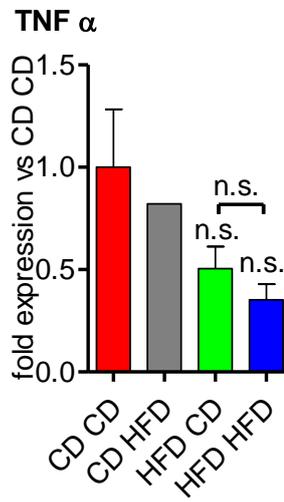
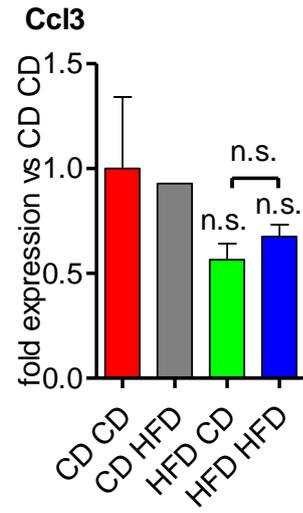
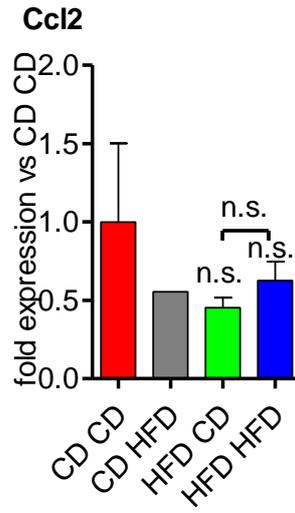
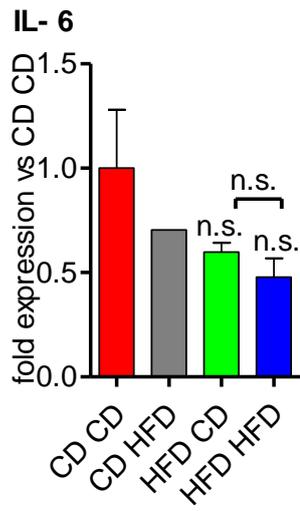


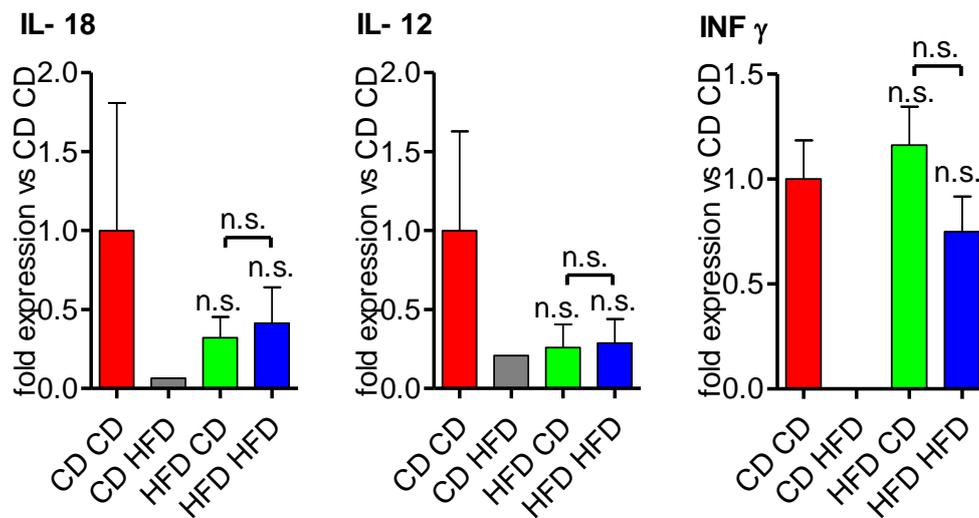


**Abb. 37:** Quantitative real-time PCR-Ergebnisse in fold expression vs. CD\_CD des weiblichen Nachwuchses im Ammenexperiment. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. 1way ANOVA und Tukey's post-hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD n=12, CD\_HFD n=3, HFD\_CD n=5, HFD\_HFD n=5.

Die mRNA-Expressionen von Cyclooxygenase (COX) 1 und 2, Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), Interleukin 6 (IL6), Chemokinligand 2 (CCL 2), Chemokinligand 3 (CCL3), Tumornekrose Faktor (TNF)  $\alpha$ , induzierbare Stickstoffoxidase (NOS) 2, Toll-like-rezeptor (TLR) 6 und 4, Interleukin (IL) 18 und 12 und Interferon Gamma (IFN  $\gamma$ ) sind in Abbildung 37 innerhalb der verschiedenen Gruppen des weiblichen Nachwuchses dargestellt. Auf der X-Achse sind verschiedenen Studiengruppen mit den unterschiedlich gefütterten Muttertieren und Ammen (CD\_HFD (n=3), HFD\_CD (n=5), HFD\_HFD (n=5)) und die Kontrollgruppe (CD\_CD (n=12)) dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Expression der mRNA aufgetragen, gemessen am Vielfachen der Kontrollgruppe CD\_CD. Es zeigt sich nach one-way ANOVA sowie Tukey's post hoc Test ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,5$ ) für CCL2 und TLR6 in der Versuchsgruppe HFD\_HFD gegenüber der Studiengruppe CD\_HFD sowie die Expression von TLR4 in der Studiengruppe HFD\_CD gegenüber der Gruppe HFD\_HFD sowie der Kontrollgruppe. Zudem ist die Expression von Interferon Gamma in der Gruppe HFD\_HFD gegenüber der Gruppen CD\_HFD und HFD\_CD signifikant erhöht. Die weiteren Gruppen- und Einzelvergleiche zeigten hinsichtlich der untersuchten mRNA keine statistisch signifikanten Unterschiede.







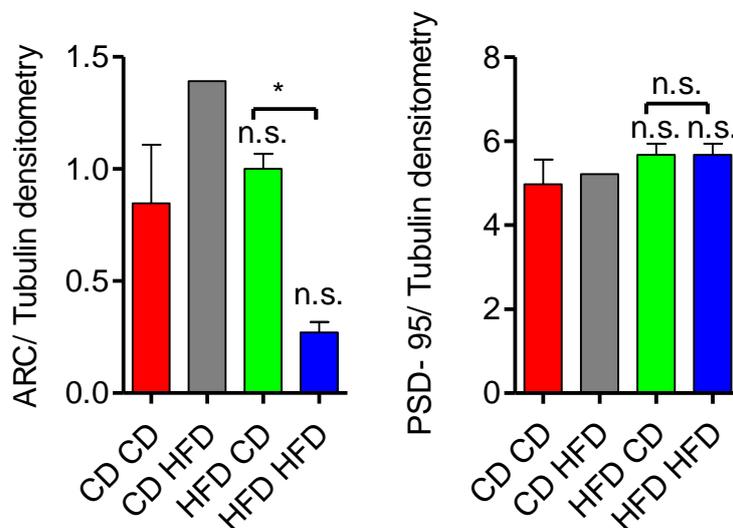
**Abb. 38:** Quantitative real-time PCR-Ergebnisse in fold expression vs. CD\_CD des männlichen Nachwuchses im Ammenexperiment. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. One-way ANOVA und Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD n=8, CD\_HFD n=1, HFD\_CD n=5, HFD\_HFD n=7. Aufgrund der Gruppengröße erfolgte keine statistische Analyse der Gruppe CD\_HFD.

In Abbildung 38 sind die mRNA-Expressionen von Cyclooxygenase (COX) 1 und 2, Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ), Interleukin 6 (IL6), Chemokinligand 2 (CCL 2), Chemokinligand 3 (CCL3), Tumornekrose Faktor (TNF)  $\alpha$ , induzierbare Stickstoffoxidase (NOS) 2, Toll-like-rezeptor (TLR) 6 und 4, Interleukin (IL) 18 und 12 und Interferon Gamma (IFN  $\gamma$ ) innerhalb der verschiedenen Gruppen des männlichen Wildtyp-Nachwuchses dargestellt. Auf der X-Achse sind verschiedenen Studiengruppen CD\_HFD (n=1), HFD\_CD (n=5), HFD\_HFD (n=7) und die Kontrollgruppe CD\_CD (n=8) dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Expression der mRNA, gemessen am Vielfachen der Kontrollgruppe CD\_CD. Es zeigt sich nach one-way ANOVA sowie Tukey's post hoc Test keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der mRNA Expression oben genannter Marker innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen.

#### 4.2.6 Untersuchungen auf Protein-Ebene

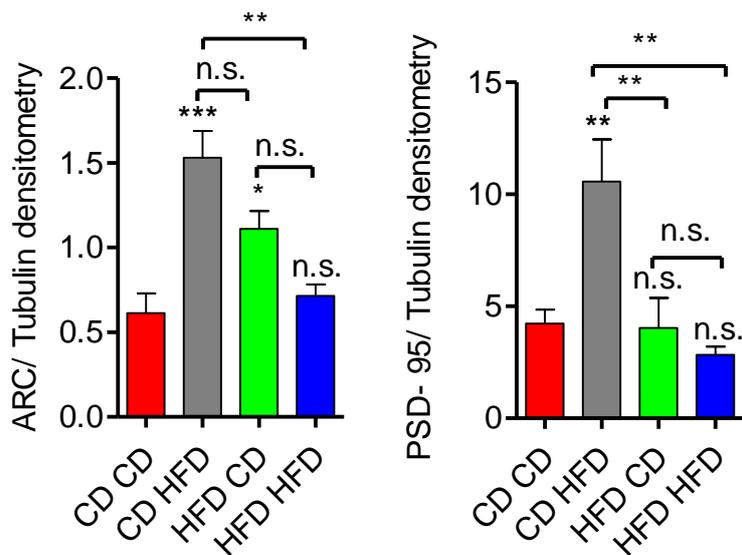
Zur Untersuchung potentieller Unterschiede in Bezug auf die synaptische Plastizität als histopathologisches Korrelat wurde auf Proteinebene mittels Westernblot-Analyse aus

dem Homogenat einer Hemisphäre die PSD-95-Proteinlevel zwischen den Gruppen des Nachwuchses im Ammenexperiment verglichen. Zudem erfolgte ergänzend zur Untersuchung neuroinflammatorischer Prozesse auf RNA-Ebene mittels real time PCR (Kapitel 4.2.5) die Untersuchung von Apoptosis Repressor with CARD (ARC) auf Proteinebene, wobei es sich um ein Protein handelt, das mit der Caspase 2 und 8 interagiert und auf diesem Weg maßgeblich bei der Steuerung von Inflammation und Apoptose interagiert.



**Abb. 39:** Westernblot Analyse des männlichen Nachwuchses im Ammenexperiment. Links PSD-95/Tubulin densitometry, rechts ARC/Tubulin densitometry. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. One-way ANOVA,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD n=10, CD\_HFD n=1, HFD\_CD n=4, HFD\_HFD n=5. Aufgrund der Gruppengröße erfolgte keine statistische Analyse der Gruppe CD\_HFD.

Die Ergebnisse der Westernblotanalyse des männlichen Nachwuchses im Ammenexperiment sind in Abbildung 39 visualisiert. Auf der Y-Achse sind jeweils die relativen Densitometrieergebnisse (PSD95/Tubulin und ARC/Tubulin) aufgetragen, auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf PSD-95. Die ARC/Tubulin Densitometrie ist in der HFD\_CD-Gruppe signifikant höher als in der HFD\_HFD-Gruppe, weitere signifikante Unterschiede finden sich hier nicht.



**Abb. 40:** Westernblot Analyse des männlichen Nachwuchses im Ammenexperiment. Links PSD-95/Tubulin densitometry, rechts ARC/Tubulin densitometry. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. One-way ANOVA,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD n=12, CD\_HFD n=4, HFD\_CD n=5, HFD\_HFD n=5.

Dargestellt in Abbildung 40 sind die Ergebnisse der Westernblotanalyse des weiblichen Nachwuchses im Ammenexperiment. Auf der Y-Achse sind jeweils die relativen Densitometrieergebnisse (PSD95/Tubulin und ARC/Tubulin) aufgetragen, auf der X-Achse sind die verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Im weiblichen Nachwuchs zeigt sich auf Proteinebene eine signifikant höhere ARC-Expression in der CD\_HFD- und HFD\_CD- Gruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe, sowie im Fall der CD\_HFD-Gruppe auch gegenüber der HFD\_HFD-Gruppe. Die CD\_HFD-Gruppe zeigt zudem im Vergleich mit allen anderen Versuchsgruppen einen signifikant höheren PDS-95/Tubulin-Quotienten.

## 5 Diskussion und Ausblick

Fetteiche Ernährung ist der Trigger für inflammatorische Prozesse, sowohl peripher als auch im Hypothalamus und verursacht hierdurch metabolische Veränderungen. Diese Veränderungen sind in letzter Zeit auch zunehmend hinsichtlich inflammatorischer Prozesse im Bereich des ZNS und hier insbesondere in den Hirnregionen, die wie

Hippocampus und Kortex für die Kognition verantwortlich sind, im Fokus (Whitmer et al., 2008; White et al., 2009; Bilbo et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass sich eine fettreiche Ernährung sowohl auf verhaltensbiologische Prozesse, als auch auf neuropathologische Korrelate der Alzheimer Krankheit auswirkt (Ho et al., 2004; Julien et al., 2010; Maesako et al., 2012; Knight et al., 2014; Martin et al., 2014). Es hat sich bereits sowohl in den Experimenten der eigenen Arbeitsgruppe (siehe Kapitel 1.5) als auch in publizierten Studien gezeigt, dass diese Effekte nicht nur im mittleren Lebensalter relevant sind, sondern auch von adipösen Muttertieren auf den Nachwuchs übertragen werden können (Lahiri et al., 2008; White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; Martin et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst ergänzende Untersuchungen an Mäusen durchgeführt, die teils Wildtyp-Tiere und teils APP/PS1<sup>+/-</sup>-Tiere waren. Die jeweiligen Muttertiere waren entweder fettreich ernährt oder erhielten eine Kontrolldiät mit normalem Fettanteil. Die Ernährung der Nachkommen war ebenfalls entweder fettreich oder normal (siehe Abb.3).

Die Auswirkungen von mütterlicher Adipositas während Schwangerschaft und Säugezeit auf kognitive Defizite der Nachkommen sind bislang wenig untersucht. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass als neuropathologische Korrelat die Tau-Expression hippocampaler Neuronen beim Nachwuchs fettreich ernährter Mäuse unabhängig von der eigenen Ernährung signifikant erhöht ist (Martin et al., 2014). In einem Vorexperiment konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Konzentration von A $\beta$  1-40 im Hippocampus beim Nachwuchs adipöser Muttertiere ebenfalls signifikant erhöht ist (Kapitel 1.5, Abb.7). Dieser Befund wurde mittlerweile auch durch andere Arbeiten bestätigt (Hawkes et al., 2015). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass auch in der histochemischen Färbung mit Thioflavin S von Kortex signifikant mehr Amyloid Beta bei Tieren mit fettreich ernährten Muttertieren, unabhängig von der eigenen Ernährung, sowie in der Gruppe, die selbst fettreich ernährt wurde. Dies zeigt, dass die Ernährung der Mutter die gleichen Auswirkungen auf kognitive Einbußen im höheren Lebensalter zu haben scheint, wie die eigene hochkalorische Ernährung. Weshalb sich die beiden Effekte nicht addieren oder zumindest eine Verstärkung erzielen ist unklar. Denkbar wäre an dieser Stelle ein Deckeneffekt. Im Bereich des

Hippocampus zeichnet sich bei denselben Tieren ein ähnliches Ergebnis ab, jedoch deutlich weniger stark ausgeprägt. An dieser Stelle ist anzunehmen, dass die kortikale Pathologie der hippocampalen voraus eilt. Die gefundenen Unterschiede hinsichtlich der Amyloid Beta Plaquebildung in Kortex und Hippocampus sind möglicherweise ein morphologisches Korrelat für die schlechtere Leistung in einem räumlichen Gedächtnistest dieser Tiere (Siehe Kapitel 1.5, Abb. 6). Dies entspricht bereits publizierten Befunden, die beschreiben, dass der Nachwuchs von Muttertieren mit nahrungsinduzierter Adipositas kognitive Einbußen aufweist (White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; Martin et al., 2014).

Einhergehend mit erhöhten Amyloid Beta Konzentrationen ist auch ein erhöhtes Vorkommen neuroinflammatorischer Prozesse beobachtet worden (Gendelman, 2002; Rodriguez et al., 2009; Heneka et al., 2010; Hawkes et al., 2015). So wird auch Astroglia durch Amyloid Beta aktiviert (Rodriguez et al., 2009; Heneka et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde daher auch die Auswirkung auf die Anzahl von Astrozyten mittels immunhistochemischer Färbung im transgenen und im Wildtyp Nachwuchs untersucht. In den APP/PS1<sup>+/-</sup>- Tieren zeigt sich im Bereich des Kortex ein signifikant höherer Anteil an Astrozyten als in der Gruppe mit adipösen Muttertieren und eigener normaler Diät. Im Bereich des Hippocampus ist der Anteil in dieser Gruppe nur im Vergleich mit der Gruppe HFD\_HFD erhöht. In der Gruppe der Wildtyp-Tiere zeigt sich ein erhöhter Anteil in der Gruppe mit normal ernährten Muttertieren und eigener hochkalorischer Diät im Vergleich zu den beiden Gruppen mit fettreich ernährten Muttertieren (HFD\_CD und HFD\_HFD). White et al. konnten 2009 im Rattenmodell ebenfalls keine homogene Beeinflussung durch mütterliche Ernährung auf die gliale Aktivität feststellen. Als mögliche Ursache hierfür ist, zumindest hinsichtlich der transgenen Tiere, die bereits beschriebene und mit Alzheimer assoziierte gliale Atrophie zu diskutieren (Yeh et al., 2011).

Zur weiteren Differenzierung dieser heterogenen Ergebnisse erfolgte die ergänzende Untersuchung neuroinflammatorischer Marker auf RNA-Ebene. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung von Toll-like-Receptor 4 in der Gruppe CD\_HFD des transgenen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchs im Vergleich zu den anderen drei Gruppen. Für die weiteren gängigen Marker zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen

innerhalb des männlichen Wildtyp- bzw. APP/PS1<sup>+/-</sup> - Nachwuchs. An dieser Stelle muss jedoch kritisiert werden, dass die zur Verfügung stehende Menge an RNA sehr gering war, weshalb die oben beschriebene Präamplifizierung erfolgte. Zudem waren die Gruppengrößen grenzwertig klein, sodass sich sogenannte Ausreiser in der quantitativen Auswertung stärker bemerkbar machen. Diese Effekte spiegeln sich auch in der Größe der Fehlerbalken wider. Bilbo und Kollegen konnten 2010 zeigen, dass es zu einer deutlichen Aktivierung von Mikroglia im Nachwuchs fettreich ernährter Muttertiere kommt und auch White und Kollegen hatten signifikant höhere Level von iNOS, Interleukin 6, Iba1 und anti-GFAP im Nachwuchs adipöser Mütter beschrieben. Um die Ergebnisse in diesem Kontext besser einordnen zu können, wäre eine Wiederholung des Experimentes sowie eine ergänzende Untersuchung der Gruppen des weiblichen Wildtyp- und APP/PS1<sup>+/-</sup> - Nachwuchs sinnvoll, insbesondere vor dem Hintergrund, dass auf Proteinebene bereits Unterschiede hinsichtlich neuroinflammatorischer Marker an diesen Tieren gefunden wurden (siehe Kapitel 1.5, Abb.8).

Die negativen Effekte mütterlicher Adipositas auf die kognitiven Fähigkeiten des Nachwuchses und Ausprägung Alzheimer-typischer Morphologien sind zunehmend Gegenstand der Forschung und mittlerweile in mehreren Studien publiziert (Lahiri et al., 2008; White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; Martin et al., 2014; Hawkes et al., 2015).

Zu welchem Zeitpunkt innerhalb der intrauterinen und frühen postnatalen Phase diese Effekte auf die kognitiven Fähigkeiten an den Nachwuchs weitergegeben werden, ist bislang noch nicht erforscht worden. Es ist anzunehmen, dass sowohl die Phase der Schwangerschaft, als auch Prozesse während der Säugezeit hierzu beitragen (Martin et al., 2014). Denn es ließ sich bereits zeigen, dass in einem Ammenexperiment durch das Säugen durch eine fettreich ernährte Amme die negativen Effekte hinsichtlich des metabolischen Syndroms im Nachwuchs addiert werden. Die Autoren vermuten hierfür eine Zunahme von Leptin (Masuyama et al., 2014). Jedoch gilt es zu untersuchen in welcher Phase zu welchem Anteil und vor allem durch welche Pathomechanismen kognitive Defizite vermittelt werden. Zu diesem Zweck erfolgte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit erstmals ein Ammenexperiment in Hinblick auf kognitive Defizite. Es wurden Wildtyp-Muttertiere randomisiert entweder mit fettreicher Nahrung

beziehungsweise mit einer Kontrolldiät gefüttert und mit Wildtypmännchen verpaart. Nach der Geburt wurde der Nachwuchs jeweils diesen Ammen zugeteilt (siehe Kapitel 3, Abb. 9).

Die Gewichtsverläufe der Muttertiere sind nach Beginn der spezifischen Fütterungsphase deutlich divergent, die fettreich ernährten Tiere nehmen stetig stärker an Gewicht zu, als die Tiere der Kontrollgruppe. Diese Kurven sind vergleichbar mit denen des Vorexperimentes (siehe Kapitel 1.5) und den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen (Grattan, 2008; Shankar et al., 2008; White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; Mcguire et al., 2010). Wir konnten zeigen, dass der Grund für die stärkere Gewichtszunahme nicht die vermehrte Nahrungsaufnahme war. Die pro Tag zugeführte Futtermenge zeigte sich ähnlich, jedoch war die Zufuhr von Energie durch die Nahrung aufgrund des höheren Kaloriengehaltes signifikant höher.

Im Nachwuchs zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Gewichtsverläufen, allerdings ist hierbei zu sagen, dass auch in der Literatur die Angaben hierzu sehr inhomogen sind und einige Publikationen ein erhöhtes Geburtsgewicht beim Nachwuchs adipöser Muttertieren beschreiben, viele weitere Arbeiten mit gleichem oder ähnlichem experimentellen Ansatz jedoch keine Unterschiede feststellten (Rolls et al., 1982; Buckley et al., 2005; White et al., 2009). White et al vermuten den Grund für die verschiedenen Ergebnisse in den unterschiedlichen Futterzusammensetzungen sowie die unterschiedlich langen Fütterungsphasen.

Übergewicht und fettreiche Ernährung resultieren häufig in zahlreichen metabolischen Veränderungen wie einer gestörten Glucosetoleranz beziehungsweise Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und Hypercholesterinämie. Dieser auch als metabolisches Syndrom zusammengefasster Symptomenkomplex ist häufig miteinander vergesellschaftet (Pasinetti et al., 2008). Es zeigt sich hierdurch ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie neurodegenerative Erkrankungen (Haslam et al., 2005; Pasinetti et al., 2008; Bruce-Keller et al., 2009). Die Auswirkungen von Übergewicht und fettreicher Ernährung auf kognitive Funktionen treten jedoch auch unabhängig hiervon auf (Elias et al., 2003; Whitmer et al., 2008; Bruce-Keller et al., 2009; Singh-Manoux et al., 2012). Daher ist es prinzipiell eher positiv zu werten, dass in der vorliegenden Arbeit weder im Nachwuchs, noch bei den Muttertieren Unterschiede

in den Blutzuckerspiegeln nachgewiesen wurden. So können die Auswirkungen mütterlicher Adipositas und fettreicher Ernährung während der Schwangerschaft und Säugezeit unabhängig von einer zusätzlich bestehenden gestörten Glucosetoleranz betrachtet werden. Jedoch zeigen andere Veröffentlichungen erhöhte Blutglucosekonzentrationen im Nachwuchs adipöser Muttertiere im Vergleich zum Nachwuchs normal ernährter Muttertiere (Masuyama et al., 2014; Hawkes et al., 2015).

Eine langjährig etablierte Methode zur Beurteilung kognitiver Fähigkeiten im Mausmodell ist der Morris-Water-Maze Versuchsaufbau. Hier wird das räumliche Lernvermögen getestet. Die Methode findet häufig Anwendung bei der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen (Morris, 1984). Die Tiere werden täglich über einen Zeitraum von sechs Tagen an derselben Stelle in ein rundes Wasserbecken mit getrübbtem Wasser gesetzt und müssen eine nicht-sichtbare Plattform erreichen (Morris, 1984). In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Muttertiere untersucht. Zum Zeitpunkt der Verhaltenstest waren diese circa 12 Monate alt und wurden circa 10 Monate lang entsprechend der Gruppenzugehörigkeit entweder mit der fettreichen Ernährung beziehungsweise mit dem Kontrollfutter gefüttert. Ähnliche Experimente sind bereits mehrfach beschrieben worden (Cao et al., 2007; Bruce-Keller et al., 2009; Wu et al., 2013). Es ist sowohl im Tierversuch, als auch in großen klinischen Studien (Elias et al., 2003; Whitmer et al., 2008; Van Lieshout et al., 2011; Singh-Manoux et al., 2012; Williams et al., 2014) erwiesen, dass fettreiche Ernährung und Adipositas im mittleren Lebensalter mit kognitiven Defiziten im Alter einhergehen. So konnte auch mehrfach gezeigt werden, dass adipöse Tiere im Morris Water Maze Versuchsaufbau signifikant schlechter abschneiden, als Tiere die normal gefüttert werden. Hierzu sind die hier erzielten Ergebnisse eher gegenläufig. Die Tiere haben im Laufe des Versuches alle einen Lernprozess durchlaufen, welches daran ersichtlich ist, dass mit jedem Tag die Plattform schneller gefunden wurde. Allerdings lassen sich trotz der langen vorangegangenen Fütterungsphase von 10 Monaten zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellen. Tendenziell ist im mittleren Teil die Gruppe mit den adipösen Tieren sogar schneller, am Ende des Experimentes decken sich die Kurven jedoch wieder. Dies lässt sich nur schwer erklären und steht absolut im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Daten sowie den Ergebnissen, die im vergleichbaren Vorexperiment in der Arbeitsgruppe erhoben wurden (siehe Kapitel 1.5). Weiterführende

molekularbiologische Untersuchungen an den Tieren hinsichtlich synaptischer Plastizität und neuroinflammatorischer Prozesse könnten hier eventuell Aufschluss geben.

Schlechteres Abschneiden in verhaltensbiologischen Untersuchungen beim Nachwuchs adipös ernährter Muttertiere sowie in Abhängigkeit der eigenen Diät wurde ebenfalls bereits in der eigenen Arbeitsgruppe (vergleiche Kapitel 1.5) sowie in unabhängig hiervon veröffentlichten Daten nachgewiesen (White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; Wu et al., 2013). Die genauere Untersuchung mittels Ammenexperiment ist in Bezug auf diese Fragestellung zuvor nicht erfolgt. Die Testung erfolgte im Lebensalter von sechs Monaten. Weder im weiblichen, noch im männlichen Nachwuchs konnten zwischen den unterschiedlichen Gruppen Unterschiede gezeigt werden. Dies steht im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Untersuchungen (Cao et al., 2007; White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; Wu et al., 2013; Masuyama et al., 2014).

Die möglichen Gründe hierfür sind zahlreich. Zum einen ist der Zeitpunkt der Untersuchung in der Entwicklung mit dem sechsten Lebensmonat relativ früh gewählt. Bisherige Daten zeigen, dass kognitive Defizite in transgenen APP/PS1<sup>+/-</sup>-Tieren erst im Alter von fünf bis sieben Monaten im Morris-Water-Maze Versuch messbar werden (Arendash et al., 2001; Gordon et al., 2001; Liu et al., 2002; Puolivali et al., 2002; Heneka et al., 2006). So ist es vorstellbar, dass Effekte, die nicht durch einen Gendefekt, sondern durch mütterliche Ernährung während Schwangerschaft und Säugezeit vermittelt werden erst später und gegebenenfalls weniger stark ausgeprägt sind (Martin et al., 2014). Des Weiteren ist kritisch anzumerken, dass die Gruppengrößen mit ein bis fünf Tieren pro Gruppe auch hier extrem klein waren. Dies ist am ehesten dadurch begründet, dass die Mäuse während der Aufzucht mehreren negativen Störfaktoren ausgesetzt waren, die mutmaßlich zu deutlichem Stress für die Tiere geführt haben könnten. Unter anderem bestand während der Aufzuchtphase eine große Baustelle vor dem Containerbau, hierdurch bedingt ließ sich häufig ein hoher Lärmpegel sowie ausgeprägte Vibrationen im Gebäude feststellen. Ein Großteil des Wurfes wurde häufig durch die Mutter gefressen. Hierbei ist unklar, ob der Nachwuchs, der zunächst lebend gesichtet wurde, durch die Mütter vernachlässigt wurde und daher starb und gefressen wurde, oder direkt gefressen wurde. Die Sterblichkeit von Labormaus-Würfen ist ein bekanntes, aber bislang wenig untersuchtes Thema (Weber

et al., 2013). Weber und Kollegen konnten diesbezüglich keine Hinweise auf das aktive Töten von neugeborenen Mäusen durch die Mütter beobachten, zeigen jedoch auf, dass es häufig zum Verlust des Nachwuchses von Labormäusen kommt. Aus diesem Grund erfolgte mehrfach die Wiederholung des gesamten Experimentes, aber dennoch konnten keine ausreichend großen Gruppengrößen generiert werden.

Um Unterschiede herauszufinden, die sich zwar noch nicht im Verhalten der Mäuse widerspiegeln, jedoch auf molekularbiologischer Ebene sichtbar sind, erfolgte unter anderem die Untersuchung neuroinflammatorischer Marker auf mRNA-Ebene. Neurodegenerative Erkrankungen werden stets von neuroinflammatorischen Prozessen begleitet (Heneka et al., 2015). So konnte bereits gezeigt werden, dass kognitive Einbußen im Nachwuchs fettreicher ernährter Tiere mit erhöhten Spiegeln von Interleukin 6, Interleukin 1 $\beta$  und induzierbarer Stickoxidase im Nachwuchs einhergehen (White et al., 2009; Bilbo et al., 2010). Es erfolgte die Untersuchung von mRNA des weiblichen sowie männlichen Nachwuchses auf gängige neuroinflammatorische Marker. Trotz Präamplifikation und ausreichend eingesetzter Menge an mRNA ließen sich jedoch keine Unterschiede feststellen. Dies ist kritisch einzuordnen, da sowohl in der eigenen Arbeitsgruppe (siehe Abb. 8), als auch in weiteren Arbeitsgruppen (Lahiri et al., 2008; Martin et al., 2014; Hawkes et al., 2015) ebenfalls deutliche Unterschiede bestanden. Auch ein bereits veröffentlichtes Ammenexperiment, das die Auswirkungen eines metabolischen Syndroms in Abhängigkeit der Ernährung von Mutter und Amme auf den Nachwuchs untersucht, ergibt Hinweise, dass sich Effekte auch durch die Ernährung der Amme addieren könnten (Masuyama et al., 2014). Bei fehlenden Unterschieden in den Verhaltensuntersuchungen deuten die Ergebnisse jedoch darauf hin, dass die potentiell zu erwartenden Effekte auf den Nachwuchs durch die mütterliche Ernährung beziehungsweise durch die Ernährung der Amme ausgeblieben sein.

In frühen Krankheitsstadien, weit vor Manifestation eines *mild cognitive impairment* (klinische Frühform kognitiver Defizite) oder manifesten kognitiven Defiziten im Sinne eines Morbus Alzheimer kommt es bereits zu neuronaler Dysfunktion auf dem Level der Synapsen (Dorostkar et al., 2012). Hatanaka und Kollegen konnten 2016 zeigen, dass mütterliche fettreiche Ernährung mit einer Instabilität von Dendriten im Kortex des Nachwuchses vergesellschaftet ist. Diese Auswirkungen konnten auch bei normaler Diät

des Nachwuchses festgestellt werden. Dieser Effekt war im gleichen Maße messbar beim Nachwuchs, der ausschließlich während der Säugezeit mütterlicher High-fat-Diet ausgesetzt war. Bei eigener fettreicher Ernährung, zeigte sich im Nachwuchs zusätzlich eine starke Verminderung der dendritischen Fortsätze *per se*. Perinatale und dauerhafte fettreiche Ernährung führen zur Aktivierung von Microglia (White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; Hatanaka et al., 2016), was wiederum zu einer Reduktion der Anzahl der Synapsen führt (Hatanaka et al., 2016). PSD95 ist ein postsynaptisches Protein, welches maßgeblich zur Entwicklung von Synapsen und synaptischer Plastizität beiträgt. Bei der Alzheimer Krankheit wird eine Ursache in der Entwicklung kognitiver Defizite durch Amyloid beta-induzierten Verlust von Synapsen und Neuronen vermutet. Hiermit korrelierend kommt es zu einer Herabregulation von PSD95 (Tu et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch in der Westernblot Analyse diesbezüglich keine signifikanten Einflüsse von mütterlicher Adipositas während Schwangerschaft und/oder Säugezeit gefunden werden. Ergänzend könnten aufgrund der Vielzahl weiterer möglicher synaptischer Destruktion noch die präsynaptischen Marker Synaptotagmin, Synaptobrevin und munc-18 sowie die postsynaptischen Marker Synaptophysin und CaMKII zur weiteren Evaluation der synaptischen Plastizität erfolgen (Weberpals et al., 2009) .

Auf Proteinebene zeigte sich „Apoptosis Repressor with CARD“ (ARC) ebenfalls ohne signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen in der Western Blot Analyse. ARC ist ein Protein, dessen Expression eng an die neuronale Aktivität gebunden ist. Es gibt experimentelle Hinweise, dass ARC von Neuronen mit neuritischer Dystrophie nicht mehr exprimiert werden kann und mit einem Verlust neuronaler Aktivität vergesellschaftet ist (Dorostkar et al., 2012).

Dass die Untersuchungen auf Proteinebene ebenfalls ohne signifikante Unterschiede sind, stützt die Vermutung, dass sämtliche Untersuchungsergebnisse valide sind und die Ernährung der Amme im vorliegenden Experiment keinen Einfluss auf die postnatal festgestellten kognitiven Defizite des Nachwuchses fettreich ernährter Mütter beiträgt.

Die Relevanz des Themas wird durch die Vielzahl der erscheinenden Publikationen zu diesem Thema in den letzten Jahren deutlich. Ein Ammenexperiment hinsichtlich der

Auswirkungen auf kognitive Defizite im Nachwuchs in Abhängigkeit der Ernährung von Mutter und Amme wurde bislang noch nicht veröffentlicht.

Da bereits eine andere Arbeitsgruppe einen additiven Effekt bei fettreicher Ernährung der Amme in Bezug auf die Risiken eines metabolischen Syndroms feststellen konnte (Masuyama et al., 2014) und negative Effekte auf kognitive Fähigkeiten im Nachwuchs fettreich ernährter Muttertiere (White et al., 2009; Bilbo et al., 2010; Wu et al., 2013) bekannt sind, sollte dieses Experiment in deutlich größerem Rahmen wiederholt werden, um mit größeren Gruppengrößen die hier erzielten Ergebnisse zu reproduzieren. Zudem sind weitere Experimente notwendig, um zu differenzieren, ob oben genannte Effekte durch die fettreiche Ernährung *per se* oder die adipöse Konstitution der Muttertiere verursacht ist. In bislang beschriebenen Studien werden diese beiden unterschiedlichen Einflüsse nicht voneinander getrennt betrachtet (Martin et al., 2014). Ebenso gilt es die Vielzahl an potentiellen Übertragungsmechanismen zu erforschen, prinzipiell ist von einer multifaktoriellen Genese mit multiplen Pathomechanismen auszugehen. Epigenetische Phänomene während der intrauterinen Entwicklungsphase könnten hierfür mit verantwortlich sein (Graff et al., 2012; Li et al., 2017). Mehrfach sind veränderte Leptinspiegel im Nachwuchs adipöser Muttertiere (Martin et al., 2014) und in Abhängigkeit der eigenen Diät dokumentiert worden. Leptin wird von den Muttertieren und der Plazenta produziert und erreicht somit das Gehirn der Föten. Hier ist es an der Hirnentwicklung beteiligt. Postnatal ist der Leptin-Spiegel des Nachwuchses von den Konzentrationen in der Muttermilch abhängig, eine Beeinflussung der kognitiven Defizite ist über diesen Weg somit sowohl intrauterin als auch in der frühen postnatalen Phase wahrscheinlich (Moody et al., 2017). Aber auch weniger offensichtliche Wege wurden bereits beschrieben. So wurde bereits erforscht, dass ein durch Adipositas und fettreiche Ernährung verändertes Mikrobiom der Mutter Auswirkungen auf die Kognition im Nachwuchs hat (Bruce-Keller et al., 2017). Das Mikrobiom selbst wiederum steht aktuell ebenfalls im Fokus der Wissenschaft und es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass ein verändertes Mikrobiom sowohl Auswirkungen auf zahlreiche Risikofaktoren der Alzheimer Demenz, wie Diabetes mellitus Typ 1 und 2 und die Koronare Herzerkrankung hat, als auch selbst Einfluss auf die angeborene und erworbene Immunabwehr hat (Erny et al., 2017). Zudem gibt es mehrere Hinweise darauf, dass Mikrobiom auch direkt Einfluss auf die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen

wie Morbus Alzheimer nimmt. Diskutiert wird an dieser Stelle durch die Darmbakterien sezernierte Moleküle sowie Hormone, Zytokine und Neurotransmitter, die vom Darm aus in den systemischen Kreislauf kommen (Erny et al., 2017). In wie weit diese Effekte perinatal von der Mutter auf den Nachwuchs übertragen werden und inwiefern sie für die Übermittlung negativer Effekte auf die Kognition in Zusammenhang mit mütterlicher Adipositas verantwortlich sind, gilt es in zukünftigen Studien zu untersuchen.

Während der postnatalen Entwicklung des Gehirns kommt es bis zur Pubertät zu einem natürlichen Verlust nicht genutzter, überzähliger Synapsen, dem sogenannten *synaptic pruning* (Tremblay et al., 2010; Hong et al., 2016). Diese Phase der Entwicklung wird nach aktuellem Stand der Wissenschaft hauptsächlich von Umweltfaktoren beeinflusst. Dieser Prozess erfolgt unter Einbindung der angeborenen Immunabwehr. Im erwachsenen Alter wird dieser Prozess herabreguliert (Tremblay et al., 2010; Hong et al., 2016). Im Rahmen der Alzheimer Krankheit kommt es jedoch zu einer Reaktivierung dieses Prozesses einhergehend mit einem Verlust von Synapsen, der maßgeblich für den klinischen Verlauf mitverantwortlich ist (Hong et al., 2016). Eine perinatale Beeinflussung durch mütterliche Adipositas könnte den Vorgang des *synaptic prunings* gegebenenfalls beeinflussen, ebenso wäre eine Beeinflussung der Reaktivierung im Alter im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen denkbar. Dies muss im Weiteren untersucht werden.

Die potentiellen perinatalen Einflüsse von mütterlicher Adipositas auf kognitive Defizite im Nachwuchs sind multifaktoriell und nicht einheitlich reproduzierbar. Viele potentielle Pathomechanismen sind bislang nur unvollständig verstanden und eine Reihe weiterer Studien wird notwendig sein, diese komplexen Vorgänge weiter aufzuklären.

## **6 Zusammenfassung**

Morbus Alzheimer ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit mit stetig steigender Inzidenz. Nur ein kleiner Anteil der Fälle ist rein genetisch bedingt, die meisten Krankheitsfälle sind durch multiple Risikofaktoren beeinflusst. Kausale Behandlungskonzepte bestehen bislang nicht. Da keine kausalen Behandlungskonzepte

bestehen und die Krankheit am Lebensende auftritt, käme eine Verzögerung des Ausbruchs einer Verhinderung der Krankheit gleich. Ein wichtiger und beeinflussbarer Risikofaktor ist Adipositas. Zum einen ist Adipositas im mittleren Lebensalter mit einer höheren Inzidenz von kognitiven Defiziten im Alter vergesellschaftet, zum anderen ist mehrfach eine negative Auswirkung perinataler mütterlicher Adipositas auf kognitive Fähigkeiten im Nachwuchs beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte zunächst die tieferegehende Auswertung eines vorangegangenen Experimentes, wo der Nachwuchs fettreich ernährter Wildtyp- und APP/PS1<sup>+/-</sup>-Muttertiere untersucht wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass in der Thioflavin S-Färbung eine deutlich höhere Amyloid-beta Plaque Belastung bei den Tieren mit fettreich ernährten Muttertieren festgestellt werden. Unterschiede hinsichtlich inflammatorischer Marker zeigten sich sowohl in der immunhistochemischen Färbung mit anti-GFAP, als auch in der Untersuchung auf mRNA-Ebene mittels real time PCR nicht.

Im Anschluss wurde ein sogenanntes Ammenexperiment durchgeführt. Hierfür wurden ausschließlich Wildtyp-Mäuse verwendet. Die Muttertiere wurden zur Hälfte mit fettreicher Ernährung und zur anderen Hälfte mit einer standardisierten Kontrolldiät gefüttert. Postnatal wurde der Nachwuchs jeweils entsprechend gefütterten Ammen zugeordnet. Im Alter von 6 Monaten erfolgte zunächst die verhaltensbiologische Testung mittels Openfield- und Morris-Water-Maze Versuch, wo sich jeweils kein Einfluss durch die unterschiedliche Fütterung der Muttertiere auf die Leistung des Nachwuchses zeigte. Ergänzend erfolgte hiernach die molekularbiologische Aufarbeitung. In der Untersuchung auf mRNA-Ebene konnte kein Effekt der mütterlichen Ernährung auf gängige inflammatorische Marker im Nachwuchs gezeigt werden und auch auf Proteinebene ergab sich kein Hinweis auf Unterschiede hinsichtlich der synaptischen Plastizität.

Die Übertragung kognitiver Defizite von Muttertier auf den Nachwuchs in Zusammenhang mit mütterlicher Adipositas scheint offensichtlich multifaktoriell und zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung zu erfolgen. Zum detaillierteren Verständnis sind weitere Untersuchungen an dieser Stelle erforderlich.

## 7 Tabellenverzeichnis

**Tab. 1:** Verfügbare Tierzahlen aus dem Vorexperiment .....- 30 -

**Tab. 2:** Übersicht über die Erstantikörper bei Western Blots .....- 38 -

## 8 Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1:** (Links) (Blau) Verteilungsmuster der A $\beta$ -Plaques (Rechts) (Grün) Die 6 Stadien nach Braak. Verteilungsmuster neurofibrillärer Tangles. Stadien I und II sind die transentorhinalen Stadien, Stadien III und IV die limbischen Stadien und Stadium V und VI die kortikalen Stadien. (Modifiziert nach Braak&Braak 1991 und Goedert 2015) .....- 9 -

**Abb. 2:** Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins.....- 10 -

**Abb. 3:** Versuchsgruppenbildung des Vor-Experiments. NCD = normal chow diet. HFD = high fat diet .....- 20 -

**Abb. 4:** Gewichtsverlauf Muttertiere nach Beginn der Futterphase im Alter von 8 Wochen. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet.....- 21 -

**Abb. 5:** Gewichtsverlauf der Nachkommenschaft. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, app = APP/PS1<sup>+/-</sup>, wt = Wildtyp, die Ernährung an erster Position ist die der Mutter, die an zweiter Stelle die des Nachwuchses.....- 22 -

**Abb. 6:** Räumliche Gedächtnisbildung analysiert mit dem Morris-Water-Maze-Versuchs bei Nachkommen normal ernährter Mütter (1. Position NCD) oder fettreich hochkalorisch ernährter Mütter (1. Position HFD), wobei die Nachkommen entweder normal ernährt (2. Position NCD) oder fettreich hochkalorisch ernährt wurden (2. Position HFD).(n = 10-15 Tiere pro Gruppe, ANOVA, pos-hoc TUKEY-test, Vergleich innerhalb der Wildtyp- oder APP/PS1<sup>+/-</sup>- Gruppen:\* <0.05, \*\* <0.01, \*\*\* <0.001; Vergleich zwischen APP/PS1<sup>+/-</sup> und Wildtyp Gruppen, # <0.05, ## <0.01, ### <0.001, #### < 0.0001) .....- 23 -

**Abb. 7:** SDS-fraction A $\beta$ 1-38 (links) und A $\beta$  1-40 im Hippocampus bei Nachkommen normal ernährter Mütter (1. Position NCD) oder hochkalorisch fettreich ernährter adipöser Mütter (1. Position HFD), wobei die Nachkommen entweder normal ernährt (2. Position NCD) oder hochkalorisch fettreich ernährt worden (2.Position HFD). (n =

10 - 15 Tiere pro Gruppe, ANOVA, pos-hoc TUKEY-test, Vergleich innerhalb der wildtyp oder APP/PS1<sup>+/-</sup>-Gruppen : \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001) ..... - 24 -

**Abb. 8:** Entzündungsmarker werden durch maternale hochkalorische Ernährung bzw. Adipositas verstärkt. Kennzeichnung 1. Maternale Diät 2. Nachkommen-Diät (NCD: Normaldiät, HFD: Hochkalorisch fettreiche Diät). Analyse for Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL-4) (n = 10 Hirnhomogenate unterschiedlicher Tiere, ANOVA, pos-hoc TUKEY-test, \* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001) ..... - 25 -

**Abb. 9:** Versuchsgruppenbildung Ammenexperiment. .... - 29 -

**Abb. 10:** Aufnahme des Open field Versuchssettings in EthoVision 3.1. a: Auswertungszone "center" und "corridor". b: Auswertungszone der "corner 1-4". c: Projektion der Mausbewegung innerhalb eines 10-s-Intervalls..... - 32 -

**Abb. 11:** Quadranteneinteilung des Morris-Water-Maze und Position der Plattform. - 33 -

**Abb. 12:** Repräsentative Abbildung der Thioflavin-S Färbung des Kortex des weiblichen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchs. Aufgenommen in 10x Vergrößerung. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet; erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6. Bildbearbeitung mit cell P (Olympus, Tokio, Japan) und Quantifizierung mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Es zeigt sich visuell eine vermehrte Darstellung Thioflavin-S gefärbter Anteile in den Gruppen, die entweder bei der mütterlichen Diät und/ oder in der eigenen Ernährung highfat-Diet erhalten haben..... - 40 -

**Abb. 13:** Kortex, weiblicher APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchs. Plaque Anzahl-pro-Gesichtsfeld links, Thioflavin-S-Signalstärke mittig, prozentuale Oberflächenanteile rechts. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet. One-way ANOVA und Tukey's post hoc-Test, p < 0,0001 \*\*\*, p  $\geq$  0,05 n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6..... - 41 -

**Abb. 14:** Repräsentative Abbildung der Thioflavin-S Färbung des Hippocampus des weiblichen APP/PS1<sup>+/-</sup>- Nachwuchs Aufgenommen in 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet; erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit cell P (Olympus, Tokio,

Japan) und Quantifizierung mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Das Bild zeigt visuell eine deutlich vermehrte Darstellung Thioflavin-S-gefärbter Anteile für die NCD-HFD, HFD\_NCD, HFD\_HFD-Gruppe gegenüber der NCD\_NCD-Gruppe.....- 42 -

**Abb. 15:** Hippocampus, APP/PS1<sup>+/-</sup> weiblicher Nachwuchs. Plaque Anzahl pro Hippocampus links, Thioflavin-S-Signalstärke mittig, prozentuale Oberflächenanteile rechts. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet. One-way ANOVA und Tukey's post hoc-Test,  $p < 0,0001$  \*\*\*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6.....- 43 -

**Abb. 16:** Repräsentative Darstellung Anti-GFAP Färbung der Kortex der APP/PS1<sup>+/-</sup> Männchen. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit cell P (Olympus) und Quantifizierung mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Gefärbte Anteile erscheinen weiß, die übrigen Hirnstrukturen sind in Graustufen abgebildet. Rein visuell scheint die gliale Aktivität in der Kontrollgruppe geringer, als in den anderen Gruppen (HFD\_HFD, HFD\_NCD, NCD\_HFD).....- 45 -

**Abb. 17:** Anti-GFAP gefärbte Zellen im Kortex pro Gesichtsfeld (links), Anti-GFAP-Reaktivität pro Gesichtsfeld (mittig), Anti-GFAP Area-fraction (rechts) bei 10x Vergrößerung. Untersucht wurden die APP/PS1<sup>+/-</sup> Männchen. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,0001$  \*\*\*,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6.....- 45 -

**Abb. 18:** Repräsentative Darstellung Anti-GFAP Färbung der Hippocampi der APP/PS1<sup>+/-</sup> Männchen. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit der Software Cell P (Olympus, Tokio, Japan) Quantifizierung der gefärbten Anteile mit Image (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Gefärbte Anteile erscheinen weiß, die übrigen Hirnstrukturen sind in Graustufen abgebildet.

Visuell scheint die Expression von GFAP in der NCD\_NCD Gruppe vermindert im Vergleich zu den anderen drei Gruppen (NCD\_HFD; HFD\_NCD; HFD\_HFD). ...- 46 -

**Abb. 19:** Hippocampus der APP/PS1<sup>+/-</sup> Männchen. Anti-GFAP gefärbte Zellen pro Hippocampus (links), Anti-GFAP-Reaktivität pro Hippocampus (mittig), Anti-GFAP prozentuale Oberflächenanteile (rechts) bei 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,0001$  \*\*\*,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=3, NCD\_HFD n=3, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=6.....- 47 -

**Abb. 20:** Repräsentative Abbildung der Anti-GFAP des Kortex des Wildtyp-Nachwuchses. Aufgenommen in 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet; erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit Cell P (Olympus, Tokio, Japan) und Quantifizierung mittels Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Gefärbte Anteile erscheinen weiß, die übrigen Hirnstrukturen sind in Graustufen abgebildet. Visuell scheint die Expression von GFAP in den verschiedenen Versuchsgruppen ähnlich zu sein.....- 48 -

**Abb. 21:** Anti-GFAP gefärbte Zellen im Kortex der Wildtyp-Männchen pro Gesichtsfeld (links), Anti-GFAP-Signalstärke pro Gesichtsfeld (mittig), Anti-GFAP prozentualen Oberflächenanteile (rechts) bei 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=5, NCD\_HFD n=5, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=5.....- 49 -

**Abb. 22:** Repräsentative Abbildung der Anti-GFAP-Färbung des Hippocampus des Wildtyp-Nachwuchses. Aufgenommen in 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet; HFD = high fat diet; erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. Bildbearbeitung mit Cell P (Olympus), Quantifizierung mit Image J (Mac Biophotonics, Bethesda, MD, USA). Gefärbte Anteile erscheinen weiß, die übrigen Hirnstrukturen sind in Graustufen abgebildet. Visuell scheint die Expression von GFAP in den verschiedenen Versuchsgruppen ähnlich zu sein. - 50 -

- Abb. 23:** Anti-GFAP-Färbung des Hippocampus im männlichen Wildtyp-Nachwuchs. Anti-GFAP gefärbte Zellen im pro Hippocampus (links), Anti-GFAP-Reaktivität pro Hippocampus (mittig), Anti-GFAP area fraction (rechts) bei 4x Vergrößerung. NCD = normal chow diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung des Nachwuchses. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. NCD\_NCD: n=5, NCD\_HFD n=5, HFD\_NCD n=5, HFD\_HFD n=5 ..... - 51 -
- Abb. 24:** Real-time PCR-Ergebnisse in fold expression vs. CD\_CD der APP/PS1<sup>+/-</sup>-Männchen. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Eigene Ernährung. 1way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD CD: n=3, CD HFD: n=3, HFD CD: n=5, HFD HFD n=5 ..... - 53 -
- Abb. 25:** Real-time PCR-Ergebnisse in fold expression vs. CD\_CD der Wildtyp-Männchen. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Eigene Ernährung. One-way ANOVA,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD: n=6, CD\_HFD: n=6, HFD\_CD n= 6, HFD\_HFD: n=7..... - 56 -
- Abb. 26:** Gewichtsverlauf der Muttertiere im Ammenexperiment nach Beginn der Fütterungsphase. HFD = high fat diet (n=19). CD = Kontrolldiät (n=19). ..... - 56 -
- Abb. 27:** Gewichtsverlauf des weiblichen (links) und männlichen (rechts) Nachwuchses im Ammenexperiment nach Geburt. CD = Kontrolldiät, HFD = high fat diet. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. Gruppennzahlen siehe in der Abbildung..... - 57 -
- Abb. 28:** Nahrungs- und Energiezufuhr der Muttertiere während der Fütterungsphase, Schwangerschaft, Säugezeit und danach bis zu den Verhaltensuntersuchungen. Links dargestellt ist die tägliche Nahrungsaufnahme in Gramm pro Maus pro Tag. CD = Kontrolldiät, HFD = high fat diet, rechts die tägliche Energiezufuhr in Kilokalorien pro Maus pro Tag. .... - 58 -
- Abb. 29:** Blutzuckermessungen der Muttertiere zu verschiedenen Zeitpunkten. CD = Kontrolldiät, n=19, HFD = high fat diet, n=19. Unpaired t-test.  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. .... - 59 -

**Abb. 30:** Blutzuckerspiegel im Vollblut bei Sacrifice. Links: männlicher Nachwuchs, rechts: weiblicher Nachwuchs. CD = Kontrolldiät, HFD = high fat diet. Erste Position = Ernährung der Mutter, zweite Position = Ernährung der Amme. (Unpaired t-test links; One-way ANOVA und Tukey's post-hoc Test rechts;  $p \geq 0,05$  n.s.= nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM). Versuchsgruppengröße siehe Abbildung. ....- 59 -

**Abb. 31:** Open-field-Analyse der Muttertiere. HFD=high fat diet (n=19), CD=control diet (n=19). Time in corner, time in center und time in corridor sowie distance moved wurden erhoben. Unpaired t-Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).....- 60 -

**Abb. 32:** Open-field-Analyse des weiblichen Nachwuchses. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. HFD=high fat diet, CD=control diet. CD\_CD n= 11, CD\_HFD n=4, HFD\_CD n=5. Time in corner, time in center und time in corridor sowie distance moved wurden erhoben. One-way ANOVA, Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL). ....- 62 -

**Abb. 33:** Open-field-Analyse des männlichen Nachwuchses. Erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position Ernährung: der Amme. HFD=high fat diet, CD=control diet. CD\_CD n= 12, CD\_HFD n=1, HFD\_CD n=5. Time in corner, time in center und time in corridor sowie distance moved wurden erhoben. Aufgrund der Gruppengröße von DC\_HFD konnte nur CD\_CD mit HFD\_CD verglichen werden. (Unpaired-t-test,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL). ....- 63 -

**Abb. 34:** Räumliche Gedächtnisbildung analysiert mit dem Morris-Water-Maze-Versuch bei den Muttertieren, die entweder hochkalorisch gefüttert wurden (HFD) oder die Kontrolldiät erhielten (CD). Untersucht wird die benötigte Zeit die Plattform zu finden in Sekunden, sowie die Distanz, die hierzu erforderlich ist in Zentimetern. Die Darstellung erfolgt über den Zeitraum des Experimentes von 6 Tagen. Versuchsgruppengröße siehe Legende. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL). ....- 64 -

**Abb. 35:** Räumliche Gedächtnisbildung analysiert mit dem Morris Water Maze-Versuch bei den weiblichen Nachkommen normal ernährter Mütter (1. Position NCD) oder

hochkalorisch fettreich ernährter Mütter (1. Position HFD), wobei die Nachkommen entweder von einer normal ernährten Amme gesäugt wurden (2. Position NCD) oder von einer hochkalorisch fettreich ernährten Amme (2. Position HFD). CD\_CD n= 11, CD\_HFD n=4, HFD\_CD n=5. Untersucht wird die benötigte Zeit die Plattform zu finden in Sekunden, sowie die Distanz, die hierzu erforderlich ist in Zentimetern. Die Darstellung erfolgt über den Zeitraum des Experimentes von 6 Tagen. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL).....- 65 -

**Abb. 36:** Räumliche Gedächtnisbildung analysiert mit dem Morris-Water-Maze-Versuch bei den männlichen Nachkommen normal ernährter Mütter (1. Position NCD) oder hochkalorisch fettreich ernährter Mütter (1. Position HFD), wobei die Nachkommen entweder von einer normal ernährten Amme gesäugt wurden (2. Position NCD) oder von einer hochkalorisch fettreich ernährten Amme (2. Position HFD). CD\_CD n= 12, CD\_HFD n=1, HFD\_CD n=5. Datenerhebung mittels Ethovision 3.1, Noldus Information Technology (Wageningen, NL). .....- 66 -

**Abb. 37:** Quantitative real-time PCR-Ergebnisse in fold expression vs. CD\_CD des weiblichen Nachwuchses im Ammenexperiment. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. 1way ANOVA und Tukey's post-hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD n=12, CD\_HFD n=3, HFD\_CD n=5, HFD\_HFD n=5. ....- 69 -

**Abb. 38:** Quantitative real-time PCR-Ergebnisse in fold expression vs. CD\_CD des männlichen Nachwuchses im Ammenexperiment. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. One-way ANOVA und Tukey's post hoc Test,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD n=8, CD\_HFD n=1, HFD\_CD n=5, HFD\_HFD n=7. Aufgrund der Gruppengröße erfolgte keine statistische Analyse der Gruppe CD\_HFD. ....- 71 -

**Abb. 39:** Westernblot Analyse des männlichen Nachwuchses im Ammenexperiment. Links PSD-95/Tubulin densitometry, rechts ARC/Tubulin densitometry. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. One-way ANOVA,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant.

Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD n=10, CD\_HFD n=1, HFD\_CD n=4, HFD\_HFD n=5. Aufgrund der Gruppengröße erfolgte keine statistische Analyse der Gruppe CD\_HFD. ....- 72 -

**Abb. 40:** Westernblot Analyse des männlichen Nachwuchses im Ammenexperiment. Links PSD-95/Tubulin densitometry, rechts ARC/Tubulin densitometry. CD = control diet, HFD = high fat diet, erste Position: Ernährung der Mutter, zweite Position: Ernährung der Amme. One-way ANOVA,  $p < 0,05$  \*,  $p \geq 0,05$  n.s.=nicht signifikant. Mean  $\pm$  SEM. CD\_CD n=12, CD\_HFD n=4, HFD\_CD n=5, HFD\_HFD n=5. ....- 73 -

## 9 Literaturverzeichnis

**Alzheimer, A**, Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Centralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie 1907; 30: 177-179.

**Arendash, GW, King, DL, Gordon, MN, Morgan, D, Hatcher, JM, Hope, CE and Diamond, DM**, Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. Brain Res. 2001; 891(1-2): 42-53.

**Barker, DJP**, Intrauterine programming of adult disease. Mol. Med. Today 1995; 1(9): 418-423.

**Bilbo, SD and Tsang, V**, Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2010; 24(6): 2104-2115.

**Braak, H and Braak, E**, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol 1991; 82(4): 239-259.

**Bruce-Keller, AJ, Fernandez-Kim, SO, Townsend, RL, Kruger, C, Carmouche, R, Newman, S, Salbaum, JM and Berthoud, HR**, Maternal obese-type gut microbiota differentially impact cognition, anxiety and compulsive behavior in male and female offspring in mice. PloS one 2017; 12(4): e0175577.

**Bruce-Keller, AJ, Keller, JN and Morrison, CD**, Obesity and vulnerability of the CNS. Biochimica et biophysica acta 2009; 1792(5): 395-400.

**Bu, G**, Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature reviews. Neuroscience* 2009; 10(5): 333-344.

**Buckley, AJ, Keseru, B, Briody, J, Thompson, M, Ozanne, SE and Thompson, CH**, Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism*. 2005; 54(4): 500-507.

**Cao, D, Lu, H, Lewis, TL and Li, L**, Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(50): 36275-36282.

**Cedergren, MI**, Maternal morbid obesity and the risk of adverse pregnancy outcome. *Obstet. Gynecol.* 2004; 103(2): 219-224.

**Chomczynski, P and Sacchi, N**, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162(1): 156-159.

**Christian Schultz, KD, Heiko Braak**. Neuropathology in Alzheimer's Disease. In: B. Z. R. Ralph W. Richter, Hrsg., *Alzheimer's Disease: A Physician's Guide to Practical Management*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2004: 21-31.

**Dorostkar, MM and Herms, J**, Arc illuminates Alzheimer's pathophysiology. *Nat. Neurosci.* 2012; 15(10): 1323-1325.

**Dubois, B, Feldman, HH, Jacova, C, Cummings, JL, Dekosky, ST, Barberger-Gateau, P, Delacourte, A, Frisoni, G, Fox, NC, Galasko, D, Gauthier, S, Hampel, H, Jicha, GA, Meguro, K, O'brien, J, Pasquier, F, Robert, P, Rossor, M, Salloway, S, Sarazin, M, De Souza, LC, Stern, Y, Visser, PJ and Scheltens, P**, Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* 2010; 9(11): 1118-1127.

**Elias, MF, Elias, PK, Sullivan, LM, Wolf, PA and D'agostino, RB**, Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart study. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 2003; 27(2): 260-268.

**Erny, D, Hrabe De Angelis, AL and Prinz, M**, Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate. *Immunology* 2017; 150(1): 7-15.

**Esposito, K, Giugliano, F, Di Palo, C, Giugliano, G, Marfella, R, D'andrea, F, D'armiento, M and Giugliano, D**, Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291(24): 2978-2984.

**Fewlass, DC, Noboa, K, Pi-Sunyer, FX, Johnston, JM, Yan, SD and Tezapsidis, N**, Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18(15): 1870-1878.

**Gendelman, HE**, Neural immunity: Friend or foe? *Journal of neurovirology* 2002; 8(6): 474-479.

**Ginhoux, F, Greter, M, Leboeuf, M, Nandi, S, See, P, Gokhan, S, Mehler, MF, Conway, SJ, Ng, LG, Stanley, ER, Samokhvalov, IM and Merad, M**, Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 2010; 330(6005): 841-845.

**Goedert, M**, NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein. *Science* 2015; 349(6248): 1255555.

**Gordon, MN, King, DL, Diamond, DM, Jantzen, PT, Boyett, KV, Hope, CE, Hatcher, JM, Dicarlo, G, Gottschall, WPE, Morgan, D and Arendash, GW**, Correlation between cognitive deficits and A $\beta$  deposits in transgenic APP+PS1 mice. *Neurobiol. Aging* 2001; 22(3): 377-385.

**Graff, J, Rei, D, Guan, JS, Wang, WY, Seo, J, Hennig, KM, Nieland, TJ, Fass, DM, Kao, PF, Kahn, M, Su, SC, Samiei, A, Joseph, N, Haggarty, SJ, Delalle, I and Tsai, LH**, An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* 2012; 483(7388): 222-226.

**Grattan, DR**, Fetal programming from maternal obesity: eating too much for two? *Endocrinology* 2008; 149(11): 5345-5347.

**Haslam, DW and James, WPT**, Obesity. *Lancet* 2005; 366(9492): 1197-1209.

**Hatanaka, Y, Wada, K and Kabuta, T**, Maternal high-fat diet leads to persistent synaptic instability in mouse offspring via oxidative stress during lactation. *Neurochem. Int.* 2016; 97: 99-108.

**Hawkes, CA, Gentleman, SM, Nicoll, JA and Carare, RO**, Prenatal high-fat diet alters the cerebrovasculature and clearance of beta-amyloid in adult offspring. *J. Pathol.* 2015; 235(4): 619-631.

**Hebert, LE, Scherr, PA, Bienias, JL, Bennett, DA and Evans, DA**, Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol.* 2003; 60(8): 1119-1122.

**Heneka, MT, Carson, MJ, Khoury, JE, Landreth, GE, Brosseron, F, Feinstein, DL, Jacobs, AH, Wyss-Coray, T, Vitorica, J, Ransohoff, RM, Herrup, K, Frautschy, SA, Finsen, B, Brown, GC, Verkhratsky, A, Yamanaka, K, Koistinaho, J, Latz, E, Halle, A, Petzold, GC, Town, T, Morgan, D, Shinohara, ML, Perry, VH, Holmes, C, Bazan, NG, Brooks, DJ, Hunot, S, Joseph, B, Deigendesch, N, Garaschuk, O, Boddeke, E, Dinarello, CA, Breitner, JC, Cole, GM, Golenbock, DT and Kummer, MP**, Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2015; 14(4): 388-405.

**Heneka, MT, Kummer, MP and Latz, E**, Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Immunology* 2014; 14(7): 463-477.

**Heneka, MT, O'banion, MK, Terwel, D and Kummer, MP**, Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2010; 117(8): 919-947.

**Heneka, MT, Ramanathan, M, Jacobs, AH, Dumitrescu-Ozimek, L, Bilkei-Gorzo, A, Debeir, T, Sastre, M, Galldiks, N, Zimmer, A, Hoehn, M, Heiss, WD, Klockgether, T and Staufenbiel, M**, Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J. Neurosci.* 2006; 26(5): 1343-1354.

**Ho, L, Qin, W, Pompl, PN, Xiang, Z, Wang, J, Zhao, Z, Peng, Y, Cambareri, G, Rocher, A, Mobbs, CV, Hof, PR and Pasinetti, GM**, Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2004; 18(7): 902-904.

**Hong, S, Beja-Glasser, VF, Nfonoyim, BM, Frouin, A, Li, S, Ramakrishnan, S, Merry, KM, Shi, Q, Rosenthal, A, Barres, BA, Lemere, CA, Selkoe, DJ and Stevens, B,** Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 2016; 352(6286): 712-716.

**Julien, C, Tremblay, C, Phivilay, A, Berthiaume, L, Emond, V, Julien, P and Calon, F,** High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiology of aging* 2010; 31(9): 1516-1531.

**Knight, EM, Martins, IV, Gumusgoz, S, Allan, SM and Lawrence, CB,** High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiology of aging* 2014; 35(8): 1821-1832.

**Lahiri, DK, Zawia, NH, Greig, NH, Sambamurti, K and Maloney, B,** Early-life events may trigger biochemical pathways for Alzheimer's disease: the "LEARn" model. *Biogerontology* 2008; 9(6): 375-379.

**Li, K, Wei, Q, Liu, FF, Hu, F, Xie, AJ, Zhu, LQ and Liu, D,** Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease: Abeta, Tau, and Epigenetic Alterations. *Mol. Neurobiol.* 2017.

**Liu, L, Ikonen, S, Heikkinen, T, Heikkilä, M, Puoliväli, J, Van Groen, T and Tanila, H,** Effects of fimbria-fornix lesion and amyloid pathology on spatial learning and memory in transgenic APP+PS1 mice. *Behav. Brain Res.* 2002; 134(1-2): 433-445.

**Maesako, M, Uemura, K, Kubota, M, Kuzuya, A, Sasaki, K, Asada, M, Watanabe, K, Hayashida, N, Ihara, M, Ito, H, Shimohama, S, Kihara, T and Kinoshita, A,** Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced Abeta deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiology of aging* 2012; 33(5): 1011 e1011-1023.

**Martin, SA, Jameson, CH, Allan, SM and Lawrence, CB,** Maternal high-fat diet worsens memory deficits in the triple-transgenic (3xTgAD) mouse model of Alzheimer's disease. *PloS one* 2014; 9(6): e99226.

**Masuyama, H and Hiramatsu, Y**, Additive effects of maternal high fat diet during lactation on mouse offspring. *PloS one* 2014; 9(3): e92805.

**Mcguire, W, Dyson, L and Renfrew, M**, Maternal obesity: consequences for children, challenges for clinicians and carers. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 2010; 15(2): 108-112.

**Mischke, M, Pruis, MG, Boekschoten, MV, Groen, AK, Fitri, AR, Van De Heijning, BJ, Verkade, HJ, Muller, M, Plosch, T and Steegenga, WT**, Maternal Western-style high fat diet induces sex-specific physiological and molecular changes in two-week-old mouse offspring. *PloS one* 2013; 8(11): e78623.

**Moody, L, Chen, H and Pan, YX**, Early-Life Nutritional Programming of Cognition-The Fundamental Role of Epigenetic Mechanisms in Mediating the Relation between Early-Life Environment and Learning and Memory Process. *Adv Nutr* 2017; 8(2): 337-350.

**Morris, R**, Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1984; 11(1): 47-60.

**Pasinetti, GM and Eberstein, JA**, Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 2008; 106(4): 1503-1514.

**Pasquali, R, Casimirri, F and Vicennati, V**, Weight control and its beneficial effect on fertility in women with obesity and polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 1997; 12(suppl 1): 82-87.

**Perl, DP**, Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med.* 2010; 77(1): 32-42.

**Puolivali, J, Wang, J, Heikkinen, T, Heikkila, M, Tapiola, T, Van Groen, T and Tanila, H**, Hippocampal A beta 42 levels correlate with spatial memory deficit in APP and PS1 double transgenic mice. *Neurobiology of disease* 2002; 9(3): 339-347.

**Querfurth, HW and Laferla, FM**, Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 2010; 362(4): 329-344.

**Reitz, C and Mayeux, R**, Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 88(4): 640-651.

**Richter, BZ.** Potential and Established Risk Factors for Alzheimer's Disease. In: B. Z. R. Ralph W. Richter, Hrsg., *Alzheimer's Disease: A Physician's Guide to Practical Management*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. , 2004: 65-70.

**Rodriguez, JJ, Olabarria, M, Chvatal, A and Verkhatsky, A,** Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell death and differentiation* 2009; 16(3): 378-385.

**Rolls, BJ and Rowe, EA,** Pregnancy and lactation in the obese rat: effects on maternal and pup weights. *Physiol. Behav.* 1982; 28(3): 393-400.

**Shankar, K, Harrell, A, Liu, X, Gilchrist, JM, Ronis, MJ and Badger, TM,** Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2008; 294(2): R528-538.

**Singh-Manoux, A, Czernichow, S, Elbaz, A, Dugravot, A, Sabia, S, Hagger-Johnson, G, Kaffashian, S, Zins, M, Brunner, EJ, Nabi, H and Kivimaki, M,** Obesity phenotypes in midlife and cognition in early old age: the Whitehall II cohort study. *Neurology* 2012; 79(8): 755-762.

**Tremblay, ME, Lowery, RL and Majewska, AK,** Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology* 2010; 8(11): e1000527.

**Tu, S, Okamoto, S, Lipton, SA and Xu, H,** Oligomeric Abeta-induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration* 2014; 9: 48.

**Van Lieshout, RJ, Taylor, VH and Boyle, MH,** Pre-pregnancy and pregnancy obesity and neurodevelopmental outcomes in offspring: a systematic review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 2011; 12(5): e548-559.

**Weber, EM, Algers, B, Hultgren, J and Olsson, IA,** Pup mortality in laboratory mice--infanticide or not? *Acta Vet. Scand.* 2013; 55: 83.

**Weberpals, M, Hermes, M, Hermann, S, Kummer, MP, Terwel, D, Semmler, A, Berger, M, Schafers, M and Heneka, MT,** NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *J. Neurosci.* 2009; 29(45): 14177-14184.

**White, CL, Pistell, PJ, Purpera, MN, Gupta, S, Fernandez-Kim, SO, Hise, TL, Keller, JN, Ingram, DK, Morrison, CD and Bruce-Keller, AJ**, Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: contributions of maternal diet. *Neurobiology of disease* 2009; 35(1): 3-13.

**Whitmer, RA, Gustafson, DR, Barrett-Connor, E, Haan, MN, Gunderson, EP and Yaffe, K**, Central obesity and increased risk of dementia more than three decades later. *Neurology* 2008; 71(14): 1057-1064.

**WHO, 2014:** "Fact sheet No. 311: Obesity and overweight."  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Zugriffsdatum: 17.06.2014

**Widmann, CN and Heneka, MT**, Long-term cerebral consequences of sepsis. *Lancet Neurol.* 2014; 13(6): 630-636.

**Williams, L, Seki, Y, Vuguin, PM and Charron, MJ**, Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochimica et biophysica acta* 2014; 1842(3): 507-519.

**Wood, PL.** Microglia- Roles of Microglia in Chronic Neurodegenerative Diseases. In: P. L. Wood, Hrsg., *Neuroinflammation, 2nd Edition: Mechanisms and Management*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. , 2003: 3-27.

**Wu, T, Deng, S, Li, WG, Yu, Y, Li, F and Mao, M**, Maternal obesity caused by overnutrition exposure leads to reversal learning deficits and striatal disturbance in rats. *PloS one* 2013; 8(11): e78876.

**Yeh, CY, Vadhwana, B, Verkhatsky, A and Rodriguez, JJ**, Early astrocytic atrophy in the entorhinal cortex of a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *ASN neuro* 2011; 3(5): 271-279.

## **10 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Heneka für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des interessanten Themas. Bedanken möchte ich mich auch für die stete Unterstützung bei dem Projekt selbst sowie der Anfertigung dieser Arbeit in jeglicher Hinsicht.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Delia Kurzwelly für die gute Betreuung des Projektes und die Heranführung an wissenschaftliches Arbeiten. Für das gute Teaching der Methoden an der Bench, im Tierstall und bei den Verhaltensexperimenten bedanke ich mich sehr bei Frau Dipl. Biol. Stephanie Schwartz. Ebenso gilt mein Dank dem gesamten Henekalab und hier insbesondere den MTAs Meltem Eryilmaz, Angelika Griep, Daisey Axt und Ana Saecker, von denen ich ebenfalls viel lernen konnte. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Markus Kummer für die Hilfe bei diversen methodischen Problemen und Frau Anke Krämer für die organisatorische Unterstützung während dieser Zeit.

Für das schnelle und gründliche Korrekturlesen möchte ich mich herzlich bei Irmgard bedanken.

Ohne die fortwährende Unterstützung meiner Eltern und meiner Familie hätte ich diese Arbeit vermutlich nie anfertigen können. Vielen Dank dafür, dass ihr immer für mich da seid.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden für die stetigen Ermutigungen und die schönen Zeiten, nicht nur während der Zeit der Doktorarbeit.

Zum Schluss danke ich Georg von Herzen dafür, dass er in jeder Lebenslage für mich da ist.