

Mechanismen der A $\beta$ -induzierten neuronalen Dysfunktion

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

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

Dipl.-Biol. Raik Rönicke

geb. am 27.01.1981

in Magdeburg

Gutachter:

Prof. Dr. Klaus Reymann

Prof. Dr. Martin Korte

eingereicht am: 28.04.2010

verteidigt am: 14.07.2010

## INHALTSVERZEICHNIS

|  |     |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis.....  | I   |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | III |
| Abbildungsverzeichnis .....  | V   |
| 1 Einleitung .....   | 1   |
| 1.1 Morbus Alzheimer .....   | 1   |
| 1.2 Die A $\beta$ -Hypothese der AD: Hinweise für den Zusammenhang von A $\beta$ und Alzheimer.....  | 4   |
| 1.3 Die Generierung von A $\beta$ .....  | 5   |
| 1.4 Die besondere Rolle von A $\beta$ Oligomeren.....  | 6   |
| 1.5 Die schädigende Wirkung von A $\beta$ auf Neurone.....   | 8   |
| 1.6 LTP als zelluläres Korrelat für Lernen und Gedächtnis .....  | 9   |
| 1.7 Die Störung der LTP durch A $\beta$ als Schädigungsmodell früher Alzheimerstadien....  | 10  |
| 1.8 Die Reduktion von dendritischen Spines durch A $\beta$ .....   | 12  |
| 1.9 Der NMDA-Rezeptor .....  | 12  |
| 1.10 Die Dichotomie des NMDA-Rezeptors.....  | 14  |
| 1.11 NMDA-Rezeptor Überaktivierung durch A $\beta$ .....   | 17  |
| 1.12 Zielstellung der Arbeit.....  | 18  |
| 2 Material und Methoden .....  | 20  |
| 2.1 Elektrophysiologie.....  | 20  |
| 2.1.1 Präparation der Hippokampusschnitte .....  | 20  |
| 2.1.2 Elektrophysiologische Messung.....   | 21  |
| 2.2 Zellkultur .....   | 22  |
| 2.2.1 Präparation der Primärkulturen .....   | 22  |
| 2.2.2 Kultivierung der neuronalen Primärkultur .....   | 22  |
| 2.2.3 Präparation und Kultivierung der organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHC).....  | 23  |
| 2.3 A $\beta$ Aggregation .....  | 23  |
| 2.4 Untersuchung der Toxizität und Viabilität .....  | 24  |
| 2.4.1 Der MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay .....   | 24  |
| 2.4.2 Propidiumiodid Aufnahme .....  | 24  |
| 2.5 Immunhistochemie .....   | 24  |
| 2.5.1 Quantitative Immunocytochemie an Einzelzellen.....   | 25  |
| 2.6 Konfokale Laserscan-Mikroskopie.....   | 26  |
| 2.7 <i>In vivo</i> Infusion von A $\beta$ .....  | 26  |
| 2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot.....   | 27  |
| 2.9 Messung der neuronalen Netzwerkaktivität <i>in vitro</i> .....   | 27  |
| 2.10 Statistik .....   | 28  |
| 3 Ergebnisse .....   | 30  |
| 3.1 LTP Störung durch A $\beta$ .....  | 30  |
| 3.1.1 Die Beeinflussung der LTP ist abhängig vom Aggregationszustand des A $\beta$ ....  | 30  |
| 3.2 Korrelation zwischen A $\beta$ Oligomer vermittelter LTP Störung und A $\beta$ -Zytotoxizität .....  | 42  |
| 3.3 Die LTP Störung ist abhängig von der Aktivierung des NR2B-haltigen NMDA-Rezeptors.....   | 47  |
| 3.4 Submikromolare A $\beta$ Oligomer Konzentrationen bewirken keinen neuronalen Zelltod, sondern neuronale Schäden auf funktioneller und struktureller Ebene..... | 51  |

|     |  |      |
|-----|--|------|
| 3.5 | Die durch A $\beta$ hervorgerufene neuronale Dysfunktion korreliert mit der Aktivierung von Jacob.....               | 59   |
| 4   | Diskussion .....   | 62   |
| 4.1 | LTP Störung durch A $\beta$ .....  | 62   |
| 4.2 | Die Schädigung der LTP durch A $\beta$ geht nicht mit einer Beeinträchtigung der Redoxaktivität einher .....         | 64   |
| 4.3 | Der Abfall der synaptischen Basisaktivität durch A $\beta$ .....   | 65   |
| 4.4 | Die Reduzierung synaptischer Kontakte durch A $\beta$ .....  | 67   |
| 4.5 | Die Verminderung spontaner Netzwerkaktivität durch A $\beta$ .....   | 68   |
| 4.6 | Die A $\beta$ -vermittelte neuronale Dysfunktion ist abhängig von der Aktivierung NR2B-haltiger NMDA-Rezeptoren..... | 69   |
| 4.7 | Die A $\beta$ -vermittelte neuronale Dysfunktion korreliert mit der Aktivierung von Jacob .....                      | 72   |
| 4.8 | A $\beta$ als Vermittler homeostatischer Plastizität?.....   | 74   |
| 5   | Abstract .....   | 77   |
| 6   | Zusammenfassung .....  | 78   |
| 7   | Referenzen.....  | 80   |
|     | Danksagung .....   | VII  |
|     | Publikationen.....   | VIII |
|     | Lebenslauf .....   | IX   |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                 |   |
|-----------------|---|
| ACSF            | Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit ( <i>Artificial CerebroSpinal Fluid</i> )                       |
| AD              | Alzheimer'sche Demenz ( <i>Alzheimer's disease</i> )  |
| ADDL            | A $\beta$ derived diffusible ligands  |
| AMPA            | Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid  |
| $\alpha$ 7nAChR | Nicotinische $\alpha$ 7 Acetylcholinrezeptoren  |
| APP             | Amyloid Precursor Protein   |
| APV             | 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure  |
| A $\beta$       | Amyloid beta  |
| BCIP            | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat   |
| BDNF            | Brain-derived neurotrophic factor   |
| BSA             | Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )   |
| CAA             | Zerebrale amyloide Angiopathie  |
| CAMK2           | Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Type II   |
| CREB            | cAMP response element-binding protein   |
| CSF             | Cerebrospinalflüssigkeit ( <i>Cerebrospinal fluid</i> )   |
| D-AP5           | D-2-amino-5-phosphonopentanoate   |
| DAPI            | 4',6-Diamidin-2-phenylindol   |
| D-CPP           | 3-((D)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid  |
| DIV             | day in vitro  |
| DMEM            | Dulbecco's Modified Eagle Medium  |
| DMSO            | Dimethylsulfoxide   |
| EM              | Elektronenmikroskopie   |
| EPSP            | exzitatorischen postsynaptischen Feldpotenziale   |
| Erk/MAPK        | mitogen-activated protein kinase  |
| fEPSP           | Exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential ( <i>field excitatory post-synaptic potentials</i> ) |
| FKS             | Fötales Kälberserum   |
| GFAP            | Saures gliales Faserprotein ( <i>Glial fibrillary acidic protein</i> )                              |
| GLT-1           | Astrozytärer Glutamattransporter 1  |
| HBSS            | Hank's balanced salt solution   |
| HFIP            | 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol   |
| HRP             | Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )   |
| HS              | Horse Serum   |
| IFN             | Leibniz-Institut für Neurobiologie  |
| Ifn             | Ifenprodil  |
| JNK             | c-Jun-N-terminale Kinase  |
| kDa             | kilo Dalton   |
| LTP             | Langzeitpotentierung  |
| MAP             | Mitogen-activated protein   |
| MCI             | AD in Form leichter kognitiver Störungen ( <i>mild cognitive impairment</i> )                       |
| mGluR 1, 5      | Metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe 1 und 5   |
| mRNA            | Messenger Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )                                    |
| MTT             | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  |
| n               | Anzahl der Versuche   |
| NBT             | Nitro-blau-tetrazolium-chlorid  |
| NMDA            | N-methyl-D-aspartate  |
| NMDAR           | NMDA Rezeptor   |
| OHC             | Organotypischen hippocampalen Schnittkulturen   |

|          |   |
|----------|---|
| PBS      | Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> ) |
| PKA      | Proteinkinase A   |
| PKB      | Proteinkinase B   |
| PKC      | Proteinkinase C   |
| PS2      | Presenilin 2  |
| PSD      | Postsynaptischen Dichte   |
| PVDF     | Polyvinylidenfluorid  |
| RAGE     | Receptor for Advanced Glycation Endproducts                         |
| ROS      | Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )       |
| SDS      | Sodiumdodecylsulphat  |
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese                  |
| TNF      | Tumor Nekrose Faktor ( <i>tumor necrosis factor</i> )               |
| TNF-R1   | Typ-1 TNF $\alpha$ Rezeptoren                                       |
| VGCC     | Spannungsabhängiger Kalziumkanal                                    |

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1:  | Abhängigkeit der Häufigkeit der Alzheimer-Krankheit vom Lebensalter.....   | 1  |
| Abbildung 2:  | Pathologie des Alzheimers.....   | 3  |
| Abbildung 3:  | APP und seine proteolytischen Produkte.....  | 6  |
| Abbildung 4:  | Aggregationsformen des A $\beta$ -Peptids.....   | 7  |
| Abbildung 5:  | Durch A $\beta$ beeinflusste Signalwege und Strukturen.....  | 11 |
| Abbildung 6:  | Schematischer Aufbau und pharmakologische Bindungsstellen des NMDA-Rezeptors.....  | 13 |
| Abbildung 7:  | Die Aktivierung von pCREB bei der LTP.....   | 14 |
| Abbildung 8:  | Signalwege des NMDA-Rezeptors.....   | 16 |
| Abbildung 9:  | Monomeres A $\beta$ (25-35) hat keinen Einfluss auf die LTP.....   | 31 |
| Abbildung 10: | Elektronenmikroskopische Analyse von frisch gelöstem A $\beta$ (25-35).....  | 32 |
| Abbildung 11: | Monomeres A $\beta$ (1-40) hat keinen Einfluss auf die LTP.....  | 32 |
| Abbildung 12: | Elektronenmikroskopische Analyse von frisch aufgelöstem A $\beta$ (1-40).....  | 33 |
| Abbildung 13: | Elektronenmikroskopische Analyse von fibrillärem A $\beta$ (1-40).....   | 34 |
| Abbildung 14: | Fibrilläres A $\beta$ (1-40) hat keinen Einfluss auf die LTP.....  | 34 |
| Abbildung 15: | Elektronenmikroskopische Analyse von oligomerem A $\beta$ (1-40).....  | 35 |
| Abbildung 16: | Oligomeres A $\beta$ (1-40) stört die LTP.....   | 36 |
| Abbildung 17: | Oligomeres A $\beta$ (1-42) stört die LTP.....   | 37 |
| Abbildung 18: | Elektronenmikroskopische und SDS Analyse von oligomerem A $\beta$ (1-42).....  | 38 |
| Abbildung 19: | Einfluss eines A $\beta$ Antikörpers auf die durch oligomeres A $\beta$ geschädigte LTP.....   | 39 |
| Abbildung 20: | 17 Monate alte Mäuse weisen eine verminderte Signalgröße im Vergleich zu 4 Monate alten Tieren auf.....  | 40 |
| Abbildung 21: | Oligomeres A $\beta$ stört die LTP in 17 Monate alten Mäusen nicht.....  | 40 |
| Abbildung 22: | Oligomeres A $\beta$ stört die durch einen Thetaburst induzierte LTP nicht.....  | 41 |
| Abbildung 23: | Die LTP Störung durch oligomeres A $\beta$ (1-40) geht nicht mit einer Reduktion der MTT Umsatzrate des hippokampalen Akutschnitts einher..... | 43 |
| Abbildung 24: | Zeitabhängiger MTT Umsatz durch einen OHC.....   | 44 |
| Abbildung 25: | Beeinflussung des MTT Umsatzes durch oligomeres A $\beta$ und Glutamat.....  | 45 |
| Abbildung 26: | Immunhistochemische Färbung der OHC nach A $\beta$ Behandlung.....   | 45 |
| Abbildung 27: | Einfluss von A $\beta$ auf den MTT Umsatz von hippokampalen ex vivo schnitten.....   | 46 |
| Abbildung 28: | Immunhistochemische Färbung von A $\beta$ nach in-vivo Applikation von A $\beta$ .....   | 47 |
| Abbildung 29: | APV blockiert die LTP.....   | 48 |
| Abbildung 30: | Einfluss von Ifenprodil auf die LTP.....   | 49 |
| Abbildung 31: | Einfluss von Ifenprodil auf die durch oligomeres A $\beta$ geschädigte LTP.....  | 50 |
| Abbildung 32: | Ro 25,6981 beeinflusst die LTP nicht.....  | 50 |
| Abbildung 33: | Einfluss von Ro 25,6981 auf die durch oligomeres A $\beta$ geschädigte LTP.....  | 51 |

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Abbildung 34: | Einfluss von oligomerem A $\beta$ (1-42) auf die synaptische Basisaktivität.....   | 52 |
| Abbildung 35: | Einfluss von Ro 25,6981 auf die durch oligomeres A $\beta$ geschädigte Basislinienaktivität.....   | 52 |
| Abbildung 36: | Einfluss von Ro 25,6981 auf die Basislinienaktivität unter Kontrollbedingungen.....  | 53 |
| Abbildung 37: | Effekt von oligomerem A $\beta$ auf die neuronale Morphologie.....   | 54 |
| Abbildung 38: | Effekt von oligomerem A $\beta$ auf die neuronale LDH-Ausschüttung.....  | 54 |
| Abbildung 39: | Effekt von oligomerem A $\beta$ (500 nM) auf die Zahl synaptischer Kontakte in einer neuronalen Primärkultur und Abhängigkeit vom NR2B-haltigen NMDAR.....   | 55 |
| Abbildung 40: | Repräsentative Aufnahmen der mit Fura-2 beladenen neuronalen Primärkultur (21 DIV).....  | 57 |
| Abbildung 41: | Oligomeres (A $\beta$ 1-42) reduzierte die Häufigkeit spontaner Aktivität innerhalb von Neuronenkulturen. Die Inhibition des NR2B-haltigen NMDARs durch Ifenprodil hob diesen A $\beta$ -Effekt auf..... | 58 |
| Abbildung 42: | Repräsentative Immunfärbung von A $\beta$ und NMDA behandelten Neuronen.....   | 60 |
| Abbildung 43: | Effekt von A $\beta$ , NMDA und Ifenprodil auf die nukleäre Translokation von Jacob.....   | 60 |
| Abbildung 44: | Effekt von oligomerem A $\beta$ (1-42) auf die LTP und die Jacobkonzentration im Zellkern von akut isolierten hippocampalen Schnitten.....   | 61 |
| Abbildung 45: | Die Störung des Glutamathaushaltes bei Alzheimerpatienten.....   | 70 |
| Abbildung 46: | Stabilisierung der neuronalen Feuerrate über die globale Regulation der synaptischen Stärke.....   | 75 |
| Abbildung 47: | Zusammenfassung der A $\beta$ Schädigungskaskade.....  | 76 |

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer'sche Demenz (AD) ist eine unheilbare, neurodegenerative Erkrankung von der fast ausschließlich Menschen höheren Alters betroffen sind. Durch die demographische Entwicklung in den westlichen Industrienationen steigt der Anteil älterer Bürger und somit auch die Alzheimer-Prävalenz. So sind durchschnittlich 2 % aller 65-Jährigen und bereits 20% aller 85-Jährigen von der Krankheit betroffen (Abbildung 1).

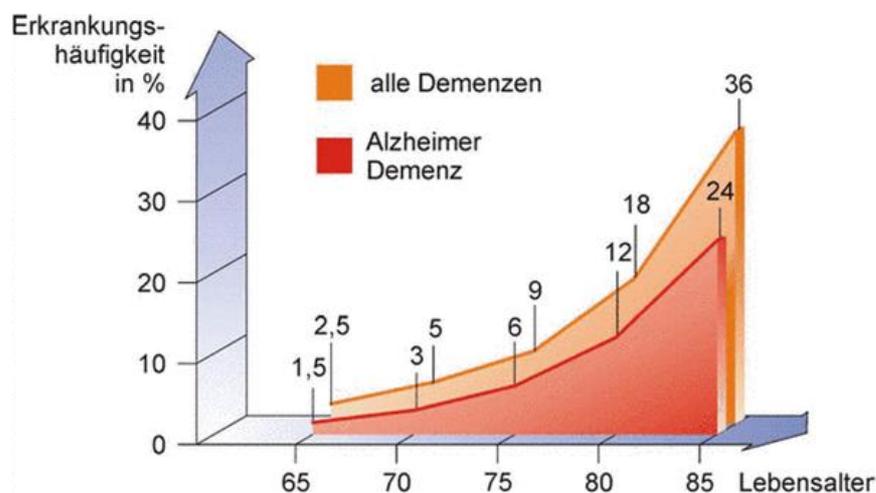


Abbildung 1: Abhängigkeit der Häufigkeit der Alzheimer-Krankheit vom Lebensalter.

Mit steigendem Alter nimmt die Anzahl der Erkrankung exponentiell zu (adaptiert von <http://www.berlin-institut.org/online-handbuchdemografie/bevoelkerungsdynamik/auswirkungen/neue-volkskrankheiten/alzheimerdemenz.html>).

Zurzeit leiden in der Bundesrepublik Deutschland etwa 700.000 Menschen unter Morbus Alzheimer. Jährlich werden etwa 120.000 Neuerkrankungen erwartet.

Im weltweiten Maßstab wird das verheerende Ausmaß dieser Krankheit besonders deutlich. Laut Schätzungen der WHO werden im Jahr 2050 etwa 106 Millionen Patienten betroffen sein. Durch den hohen Pflegebedarf der Erkrankten wird die AD zur größten sozioökonomischen Aufgabe unserer Zeit.

Bisher werden die Symptome der AD, die sich als ein gestörtes Orientierungs- und Erinnerungsvermögen sowie durch Verhaltensstörungen darstellen, durch Eingriffe in die Transmittersysteme des Gehirns, zum Beispiel mit Acetylcholinesterasehemmern oder mit dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin, medikamentiert. Diese symptomatische Behandlung bewirkt jedoch nur marginale Zustandsverbesserungen und keine Heilung der

fortschreitenden Krankheit. Erschwerend für die Behandlung kommt hinzu, dass die Symptome erst sehr spät auftreten, wenn die Schädigung des Zentralnervensystems bereits weit fortgeschritten ist. Man geht heute von etwa 15 bis 30 Jahren symptomfreier Vorerkrankung aus.

Erst durch eine ursächliche Behandlung kann der Alzheimer Demenz wirksam entgegengetreten werden. Jedoch konnte bisher die Ursache beziehungsweise der Auslöser der Alzheimer Demenz nicht eindeutig bestimmt und bewiesen werden. Als die Krankheit 1906 zum ersten Mal von Alois Alzheimer an der Patientin Auguste Deter beschrieben wurde, waren morphologische Veränderungen des Gehirns auffällig, die sich später als eine pathologische Anreicherung von extrazellulären  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ )-haltigen Plaques und intrazellulären Neurofibrillenbündel aus Tau Protein herausstellten. Das  $A\beta$ -Peptid ist ein etwa 40 Aminosäuren langes Peptid, welches von Neuronen aus dem Vorläuferprotein Amyloid Precursor Protein (APP) geschnitten wird und sich durch seine hydrophobe Eigenschaft in der  $\beta$ -Faltblattstruktur zu Proteinfibrillen zusammenlagern kann. Diese  $A\beta$ -Proteinfibrillen sind Bestandteil der extrazellulären Plaques. Die intrazellulären Neurofibrillenbündel bestehen aus zusammengelagerten mikrotubuli-assoziiertem hyperphosphoryliertem Tau Protein. Mit den Proteinablagerungen korreliert eine Atrophie des Gehirns (Abbildung 2).

So wurde die  $A\beta$ -Hypothese, sowie die Tau-Hypothese der Alzheimerdemenz aufgestellt, welche diese pathologischen Veränderungen als Ursache der Krankheit postulieren. Lange Zeit konnte keiner der genannten Pathologien die entscheidende Rolle bei der AD zugewiesen werden, da beide auch unabhängig von einander auftreten und jeweils Demenzen auslösen können (Selkoe, 2001). Daneben blieb ebenfalls ungeklärt, wie die Schädigung des Gedächtnisses der Patienten durch die Tau- und  $A\beta$ -Ablagerungen vermittelt wird. So wurden drei weitere AD-Hypothesen aufgestellt, welche die globale Schädigung des Gehirns erklärten. Die Acetylcholin-Hypothese beruht auf einem deutlichen Rückgang dieses Neurotransmitters, sowie seiner Rezeptoren im Gehirn von Alzheimer Patienten (Whitehouse et al., 1982; Maelicke et al., 2000). Da Acetylcholin entscheidend für Lernprozesse ist, kann der dauerhafte Mangel zu Gedächtnisdefiziten führen. Weiterhin wurde in Gehirnen von AD Patienten eine chronische Neuroinflammation (Wyss-Coray, 2006) beobachtet, die zu der Entzündungshypothese des Alzheimers führte. Als drittes wurde eine neurovaskuläre Dysfunktion als integrale Pathologie der Alzheimerdemenz beschrieben (Zlokovic, 2008).

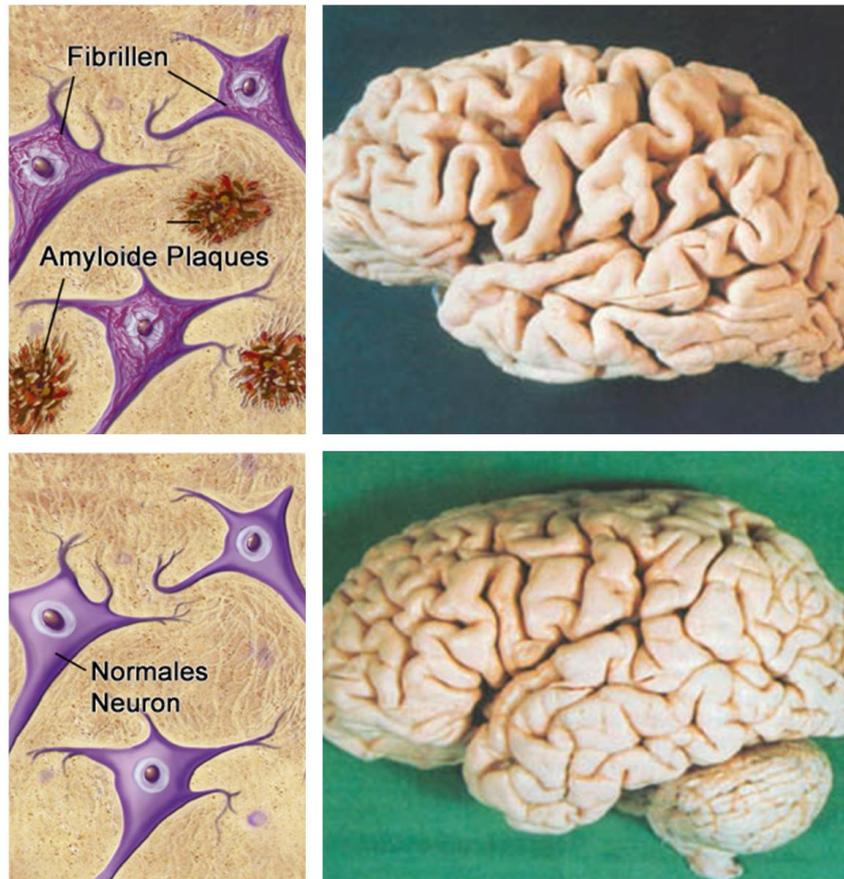


Abbildung 2: Pathologie des Alzheimers

Im Gehirn von Alzheimerpatienten (obere Darstellung) sind intraneuronale Neurofibrillenbündel (Fibrillen) sowie extrazelluläre amyloide Plaques nachweisbar. Im Vergleich zu einem gesunden Menschen (untere Darstellung) ist das Gehirn der Erkrankten atroph (adaptiert von <http://pakmed.net/index.html>)

Mittlerweile wurden viele der genannten pathologische Veränderungen mit einem gestörten A $\beta$  Metabolismus in Verbindung gebracht. So gehen die Acetylcholin produzierenden Zellen des *Nucleus basalis Meynert* aufgrund ihrer Nähe zu benachbarten amyloiden Plaques unter (Luth et al., 2003) und nicotinische  $\alpha 7$  Acetylcholinrezeptoren ( $\alpha 7$ nAChR) werden durch A $\beta$  direkt inhibiert (Chen et al., 2006). In 80 % aller Alzheimerpatienten sind die zerebralen Blutgefäße von einer CAA (Zerebrale amyloide Angiopathie) betroffen, die sich durch eine  $\beta$ -Amyloid Ablagerung an den Gefäßwänden auszeichnet (Zlokovic, 2008) und reaktive Mikroglia und Astrozyten säumen A $\beta$ -Plaques (Frederickson, 1992). Darüber hinaus wurde die Bildung der Neurofibrillenbündel als eine Konsequenz der A $\beta$  Pathologie postuliert (Hardy und Selkoe, 2002). Da dem A $\beta$  weiterhin eine direkte schädigende Wirkung auf Neurone zugeschrieben wird und einige Mutationen, welche den A $\beta$  Metabolismus beeinflussen, zu vererbbarem familiären Alzheimer führen, bietet die A $\beta$ -Hypothese der AD eine plausible Grundlage zur Erklärung vieler pathologischer Vorgänge im Gehirn des Patienten.

## **1.2 Die A $\beta$ -Hypothese der AD: Hinweise für den Zusammenhang von A $\beta$ und Alzheimer**

Das Vorhandensein von A $\beta$ -haltigen amyloiden Plaques ist ein notwendiges Kriterium für die neuropathologische Diagnose des Alzheimers. Daher liegt der Schluss nahe, dass A $\beta$  eine ursächliche Rolle für die Krankheit spielt. Tatsächlich liefern verschiedene genetische Krankheiten Indizien für einen kausalen Zusammenhang zwischen einem gestörten A $\beta$ -Metabolismus und dem Ausbruch der AD. So entwickeln Patienten mit Down-Syndrom ab einem Alter von 40 häufig alzheimerartige Symptome, sowie die pathologischen Kennzeichen amyloide Plaques und Neurofibrillenbündel (Wisniewski et al., 1985). In diesen Patienten wurde eine erhöhte Expression von APP, dem Vorläuferprotein des A $\beta$  beobachtet, die vermutlich durch das zusätzliche Chromosom 21 bedingt ist, auf dem das APP codiert wird. Darüber hinaus konnten autosomal dominante Mutationen im APP als Ursache für bestimmte familiäre, also vererbare, Alzheimer Fälle bestimmt werden. Diese Mutationen bewirken eine veränderte APP-Prozessierung (Goate et al., 1991). Auch Mutationen in den A $\beta$  produzierenden  $\gamma$ -Sekretasen Presenilin 1 (Sherrington et al., 1995) und Presenilin 2 (PS2; (Levy-Lahad et al., 1995)) wurden als Ursache für familiären Alzheimer beschrieben. All diese familiären Alzheimerfälle, nehmen neben dem sporadischen Alzheimer nur einen Anteil von 10% aller AD Patienten ein. Sie entwickeln die Krankheitssymptome, im Vergleich zu den sporadischen Fällen, in einem deutlich jüngeren Alter. Dies könnte durch die beschleunigte A $\beta$ -Produktion zu erklären sein. Untersuchungen in transgenen Tiermodellen bestätigen diese Annahme. So bewirkt die Doppelmutation im APP (APP<sub>swe</sub>), welche auf einem in Schweden auftretenden familiären Alzheimer beruht, eine 5-8 fache höhere A $\beta$ -Produktion durch Neurone (Gotz und Ittner, 2008). Mittlerweile wurden diverse Mausmodelle entwickelt, die für Gene, welche in familiären Alzheimer Fällen gefunden wurden, transgen sind. Viele dieser Gene sind direkt oder indirekt an der A $\beta$ -Produktion beteiligt. Die Mäuse zeigen erhöhte A $\beta$  Ablagerungen, morphologische und zelluläre Veränderungen, die auch in Gehirnen von Patienten beobachtet werden, sowie Lern- und Gedächtnisstörungen (Gotz und Ittner, 2008).

### 1.3 Die Generierung von A $\beta$

Die Generierung des A $\beta$ -Peptids erfolgt über proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins APP. APP ist ein Transmembranprotein, welches auf dem Chromosom 21 codiert wird und durch alternatives Splicing der mRNA 695, 751 oder 770 Aminosäuren groß sein kann. Während die Funktion des APP noch unbekannt ist, wurde sein Metabolismus intensiv untersucht. APP kann durch drei Enzyme, die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase geschnitten werden, wobei die  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der A $\beta$  Domäne schneidet und somit eine Generierung von A $\beta$  ausschließt. Wird APP dagegen von der  $\beta$ -Sekretase und danach von der  $\gamma$ -Sekretase geschnitten, entsteht A $\beta$ . Dieses A $\beta$ -Peptid kann 40, 42 oder 43 Aminosäuren lang sein, wobei im Gehirn durch nachträgliche Proteolyse und Modifizierung auch die ersten zwei, vier oder 10 Aminosäuren abgespalten sein können (Saido et al., 1995). Bedingt durch den hydrophoben Charakter des A $\beta$ -Peptids, neigt dieses dazu, schnell zu aggregieren und unlösliche Proteinfibrillen zu bilden. Es ist hierbei jedoch wichtig zu betonen, dass der beschriebene APP-Abbau ein physiologischer Prozess ist, der mit einer sehr hohen Rate tagtäglich im Gehirn aller Menschen abläuft (Haass et al., 1992). Warum ein Teil der Menschen Alzheimer entwickeln, ist ungeklärt. Der zentrale Punkt der A $\beta$ -Hypothese des Alzheimers postuliert lediglich, dass eine erhöhte A $\beta$  Konzentration im Gehirn ein kausaler Faktor der Demenz ist. Die Ursache für diese erhöhte Konzentration kann mannigfaltig sein und ist für die Hypothese nicht entscheidend.

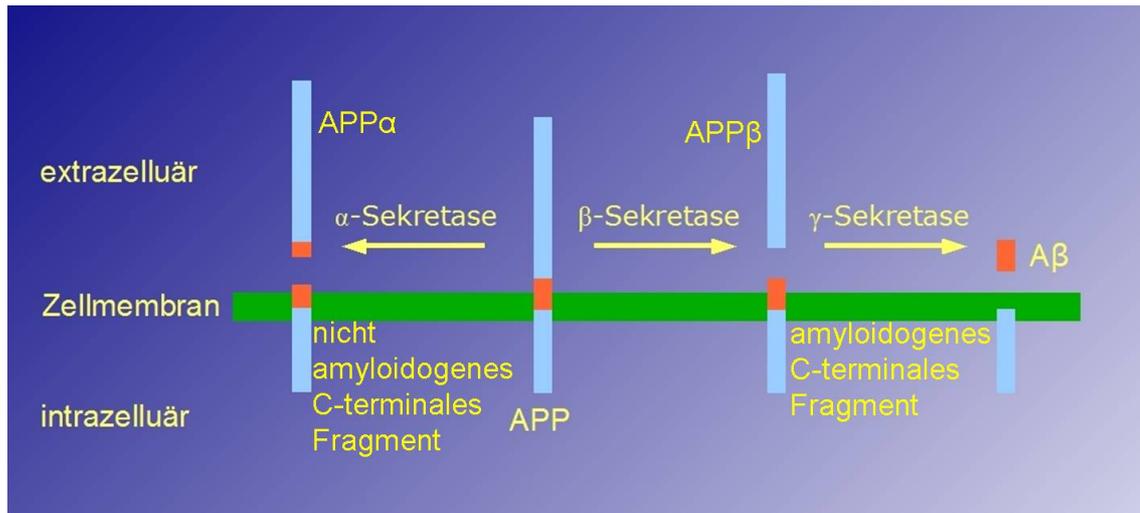


Abbildung 3: APP und seine proteolytischen Produkte.

APP kann über zwei proteolytische Wege abgebaut werden. Wenn der erste (entscheidende) Schnitt durch die  $\alpha$ -Sekretase erfolgt, wird die  $A\beta$  Domäne zerschnitten und das lösliche N-terminale  $APP\alpha$  und das nicht-amyloidogene C-terminale Fragment entsteht. Die weitere Proteolyse dieses Fragments durch die  $\gamma$ -Sekretase generiert das nicht amyloidogene Peptid p3. Alternativ kann jedoch auch die  $\beta$ -Sekretase das APP am Anfang der  $A\beta$  Domäne spalten und somit den löslichen N-Terminus,  $APP\beta$ , sowie das amyloidogene C-terminale Fragment (C99) erzeugen. Die nachfolgende Spaltung des C-terminalen Fragments durch die  $\gamma$ -Sekretase generiert  $A\beta$  (Adaptiert von: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:APPSchema.jpg&filetimestamp=20060123174938>).

#### 1.4 Die besondere Rolle von $A\beta$ Oligomeren

Wie bereits dargestellt, sprechen viele Indizien für eine zentrale Bedeutung von  $A\beta$  für die Pathogenese der AD. Es gibt jedoch die kontroverse Beobachtung, dass die Zahl und die zeitliche Entwicklung der amyloiden Plaques im Gehirn der Patienten nicht direkt mit dem klinischen Fortschreiten der Krankheit korreliert (Terry et al., 1991). Eine plausible Begründung für diese Diskrepanz bieten Studien jüngerer Zeit, welche die schwache Korrelation zwischen dem Auftreten der Plaques und der Stärke der kognitiven Beeinträchtigung mit der Existenz verschiedener  $A\beta$ -Aggregate erklären. So wurde gezeigt, dass frühe Gedächtnisstörungen durch kleine lösliche  $A\beta$ -Oligomere ausgelöst werden könnten. Diese  $A\beta$ -Oligomere bestehen aus wenigen  $A\beta$  Monomeren, wobei den Di-, Tri- und Dodekameren eine besondere biologische Aktivität zugesprochen wird (Walsh und Selkoe, 2007). Die elektronenmikroskopische Analyse dieser Strukturen stellt die Oligomere in einer sphärischen Form dar, womit sie sich klar von den nadelförmigen  $A\beta$  Proteinfibrillen unterscheiden. Weiterhin binden die  $A\beta$ -Oligomere im Gegensatz zu dem fibrillären  $A\beta$  weder Kongorot noch Thioflavin (die Bindung von Kongorot ist ein Definitionskriterium

für A $\beta$  Fibrillen). Bisher ist ungeklärt, ob die Oligomere eine Aggregationsvorstufe der Fibrillen oder einen eigenständigen Aggregationsweg darstellen (Abbildung 4).

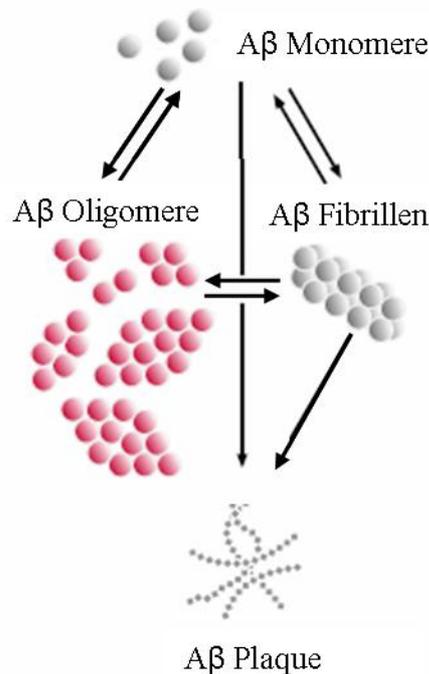


Abbildung 4: Aggregationsformen des A $\beta$ -Peptids

A $\beta$  kann distinkte Aggregate bilden. Zum einen ist die Bildung von unlöslichen Proteinfibrillen, zum anderen von löslichen Oligomeren möglich. Es ist zu betonen, dass die chemischen Gleichgewichte (durch den Hin- und Rückpfeil symbolisiert) nicht belegt sind und auch der Aggregationsweg der Oligomere (hier dargestellt als eigenständiger Aggregationsweg) gemutmaß ist (adaptiert von Cheng et al., 2007).

Die Existenz von A $\beta$  Oligomeren wurde in Patienten (Pitschke et al., 1998), sowie in transgenen Mausmodellen belegt (Gotz und Ittner, 2008). Eine beeindruckende Studie, welche die besondere Potenz der Oligomere, die neuronale Funktion zu stören, darstellt, wurde 2006 von Lesne et al. durchgeführt. Hier wurden Lerndefizite in dem Mausmodell Tg2576, welches für APP<sub>Swe</sub> transgen ist, mit dem Auftreten von verschiedenen A $\beta$ -Aggregaten zeitlich korreliert. Interessanterweise gibt es einen klaren Zusammenhang zwischen der Existenz von A $\beta$ -Dodekameren (bestehend aus 12 Monomeren) und den ersten Gedächtnisdefiziten (Lesne et al., 2006). Ein überzeugendes Experiment, welches die kritische Rolle der A $\beta$ -Oligomere für die frühen kognitiven Defizite im Alzheimerpatienten belegt, publizierte Shankar 2008. In dieser Arbeit wurde die Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimerpatienten isoliert und damit die neuronale Funktion in einem tierischen

Lernmodell gestört (Shankar et al., 2008). Für den beobachteten Effekt wurden A $\beta$  Dimere verantwortlich gemacht. Dies zeigt, dass zum einen lösliche A $\beta$  Spezies neuronale Dysfunktion bewirken können und dass zum anderen der frühe schädigende A $\beta$ -Effekt auf Neurone eher funktionell störend als tödlich ist. Gerade der zweite Punkt ist insofern interessant, als dass in den letzten zwei Jahrzehnten eine enorme Flut an Untersuchungen die Wirkung von A $\beta$  auf neuronale Zellen beschrieben hat und mittlerweile eine schwer überschaubare Zahl von beeinflussten Rezeptoren und Signalwegen, sowie zellulären A $\beta$ -Effekten publiziert wurde.

### **1.5 Die schädigende Wirkung von A $\beta$ auf Neurone**

Mit der Identifizierung von A $\beta$  als wesentliches Peptid in den Plaques (Masters et al., 1985), wurde folglich die Wirkung dieses Peptids auf neuronale Zellen hinterfragt. In Einklang mit der A $\beta$ -Hypothese der AD, konnte von vielen Laboren ein neurotoxischer Effekt von A $\beta$  gefunden werden. Zum Beispiel wurde von Shearman et al. 1994 mit Hilfe des MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assays A $\beta$ -vermittelte Neurotoxizität beschrieben (Shearman et al., 1994). Zellen können in einer NADH abhängigen Reaktion das Tetrazolium Salz MTT in ein Formazan umwandeln (Liu und Schubert, 1997). Die Menge an produziertem Formazan lässt dabei über die Anzahl sowie die Viabilität, also Lebendigkeit, der Zellen schließen. Die Hemmung dieser Reaktion durch A $\beta$  wurde mit einer Veränderung der neuronalen Membraneigenschaften und einer gestörten zellulären Viabilität erklärt (Liu und Hong, 2005) und bietet die Grundlage für viele A $\beta$ -Toxizitätsstudien. Der A $\beta$ -MTT-Effekt wurde für fibrilläres aber auch für oligomeres A $\beta$  beschrieben (Shearman et al., 1994; Walsh und Selkoe, 2007). Neben der Störung der neuronalen Viabilität konnte verschiedenen A $\beta$ -Aggregaten auch eine direkte toxische Wirkung nachgewiesen werden. Die Applikation von ADDL (A $\beta$  derived diffusible ligands), einem Gemisch aus Di- Tri- und weiteren A $\beta$  Oligomeren, löste schon im submikromolaren Konzentrationsbereich neuronalen Zelltod in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHC) aus (Lambert et al., 1998). Als verantwortlicher Zelltodmechanismus wird vorrangig die Apoptose diskutiert. Wahrscheinlich kann diese von A $\beta$  über verschiedene, distinkte Signalwege induziert werden. Die wichtigsten sind die Aktivierung der p75<sub>NTR</sub> und c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) Signalkaskade; die Aktivierung des Tumor Necrose Factors (TNF) Rezeptoren mit folgender Caspase 3 Aktivierung; die Überaktivierung von Glutamatrezeptoren mit einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS); sowie die Schädigung der Mitochondrien mit einer Ausschüttung

von Cytochrom C (Shen et al., 2006). Neuronaler Zelltod tritt im Alzheimerpatienten jedoch erst in den späten Krankheitsstadien auf. Jahre zuvor kündigt sich die AD in Form leichter kognitiver Störungen an (mild cognitive impairment, MCI). Während dieser frühen Stadien ist ein schneller neuronaler Zelltod, ausgelöst durch geringe Konzentrationen von löslichem A $\beta$ , wie er in vielen *in vitro* Experimenten beobachtet wird, unwahrscheinlich. Denn in diesem Falle wäre der Krankheitsverlauf deutlich progressiver. Es ist daher plausibel, dass innerhalb früher AD-Stadien anstatt eines schnellen Zelltods eher die Funktion und Morphologie der Neurone gestört ist. Tatsächlich korreliert die Reduktion der Zahl neokortikaler Synapsen in Alzheimerhirnen sehr stark mit den Gedächtnisdefiziten der Patienten (Terry et al., 1991). Weiterhin wurde beschrieben, dass die ersten Defizite beim Patienten, welche vorrangig das deklarative Gedächtnis betreffen, auftreten, wenn noch keine ausgedehnte Neurodegeneration stattgefunden hat (Selkoe, 2002). Darüber hinaus findet die Idee der funktionellen Störung der Neurone innerhalb früher Alzheimer Stadien besondere Unterstützung durch die Beobachtung, dass lösliches A $\beta$  die Langzeitpotentierung (LTP) inhibiert.

### **1.6 LTP als zelluläres Korrelat für Lernen und Gedächtnis**

Die Umwandlung von Umweltinformationen in Gedächtnisinhalte erfordert eine beständige Änderung des Zustands der an der Gedächtnisbildung beteiligten Strukturen (Bliss und Collingridge, 1993). Heutzutage wird die neuronale Plastizität in Form der LTP als zelluläres Korrelat des Lernens weitgehend akzeptiert. Die LTP ist eine Verstärkung der interneuronalen Signalübertragung (Bliss und Lomo, 1973), die *in vitro* Minuten bis Stunden und *in vivo* Stunden bis Monate andauern kann. Sie wurde zuerst an Synapsen hippokampaler Neurone beschrieben. Werden Synapsen einem bestimmten Reiz ausgesetzt, so können sie ihre Übertragungseffizienz für längere Zeit steigern. Viele Indizien sprechen für eine Verknüpfung dieser zellulären Plastizität mit der Gedächtnisbildung. Besonders die synaptische LTP weist Eigenschaften auf, die auch für das Lernen charakteristisch sind. So kann die Assoziativität des Lernens ebenfalls auf zellulärer Ebene gefunden werden: Auch schwach und unzureichend stimulierte Synapsen potenzieren sich, wenn gleichzeitig stärkere synaptische Eingänge am gleichen Neuron zu einer Depolarisation führen. Neben der Assoziativität sind Eingangsspezifität (nur die Synapsen, welche den Reiz erhalten oder sehr nah benachbarte Synapsen können sich potenzieren) und Kooperativität (eine gewisse Anzahl von Synapsen muss aktiviert werden um LTP auszubilden) für die LTP charakteristisch. Insgesamt stellen die genannten Punkte wünschenswerte Eigenschaften für einen

physiologischen Mechanismus zur Abspeicherung von Informationen an Synapsen dar (Frey und Morris, 1998; Reymann und Frey, 2007). Des Weiteren korreliert die zeitliche Abfolge des Kurz- beziehungsweise Langzeitgedächtnisses mit den unterschiedlichen Formen und Phasen der zellulären Plastizität. Darüberhinaus konnten gemeinsame Abhängigkeiten von bestimmten Strukturen, wie dem NMDA-Rezeptor, gefunden werden (Collingridge und Bliss 1995). Somit entspricht das vorherrschende Modell der Langzeitpotenzierung wesentlichen zellulären Aspekten und Mechanismen der Gedächtnisbildung und -konsolidierung (Dash et al., 2004; Lynch 2004; Reymann und Frey, 2007).

### **1.7 Die Störung der LTP durch A $\beta$ als Schädigungsmodell früher Alzheimerstadien**

Lösliche A $\beta$  Spezies inhibieren die Langzeitpotenzierung *in vitro* und *in vivo* (Walsh et al., 2005). Somit könnte A $\beta$  während früher AD-Stadien zu einer Plastizitätsstörung im Gehirn führen, ohne dass das neuronale Überleben beeinträchtigt ist (Lue et al., 1999). Vor dem Hintergrund der LTP als anerkanntem zellulärem Modell der Gedächtnisbildung, bietet die Beobachtung der LTP-Störung durch A $\beta$  eine schlüssige Erklärung für die frühen Gedächtnisdefizite und Lernstörungen beim Alzheimerpatienten. Tatsächlich konnte mit isolierten Oligomeren aus der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) von Alzheimerpatienten die LTP in hippokampalen Schnitten der Ratte gestört werden, während die CSF gesunder Menschen keine Auswirkungen hatte (Shankar et al., 2008). Noch ist der Mechanismus des A $\beta$ -LTP-Effekts nicht vollständig aufgeklärt, doch Untersuchungen offenbarten, dass A $\beta$  über die Beeinflussung verschiedener Rezeptoren und Signalwege zu einer Verringerung der Anzahl synaptischer NMDA-Rezeptoren führen kann (Snyder et al., 2005). Da für die Induktion der LTP die Aktivierung des NMDA-Rezeptors essentiell ist, kann die LTP auf diese Weise durch A $\beta$  gestört werden. Weiterhin wurden auch A $\beta$  Effekte auf Signalkaskaden, welche dem NMDA-Rezeptor nachgeschaltet sind, beschrieben, die ebenfalls die Störung der LTP erklären können. So konnte eine Inhibierung der calcium/calmodulindependent protein kinase II (CAMK2); der mitogen-activated protein kinase (Erk/MAPK) und der Akt/protein kinase B (PKB) durch A $\beta$  beobachtet werden. All diese Kinasen sind für die Induktion der LTP wichtig (Townsend et al., 2006). Aber auch eine indirekte Störung der LTP über eine Aktivierung von Typ-1 TNF $\alpha$  Rezeptoren (TNF-R1) (Rowan et al., 2007), sowie über eine A $\beta$ -vermittelte Inhibierung des nicotinischen  $\alpha$ 7 Acetylcholin Rezeptors (Chen et al., 2006) wurden beschrieben. Zusammenfassend sind die von A $\beta$  beeinflussten Signalwege und/oder Rezeptoren, welche zu einer Störung der LTP führen: der NMDA-

Rezeptor, als entscheidender Rezeptor der LTP Induktion und/oder Kinasen, die dem NMDA-Rezeptor nachgeschaltet sind und/oder LTP modulierende Signale. Es ist zu betonen, dass die beschriebene LTP-Inhibition durch das A $\beta$ -Peptid lediglich die Konsequenz einer pathologischen A $\beta$  Wirkung ist. Eine entscheidende Frage, die beantwortet werden muss, um den A $\beta$ -vermittelten Plastizitätsstörungen effektiv entgegen zu können, ist die Frage nach dem Wirkort des A $\beta$ . Bisher wurden mehrere Wirkungsorte des A $\beta$  beschrieben. Die Zellmembran kann durch die Bildung von Membranporen aus A $\beta$ -Peptid geschädigt werden (Wong et al., 2009). Eine Aktivierung von RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), zieht eine Aktivierung der p38 MAP Kinase nach sich, welches die LTP inhibiert (Yan et al., 2009). Eine  $\alpha$ 7 nAChR abhängige Inhibierung der Akt-Phosphorylierung, bewirkt eine Störung der LTP Induktion (Abbott et al., 2008). Darüber hinaus weisen viele Untersuchungen darauf hin, dass A $\beta$  zu einer Überaktivierung des NMDA-Rezeptors führen kann (Abbildung 5).

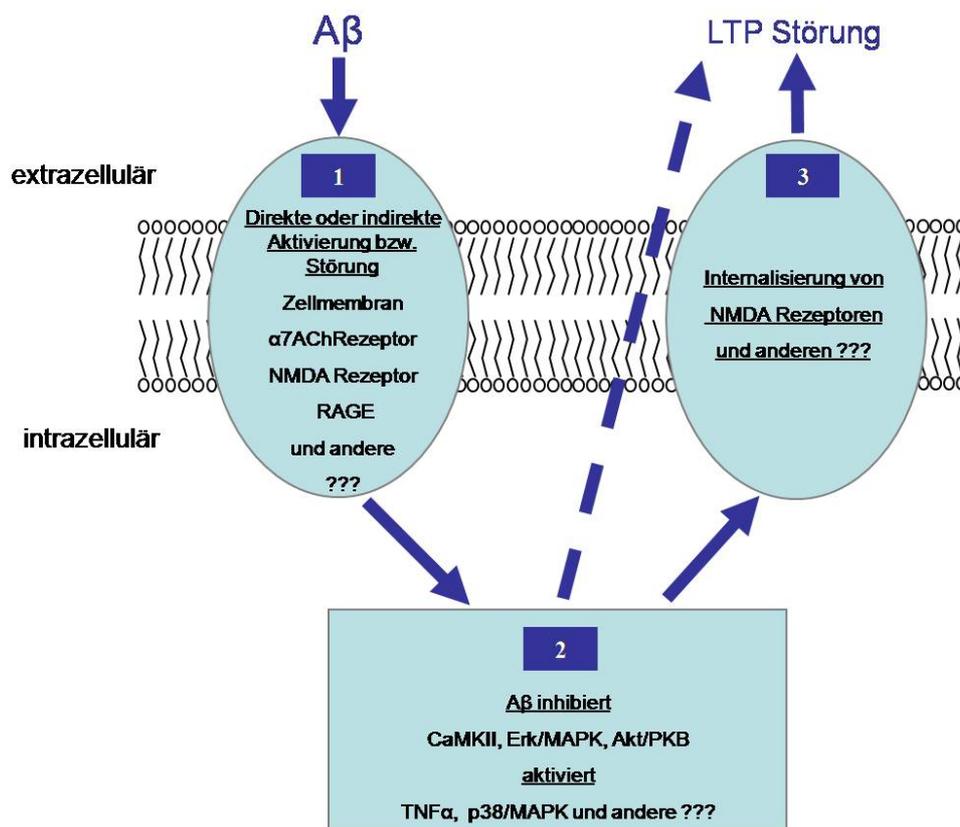


Abbildung 5: Durch A $\beta$  beeinflusste Signalwege und Strukturen.

## **1.8 Die Reduktion von dendritischen Spines durch A $\beta$**

Wie bereits erwähnt, ist neben der wahrscheinlichen Plastizitätsstörung im Gehirn von Alzheimerpatienten ebenfalls eine Reduktion von Synapsen zu beobachten, die wahrscheinlich auf einem Rückzug dendritischer Dornen (Spines) beruht. Dendritische Spines sind kleine Membranausstülpungen entlang des Dendriten, die den postsynaptischen Anteil vieler exzitatorischer Synapsen bilden. Sie sind sehr plastisch und können einem ständigen Umbau unterworfen sein. Dieser Spine-Umbau und die Bildung neuer Synapsen sind aktivitätsabhängige Prozesse und können somit die strukturelle Basis für die Gedächtnisbildung darstellen (Yang und Zhou 2009). Interessanterweise ist bei Alzheimerpatienten eine Reduktion von Synapsen zu finden. In transgenen Mausmodellen und in A $\beta$  exponierten neuronalen Primärkulturen wurde ebenfalls eine verringerte Anzahl dieser Strukturen beobachtet (Knobloch und Mansuy, 2008; Green und LaFerla, 2008; Terry et al., 1991). Somit können diese Veränderungen ein entscheidender Grund für die kognitiven Defizite innerhalb früher Phasen der Krankheit sein. Der molekulare Mechanismus dieser Spine bzw. Synapsen-Schädigung wurde ebenfalls mit einer NMDA-Rezeptorüberaktivierung in Verbindung gebracht (Shankar et al., 2007).

## **1.9 Der NMDA-Rezeptor**

Der NMDA-Rezeptor gehört neben dem AMPA-Rezeptor (amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) und dem Kainatrezeptor zu den ionotropen Glutamatrezeptoren. Er zeichnet sich dadurch aus, dass er über den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat ligandengesteuert und zusätzlich spannungsgesteuert ist. Ein Magnesiumion blockiert den Kanal bis zu einem Membranpotential von -30 mV. Somit können nur starke synaptische Eingänge, welche das Membranpotential entsprechend depolarisieren, den NMDA-Rezeptor öffnen. Durch seine Durchlässigkeit für Ca<sup>2+</sup>-Ionen spielt seine Aktivierung für viele kalziumabhängige Signalkaskaden eine wichtige Rolle. Sein schematischer Aufbau ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

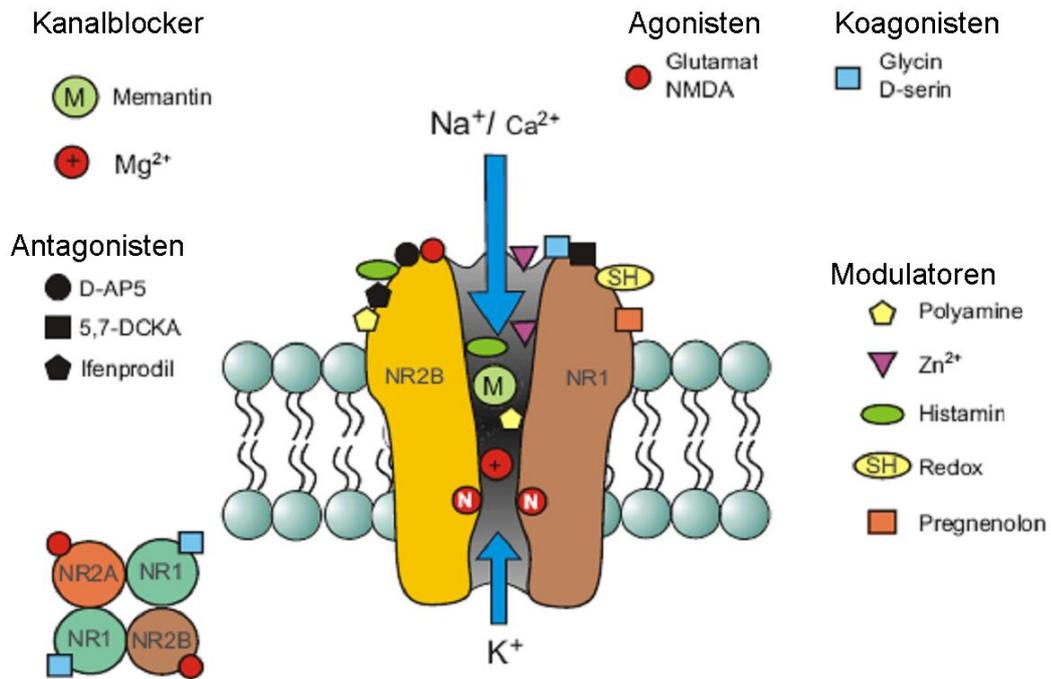


Abbildung 6: Schematischer Aufbau und pharmakologische Bindungsstellen des NMDA-Rezeptors.

Der NMDA-Rezeptor ist ein Tetramer aus je zwei NR1 und zwei NR2 Untereinheiten. Es gibt vier Subtypen der NR2 Untereinheit: (A, B, C und D) und acht Splicevarianten der NR1 Untereinheit. Die Agonisten Glutamat und NMDA, sowie die Co-Agonisten Glycin und D-Serin aktivieren den Rezeptor. Alle NMDA-Rezeptoren sind für Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> durchlässig. Der offene Kanal wird spannungsabhängig durch Mg<sup>2+</sup> oder dem nicht kompetitiven Antagonisten Memantin blockiert. Ifenprodil blockiert selektiv NR2B-haltige Rezeptoren. D-AP5 (D-2-amino-5-phosphonopentanoate) [oder APV (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure)] ist ein unspezifischer nicht kompetitiver Antagonist. Weiterhin wurden verschiedene Modulatoren, wie zum Beispiel Polyamine und Zink beschrieben (adaptiert von Parsons et al., 2007).

Während der Induktion der LTP bewirkt der Kalziumeinstrom durch den NMDA-Rezeptor die Aktivierung der CAMK2, der PKA, PKC und ERK1,2/MAPK, welche über nachgeschaltete Signale zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führen (Abbildung 7). PhosphoCREB kann über 100 Gene anschalten, unter anderem BDNF (brain-derived neurotrophic factor), welches für das neuronale Überleben und das Auswachsen von neuen Synapsen bedeutsam ist (Flavell und Greenberg 2008). Im Gegensatz dazu kann eine Übererregung dieses Rezeptors durch den übersteigerten Kalziumeinstrom auch zu einer Zellschädigung führen. Dieser dichotome Charakter des NMDARs ist im nachfolgenden Absatz 1.10. näher erläutert.

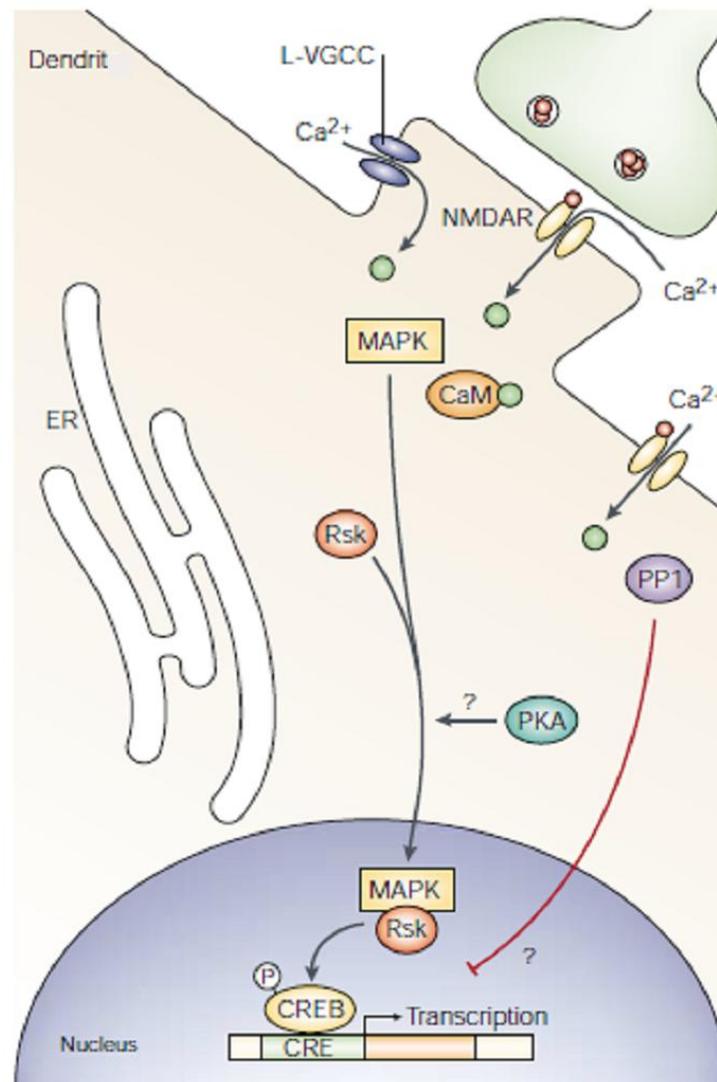


Abbildung 7: Die Aktivierung von pCREB bei der LTP

Während der Induktion der LTP werden NMDA-Rezeptoren, aber auch spannungabhängige Kalziumkanäle (VGCC) aktiviert, was zu einem Kalziumeinstrom in die Postsynapse führt. Über eine Aktivierung der CaMK und Erk/MAPK wird CREB phosphoryliert und kann somit als Transkriptionsfaktor an den CRE-Promotor binden und die Transkription von Genen initiieren (Flavell und Greenberg 2008).

## 1.10 Die Dichotomie des NMDA-Rezeptors

Der NMDA-Rezeptor ist einer der am besten untersuchten Rezeptoren des Säugerhirns. Er nimmt eine kritische Rolle für das neuronale Überleben ein, da seine Überaktivität sowie Unteraktivität zu einer neuronalen Schädigung führen kann. Dieser gegensätzliche Effekt des NMDAR wird am besten mit dem Titel des Artikels von Chris Parsons: „Homeostase des glutamatergen Systems: zu wenig Aktivierung [des NMDARs] ist schlecht, zu viel aber ebenso“ zusammengefasst (Parsons et al., 2007). So kann auch die scheinbar wider-

sprüchliche Aussage um das Alzheimermedikament Memantin erklärt werden, dass ein Antagonist des NMDA-Rezeptors Alzheimerpatienten helfen soll, wenn die Aktivität des NMDARs für die LTP und das Lernen essentiell ist (Collingridge und Bliss 1995). Da Memantin ein Antagonist mit moderater Affinität zu seiner Bindungsstelle ist und eine starke Spannungsabhängigkeit sowie eine schnelle Kinetik aufweist, blockiert es den NMDA-Rezeptor nur partiell. Damit ist der NMDAR auch unter dem Einfluss von Memantin noch funktional. Die  $\beta$ -induzierte Übererregung des NMDAR wird jedoch unterbunden (Rogawski und Wenk, 2003).

Die Übererregung des NMDA-Rezeptors resultiert in der Aktivierung von mehreren Signalwegen, welche das Neuron schädigen. Es können zum einen direkte schädliche Effekte auftreten, wie die Beeinträchtigung von Mitochondrien durch einen übersteigerten Kalziumeinstrom mit Freisetzung des proapoptotischen Cytochroms C und reaktiven Sauerstoffspezies, oder die Aktivierung der zwei MAP Kinasen p38 und JNK und der Protease Calpain ( $\text{Ca}^{2+}$ -activated cysteine protease), die wiederum proapoptotisch sind. Zum anderen kann auch eine indirekte Schädigung erfolgen, indem Signale, die das neuronale Überleben sichern, blockiert werden. Hier ist vor allem die Blockierung der ERK1/2 MAP Kinase und die Dephosphorylierung von CREB zu nennen. Hingegen ist die moderate Aktivierung des NMDA-Rezeptors für das Neuron essentiell. Durch die Aktivierung der CaMKinase, AKT und ERK1/2/MAPK werden zum einen Signale des Zelltods blockiert und zum anderen CREB phosphoryliert, welches die Transkription überlebenswichtiger Gene initiiert (Hardingham et al., 2002; Abbildung 8).

In Anbetracht dieser gegensätzlichen Effekte des NMDA-Rezeptors ist das Verständnis für den Grund der zellschädigenden oder der zellschützenden Wirkung für eventuelle pharmakologische Interventionen von enormer Bedeutung. Wie bereits angedeutet wurde, kann die Stimulusintensität entscheidend für die Richtung des NMDAR-Signals sein. Eine pathologisch überhöhte Glutamatausschüttung würde den NMDAR dermaßen aktivieren, dass so viel Kalzium einströmt, dass nachfolgend die Aktivierung der schädigenden Signalkaskaden überwiegt. Eine Bedingung für diese Theorie ist, dass die Kalziumsensoren der schädigenden Signalwege im Vergleich zu den zellschützenden Kalziumsensoren eine geringere Affinität haben. Tatsächlich werden viele protektive Signalwege vom kalziumbindenden Calmodulin aktiviert, welches schon bei sehr geringen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen aktiviert wird. Im Gegensatz dazu werden zum Beispiel die Calpaine (zentrale Vermittler von NMDAR-induziertem Zelltod) nicht von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin, sondern direkt von Kal-

zium aktiviert, womit eine deutlich höhere Konzentration dieses Ions benötigt wird (Tompa et al., 1996).

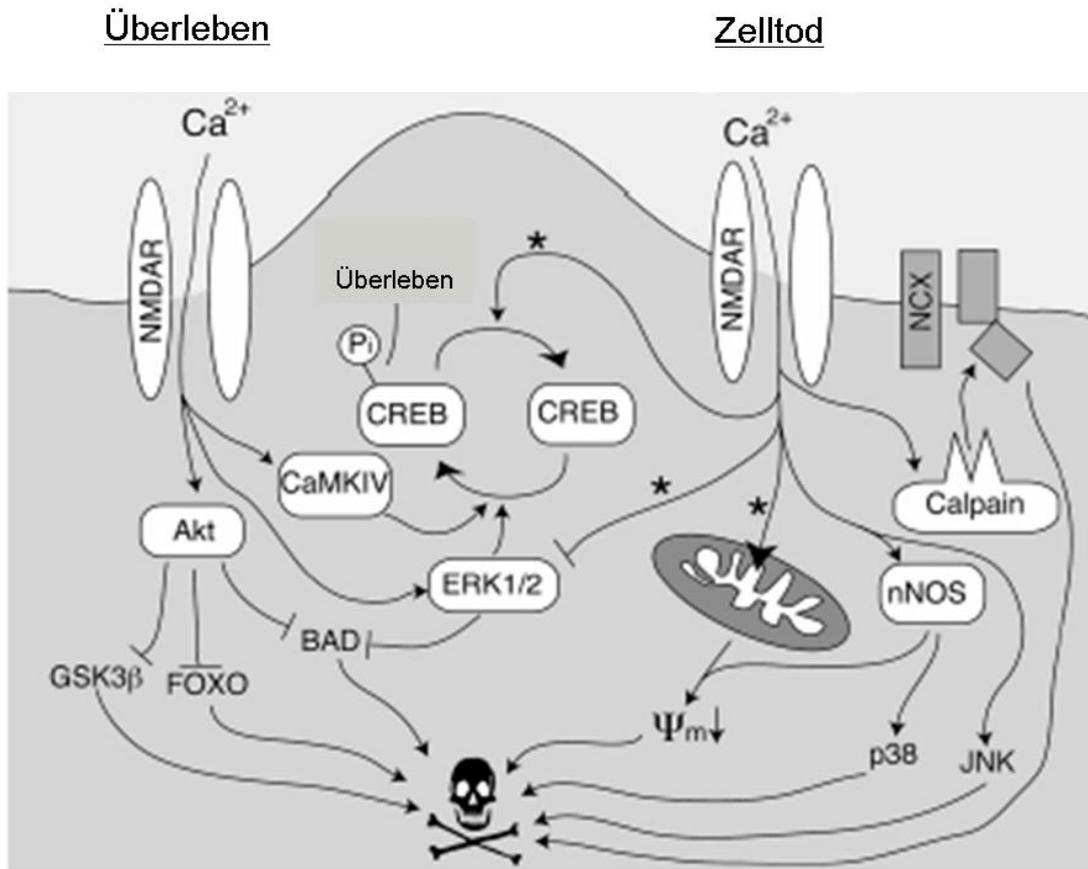


Abbildung 8: Signalwege des NMDA-Rezeptors

Die Aktivierung des NMDAR kann zu einem Signale anstoßen, die das Überleben des Neurons fördern oder Kaskaden initiieren, die Zelltod auslösen. Ein entscheidender Mechanismus dabei ist die Phosphorylierung oder die Dephosphorylierung von CREB (adaptiert von Hardingham et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit der differenzierten NMDAR-Aktivierung ist die Lokalisation des Rezeptors. Es konnte gezeigt werden, dass NMDA-Rezeptoren, die sich außerhalb der Synapse befinden (extrasynaptische NMDARs) eher eine Dephosphorylierung von CREB bewirken und synaptisch lokalisierte NMDAR eher die Phosphorylierung von CREB fördern (Hardingham et al., 2002). Interessanterweise sind extrasynaptische NMDAR größtenteils NR2B-haltig (Hardingham et al., 2002), womit ein weiterer möglicher Unterschied in der NMDA-Rezeptor-Aktivierung, nämlich der subtypspezifischen, genannt wäre. Im Zusammenhang mit Exzitotoxizität nach Schlaganfall, konnte Tompa et al. 1996 eine schädigende Wirkung der Aktivität von NR2B-haltigen NMDARs und einen schüt-

zenden Effekt der Aktivierung von NR2A haltigen NMDARs zeigen (Chen et al., 2008). Des Weiteren wurde kürzlich das Protein Jacob beschrieben, welches von extrasynaptischen, NR2B-haltigen NMDA-Rezeptoren aktiviert wird, in den neuronalen Zellkern transloziert und eine Dephosphorylierung von CREB bewirkt. Die Aktivierung von synaptischen NR2A haltigen NMDARs hatte keine Auswirkung auf Jacob und somit auch keinen Effekt auf den phosphoCREB Gehalt der Neurone (Dieterich et al., 2008). Interessanterweise wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des NMDA-Rezeptors und dem A $\beta$ -vermittelten Neuronenschaden beschrieben.

### **1.11 NMDA-Rezeptor Überaktivierung durch A $\beta$**

Bereits im Jahr 2000 wurde von Harkany et al. konstatiert, dass die A $\beta$ -vermittelte neuronale Schädigung eine Signalkaskade anstößt, welche die Verminderung der astroglialen Glutamataufnahme bewirkt. Dadurch wird eine anhaltende Aktivierung des NMDA-Rezeptors und somit ein starker intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Anstieg induziert. Diese Vorgänge sind mit einer erhöhten Aktivität der Stickstoffmonoxid Synthetase und somit einer pathologischen Generierung freier Radikale assoziiert (Harkany et al., 2000). Ein interessanter Aspekt dieses Szenarios ist die Homologie zwischen der Exzitotoxizität, wie sie zum Beispiel beim Schlaganfall beobachtet werden kann und der Schädigung durch A $\beta$ . Wenn auch die neuronale Dysfunktion und Beeinträchtigung beim Alzheimer nicht so abrupt und akut wie beim Schlaganfall auftritt, so scheint doch die Überaktivität des NMDA-Rezeptors bei beiden neurodegenerativen Krankheiten eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Idee der pathologischen Überaktivierung des NMDA-Rezeptors als Gemeinsamkeit verschiedener neurologischer Krankheiten, wie Schlaganfall, Epilepsie, Chorea Huntington und Alzheimer wurde auch im Jahr 2004 von Hynd et al. dargestellt. Des Weiteren sprechen mehrere experimentelle Ergebnisse für eine Abhängigkeit der A $\beta$ -induzierten neuronalen Schädigung von der Aktivierung des NMDA-Rezeptors. Es wurde gezeigt, dass die Verminderung der Anzahl dendritischer Spines durch A $\beta$ -Oligomere in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen mit dem NMDA-Rezeptor Antagonisten D-CPP (3-((D)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid) aufgehoben werden kann (Shankar et al., 2007). Weiterhin offenbarte die mikroskopische Analyse von neuronalen Primärkulturen, dass A $\beta$ -Oligomere an dendritischen Spines und dort an NMDA-Rezeptoren oder in deren unmittelbaren Nähe binden (Lacor et al., 2007). So wurde die These der direkten Beeinflussung des NMDARs durch A $\beta$  aufgestellt. Sie fand durch die Beobachtung, dass die Bindung von A $\beta$  Oligomeren an Neurone komplett durch einen Antikörper gegen die

extrazelluläre Domäne der NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors verhindert werden konnte und somit auch keine schädigenden A $\beta$  Effekte wie die Produktion von ROS auftraten, weitere Unterstützung (De Felice et al., 2007). Basierend auf der chronischen Dysregulation des Glutamathaushaltes beim Alzheimerpatienten, wird der NMDA-Rezeptor Antagonist Memantin für die Behandlung des Alzheimers eingesetzt. Seine protektive Wirkung auf funktioneller Ebene konnte kürzlich mit LTP Experimenten *in vivo* gezeigt werden, wo die Behandlung von Ratten mit Memantin die A $\beta$ -induzierte Plastizitätsstörung aufhob (Klyubin et al., 2009). Auch auf molekularer Ebene gibt es Anzeichen für eine pathologische Überaktivität des NMDA-Rezeptors. Untersuchungen an Alzheimer Mausmodellen ergaben Verschiebungen bestimmter Signalkaskaden. So wurde eine Dephosphorylierung von CREB (cAMP response element-binding protein) (Ma et al., 2007) und eine Dysregulation der ERK/MAPK (Echeverria et al., 2004) beschrieben. Die Rolle verschiedener NMDAR Subtypen bei der A $\beta$ -vermittelten Neuronenschädigung ist noch unklar.

### **1.12 Zielstellung der Arbeit**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Störung der synaptischen Plastizität durch A $\beta$  als ein Schädigungsmodell früher Alzheimerstadien dargestellt. Somit bietet die A $\beta$ -induzierte LTP Störung ein Modell, um pharmakologische Interventionen oder zugrunde liegende Mechanismen der Gedächtnisstörung untersuchen zu können. In dieser Arbeit sollte zunächst die Verminderung der Langzeitpotenzierung in hippocampalen Akutschnitten durch die Applikation verschiedener A $\beta$  Spezies und Aggregationsformen beschrieben und charakterisiert werden. Daraufhin sollten die Mechanismen dieser Plastizitätsstörung eingehender betrachtet werden. Da die Verminderung des MTT Umsatzes ein sehr häufig beschriebener Effekt von A $\beta$  auf neuronale Zellen ist, wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob die LTP Störung mit einer möglichen Abnahme der Redoxaktivität der Zellen innerhalb der Schnittkultur erklärt werden kann. Weiterhin ist eine kritische Beteiligung des NMDA-Rezeptors bei der Vermittlung der A $\beta$  Effekte bereits beschrieben. Bisher wurde jedoch keine subtypspezifische Untersuchung dieses Rezeptors durchgeführt. Da dem NR2B-haltigen NMDAR (NMDAR(2B)) bereits eine schädigende Wirkung nachgewiesen wurde, sollte die Rolle dieses Subtyps bei der A $\beta$ -vermittelten neuronalen Dysfunktion aufgeklärt werden. Um weitere Facetten der neuronalen Degeneration und Dysfunktion zu beleuchten, schloss sich der LTP-Messung eine Untersuchung der Involvierung der NMDA(2B)-Aktivierung bei der spontanen Netzwerkaktivität und die Synapsendichte A $\beta$  exponierter, primärer Neurone an. Anschließend sollte die Wirkung von A $\beta$

auf das intrazelluläre Signalprotein Jacob, welches durch den NMDAR(2B) aktiviert wird, hinsichtlich seiner Bedeutung für verschiedene Erscheinungsformen der neuronalen Dysfunktion geprüft werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Elektrophysiologie

#### 2.1.1 Präparation der Hippokampusschnitte

Für die Präparation der hippokampalen Akutschritte wurden 4 Monate alte Mäuse (*Mus musculus*, Stamm C57BL/6NHsd) und für die MTT Versuche 7 bis 8 Wochen alte männliche Ratten (*Rattus norvegicus*, Stamm Wistar UNILEVER: HsdCpd:WU) verwendet. Aufzucht sowie institutsinterne Haltung erfolgte bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12/12 h mit dreistündiger Dämmerung und einer Futter- und Wasserversorgung ad libitum. Zur Gehirnentnahme wurden die Ratten durch einen Schlag auf das Genick, bzw. die Mäuse durch Überstreckung der Wirbelsäule und sofortige Dekapitation getötet. Danach wurde mit einer Schere das Kopffell entfernt, der Schädel entlang der Kalotte von caudal nach rostral aufgeschnitten und die Schädelplatten mittels einer Zange vorsichtig aufgebrochen. Mit einem Spatel wurde das Gehirn aus der basalen Schädelkapsel in eine 4°C kalte, Sauerstoff-begaste künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) (124 mM NaCl; 4,9 mM KCl; 1,3 mM MgSO<sub>4</sub>; 2mM CaCl<sub>2</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25,6 mM NaHCO<sub>3</sub> und 10 mM D-Glukose) gegeben. Während der ersten Phase der Präparation ist das Schädigungsrisiko für das Nervengewebe am höchsten, da keine Kühlung und keine Glukose- sowie Sauerstoffversorgung gewährleistet wird. Sie dauerte daher nie länger als 90 Sekunden. Um das Zellschädigungsrisiko bei der weiteren Präparation zu minimieren, wurde auf eine Kühlung aller mit dem Gewebe in Kontakt stehenden Lösungen, sowie Instrumente geachtet (Pohle et al., 1986). Zur Isolierung des Hippokampus wurde im ACSF Bad mit Hilfe eines Skalpells das corpus callosum durchtrennt. Danach wurde der Hippokampus mit einer feinen Pinzette und einem gekröpften Spatel vom entorhinalen Kortex und von der Fornix getrennt, vorsichtig auf einen Messingblock gelegt und zügig mit einem Gewebeschnneider (Eigenbau Institut für Pharmakologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) in 400 µm dicke Schnitte geteilt, die einzeln mit einem feuchten Pinsel in ACSF-Lösung überführt wurden. Um den Verlauf der longitudinalen Signalverarbeitung dieser Transversalschnitte zu erhalten, wurde ein Schnittwinkel von 70° eingehalten.

Anschließend wurden die Hippokampusschnitte mittels einer Pasteurpipette in eine Vorinkubationskammer, gefüllt mit 8 ml ACSF und permanenter Carbogen-Begasung, überführt und bei den LTP-Experimenten für 2h und bei den Basislinienexperimenten für 1h bei RT inkubiert. Ausschließlich in der Vorinkubationskammer erfolgte die Behandlung der

Schnitte mit A $\beta$  und/oder den Substanzen Ro 25,6981, Ifenprodil und/oder den Lösungsmittelkontrollen.

### 2.1.2 Elektrophysiologische Messung

Die Messung erfolgte in einer vom Institut entwickelten Tauchschnittkammer. Hierbei lagen die Akutschnitte auf einem Nylonnetz und wurden kontinuierlich mit Carbogenbegaster ACSF mit einer Flussrate von 2,5 ml\*min<sup>-1</sup> umspült. Durch die Begasung der Lösung mit Carbogen stellte sich der pH des Hydrogencarbonatpuffers von 7,4 ein. Die extrazelluläre Ableitung der exzitatorischen postsynaptischen Feldpotenziale (fEPSP) erfolgte mit Hilfe von Glasmikroelektroden. Die Borsilikatglas-Kapillaren mit innerem Filament (GC 150TF-10, Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne Reading, UK) wurden mit einem Ziehgerät (PP 83, Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan) in zwei Schritten zu Elektroden gezogen, die mit ACSF Lösung gefüllt einen Spitzenwiderstand von 1-4 M $\Omega$  aufwiesen. Mit der Positionierung der Glaselektrode im *stratum radiatum* der CA1 Region wurden die Potenzialänderungen benachbarter Synapsen als fEPSP gemessen. Ein in die Kammer eingelassener elektrolytisch chlorierter und geerdeter Silberdraht diente als Referenzelektrode. Die abgeleiteten Potenziale wurden mit einem Differentialverstärker (instituteigene Entwicklung) verstärkt, mit einem Bessel-Filter gefiltert (3 Hz -10 kHz) und über einen Analog-Digital-Wandler (CED 1401+, Cambridge Electronics Design, Cambridge, UK) direkt in den Computer übertragen. Die Darstellung, Speicherung und Auswertung der evozierten Potenziale erfolgte mit einem am IFN entwickelten Computerprogramm (PWIN). Die fEPSP wurden anhand der maximalen Änderung der Potenziale zur Zeit (maximaler Anstieg) zwischen Minimum und ihm vorangegangenen Maximum gemessen. Die Potenziale wurden elektrisch evoziert, indem über eine im *stratum radiatum* ca. 500-1000 $\mu$ m von der Ableitelektrode entfernt positionierte Metallelektrode biphasische, spannungskonstante Pulse von 0,05 ms pro Halbwelle appliziert wurden. Diese Strompulse wurden mittels Computer und Digital-Analog-Wandler getriggert und mit einem Stimulusgenerator (A 365, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) erzeugt. Die damit erreichte Depolarisation afferenter Phasern (im Wesentlichen die Schaffer-Kollateralen) führte zu einer synchronen, postsynaptischen Aktivierung einer Population von CA1-Pyramidenneuronen, die wie oben beschrieben als fEPSP abgeleitet wurde. Die Tetanisierung der Schnitte erfolgte elektrisch über die Reizelektrode. Hierzu wurde in der Reiz-Signal-Kurve die maximale Signalgröße des fEPSP ermittelt. Daraufhin wurde mit Hilfe der Reizstärke das Signal auf 30% des maximalen fEPSPs eingestellt.

Nachdem das Signal mindestens 30 Minuten stabil blieb (Messung jede Minute; Abweichung < 20 %) erfolgte die Potenzierung. Für das Auslösen einer starken, lang anhaltenden LTP wurden die Schnitte dreimal im Abstand von 10 Minuten tetanisiert. Ein Tetanus beinhaltete 100 Pulse doppelter Pulsbreite (0,1 ms pro Halbwelle) in einer Frequenz von 100 Hz. Für die Induktion einer LTP durch den Theta-Burst wurden, in Anlehnung an die im Gehirn vorkommenden Theta-Wellen, drei mal alle 10 min Pulsgruppen im Abstand von 200 ms (5 Hz) appliziert. Innerhalb dieser Pulsgruppen erfolgte alle 10 ms ein Stimuluspuls. Die Steigerung des Signals wurde relativ zu der zuvor gemessenen 30 minütigen und auf 100 Prozent normierten Basislinie gemessen.

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 Präparation der Primärkulturen**

Zur Gewinnung der Einzelzellkulturen wurden neugeborene Ratten (postnataler Tag 1-3) dekapitiert, die Gehirne entnommen und in eisgekühltem Hanks-Puffer (Biochrom; Berlin) gesammelt. Um die Zellen aus dem Gewebeverband herauszulösen, wurde das Gewebe mit einer feuerpolierten Pasteurpipette trituriert. Es folgten mehrere Suspensionsschritte, wobei erst auf Kalzium- und magnesiumfreies Medium und dann auf Trypsin / EDTA haltiges Medium umgestellt wurde, um die interzellulären Kontakte zu destabilisieren bzw. aufzulösen. Die Zellen sollten nicht länger als 3 min mit trypsinhaltigem Medium inkubiert werden. Die Proteaseaktivität wird durch Zugabe von 10 % FKS inhibiert. Um grobe Zellklumpen herauszufiltern, wurde die Zellsuspension durch ein Sieb (Porengröße 1 mm) in eine Petrischale überführt. Um die Zellen weiter zu vereinzeln, wurde die Suspension mittels einer 10ml Einwegspritze trituiert. Nach abschließender Zentrifugation für 2 min bei 1200 rpm und 10°C wurde das Zentrifugat (Zellpellet) in 5ml DMEM + 10% FKS aufgenommen. Die anschließende Zellzählung erfolgte lichtmikroskopisch in einer NEUBAUER-Zählkammer.

### **2.2.2 Kultivierung der neuronalen Primärkultur**

Die Kultivierung der Neurone wurde in Zusammenarbeit mit Marina Mikhaylova durchgeführt. Die frisch präparierten Zellen wurden in poly-L-Lysin (Biochrom; Berlin) beschichteten Zellkulturflaschen, bzw. 12-Lochplatten in DMEM Medium unter Zugabe von 10% FKS, 1% Gentamycin im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 92% Luftfeuchtigkeit ausgesät. Nach 3 Tagen erfolgte Zugabe von Arabinose-C, um die Astrozytenproliferation zu hemmen.

### 2.2.3 Präparation und Kultivierung der organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHC)

Für die Präparation der OHC wurden 6 bis 9 Tage alte Ratten (*Rattus norvegicus*, Stamm Wistar UNILEVER: HsdCpd:WU) verwendet. Tierzucht und -haltung erfolgte wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben. Die Tiere wurden dekapitiert und der Schädel mit einer Schere entlang der Kalotte von caudal nach rostral aufgeschnitten. Mit einem Spatel wurde das Gehirn aus der basalen Schädelkapsel in das 4 °C kalte, Sauerstoff-begaste DMEM-Zellkulturmedium überführt. Zur Isolierung des Hippokampus wurde der *bulbus olfactorius* und das *cerebellum* vom Gehirn abgetrennt, beide Hemisphären durch einen Sagittalschnitt voneinander getrennt, das Mittelhirn entfernt und die präparierten Hippokampi mit einem Gewebeschneider (McILWAIN Tissue Chopper) in 350 µm dicke Schnitte zerteilt. Bis zu drei OHC wurden auf Zellkulturmembranen (Millicell) platziert und für drei Tage in Horse Serum (HS)-Zellkulturmedium (1% Gentamycin) bei 37°C im Inkubator (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Dann folgte eine Weiterkultivierung der OHC in Neurobasal-Zellkulturmedium (1% Gentamycin) bei 34°C mit 20% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>. Nach einer Kultivierungszeit von 12 Tagen erfolgte die Selektion der Schnitte. Als Ausschlusskriterien dienten die Erscheinung der OHC im Durchlichtmikroskop, sowie die Interkalierung von Propidiumiodid in der Cornu Ammonis (CA 1-4). Ausschließlich vitale OHC wurden für die nachfolgenden Experimente verwendet.

### 2.3 Aβ Aggregation

Das Fragment Aβ (25-35) (Bachem) wurde in bidestilliertem Wasser in einer Konzentration von 1 mg\*ml<sup>-1</sup> aufgelöst und bei -20°C eingefroren. Die Applikation erfolgte in den entsprechenden, im Ergebnisteil beschriebenen, Konzentrationen. Die Generierung der Aβ Fibrillen erfolgte mit rekombinant hergestelltem Aβ (1-40) (von Dr. Marcus Fändrich bereitgestellt). Das Peptid wurde in bidestilliertem Wasser in einer Konzentration von 1 mg\*ml<sup>-1</sup> aufgelöst und für 5-7 Tage bei 37°C inkubiert. Die erfolgreiche Generierung der Fibrillen wurde mittels Elektronenmikroskopie (EM) überprüft. Die Herstellung der Oligomere aus rekombinant hergestelltem Aβ (1-40) erfolgte durch Auflösen von Aβ in HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Sigma, St. Louis, MO)) in einer Konzentration von 2,5 mg\*ml<sup>-1</sup> bei Raumtemperatur. Dann wurde die Proteinlösung mit bidestilliertem Wasser 1:9 verdünnt, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 14000 g zentrifugiert. Die Entfernung des restlichen HFIP erfolgte durch Begasung der Lösung mit Carbogen. Die Präparation der ADDL erfolgte nach Klein, 2002. Aβ

(1-42) (Biopeptide) wurde in HFIP in einer Konzentration von  $4,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  aufgelöst. Das Lösungsmittel wurde dann über Nacht abgelüftet und der resultierende Proteinfilm für 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Nun wurde das Protein in wasserfreiem DMSO in einer Konzentration von 5mM gelöst und mit F12 Medium zu einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  verdünnt. Nach einer Inkubation dieser Lösung bei  $5^\circ\text{C}$  für 24 h erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 g für 10 min. Die erfolgreiche Präparation der ADDL wurde mit Hilfe der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Elektronenmikroskopie überprüft. Die Elektronenmikroskopie erfolgte basierend auf einer Kooperation mit Dr. Marcus Fändrich und ist in (Eckert et al., 2008) beschrieben.

## **2.4 Untersuchung der Toxizität und Viabilität**

### **2.4.1 Der MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay**

MTT (Carl Roth) wurde in einer Konzentration von  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in bidestilliertem Wasser aufgelöst und in dem jeweiligen Zellkulturmedium mit einer Konzentration von  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  angewendet. Die OHC und hippokampalen Akutschnitte wurden für drei Stunden mit MTT inkubiert. Dann erfolgten die Abstopfung der Reaktion und die Auflösung des gebildeten Formazans durch Entfernung des Zellkulturmediums und Zugabe von 20% SDS/50% Dimethylformamid. Nach Zentrifugation für 20 min bei 10000g wurde die Absorption des Überstands bei 570 nm gemessen (Fluostar, Optima), welche Aufschluss über die relative Formazankonzentration gab.

### **2.4.2 Propidiumiodid Aufnahme**

Neuronaler Zelltod wurde durch die Aufnahme von Propidiumiodid (PI) quantifiziert. Hierzu wurden die OHC mit PI-haltigem Medium ( $10 \mu\text{M}$ ) für 2 h bei  $33^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe von Fluoreszenzaufnahmen (Nikon; LUCIA Software) und anschließender densitometrischer Analyse (LUCIA Image analysis software) der Zelltod im Bereich der CA1 Region gemessen.

## **2.5 Immunhistochemie**

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnittkulturen in 0,1 M Phosphatpuffer mit 4% Paraformaldehyd über Nacht fixiert. Zwecks Gefrierschutzes folgte eine Inkubation in 30% Saccharoselösung, mit anschließendem Einfrieren der Präparate in Methylbutan bei  $-80^\circ\text{C}$ . Dann wurden mit einem Gefriermikrotom von den Präparaten  $20 \mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt, welche bei  $4^\circ\text{C}$  in Gefrierschutzlösung, bestehend aus

25% Ethylenglycol und 25% Glycerin in 0,1 M Phosphatpuffer, konserviert wurden. Vor der Färbung wurden die Schnitte in 0,1 M Phosphatpuffer überführt und über Nacht gewaschen. Daraufhin folgte die Blockierung unspezifischer Bindungen durch zweistündige Inkubation im entsprechenden Serum (abhängig vom Donor des primären Antikörpers) und die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht bei 4°C. Alle sekundären Antikörper wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte mit 1,3-diethyl-8-phenylxanthin versetzt, auf Objektträger positioniert und mit Deckgläschen abgedeckt. Es wurden folgende primäre Antikörper in den entsprechenden Konzentrationen verwendet: monoclonal mouse anti-GFAP (1:200; Chemicon), polyclonal chicken anti-A $\beta$  (1:500; abcam), DAPI (1:10000; MoBiTec). Die primären Antikörper wurden in 0,1 M Phosphatpuffer mit 0,5% Triton X-100 und 3% donkey Normalserum (Sigma, Deisenhofen, Germany) gelöst. Es wurden folgende sekundäre Antikörper in den entsprechenden Konzentrationen verwendet: donkey anti-mouse Cy3 (1:500; Dianova), donkey anti-chicken Cy2 (1:100; Dianova). Die sekundären Antikörper wurden in 0,1 M Phosphatpuffer gelöst.

### **2.5.1 Quantitative Immunocytochemie an Einzelzellen**

Die Stimulation der hippokampalen primären Neurone (DIV21) erfolgte in einem Stimulationspuffer (20 mM Na-HEPES, pH 7.4, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Glucose) bei 37°C. Nach 10 min Äquilibrierungszeit, wurden 500 nM oligomeres A $\beta$  (1-42) für 30 min appliziert. Zur Blockierung des NMDA(NR2B) Rezeptors wurde der Antagonist Ifenprodil (10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) koappliziert. NMDA wurde für 3 min in einer Konzentration von 5  $\mu$ M appliziert. Daraufhin wurden die Zellen in 100% Methanol für 20 min bei -20°C fixiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Zellen erst für 30 min in PBS und dann in einer Blockierungslösung (10% Pferdeserum, 5% Saccharose, 2% BSA und 0,3% Triton X-100 in 10 mM PBS) für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper (Jacob B150, (Dieterich et al., 2008)) wurde 1:100 in der Blockierungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach den Waschschritten (3x 10 min PBS mit 0,3% Triton X-100) wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper Alexa-488 (goat-anti-rabbit antibody 1:1000 in der Blockierungslösung) für 2 h bei RT inkubiert. Desweiteren wurden folgende Antikörper benutzt: Anti-Synaptophysin rabbit polyclonal antibody (SySy, Göttingen, Deutschland; IF 1:800); Anti-rabbit IgG-HRP-linked antibody (NEB, Frankfurt am Main; 1:5000), anti-mouse IgG-HRP-linked antibody (DAKO, Glostrup, Dänemark; 1:5000), IF anti-mouse und anti-rabbit Alexa Fluor

488 and Alexa Fluor 568 (Molecular Probes Europe BV Leiden, Niederlande; 1:1000). Nach gründlichem Waschen in PBS erfolgte die Eindeckung der Deckgläschen in Vectashield für DAPI Fluoreszenz. Die Objekte wurden mit dem konfokalen Mikroskop (LSM 5 Pascal, Zeiss, Jena), ausgestattet mit einem 40× Plan Neofluar 0.75 Objektiv, einem Argon Laser (emittiert bei 488 nm) und einem Helium/Neon Laser (emittiert bei 543 nm) analysiert. Für die Bildaufnahme wurde die interne LSM Software verwendet.

## 2.6 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Für die Quantifizierung der nukleären Translokation von Jacob wurden die Farbstoffe Alexa 488 (Jacob), Cy5 (DAPI) und für die Synapsenquantifizierung Alexa 488 (MAP 2) und Alexa 568 (Synaptophysin) sequenziell gescannt. Entlang der Z-Achse wurden vier optische Ebenen mit einer Fokustiefe von 0,3 bis 0,7  $\mu\text{m}$  aufgenommen.

Die Image J Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) diente der semiautomatischen Auswertung. Anhand der DAPI Färbung wurde die Region des Kerns und das Jacob Signal im Nucleus als durchschnittlicher Grauwert ermittelt (dargestellt in Pixelintensität). Die Zählung der Synapsen erfolgte ebenfalls semiautomatisch mit der Image J Software. Es wurde die Länge der Dendriten gemessen und die Synapsen als Synapsendichte (Synapsenzahl/Dendritenlänge) dargestellt.

## 2.7 *In vivo* Infusion von A $\beta$

10 Wochen alte, männliche Ratten (*Rattus norvegicus*, Stamm Wistar UNILEVER: HsdCpd:WU) wurden mit einem 1:1 Gemisch aus Distickstoffmonoxid und Sauerstoff (2–3% Halothan (Sigma, Deisenhofen)) anästhesiert. Dann wurden die Tiere mit ihren Köpfen in ein stereotaktisches Gestell eingespannt, das Schädelfell entfernt und ein Loch (Durchmesser 1 mm) in den Schädel gebohrt (Koordinaten: posterior, 0.9 mm von Bregma; lateral, 1.7 mm zur *Satura sagittalis*). Nachfolgend wurde eine Kanüle 4,5 mm in den Schädel geschoben und 3  $\mu\text{l}$  A $\beta$  (25-35) ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) bzw. A $\beta$  (1-42) Oligomere ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) intracerebroventrikulär injiziert. Nach 5 min wurde die Kanüle vorsichtig aus dem Gehirn gezogen. Alle Koordinaten wurden mit dem Atlas des Rattenhirns von Paxinos und Watson ermittelt. Nach drei Tagen wurden hippokampale Akutschnitte präpariert und der MTT-Umsatz gemessen, bzw. A $\beta$  immunhistochemisch gefärbt.

## 2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Zur Analyse der A $\beta$  (1-42) Oligomere wurde die Präparationslösung mit SDS haltigem Ladebuffer versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 20 % BisTris Gel bei 150 V. Als Molmassenstandard wurde eine vorgefärbte Proteinmischung von Invitrogen (SeeBlue®) verwendet. Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore, Schwalbach) übertragen. Zuvor wurde diese 3 s in Methanol eingeweicht und mit Wasser abgespült. Der Transfer des Gels erfolgte für 1,5 h in einem diskontinuierlichem Blotsystem bei 80 mA. Die Membran wurde dann über Nacht in Rotiblock inkubiert und mit dem Primärantikörper mouse Anti-A $\beta$  82E1 (Mobictec) für 2 h gefärbt. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran mehrmals mit Puffer (Tris-Tween Buffered Saline) gewaschen. Der Nachweis spezifisch gebundener Antikörper erfolgte durch Inkubation mit einem polyklonalen donkey anti-mouse IgG Sekundärantikörper, gebunden an Biotin. Durch anschließende Inkubation in alkalischem Puffer sowie Nitro-blau-tetrazolium-chlorid (NBT, Roche, Mannheim) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP, Roche, Mannheim) kam es zu einer Farbreaktion, die in der Ausbildung eines violett-blauen Farbstoffkomplexes sichtbar wurde.

## 2.9 Messung der neuronalen Netzwerkaktivität *in vitro*

Die Messung der synchronen neuronalen Aktivität wurde durch die Messung der relativen intrazellulären Kalziumkonzentration ermöglicht. Hierzu wurden drei Wochen alte neuronale Zellkulturen verwendet. In diesem Kultursystem wurde durch Applikation von Arabinose C die Proliferation der Astrozyten unterdrückt, so dass diese Kultur eine hohe Zelldichte an Neuronen aufwies. Eine hohe Neuronendichte unterstützt die Ausprägung spontaner Netzwerkaktivität. Die relative Konzentration intrazellulärer Kalziumionen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM gemessen. Hierzu wurde mit Dipl.-Biologin Sabine Rönicke (Institut für Neurobiochemie, Magdeburg) kooperiert.

Die Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie erlaubt im Gegensatz zu den statischen Momentaufnahmen fixierter Präparate, dynamische Prozesse in intakten Zellen zeitabhängig zu betrachten. Die Messung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioscope microscope) verbunden mit einem Imaging-System von TILL Photonics. Ein kontinuierliches Perfusionssystem sorgte alle 30 Sekunden für einen kompletten Austausch des Mediums (37°C) über den Zellen (Fluss: 0,8 ml/min). Der Experimentierpuffer HBSS (Hank's ba-

lanced salt solution) wurde im zuleitenden Schlauch auf 37°C erwärmt. Während der Experimente wurde über den Zellen eine Temperatur von 36°C aufrechterhalten. Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit Hilfe des Programms TILLvisION und anschließend mit Microsoft Excel und SigmaPlot. Die Konzentration freier Kalziumionen wurde, wie zuvor beschrieben (Hein et al., 2008), intrazellulär mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 AM ermittelt. Das Exzitationsspektrum dieses Kalziumchelators ist von der Bindung freier Kalziumionen abhängig. Das Maximum des Exzitationsspektrums der kalziumgebundenen Form liegt bei 340 nm, der kalziumfreien Form bei 380 nm. Die Anregung von Fura-2 AM bei einer Wellenlänge von 360 nm ist kalziumunabhängig (Isosbesischer Punkt). Die maximale Emission wurde bei 510 nm detektiert.

Die Beladung der Zellen mit Fura-2 AM (2 µM, 0,02% Pluronic) erfolgte für 30 min in HBSS bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Nach einer Nachinkubationszeit in HBSS von 10 min wurde mit der Kalziummessung begonnen. Die Intensität der Emission von 520 nm wurde nach Anregung mit 340 und 380 nm aufgenommen. Für die Analyse von  $[Ca^{2+}]_i$  wurde der Quotient R (F340nm/F380nm) berechnet und mit dem Faktor 1000 multipliziert. Für die Auswertung wurde der intrazelluläre Bereich der Zellen markiert (region of interest; ROI). Jedes Experiment dauerte 19 min, wobei innerhalb dieser Zeit 380 Messungen erfolgten. Innerhalb einer Messung wurde der Farbstoff Fura-2 dreimal (340 nm, 360 nm und 380 nm) für je 10 ms angeregt. Die Fluoreszenzintensitäten der Emission von Fura-2 wurden getrennt nach den drei Anregungswellenlängen aufgezeichnet. Der Quotient R (F340nm/ F380nm) wurde berechnet, womit die relative Konzentration des zytoplasmatischen Kalziums ermittelt werden konnte. Bei der Messung einer Zellkultur wurden alle erkennbaren Neurone im Bildausschnitt des Mikroskops (zwischen 5 und 15 Zellen) gemessen. Wenn bei der Mehrheit der beobachteten Neurone ein gleichzeitiger intrazellulärer Kalziumanstieg auf mindestens die doppelte Konzentration des Ruhezustands auftrat, wurde dies als spontane Netzwerkaktivität gewertet.

### **2.10 Statistik**

Die LTP Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) und alle übrigen Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Unterschiede zwischen Stichproben wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5 % betrug ( $P < 0,05$ ). Zur Ermittlung der Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden für die LTP Daten die ANOVA mit Messwertwiederholung und für die

übrigen Daten *Mann-Whitney U-Test* zur Bewertung von Unterschieden zwischen zwei Stichproben angewendet. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe von SPSS 3.0.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 LTP Störung durch A $\beta$

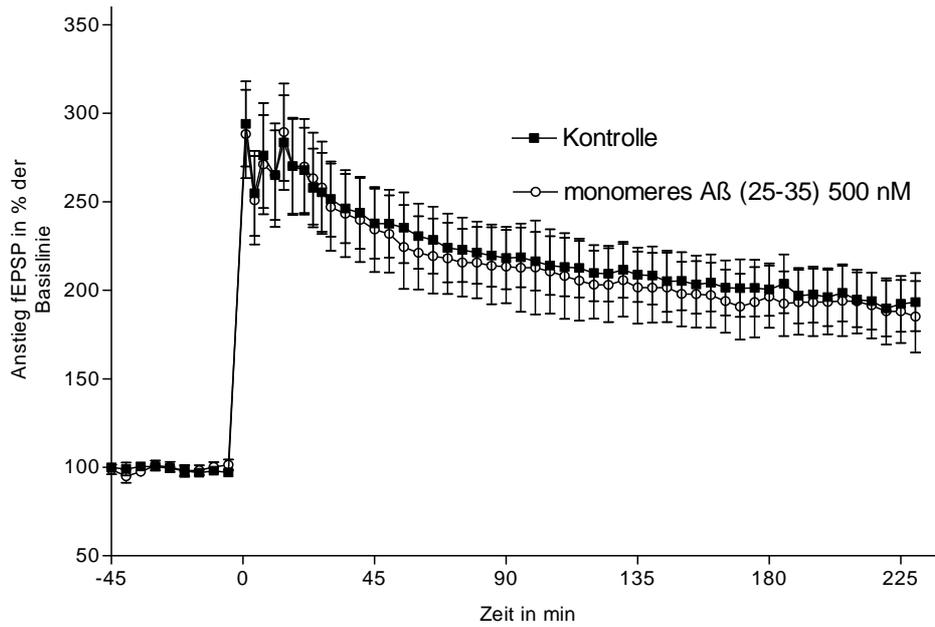
Mehrere Arbeiten zeigten bereits eine starke Reduzierung der LTP durch Applikation verschiedener A $\beta$  Spezies unterschiedlicher Aggregationsniveaus (Walsh et al., 2005; Puzzo und Arancio 2006; Gengler et al., 2007). Somit sollte zunächst anhand der Literaturangaben ein zuverlässiges Protokoll zur A $\beta$  vermittelten Schädigung der LTP reproduziert und etabliert werden, um anschließend zelluläre Mechanismen untersuchen zu können.

##### 3.1.1 Die Beeinflussung der LTP ist abhängig vom Aggregationszustand des A $\beta$

Eine experimentell einfach handhabbare und häufig verwendete A $\beta$  Spezies ist A $\beta$  (25-35), welche als so genannte toxische Domäne innerhalb des vollständigen Peptids A $\beta$  (1-40/42) identifiziert wurde (Mattson et al., 1992). Neben der neurotoxischen Wirkung dieses A $\beta$  Fragments konnte durch Applikation *in vitro*, sowie Injektion *in vivo* ein starker inhibierender Effekt auf die LTP nachgewiesen werden (Freir et al., 2001).

Zur Untersuchung der Wirkung des A $\beta$  (25-35) auf die LTP in hippocampalen Akutschnitten der Ratte wurde frisch aufgelöstes Peptidfragment in einer Konzentration von 500 nM appliziert. Es konnte keine A $\beta$  (25-35) vermittelte Störung der LTP beobachtet werden (Abbildung 9). Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Peptids ließ keine Proteinaggregate erkennen (Abbildung 10). Somit kann davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Badapplikation vornehmlich monomeres A $\beta$  (25-35) vorlag.

Um die Peptidspezies als Ursache für den fehlenden Effekt auf die LTP auszuschließen, wurde frisch gelöstes A $\beta$  (1-40) einer Konzentration von 500 nM untersucht. Es konnte keine hemmende Wirkung auf die LTP beobachtet werden (Abbildung 11). Die elektronenmikroskopische Untersuchung von A $\beta$  (1-40) belegte das Fehlen von Peptidaggregaten zum Zeitpunkt der Applikation und lässt daher die Annahme des vornehmlich monomeren Zustands des Peptids zu (Abbildung 12).



|                    |  |   |                                 |
|--------------------|--|---|---------------------------------|
| Schnittpräparation | Applikation von Aβ und/oder der Substanzen | Transfer der Schnitte in die Meßkammer und Messung der I/O Kurve sowie Basislinie | LTP Induktion und Registrierung |
| 0 h                |  | 2 h   | 4,5 h                           |

Abbildung 9: Monomeres Aβ (25-35) hat keinen Einfluss auf die LTP.

A) Aβ (25-35) wurde in einer Konzentration von 500 nM appliziert. Die LTP war im Vergleich zur Kontrollpotenzierung nicht gestört (monomeres Aβ (25-35): n= 13; Kontrolle: n=15; n.s. ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0. Das untere Schema demonstriert den Zeitverlauf aller LTP-Experimente. Es ist wichtig zu betonen, dass Aβ und die Substanzen nur während der Vorinkubation der Schnitte (siehe Methoden Abschnitt 2.1.1) präsent waren.

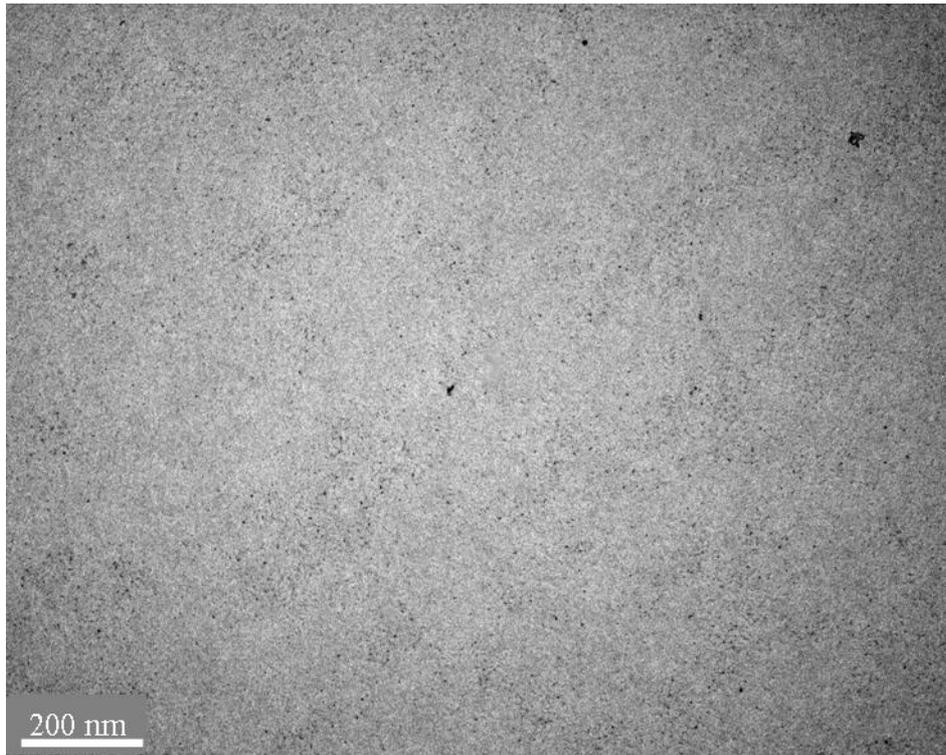


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Analyse von frisch gelöstem A $\beta$  (25-35)

Da keine Peptidaggregate zu erkennen waren, konnte vom vornehmlich monomeren Zustand des A $\beta$  zum Zeitpunkt der Analyse ausgegangen werden.

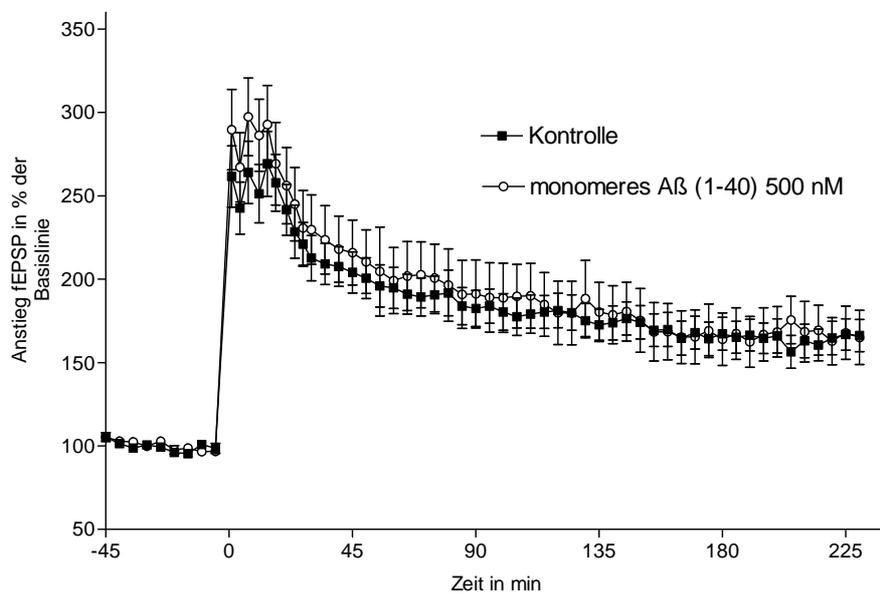


Abbildung 11: Monomeres A $\beta$  (1-40) hat keinen Einfluss auf die LTP.

A $\beta$  (1-40) wurde in einer Konzentration von 500 nM appliziert. Die LTP war im Vergleich zur Kontrollpotenzierung nicht gestört (monomeres A $\beta$  (1-40): n= 10; Kontrolle: n=11; n.s. ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

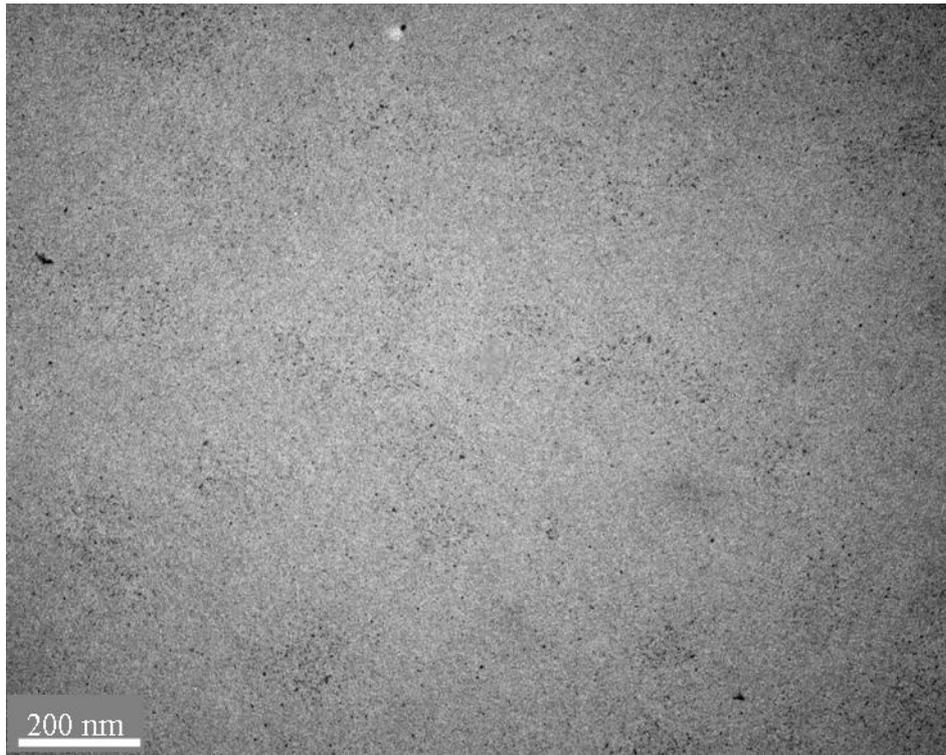


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Analyse von frisch aufgelöstem A $\beta$  (1-40)

Da keine Peptidaggregate zu erkennen waren, konnte vom vornehmlich monomeren Zustand des A $\beta$  zum Zeitpunkt der Analyse ausgegangen werden.

Daraufhin wurde der Effekt von aggregiertem A $\beta$  auf die LTP untersucht, da gezeigt werden konnte, dass Aggregate dieses Peptids eine erhöhte Toxizität auf primäre Neurone und eine ausgeprägte LTP Störung induzieren (Puzzo und Arancio 2006). Hierzu wurde A $\beta$  (1-40) für mehrere Tage inkubiert, wodurch fibrilläre A $\beta$ -Aggregate entstanden, die im elektronenmikroskopischen Bild als nadelförmige Strukturen erkennbar waren (Abbildung 13). Aufgrund der Molekülgröße wurde die Konzentration des applizierten A $\beta$  (1-40) auf  $1\mu\text{M}_{(\text{Monomer})}$  erhöht. Es konnte keine Störung der LTP durch fibrilläres A $\beta$  (1-40) beobachtet werden (Abbildung 14).

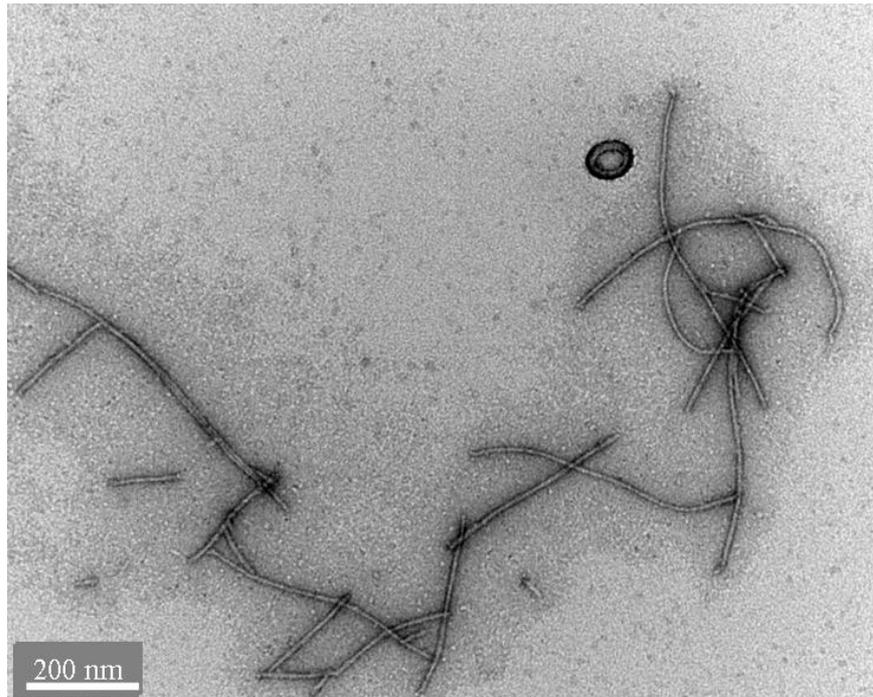


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Analyse von fibrillärem A $\beta$  (1-40).

Das Peptid wurde in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  für mehrere Tage bei in PBS bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Es sind große, nadelförmige Strukturen zu erkennen, die auf eine Aggregation des A $\beta$  zu Peptidfibrillen schließen lassen.

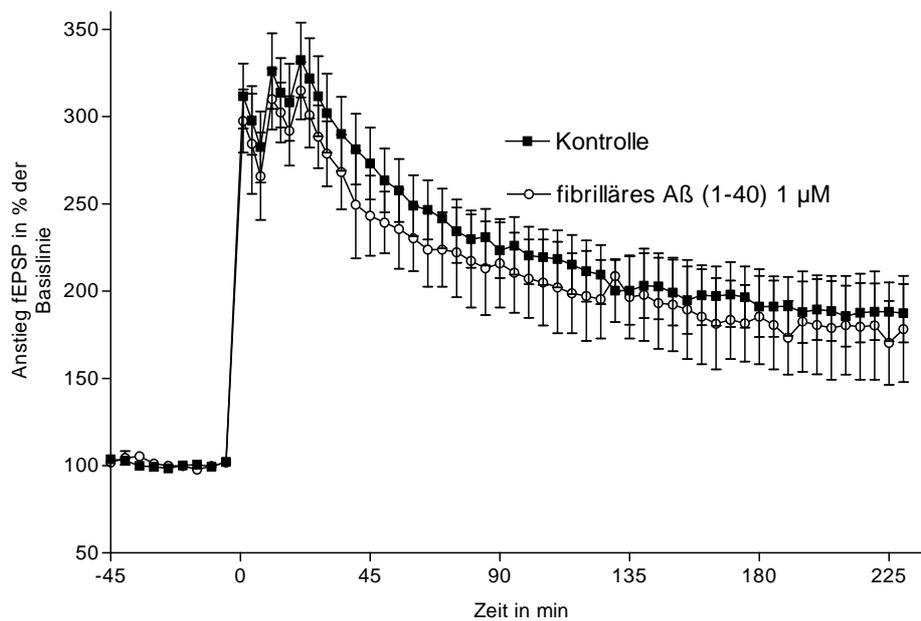


Abbildung 14: Fibrilläres A $\beta$  (1-40) hat keinen Einfluss auf die LTP.

Fibrilläres A $\beta$  (1-40) wurde in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  appliziert. Die LTP war im Vergleich zur Kontrollpotenzierung nicht gestört (fibrilläres A $\beta$  (1-40):  $n=12$ ; Kontrolle:  $n=15$ ; n.s. ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

Eine besondere Rolle in der Alzheimerpathologie nehmen A $\beta$ -Oligomere ein (Klein, 2002; Walsh et al., 2005), welche sich aus wenigen Monomeren des Peptids zusammensetzen, sphärische Strukturen bilden und durch spezielle Aggregationsprotokolle *in vitro* generiert werden können. Um ihre Wirkung auf die LTP zu untersuchen, wurden zunächst Oligomere von A $\beta$  (1-40) generiert. Ihre elektronenmikroskopische Untersuchung ließ ein heterogenes Gemisch sphärischer Strukturen erkennen (Abbildung 15). Die Molekülgröße dieser Aggregate konnte nicht ermittelt werden, da sich A $\beta$  (1-40) Oligomere nicht als SDS stabil erwiesen und somit nicht mit Hilfe der SDS PAGE analysiert werden konnten. Die Applikation der A $\beta$  (1-40) Oligomere in einer Konzentration von 500 nM bewirkte eine signifikante Verminderung der LTP im Vergleich zur Kontrollpotenzierung (Abbildung 16: oligomeres A $\beta$  (1-40):  $250,4 \pm 12,9$  %; Kontrolle:  $306,0 \pm 14,1$  %, 1 min nach Tetanusapplikation; oligomeres A $\beta$  (1-40):  $127,0 \pm 7,3$  %; Kontrolle:  $161,6 \pm 9,9$  %, 220 min nach Tetanusapplikation).

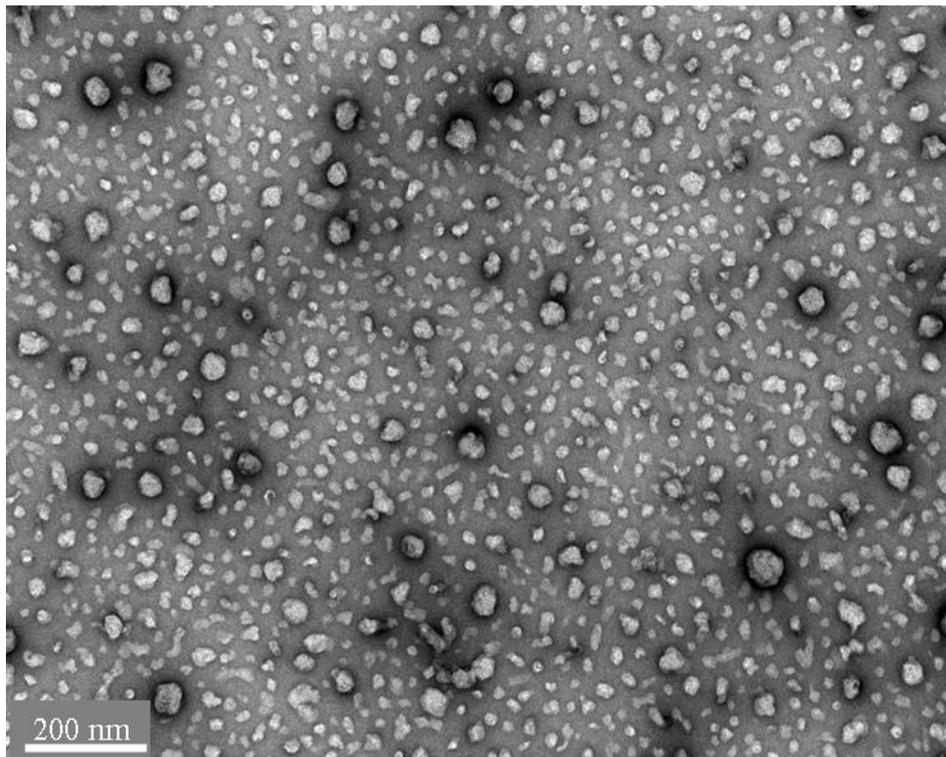


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Analyse von oligomerem A $\beta$  (1-40).

Das Peptid wurde in einer Konzentration von  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in HFIP bei Raumtemperatur gelöst, dann mit bidestilliertem Wasser 1:9 verdünnt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es sind sphärische Strukturen zu erkennen, die auf eine Aggregation des A $\beta$  zu Peptidoligomeren schließen lassen.

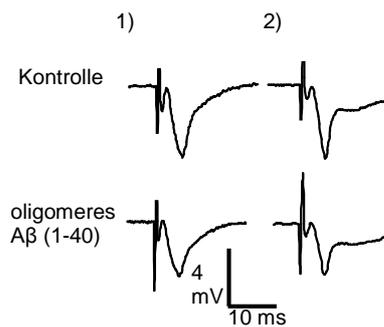
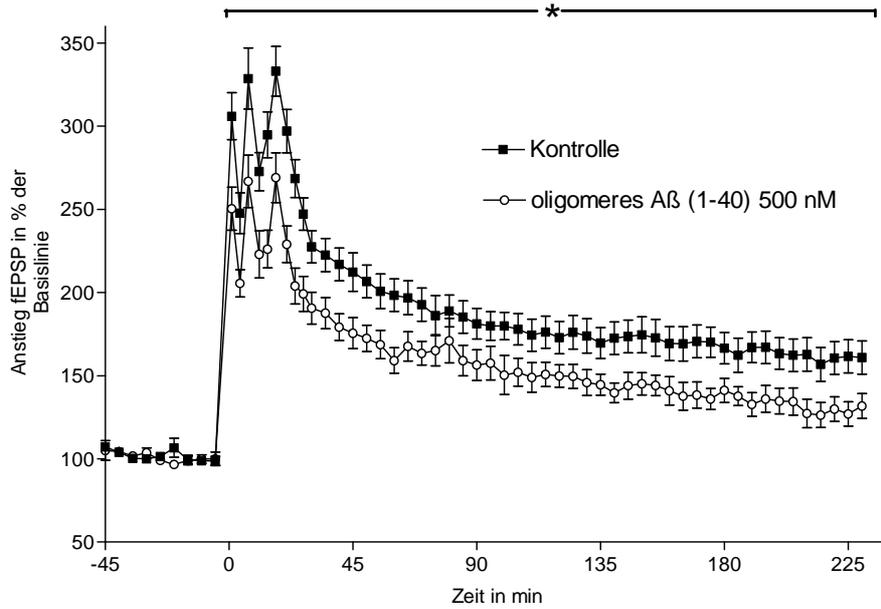


Abbildung 16: Oligomeres Aβ (1-40) stört die LTP.

Oligomeres Aβ (1-40) wurde in einer Konzentration von 500 nM appliziert. Aβ (1-40) Oligomer behandelte Akutschnitte wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte LTP auf (Aβ: n=8; Kontrolle: n=10; \*  $P \leq 0,05$ ; ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0. Analoge Signalspuren zeigen repräsentative fEPSP 1 min vor Tetanusapplikation (1) und 235 min nach Induktion der LTP (2).

Das Ergebnis der hohen LTP störenden Potenz von Oligomeren sollte nun anhand einer anderen A $\beta$  Spezies bestätigt werden. Dazu wurde A $\beta$  (1-42) oligomerisiert und in einer Konzentration von 500 nM appliziert. A $\beta$  (1-42) Oligomere konnten ebenfalls die LTP im Vergleich zu Kontrollpotenzierung signifikant reduzieren (Abbildung 17: oligomeres A $\beta$  (1-42):  $237,1 \pm 11,2$  %; Kontrolle:  $274,3 \pm 19,7$  %, 1 min nach Tetanusapplikation; oligomeres A $\beta$  (1-42):  $124,0 \pm 7,8$  %; Kontrolle:  $171,0 \pm 16,8$  %, 220 min nach Tetanusapplikation).

Im elektronenmikroskopischen Bild zeigten sich diese Oligomere ebenfalls in sphärischen Formen heterogener Größe (Abbildung 18 a). Da diese Aggregate SDS-stabil sind, war eine relative Molekülgrößenbestimmung mit der SDS-PAGE möglich, welche ein Gemisch aus Oligomeren zwischen 4,6 und 50 kDa offenbarte (Abbildung 18 b). Da die SDS PAGE unter nicht denaturierenden und monomerisierenden Bedingungen durchgeführt werden musste, um die Oligomerstrukturen zu erhalten, konnte nur eine ungefähre Ableitung der Molekülgröße erfolgen. Anhand theoretischer Erwägungen und der Beschreibungen anderer Gruppen (Klein 2002), setzen sich die Oligomere aus zwei bis 12 A $\beta$  (1-42) Monomeren zusammen.

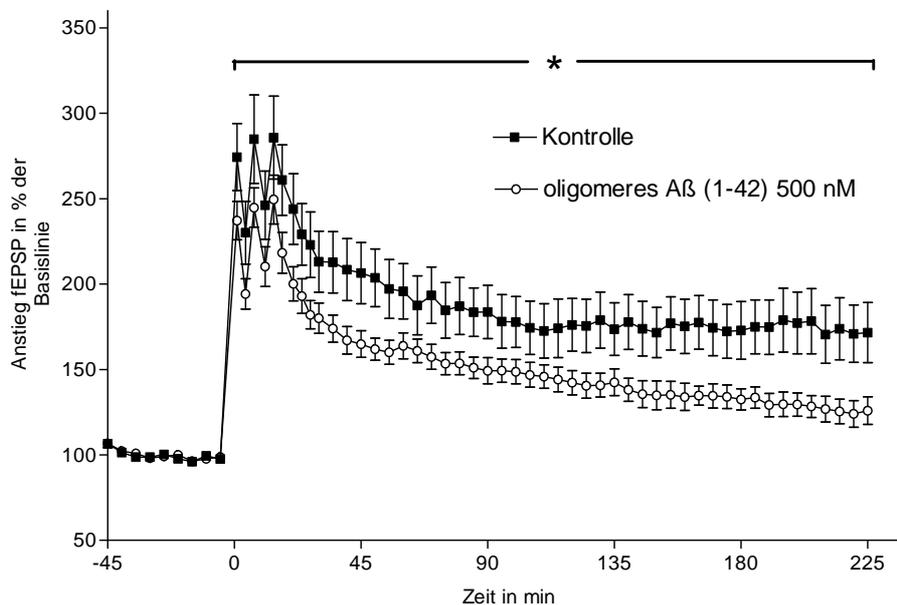


Abbildung 17: Oligomeres A $\beta$  (1-42) stört die LTP.

Oligomeres A $\beta$  (1-42) wurde in einer Konzentration von 500 nM appliziert. A $\beta$  (1-42) Oligomer behandelte Akutschnitte wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte LTP auf (oligomeres A $\beta$  (1-42):  $n=10$ ; Kontrolle:  $n=7$ ; \*  $P \leq 0,05$ ; ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

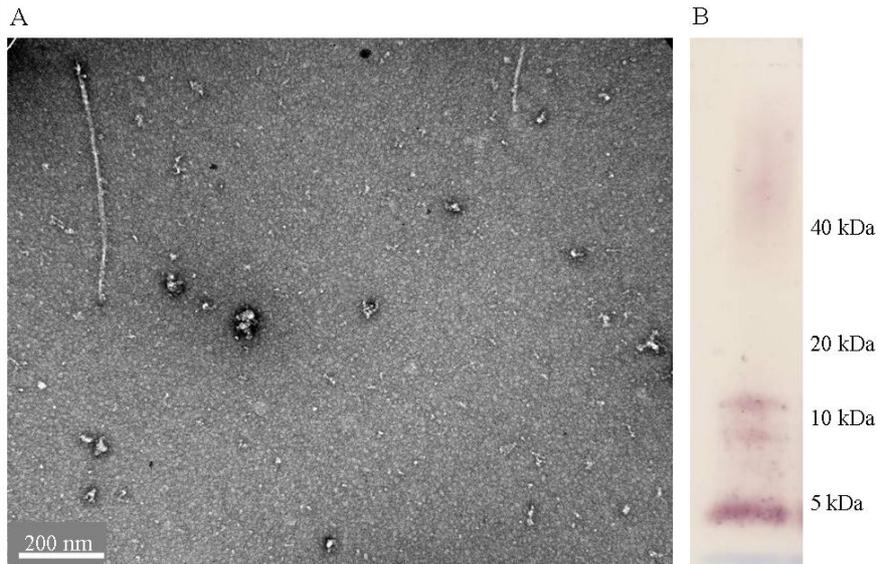


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische und SDS Analyse von oligomerem A $\beta$  (1-42).

A) Das Peptid wurde in einer Konzentration von  $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  in DMSO gelöst und bei 24h bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Es sind sphärische Strukturen von einer Größe zwischen 5 und 20 nm zu erkennen, die auf eine Aggregation des A $\beta$  zu Peptidoligomeren schließen lassen. B) Die SDS PAGE der A $\beta$  (1-42) Oligomerpräparation deutet auf das Vorhandensein von Monomeren (4,6 kDa) Dimeren (etwa 9 kDa), Trimeren (etwa 12kDa) und Dodekameren (etwa 40 kDa) hin.

Zur Überprüfung, ob die LTP Störung auf der spezifischen Wirkung der A $\beta$ -Oligomere beruht, folgte eine Koapplikation des A $\beta$ -Antikörpers Chicken anti-A $\beta$  ( $5 \mu\text{g}$ ). Zur Gewährleistung der vollständigen Bindung des Antikörpers an sein Epitop, wurde er bereits zum Zeitpunkt der Oligomerpräparation zugegeben. Die Koapplikation des Antikörpers verhinderte die A $\beta$ -vermittelte Verminderung der fEPSP Potentierung, was auf einen spezifischen A $\beta$  Effekt auf die LTP schließen lässt (Abbildung 19: oligomeres A $\beta$  (1-42):  $175,6 \pm 10,7 \%$ ; Kontrolle:  $200,2 \pm 11,4 \%$ ; oligomeres A $\beta$  (1-42)/Antikörper:  $202,8 \pm 8,4 \%$ , 1 min nach Tetanusapplikation; oligomeres A $\beta$  (1-42):  $128,8 \pm 8,0 \%$ ; Kontrolle:  $153,8 \pm 6,7 \%$ ; oligomeres A $\beta$  (1-42)/Antikörper:  $147,4 \pm 7,5 \%$ , 220 min nach Tetanusapplikation).

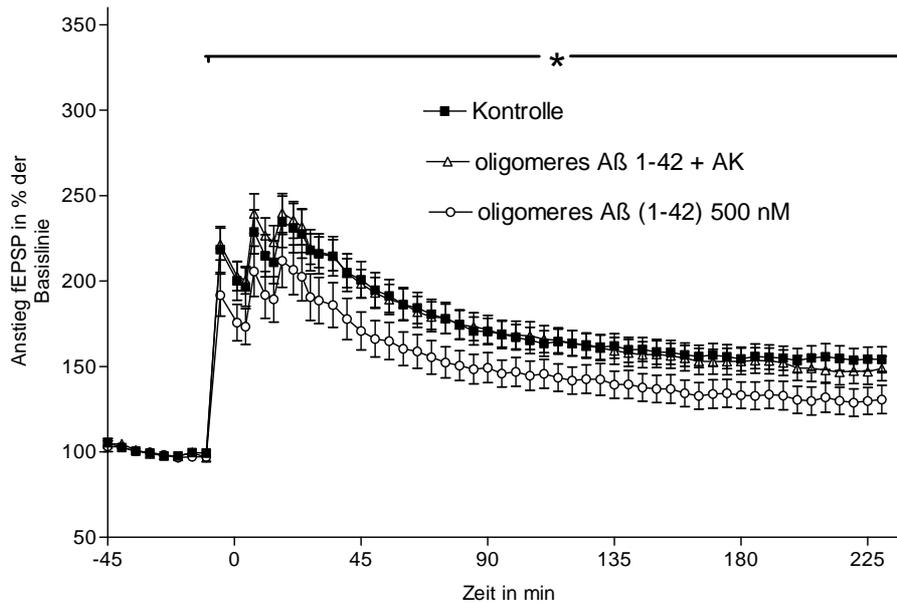


Abbildung 19: Einfluss eines A $\beta$  Antikörpers auf die durch oligomeres A $\beta$  geschädigte LTP.

Die Applikation des Antikörpers (5 $\mu$ g) hob den LTP störenden Effekt von 500 nM oligomeres A $\beta$  (1-42) auf (oligomeres A $\beta$  (1-42): n= 18; Kontrolle: n=22; A $\beta$  (1-42)/Antikörper: n= 15; A $\beta$  (1-42) vs. A $\beta$  (1-42)/Antikörper: \* P $\leq$  0,05; ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

Viele Publikationen weisen auf eine fast vollständige Inhibition der LTP durch A $\beta$  Oligomere hin. Dieser sehr ausgeprägte A $\beta$  Effekt konnte in den Experimenten dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Als mögliche Ursache dafür kann das Alter der Versuchstiere herangezogen werden. Eine Abhängigkeit der Stärke der A $\beta$ -induzierten LTP Störung wurde von (Minogue et al., 2007) in Ratten gezeigt. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden 17 Monate alte Mäuse für die LTP Testung verwendet. Bei der Messung der Input/Output-Kurve zeigten diese Tiere im Vergleich zu den jüngeren Mäusen eine signifikant verminderte Signalgröße (Abbildung 20: maximaler Anstieg fEPSP bei einer Reizstärke von 3,5 V: 4 Monate alte Mäuse: 4,9 $\pm$ 0,5 mV/ms; 17 Monate alte Mäuse: 3,4 $\pm$ 0,5 mV/ms). Überraschenderweise konnte bei der nachfolgenden Potenzierung nur eine tendenzielle Beeinträchtigung der LTP drei Stunden nach Tetanusapplikation beobachtet werden (Abbildung 21).

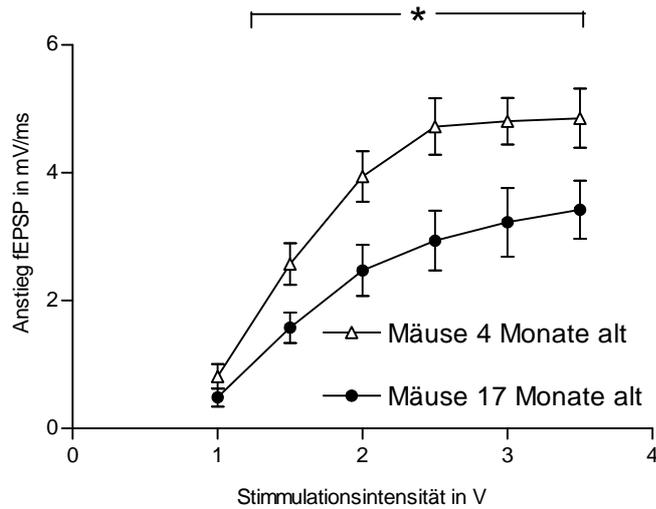


Abbildung 20: 17 Monate alte Mäuse weisen eine verminderte Signalgröße im Vergleich zu 4 Monate alten Tieren auf.

Es wurde der Anstieg des EPSP bei steigender Reizstärke gemessen. (4 Monate alte Mäuse: n=12, 17 Monate alte Mäuse: n=12; \*  $P \leq 0,05$ ; ANOVA mit Messwertwiederholung).

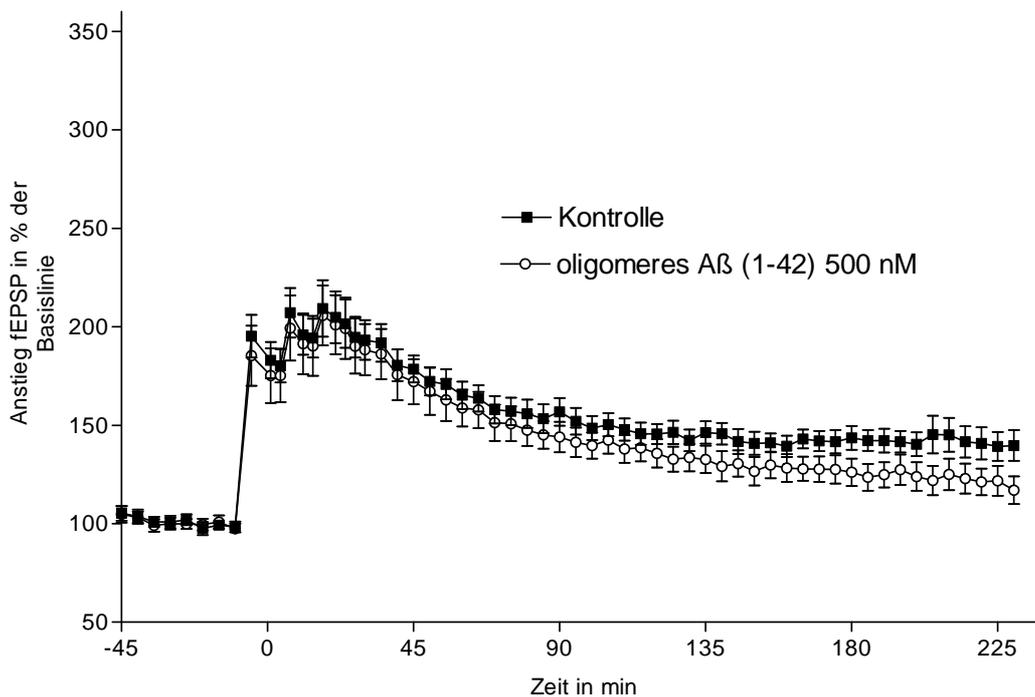


Abbildung 21: Oligomeres Aβ stört die LTP in 17 Monate alten Mäusen nicht.

Oligomeres Aβ (1-42) wurde in einer Konzentration von 500 nM appliziert. Die LTP war im Vergleich zur Kontrollpotenzierung nicht gestört (oligomeres Aβ (1-42): n=12; Kontrolle: n=12; n.s. ANOVA mit Messwertwiederholung). Drei Stunden nach Tetanusapplikation wurde eine tendenzielle, nicht signifikante Verminderung der Potenzierung unter Einfluss von Aβ (1-42) beobachtet. Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

Nun sollte überprüft werden, ob die Art des applizierten Tetanus den A $\beta$ -LTP-Effekt beeinflussen könnte, denn verschiedene Tetani können unterschiedliche Ionenkanäle aktivieren und somit verschiedene LTP-Formen induzieren. Dazu wurden wieder 4 Monate alte Mäuse verwendet. Statt des 100 Hz Tetanus (100 Pulse (Pulsabstand 10 ms) doppelter Pulsbreite (0,1 ms pro Halbwelle)) wurde der, auf der Thetafrequenz beruhende, Thetaburst (10 Pulsgruppen (Pulsgruppenabstand 200 ms) mit je vier Pulsen (Pulsabstand 10 ms) doppelter Pulsbreite (0,1 ms pro Halbwelle)) appliziert. Die durch den Thetaburst ausgelöste LTP wurde von oligomerem A $\beta$  nicht beeinflusst (Abbildung 22).

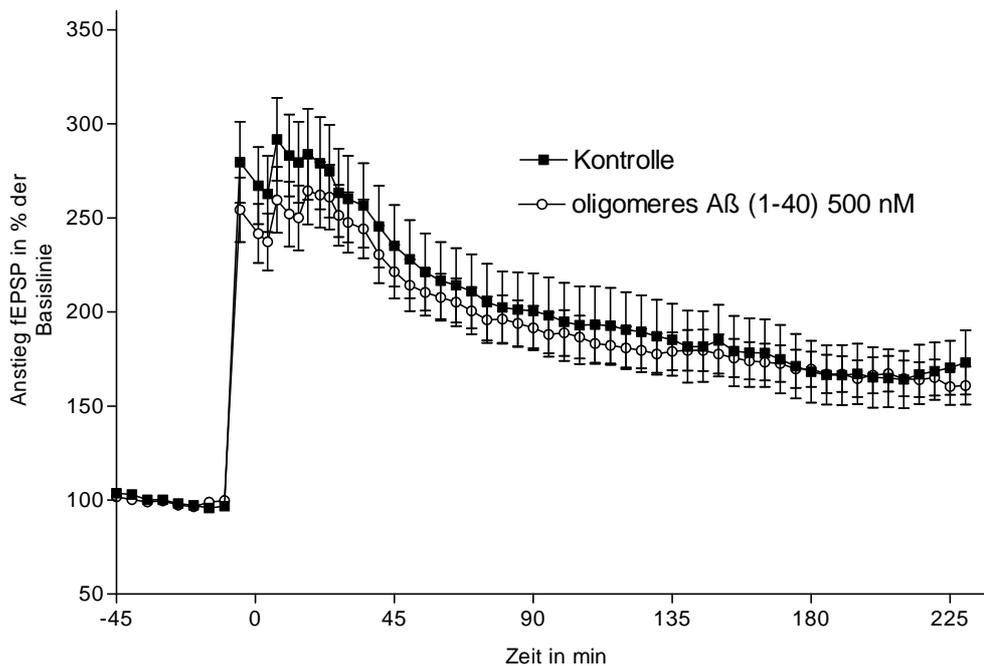


Abbildung 22: Oligomeres A $\beta$  stört die durch einen Thetaburst induzierte LTP nicht.

Oligomeres A $\beta$  (1-40) wurde in einer Konzentration von 500 nM appliziert. Die LTP war im Vergleich zur Kontrollpotenzierung nicht gestört. (oligomeres A $\beta$  (1-40): n=14; Kontrolle: n=17; n.s. ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

### **3.2 Korrelation zwischen A $\beta$ Oligomer vermittelter LTP Störung und A $\beta$ -Zytotoxizität**

Neben dem physiologischen Effekt der A $\beta$  Oligomere, der sich, wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, als eine Störung der LTP ausprägt, wurde bereits von vielen Arbeitsgruppen eine zytotoxische Wirkung von A $\beta$  beschrieben (Lambert et al., 1998; Shen et al., 2006). Inwieweit die LTP Störung mit einer Zytotoxizität korreliert oder dieser vorausgeht, sollte im Folgenden untersucht werden.

Eine häufig verwendete Methode, um die A $\beta$ -Zytotoxizität zu untersuchen, ist der MTT-Assay (Liu et al., 2005, Liu et al., 1998; Shearman et al., 1994; Walsh et al., 2005). In Einzelzellen konnte durch Zugabe von A $\beta$  eine Inhibition des MTT Umsatzes beobachtet werden (Abe und Saito, 1998). Da dieser A $\beta$ -MTT-Effekt bereits 3 Stunden nach der A $\beta$  Applikation nachweisbar ist und keinen unmittelbaren Zelltod, sondern vielmehr eine Störung der Redoxaktivität der Zellen widerspiegelt, wird er als ein früher Aspekt der A $\beta$ -vermittelten Zytotoxizität angesehen. Wegen dieser schnellen zellulären A $\beta$ -MTT-Reaktion war dieser Assay für eine Korrelation mit der ebenfalls innerhalb von Stunden eintretenden LTP Störung geeignet.

Hippokampale Akutschnitte wurden mit 500 nM oligomerem A $\beta$  (1-40) behandelt und die LTP gemessen. Die Applikation von A $\beta$  (1-40) Oligomeren bewirkte eine signifikante Störung der LTP (Abbildung 23 A: oligomeres A $\beta$  (1-40):  $264,8 \pm 18,8$  %; Kontrolle:  $294,0 \pm 24,0$  %, 1 min nach Tetanusapplikation; oligomeres A $\beta$  (1-40):  $129,7 \pm 11,1$  %; Kontrolle:  $189,7 \pm 15,8$  %, 220 min nach Tetanusapplikation). Nach der Messung der LTP wurden die Schnitte für 3 Stunden mit MTT inkubiert und die Umsatzrate ermittelt. Im Vergleich zur Kontrolle war die Redoxaktivität der mit A $\beta$  behandelten Schnitte nicht gestört (Abbildung 23 B).

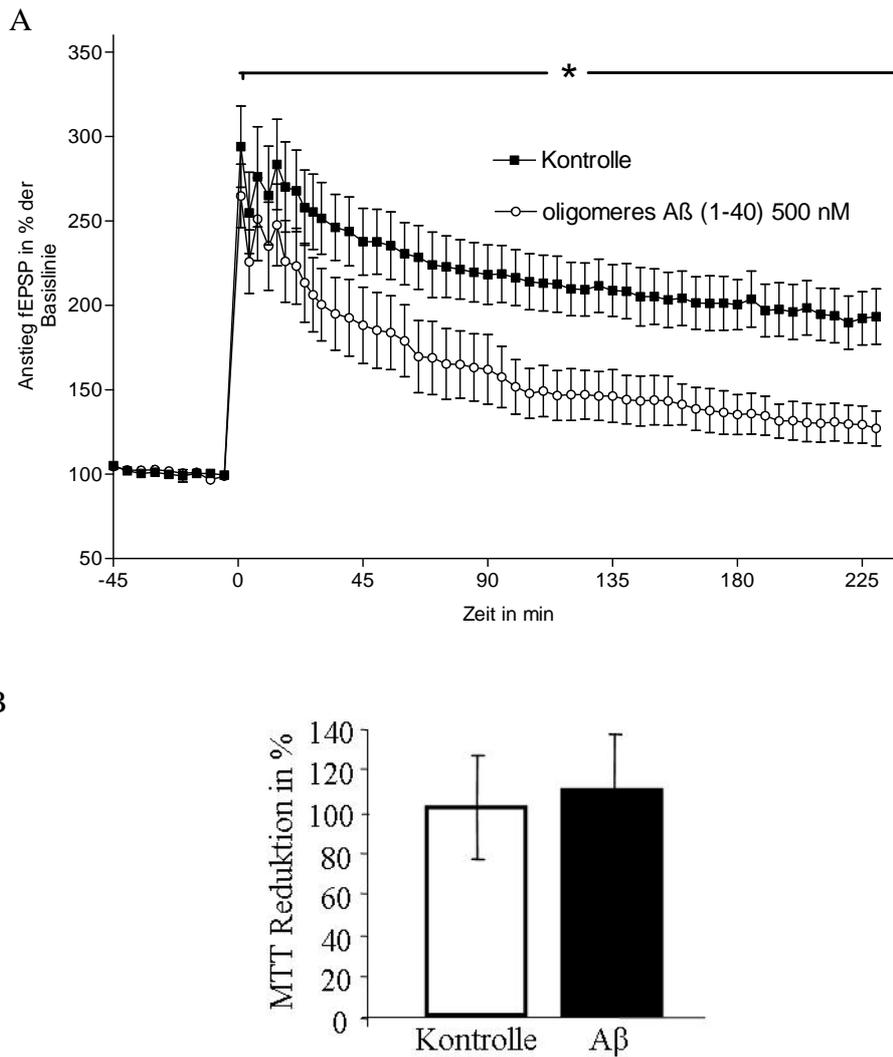


Abbildung 23: Die LTP Störung durch oligomeres A $\beta$  (1-40) geht nicht mit einer Reduktion der MTT Umsatzrate des hippocampalen Akutschnitts einher.

A) A $\beta$  (1-40) Oligomer behandelte Akutschnitte wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte LTP auf (oligomeres A $\beta$  (1-40): n=8; Kontrolle: n=16; \*P < 0,05; ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0. B) Nach der LTP-Messung wurde die MTT-Umsatzrate der Schnitte gemessen. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden.

Da die Akutschritte eine maximale Messzeit von 12-14 h erlauben, ist die Inkubationszeit des A $\beta$  auf diese Zeit begrenzt. Es bestand die Möglichkeit, dass Hippokampusschnitte über einen längeren Zeitraum mit A $\beta$  behandelt werden müssen, damit der MTT Umsatz gestört wird. Darum wurde auf organotypische hippokampale Schnittkulturen (OHC) zurückgegriffen (Abbildung 24).

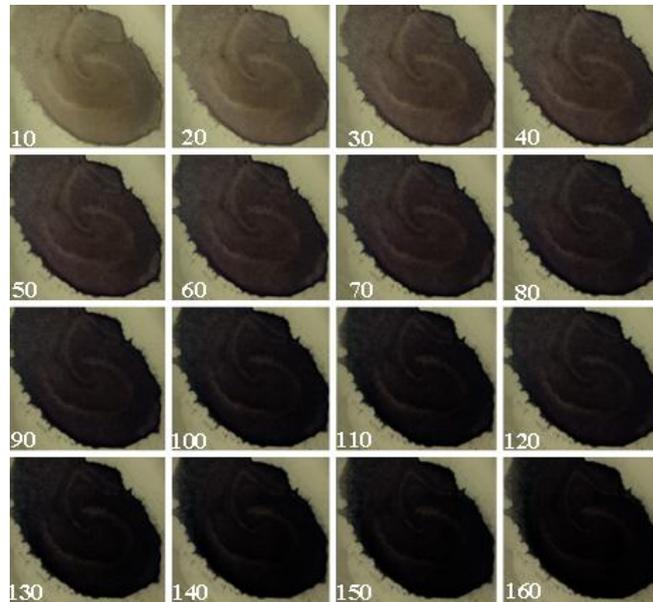


Abbildung 24: Zeitabhängiger MTT Umsatz durch einen OHC

Repräsentativer MTT Umsatz durch einen OHC. MTT wurde in der Konzentration von  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  in das Zellkulturmedium appliziert. Die violette Verfärbung zeigt die Bildung des Formazans an. In den einzelnen Bildern ist die Zeit des MTT Umsatzes in Minuten eingetragen. Innerhalb von etwa 3 Stunden ist der maximale MTT Umsatz erreicht.

Diese Kulturen wurden für 3 Tage mit  $10 \text{ }\mu\text{M}$  oligomerem A $\beta$  (1-40) oder oligomerem A $\beta$  (1-42) behandelt und die MTT Umsatzrate ermittelt. Überraschenderweise konnte keine Störung der Redoxaktivität beobachtet werden. Zum Zwecke der Kontrolle, inwieweit der MTT Assay geeignet ist, Zellschaden im OHC detektieren zu können, wurde durch Applikation von  $15 \text{ }\mu\text{M}$  Glutamat ein Zellschaden induziert, welche eine deutliche Reduktion der Formazanproduktion bewirkte (Abbildung 25: oligomeres A $\beta$  (1-40):  $103,4\% \pm 22,6\%$ ; oligomeres A $\beta$  (1-42):  $106,5\% \pm 19,3\%$ ; Kontrolle:  $100 \pm 10,6\%$ ; Glutamat ( $15 \text{ mM}$ ):  $17,4 \pm 3,5\%$ ).

Darüber hinaus konnte mit einer immunhistochemischen GFAP-Färbung eine Aktivierung von Astrozyten durch oligomeres A $\beta$  (1-42) nachgewiesen und somit eine physiologische Aktivität des A $\beta$  belegt werden (Abbildung 26).

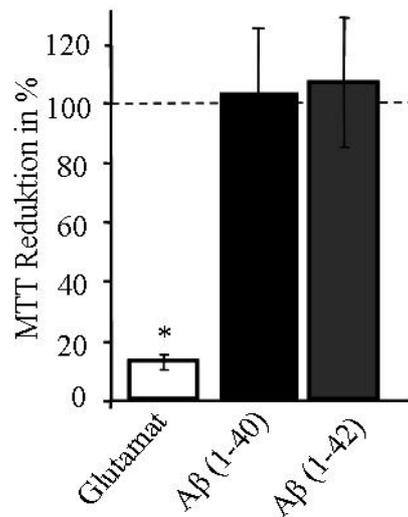


Abbildung 25: Beeinflussung des MTT Umsatzes durch oligomeres A $\beta$  und Glutamat.

Die Applikation von 15  $\mu$ M Glutamat bewirkte eine signifikante Reduktion des MTT Umsatzes. Dagegen hatte die dreitägige Applikation von 10  $\mu$ M oligomeres A $\beta$  (1-40) und oligomeres A $\beta$  (1-42) keinen Einfluss auf die MTT Reduktion der OHC. Die MTT Umsatzrate der jeweiligen Kontrollgruppe wurde auf 100 % normiert und ist als gestrichelte Linie gekennzeichnet. (alle Gruppen:  $n \geq 10$ , Glutamat vs. Kontrolle: \*  $P \leq 0,05$ ; A $\beta$  (1-40) vs. Kontrolle und A $\beta$  (1-42) vs. Kontrolle: n.s., Mann-Whitney U-Test)

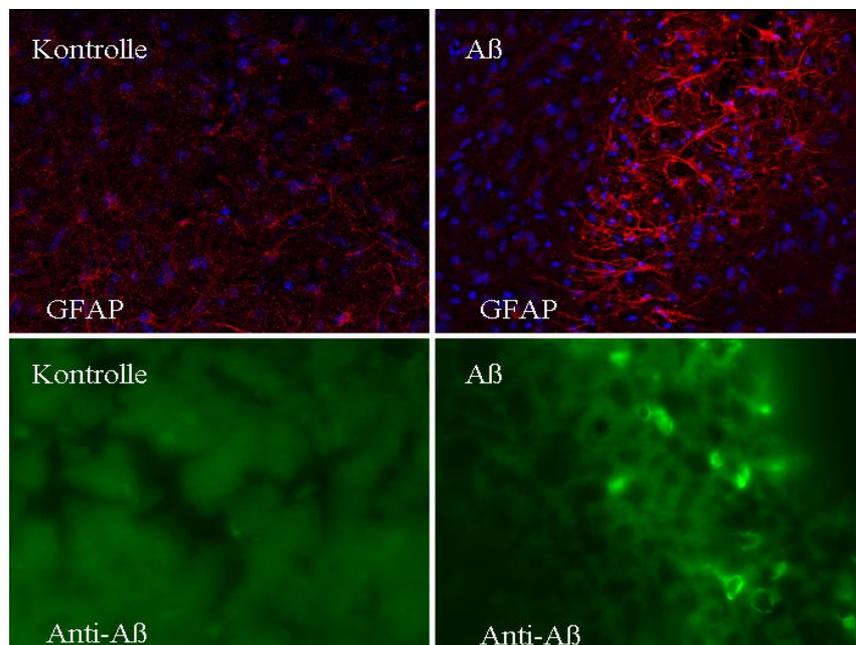


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung der OHC nach A $\beta$  Behandlung

Durch immunhistochemische A $\beta$  Färbung konnte eine Präsenz und somit eine erfolgreiche Diffusion von appliziertem A $\beta$  (1-40) in den OHC nachgewiesen werden. Die immunhistochemische GFAP Färbung zeigte im OHC eine Aktivierung von Astrozyten durch Applikation von oligomeres A $\beta$  (1-42). Die Zellkerne wurden DAPI gefärbt und erscheinen blau.

Um ausschließen zu können, dass der fehlende A $\beta$ -MTT-Effekt mit spezifischen Eigenschaften der Schnittkulturen zusammenhängt, wurde A $\beta$  *in vivo* appliziert. Hierzu wurde oligomeres A $\beta$  (1-42) oder das Kontrollprotein A $\beta$  (35-25) in den Ventrikel der Ratte injiziert. Ähnliche Versuche anderer Gruppen zeigten deutliche Effekte von ventrikulär injiziertem A $\beta$  auf die Funktion des Rattenhirns (Clarke et al., 2007). Somit war von einer Wirkung des A $\beta$  auf die Redoxaktivität des Nervengewebes auszugehen, falls sich die Zellen im intakten Gehirn wie die in der Einzelzellkultur verhielten. Drei Tage nach der A $\beta$  Injektion, wurden hippokampale Akutschnitte präpariert und der MTT Umsatz gemessen. Es konnte keine Reduktion der Formazanproduktion durch A $\beta$  verzeichnet werden (Abbildung 27).

Die Präsenz von A $\beta$  im Hippokampus wurde durch eine immunhistochemische A $\beta$  Färbung nachgewiesen (Abbildung 28).

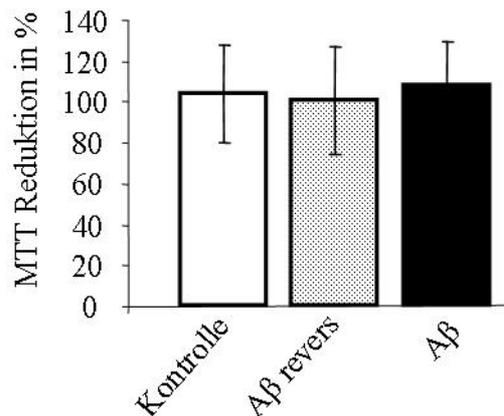


Abbildung 27: Einfluss von A $\beta$  auf den MTT Umsatz von hippokampalen ex vivo schnitten.

Die *in-vivo* Injektion von frisch aufgelöstem A $\beta$  (25-35), dem Kontrollprotein A $\beta$  (35-25) und oligomerem A $\beta$  (1-42) erfolgte drei Tage zuvor. A $\beta$  beeinflusste den MTT Umsatz des Gewebes nicht.

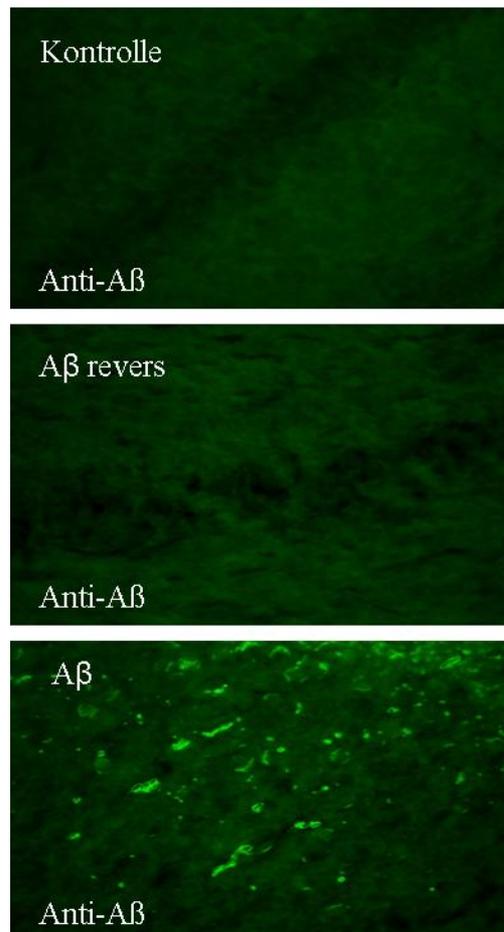


Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung von A $\beta$  nach in-vivo Applikation von A $\beta$ .

Es konnte eine Präsenz von A $\beta$  im Hippokampus nach in-vivo Applikation nachgewiesen werden

### 3.3 Die LTP Störung ist abhängig von der Aktivierung des NR2B-haltigen NMDA-Rezeptors

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist ein möglicher, von A $\beta$  Oligomeren beeinflusster Rezeptor, der NMDA-Rezeptor. Denn *in vitro* Studien zeigten, dass A $\beta$  Oligomereffekte von einer anormalen Aktivierung der NMDA-Rezeptoren begleitet sind (Lacor et al., 2004; Shankar et al., 2007). Um den Zusammenhang zwischen der A $\beta$  Oligomer vermittelten LTP Störung und einer NMDA-Rezeptorüberaktivierung zu untersuchen, sollte dieser Rezeptor während der A $\beta$  Applikation inhibiert werden. Eine Schwierigkeit bei diesem Experiment bestand darin, dass die LTP selbst von der Aktivierung des NMDA-Rezeptors abhängig ist. Dies wurde mit einem Versuch gezeigt, wo der Effekt des subtypunspezifischen NMDA-Rezeptor Antagonisten APV auf die LTP getestet wurde. APV blockierte die Potentierung fast vollständig (Abbildung 29: Kontrolle:  $249,5 \pm 15,6$  %;

APV:  $129,4 \pm 1,9$  %, 1 min nach Tetanusapplikation; Kontrolle:  $182,3 \pm 12,0$  %; APV:  $120,6 \pm 3,8$  220 min nach Tetanusapplikation).

Somit konnte dieser Antagonist nicht für die Untersuchung der möglichen NMDA-Rezeptorbeeinflussung durch A $\beta$  verwendet werden. Daraufhin wurde die Wirkung des für NR2B-haltige NMDAR spezifischen Antagonisten Ifenprodil ( $10 \mu\text{M}$ ) auf die LTP getestet. Die Applikation dieses Antagonisten beeinflusste die LTP nicht (Abbildung 30).

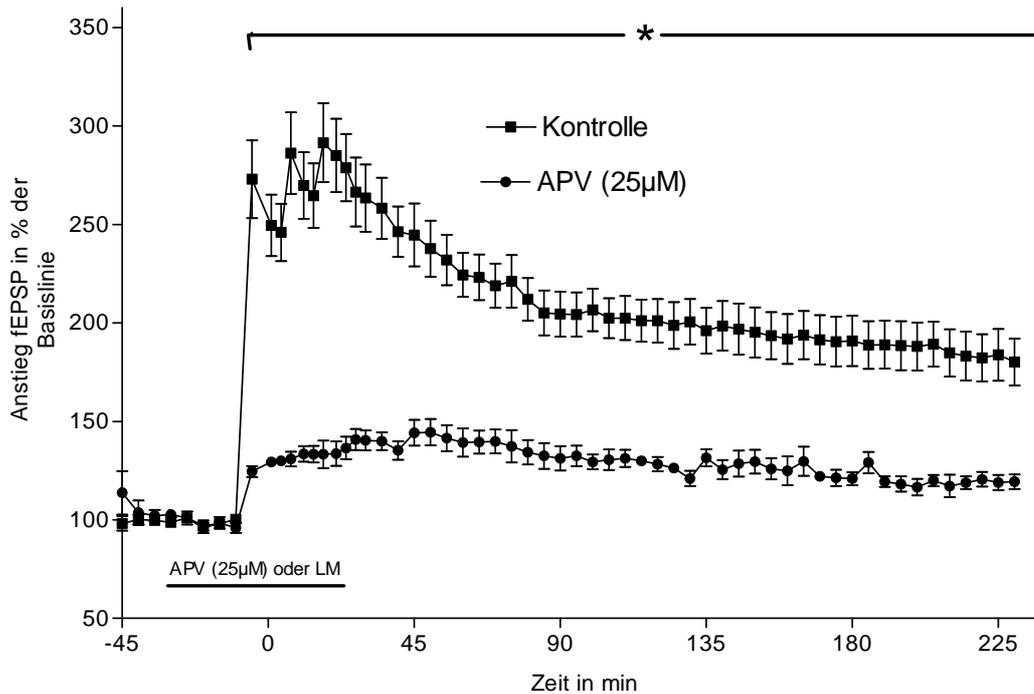


Abbildung 29: APV blockiert die LTP

Die Applikation von  $25 \mu\text{M}$  APV für 50 min bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte LTP (APV:  $n=4$ ; Kontrolle:  $n=10$ ;  $* P \leq 0,05$ ; ANOVA mit Messwertwiederholung). Der Balken kennzeichnet die Einspülzeit von APV oder der Lösungsmittelkontrolle (LM) 30 min vor bis 20 nach Applikation des ersten Tetanus. Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0 durch Applikation des 100 Hz Tetanus.

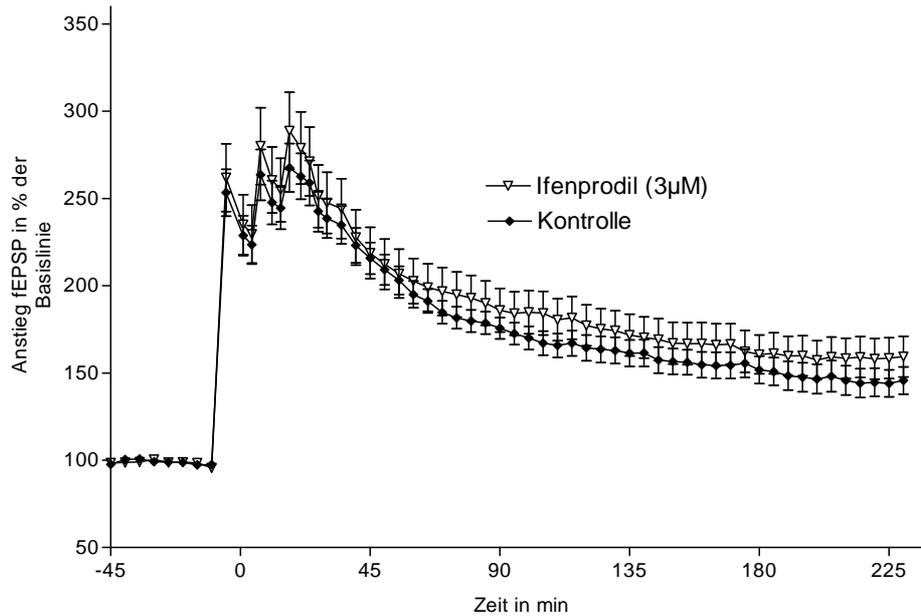


Abbildung 30: Einfluss von Ifenprodil auf die LTP

Die Applikation von 3  $\mu$ M Ifenprodil beeinflusste die LTP im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht (Ifenprodil:  $n=16$ ; Kontrolle:  $n=10$ ; n.s., ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

Folglich war Ifenprodil für die weiteren LTP-Experimente geeignet, da es die LTP nicht beeinflusste. Bei Koapplikation von Ifenprodil mit 500 nM oligomerem A $\beta$  wurde die A $\beta$ -induzierte LTP-Störung verhindert (Abbildung 31: oligomeres A $\beta$  (1-42):  $184,6 \pm 13,3$  %; Kontrolle:  $246,3 \pm 16,0$  %, oligomeres A $\beta$  (1-42)/Ifenprodil (3 $\mu$ M):  $205,7 \pm 8,8$  %, 1 min nach Tetanusapplikation; oligomeres A $\beta$  (1-42):  $116,4 \pm 9,0$  %; Kontrolle:  $148,0 \pm 13,0$  %; oligomeres A $\beta$  (1-42)/Ifenprodil (3 $\mu$ M):  $148,4 \pm 8,1$  %, 220 min nach Tetanusapplikation).

Um den protektiven Effekt der Blockade des NR2B-haltigen NMDAR zu bestätigen, wurde Ro 25,6981, ein weiterer spezifischer Inhibitor dieses Rezeptorkanals, mit oligomerem A $\beta$  koappliziert. Wie Ifenprodil beeinflusste auch Ro 25,6981 die LTP nicht (Abbildung 32). Die Koapplikation von Ro 25,6981 konnte den A $\beta$ -induzierten LTP-Schaden weitgehend aufheben (Abbildung 33).

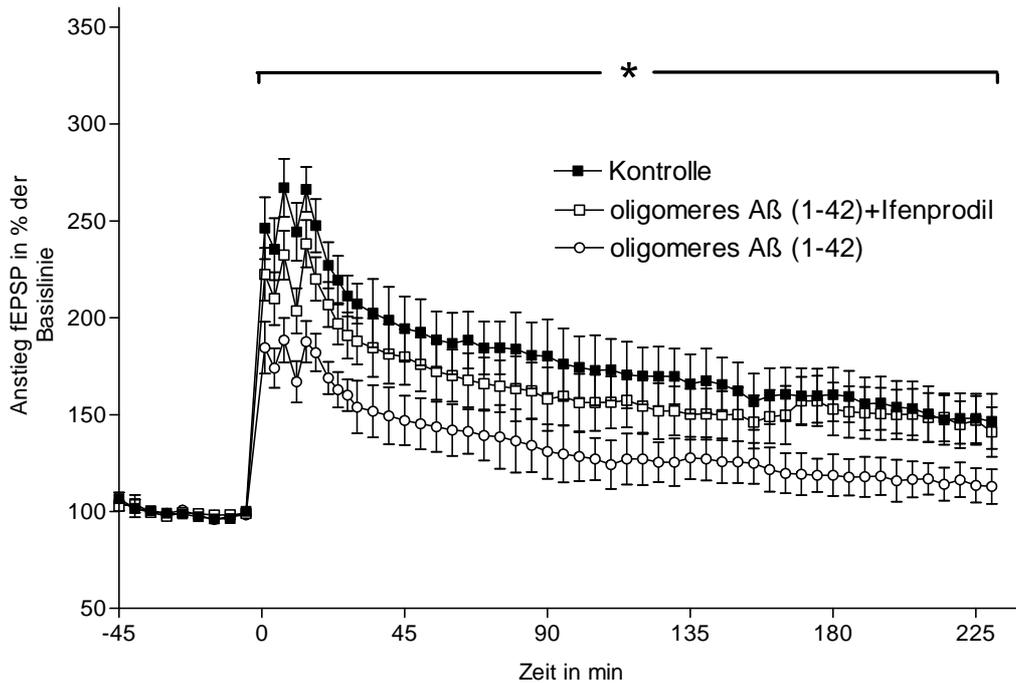


Abbildung 31: Einfluss von Ifenprodil auf die durch oligomeres A $\beta$  geschädigte LTP.

Die Applikation von Ifenprodil ( $3\mu\text{M}$ ) hob den LTP störenden Effekt von  $500\text{ nM}$  oligomeres A $\beta$  (1-42) auf (oligomeres A $\beta$  (1-42):  $n=12$ ; Kontrolle:  $n=10$ ; A $\beta$  (1-42)/Ifenprodil:  $n=10$ ; A $\beta$  (1-42) vs. A $\beta$  (1-42)/Ifenprodil: \*  $P<0,05$ ; ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

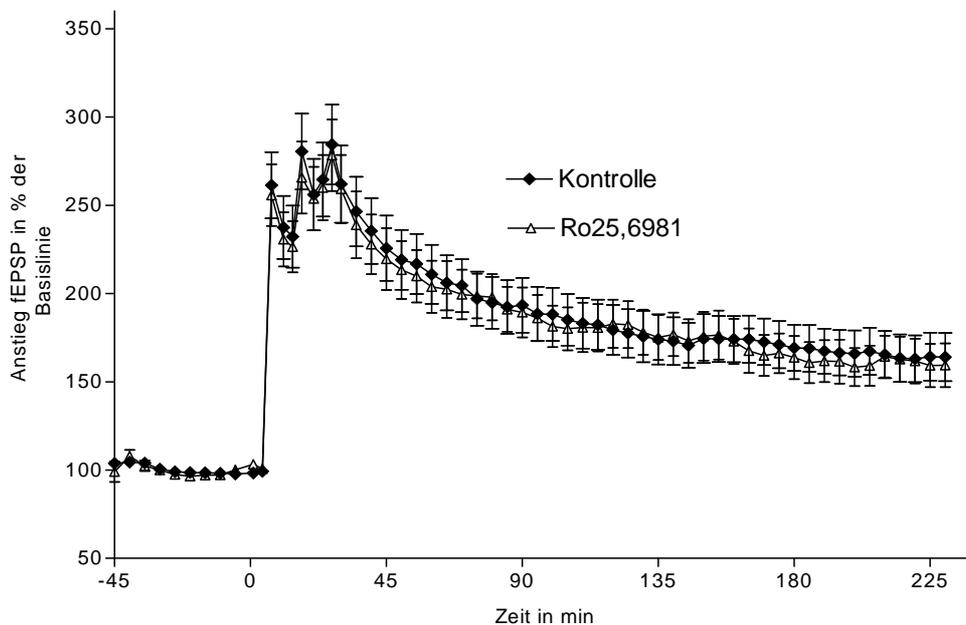


Abbildung 32: Ro 25,6981 beeinflusst die LTP nicht

Die Applikation von  $1\mu\text{M}$  Ro 25,6981 beeinflusste die LTP im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht (Ro 25,6981:  $n=12$ ; Kontrolle:  $n=12$ ; n.s., ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

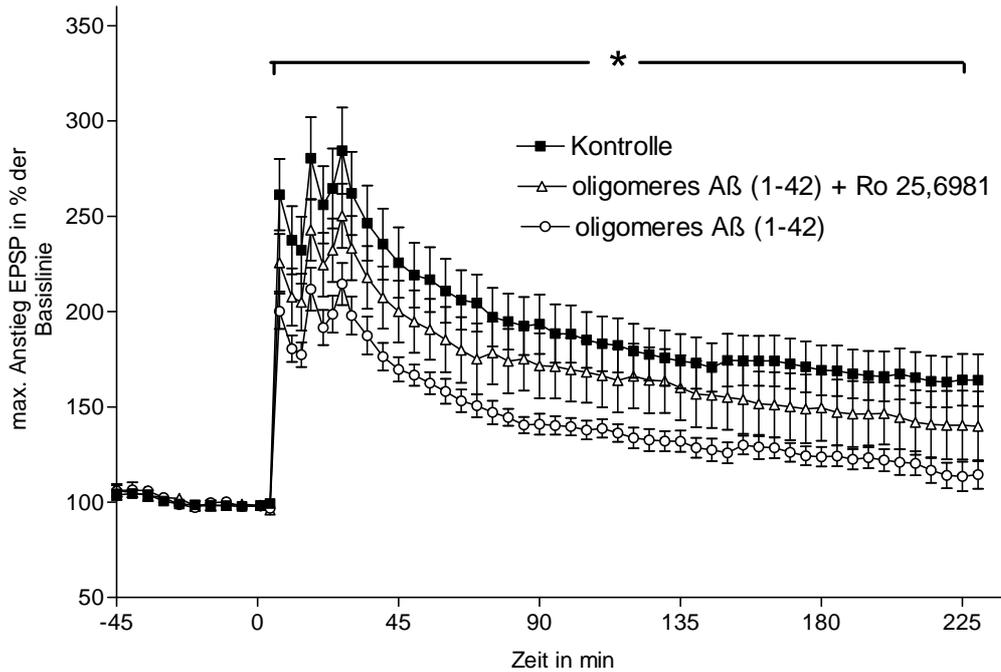


Abbildung 33: Einfluss von Ro 25,6981 auf die durch oligomeres A $\beta$  geschädigte LTP.

Die Applikation von Ro 25,6981 (1 $\mu$ M) hob den LTP beeinträchtigenden Effekt von 500 nM oligomeren A $\beta$  (1-42) annähernd vollständig auf (oligomeres A $\beta$  (1-42): n=11; Kontrolle: n=12; A $\beta$  (1-42)/ Ro 25,6981: n= 8; A $\beta$  (1-42) vs. A $\beta$  (1-42)/Ro 25,6981: \* P $\leq$  0,05; ANOVA mit Messwertwiederholung). Die Induktion der LTP erfolgte zum Zeitpunkt 0.

### 3.4 Submikromolare A $\beta$ Oligomer Konzentrationen bewirken keinen neuronalen Zelltod, sondern neuronale Schäden auf funktioneller und struktureller Ebene

Die beschriebenen LTP Experimente zeigten bisher keinen Effekt von A $\beta$  auf die synaptische Basisaktivität. Bedingt durch das Methodenprotokoll der LTP-Messung, die erst etwa 5 Stunden nach der A $\beta$  Behandlung beginnt, könnte ein früher eintretender Basislinienseffekt unerkant bleiben. Deshalb wurden die Akutschritte im Folgenden sofort nach der einstündigen Vorinkubation mit A $\beta$  auf ihre basale Aktivität hin untersucht. Es konnte ein signifikanter Abfall des fEPSPs etwa 4 h nach A $\beta$  Behandlung erfasst werden (Abbildung 34: Kontrolle: 109,3  $\pm$  9,3%; oligomeres A $\beta$  (1-42): 73,7  $\pm$  6,5%, 460 min nach Beginn der Messung). Dieser A $\beta$  induzierte Abfall der Basislinienaktivität konnte durch Koapplikation von Ro 25,6981 aufgehoben werden (Abbildung 35: Kontrolle: 109,3  $\pm$  9,3%; oligomeres A $\beta$  (1-42)/ Ro 25,6981: 93,3  $\pm$  7,4%, 460 min nach Beginn der Messung). Ro 25,6981 beeinflusste die Basislinienaktivität unter Kontrollbedingungen nicht (Abbildung 36: Kontrolle: 109,3  $\pm$  9,3; Ro 25,6981: 93,6  $\pm$  9,3%, 460 min nach Beginn der Messung)

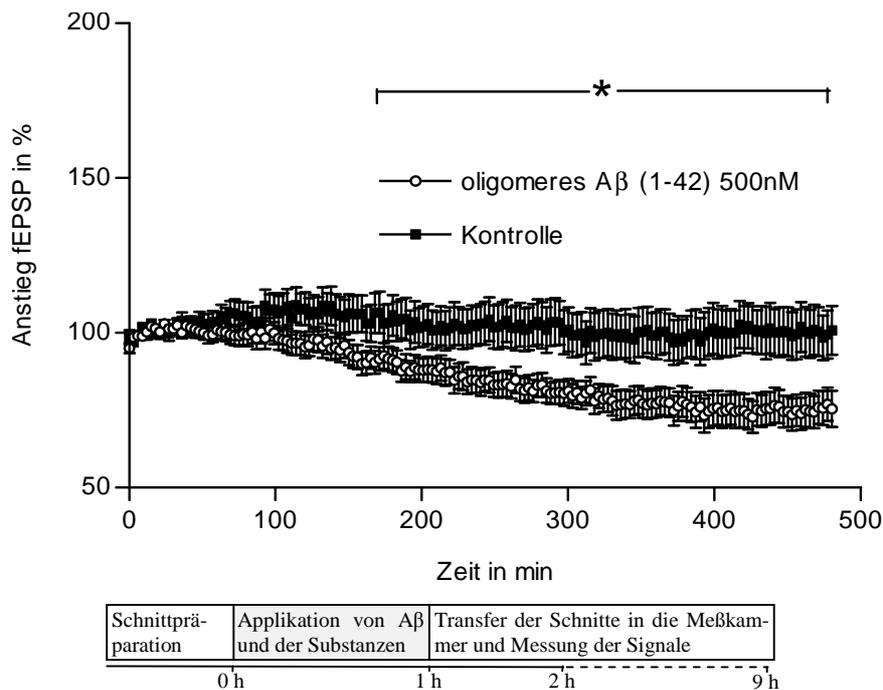


Abbildung 34: Einfluss von oligomerem Aβ (1-42) auf die synaptische Basisaktivität

Oligomeres Aβ (1-42) führt im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikanten Abfall der Basislinie (oligomeres Aβ (1-42): n=27; Kontrolle: n=23; \*P< 0,05; ANOVA mit Messwertwiederholung). Dieser Effekt beginnt etwa 4h nach der Applikation des Aβ und erreicht sein Maximum etwa 2 h später. Das untere Schema demonstriert den Zeitverlauf aller Basislinienexperimente. Es ist wichtig zu betonen, dass Aβ und die Substanzen nur während der Vorinkubation der Schnitte (siehe Methoden Abschnitt 2.1.1) präsent waren.

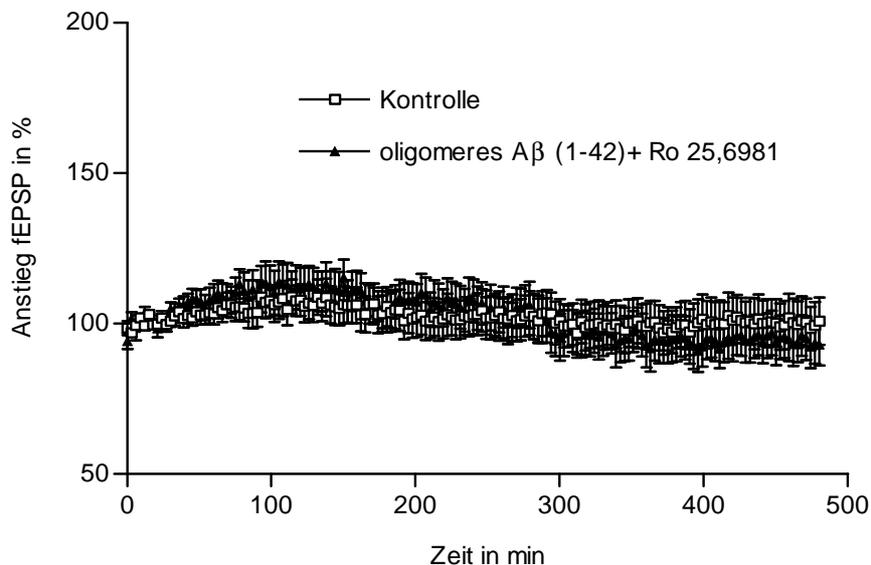


Abbildung 35: Einfluss von Ro 25,6981 auf die durch oligomeres Aβ geschädigte Basislinienaktivität.

Die Applikation von Ro 25,6981 (1μM) hob die Reduktion der Basislinienaktivität durch 500 nM oligomeres Aβ (1-42) auf (oligomeres Aβ (1-42)/Ro 25,6981: n= 11; Kontrolle: n=23).

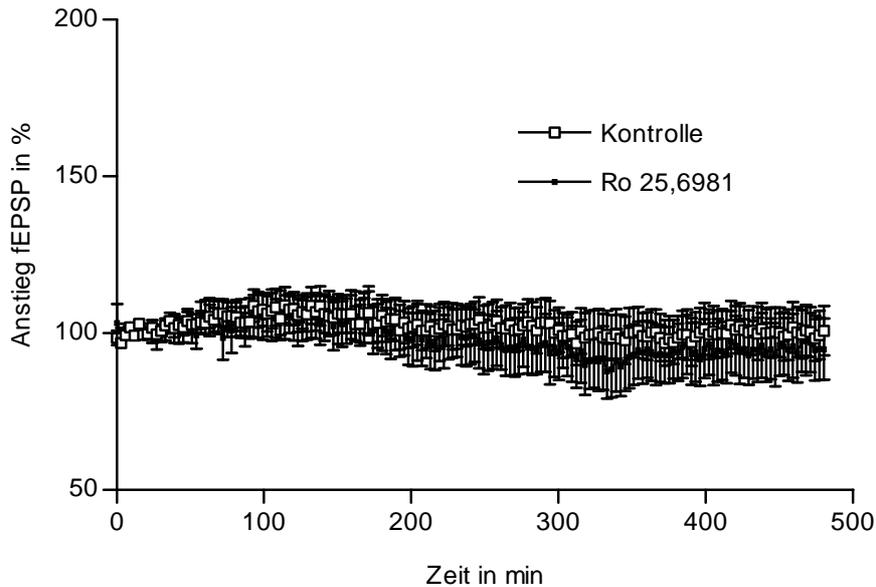


Abbildung 36: Einfluss von Ro 25,6981 auf die Basislinienaktivität unter Kontrollbedingungen.

Die Applikation von Ro 25,6981 (1 $\mu$ M) beeinflusste die Basislinienaktivität nicht (Ro 25,6981: n= 18; Kontrolle: n=23).

Ein möglicher Grund für diesen Abfall ist eine Reduktion von synaptischen Kontakten durch die A $\beta$  Behandlung der Schnitte. Um den Einfluss von A $\beta$  Oligomeren auf Synapsen zu prüfen, wurden primäre Neurone mit A $\beta$  behandelt. Die verwendeten A $\beta$  Oligomerkonzentrationen bewegten sich dabei im sublethalen Bereich. Dies wurde insofern bestätigt, als die Neuronenkulturen einen Tag nach der A $\beta$  Applikation im Phasenkontrastbild ungeschädigt wirkten (Abbildung 37) und mit Hilfe des LDH Assays im Vergleich zur Kontrolle keine erhöhte Ausschüttung von LDH messbar war (Abbildung 38).

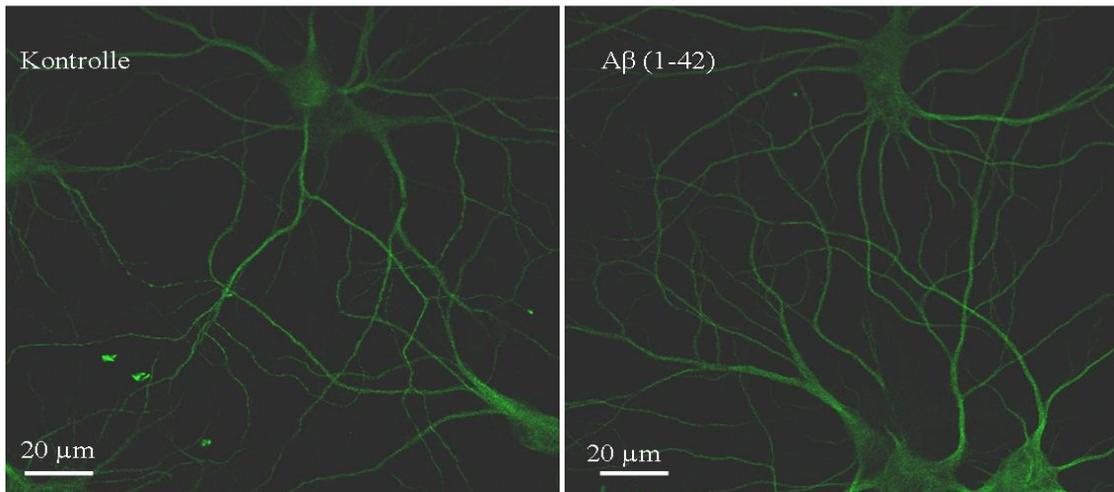


Abbildung 37: Effekt von oligomerem A $\beta$  auf die neuronale Morphologie.

500 nM A $\beta$  (1-42) Oligomere wurden für 3 Tage zu einer neuronalen Primärkultur appliziert. Die darauf folgende MAP 2 Immunfärbung zeigte keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der A $\beta$  behandelten Gruppe.

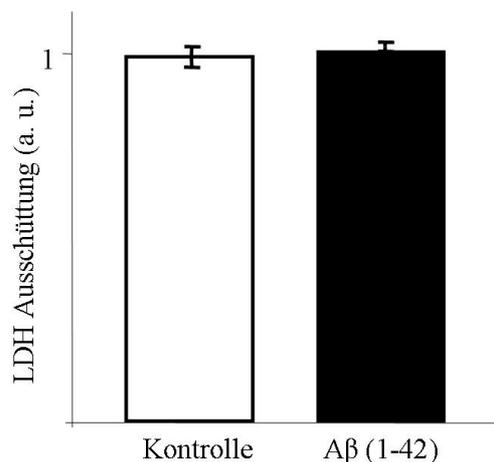
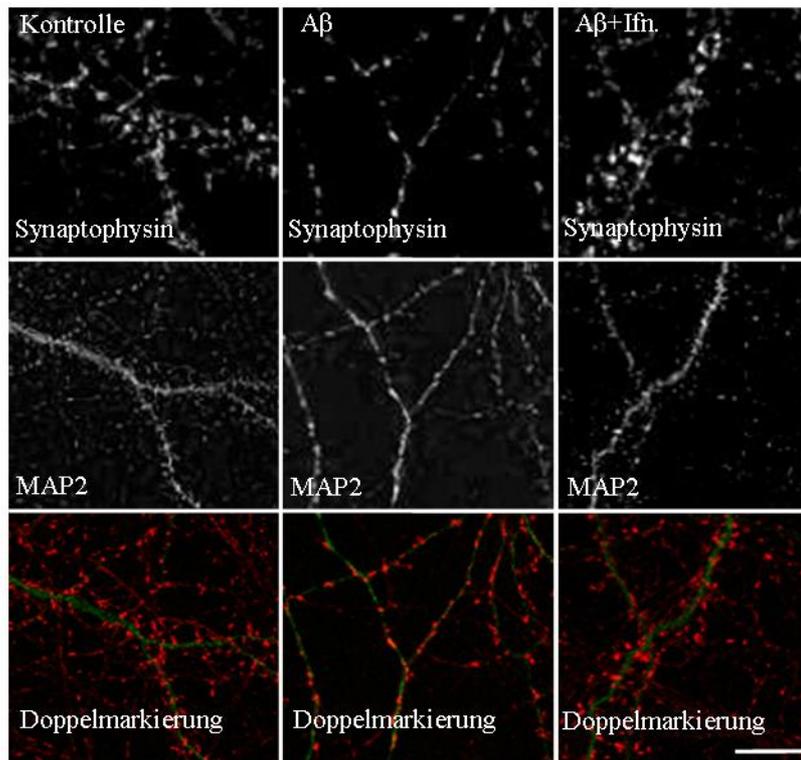


Abbildung 38: Effekt von oligomerem A $\beta$  auf die neuronale LDH-Ausschüttung.

500 nM A $\beta$  (1-42) Oligomere wurden für 3 Tage zu einer neuronalen Primärkultur appliziert. Daraufhin wurde die LDH Ausschüttung durch die Neurone quantifiziert. Es konnte kein Unterschied zwischen den A $\beta$  behandelten und unbehandelten Gruppen beobachtet werden. (alle Gruppen:  $n \geq 10$ , n.s. Mann-Whitney U-Test)

Um die mögliche degenerative Wirkung der eingesetzten A $\beta$ -Oligomere auf die synaptischen Kontakte darstellen und quantifizieren zu können, wurde eine Synapsenfärbung durchgeführt. Durch immunhistochemische Färbung von Synaptophysin, einem Protein der postsynaptischen Dichte (PSD), waren die Synapsen erkenn- und quantifizierbar. Neuronenkulturen, die mit 500 nM A $\beta$  (1-42) Oligomer versetzt wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion von Synapsen. Dieser Rückzug der Synapsen konnte durch Koapplikation von Ifenprodil (10  $\mu$ M) aufgehoben werden (Abbildung 39: *Kontrolle:  $0,70 \pm 0,06$ ; oligomeres A $\beta$  (1-42):  $0,41 \pm 0,02$ , A $\beta$ +Ifenprodil.:  $0,65 \pm 0,07$ .*

A



B

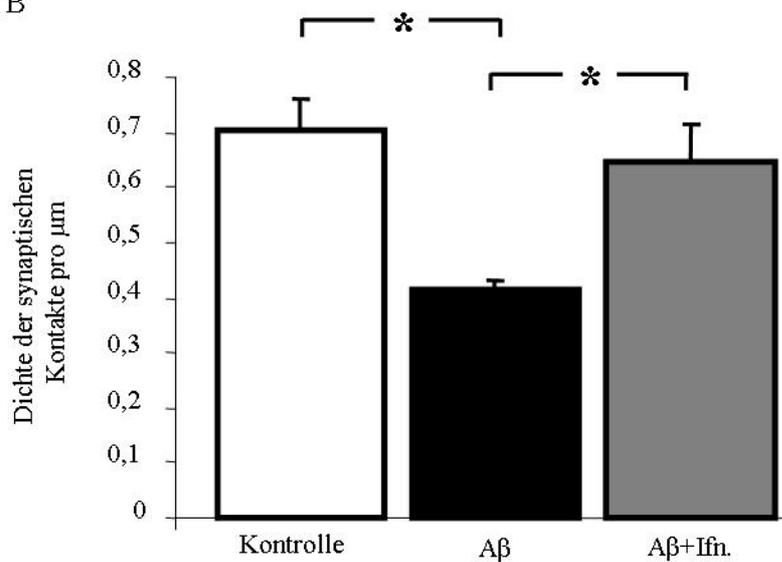


Abbildung 39: Effekt von oligomerem Aβ (500 nM) auf die Zahl synaptischer Kontakte in einer neuronalen Primärkultur und Abhängigkeit vom NR2B-haltigen NMDAR.

A) Repräsentative Aufnahmen der immunzytochemisch gegen MAP2 und Synaptophysin gefärbten Synapsen. Aβ (1-42) wurde für einen Tag appliziert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm. B) Die Behandlung der Zellen mit Aβ vermindert signifikant die Anzahl der synaptischen Kontakte nach 24h (Kontrolle: n=12; Aβ: n=10). Die Koapplikation von 10 μM Ifenprodil (Ifn) verhinderte den Rückgang der Synapsen (Aβ+Ifn.: n=10) \*P<0.05; Mann-Whitney U-Test.

Diese durch A $\beta$ -Oligomere ausgelöste synaptische Degeneration ist eine strukturelle Konsequenz der schädigenden Wirkung des Alzheimerpeptids. Im Folgenden sollte getestet werden, ob sich diese sublethale Degeneration auch funktionell ausprägt. Hierzu wurde die Häufigkeit der spontanen, synchronen Netzwerkaktivität innerhalb einer neuronalen Primärkultur gemessen. Mit Hilfe von Kalziumimaging konnte die spontane Netzwerkaktivität aufgezeichnet und quantifiziert werden. Eine Neuronenkultur wurde mit Fura 2 versetzt und für 23 min beobachtet. Wenn bei mehreren Neuronen innerhalb der Kultur der intrazelluläre Kalziumspiegel synchron auf mindestens die doppelte Konzentration anstieg, wurde dies als ein Ereignis spontaner Netzwerkaktivität gezählt (Abbildung 40).

Da die Erregbarkeit der verschiedenen Neuronenpräparationen stark variierten, wurden alle Versuchsgruppen einer Präparation immer auf die jeweilige Kontrolle der gleichen Präparation (entspricht der gleichen Zellkulturplatte) normiert. Neuronenkulturen, welche für 24 h mit A $\beta$  (1-42) Oligomeren behandelt wurden, zeigten eine signifikant reduzierte Häufigkeit spontaner Netzwerkaktivität. Dieser Effekt konnte durch Koapplikation mit Ifenprodil aufgehoben werden (Abbildung 41: Kontrolle/Ifenprodil: 100%  $\pm$  15,7; A $\beta$ : 40,1%  $\pm$  4,5; A $\beta$ +Ifenprodil.: 115,6%  $\pm$  13,9).

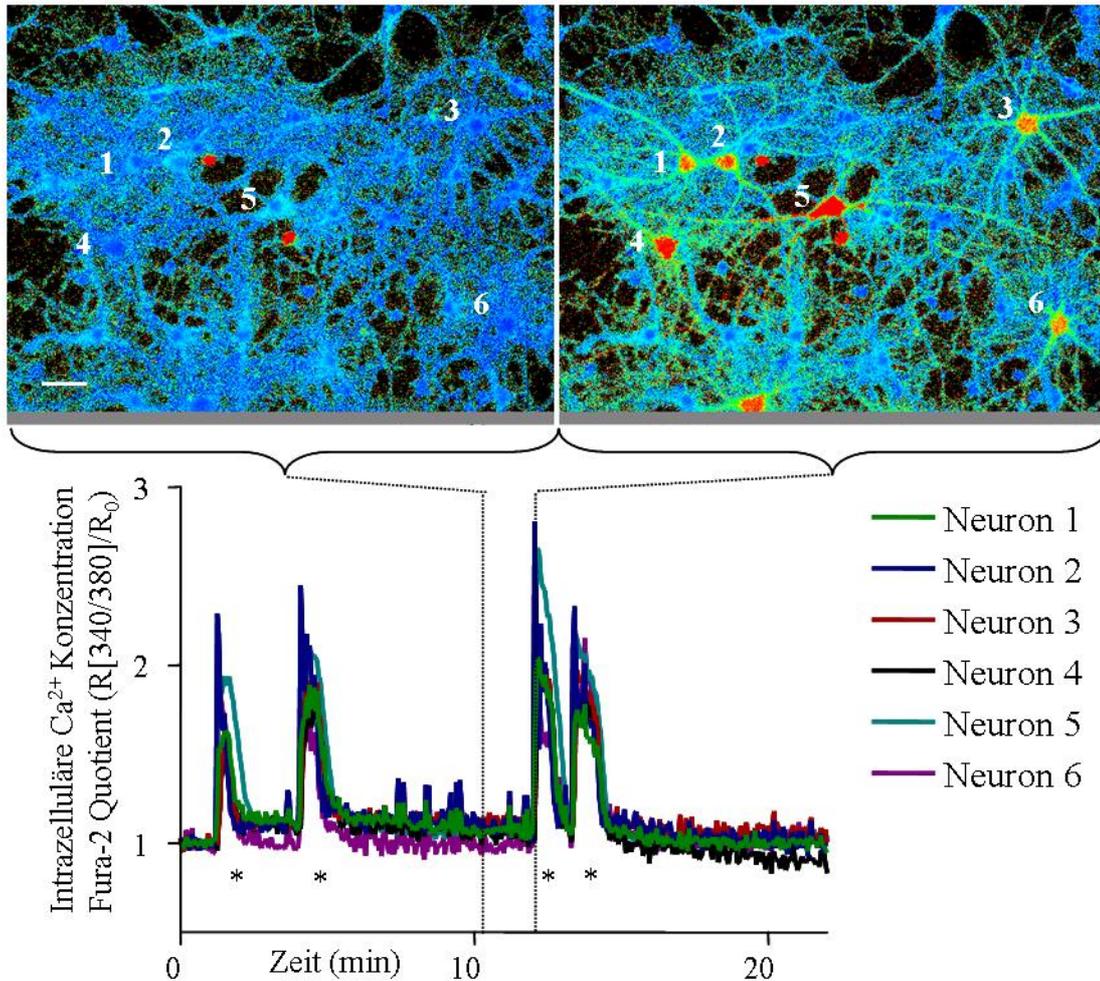


Abbildung 40: Repräsentative Aufnahmen der mit Fura-2 beladenen neuronalen Primärkultur (21 DIV).

Das linke Bild zeigt ein inaktives Netzwerk, da die intrazellulären Kalziumkonzentrationen aller Zellen unverändert sind. Im rechten Bild ist eine spontane Aktivität des neuronalen Netzwerks erkennbar. Hier erfolgte ein synchroner Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration innerhalb der Neurone, die in das Netzwerk integriert sind. Die Zellen, die während dieses spontanen Ausbruchs nicht aktiv sind, sind entweder nicht integrierte Neurone, oder Astrozyten. Die untere Graphik zeigt den zeitlichen Verlauf der spontanen Netzwerkaktivitäten dieser Neuronenkultur. Signifikante synchrone Erhöhungen der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden als ein Ereignis gezählt. Also war diese Kultur innerhalb der gemessenen 22 Minuten vier mal aktiv (Die gezählten Netzwerkausbrüche sind durch Sternchen markiert). Der Maßstabsbalken entspricht 40  $\mu\text{m}$ .

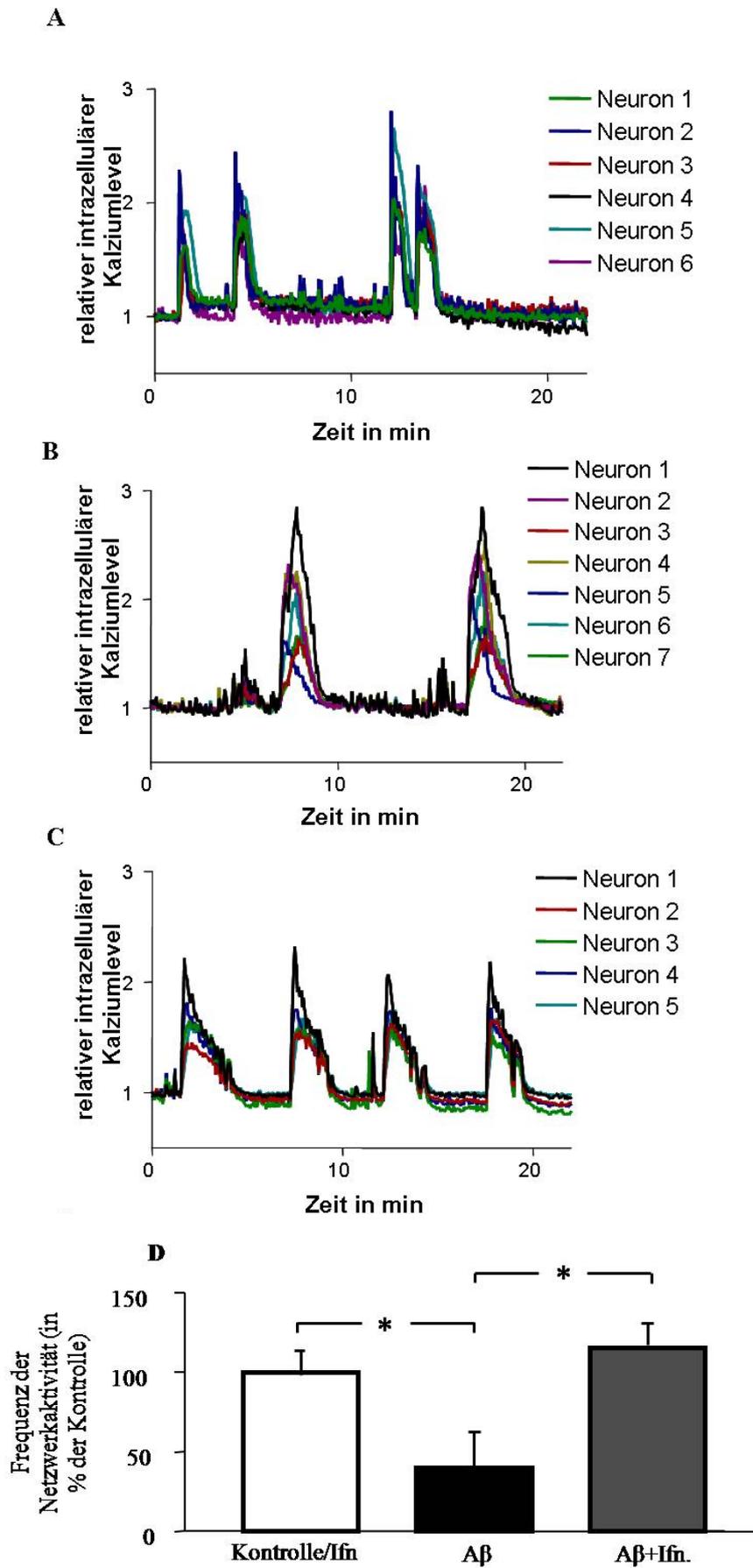


Abbildung 41: Oligomeres (A $\beta$  1-42) reduzierte die Häufigkeit spontaner Aktivität innerhalb von Neuronenkulturen. Die Inhibition des NR2B-haltigen NMDARs durch Ifenprodil hob diesen A $\beta$ -Effekt auf

A) Repräsentative Signalspur des intrazellulären Kalziumsignals in Neuronen der Kontrollgruppe, bzw. der Ifenprodil (3 $\mu$ M)-Kontrolle (es war kein Unterschied zwischen beiden Gruppen zu verzeichnen) B) Repräsentative Signalspur des intrazellulären Kalziumsignals in A $\beta$  behandelten Neuronen C) Repräsentative Signalspur des intrazellulären Kalziumsignals in A $\beta$  (500 nM) und Ifenprodil (3  $\mu$ M) behandelten Neuronen D) A $\beta$  bewirkte eine signifikante Verringerung der Häufigkeit spontaner Aktivität. Dies konnte durch Zugabe von Ifenprodil aufgehoben werden (Zahl gemessener Kulturen: Kontrolle: n=22; A $\beta$ : n= 15; A $\beta$ +Ifenprodil: n= 8, \*P<0.05; Mann-Whitney U-Test). Die Normierung der Werte der einzelnen Gruppen erfolgte immer in Bezug auf die Kontrollgruppen innerhalb der selben Zellkulturpräparation.

### **3.5 Die durch A $\beta$ hervorgerufene neuronale Dysfunktion korreliert mit der Aktivierung von Jacob**

Die bisher beschriebenen A $\beta$  Effekte weisen auf eine kritische Beteiligung des NR2B-haltigen NMDAR hin. Da kürzlich ein neues Protein (Jacob) beschrieben wurde, welches durch eine NMDA(2B)-Rezeptor-Überaktivierung aktiviert wird und zu einer neuronalen Degeneration führt (Dietrich et al., 2008), wurde die Frage aufgeworfen, ob A $\beta$ -Oligomere dieses Protein ebenfalls beeinflussen. Zur Klärung dieser Frage wurde in einer neuronalen Primärkultur die Proteinsynthese durch Zugabe von Anisomycin (7,5  $\mu$ M) blockiert. Diese Neuronen wurden für 30 min mit 500 nM A $\beta$  (1-42) Oligomeren (ADDL) behandelt und die Menge von Jacob in den Zellkernen semiquantitativ analysiert. Durch die Behandlung mit Anisomycin konnte der Jacob-Spiegel im Kern als unabhängig von der *de novo* Proteinsynthese betrachtet werden. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnte eine erhöhte nukleäre Konzentration von Jacob gemessen werden. Die Applikation von NMDA (100  $\mu$ M) für 3 min bewirkte ebenfalls einen Anstieg von Jacob in den neuronalen Zellkernen (Abbildung 42). Die Effekte der A $\beta$  Oligomere, wie auch von NMDA, konnten durch Applikation von Ifenprodil (5  $\mu$ M) aufgehoben werden (Abbildung 43).

Daraufhin wurde untersucht, ob dieser A $\beta$  Effekt auf die nukleäre Translokation von Jacob auch in komplexeren Gewebe auftritt. Hierzu wurden akute hippocampale Schnitte präpariert und in zwei Gruppen separiert. Eine Gruppe wurde mit 500 nM oligomerem A $\beta$  (1-42) behandelt und die LTP gemessen. Die andere Gruppe wurde ebenfalls mit 500 nM oligomerem A $\beta$  (1-42) sowie mit 7,5  $\mu$ M Anisomycin behandelt und nach 2h für die immunhistochemische Färbung von Jacob fixiert. Es konnte eine signifikante Störung der LTP (Abbildung 44 A) und ein signifikanter Anstieg von Jacob im Zellkern beobachtet werden (Abbildung 44 B).

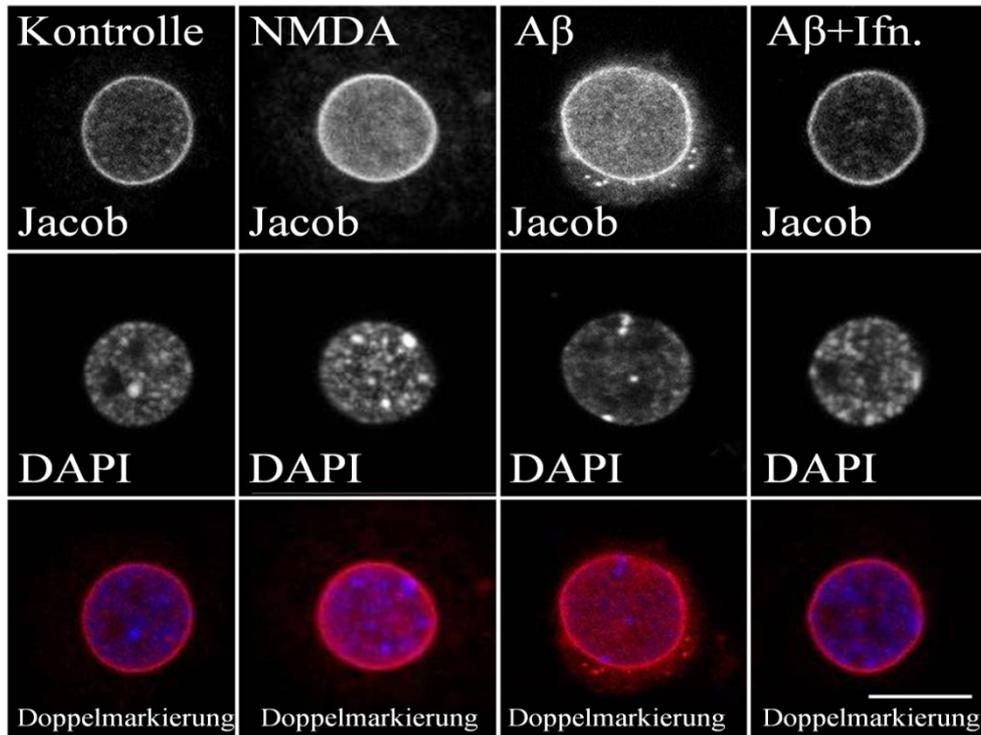


Abbildung 42: Repräsentative Immunfärbung von A $\beta$  und NMDA behandelten Neuronen.

Die DAPI gefärbten Zellkerne ließen eine Messung des nukleären Gehalts an Jacob zu. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m.

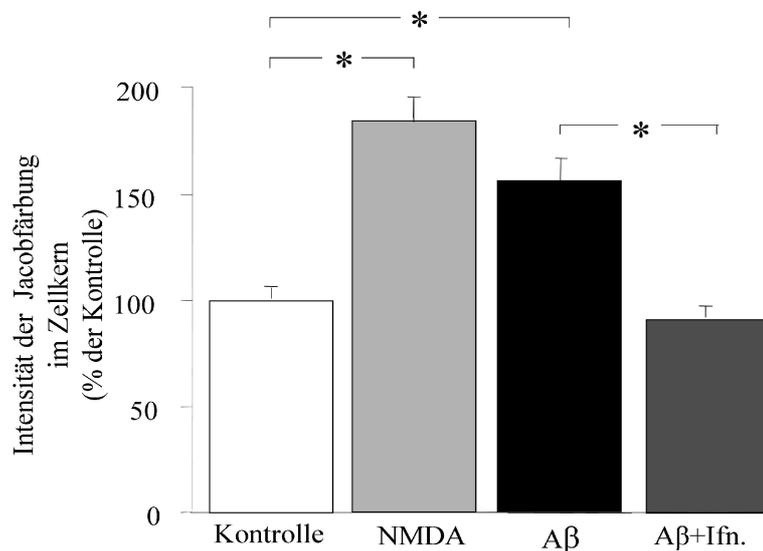
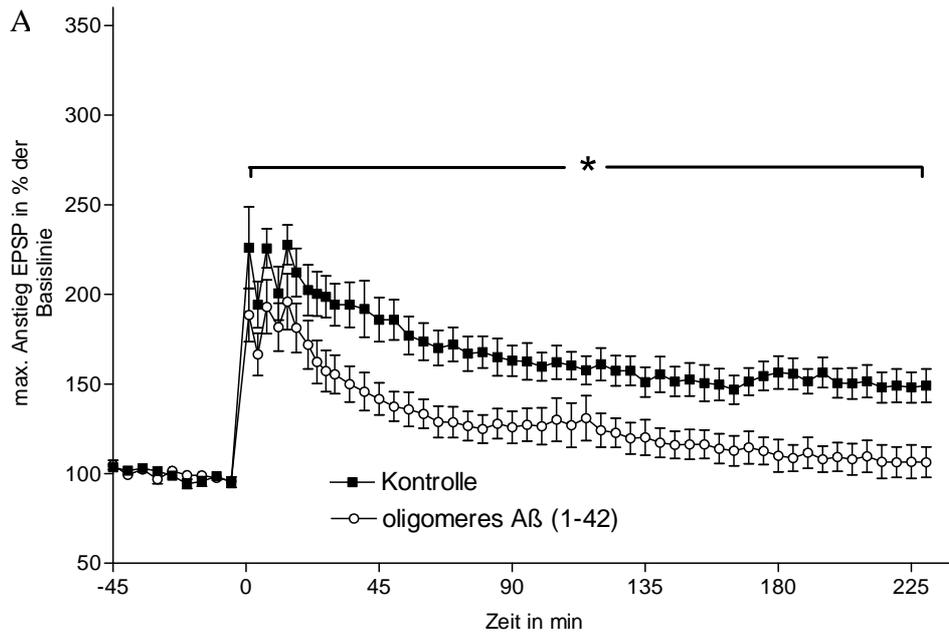


Abbildung 43: Effekt von A $\beta$ , NMDA und Ifenprodil auf die nukleäre Translokation von Jacob.

500 nM oligomeres A $\beta$  bewirkt eine signifikante Erhöhung von Jacob im Zellkern. Dieser Effekt kann durch Ifenprodil (5  $\mu$ M) aufgehoben werden. Die Applikation von NMDA treibt Jacob ebenfalls in den Zellkern (Kontrolle: 100%  $\pm$  5, n=38; NMDA: 184.4%  $\pm$  8.7, n=27; A $\beta$ : 155.6%  $\pm$  7.4, n=44; A $\beta$ +Ifenprodil: 90.6%  $\pm$  4.7, n=24; \*P<0.05; Mann-Whitney U-Test).



B

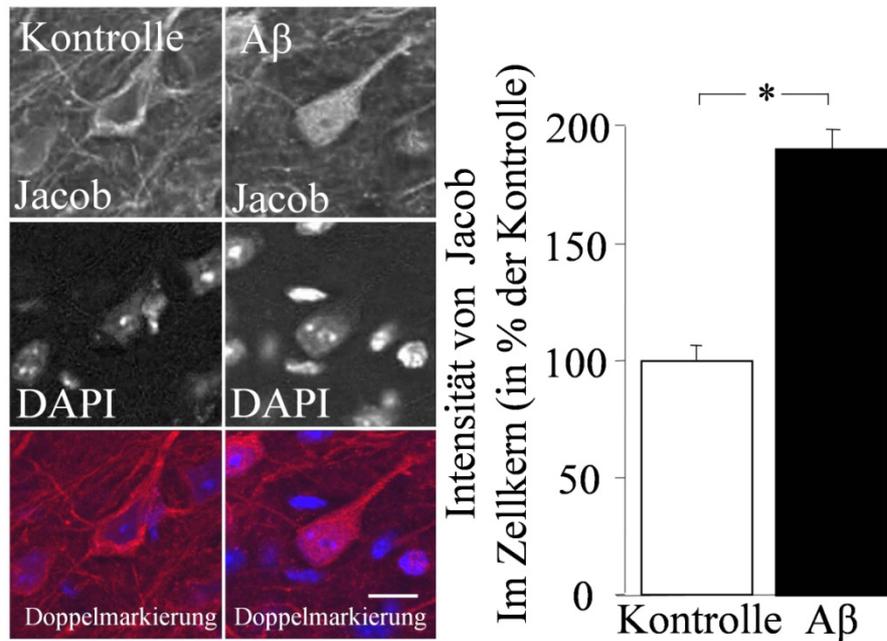


Abbildung 44: Effekt von oligomerem Aβ (1-42) auf die LTP und die Jacobkonzentration im Zellkern von akut isolierten hippocampalen Schnitten.

A) Oligomeres Aβ (1-42) wurde in einer Konzentration von 500 nM appliziert. Aβ (1-42) Oligomer behandelte Akutschnitte wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte LTP auf (Aβ: n=8; Kontrolle: n=10; \*P≤ 0,05; ANOVA mit Messwertwiederholung). B) Die parallele Analyse der Jacobkonzentration offenbarte eine signifikante Erhöhung von Jacob im Zellkern.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 LTP Störung durch A $\beta$

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation submikromolarer A $\beta$  Konzentrationen die Langzeitpotenzierung in akut isolierten hippokampalen Schnitten der Maus stört. Dieser Effekt war jedoch nur mit oligomerem A $\beta$  zu beobachten.

Verschiedene Aggregationszustände wurden für A $\beta$  identifiziert. So kann A $\beta$  als Monomer, lösliches Oligomer oder unlösliche Fibrille auftreten. Die generelle Bezeichnung „Oligomer“ beinhaltet verschiedene Formen der Zusammenlagerungen, wie Dimere, Trimer, Protofibrillen, Dodekamere oder ringförmige (porenartige) Strukturen, was die Frage nach unterschiedlichen Wirksamkeiten dieser verschiedenen Oligomere aufwirft. In den Arbeiten mehrerer Labore konnte die LTP mit allen oligomeren Formen gleichermaßen beeinflusst werden (Walsh et al., 2005; Puzzo und Arancio 2006; Shankar et al., 2008; Townsend et al., 2006; Barghorn et al., 2005). Diese gemeinsame schädigende Potenz aller Oligomere wurde im Rahmen der Experimente von Kaye et al. untersucht. Über die Selektion eines konformationsspezifischen Antikörpers, der präfibrilläre Oligomere bindet, konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Oligomere vom gleichen Antikörper erkannt werden (Kaye et al., 2003). Somit wurde ein gemeinsames, den Oligomeren eigenes Strukturmotiv postuliert, welches entscheidend für die Toxizität sein soll. Dieses Postulat deckt sich mit den Befunden dieser Arbeit. Es wurde beobachtet, dass die zwei Oligomerpräparationen aus A $\beta$  (1-40) und A $\beta$  (1-42) die LTP gleichermaßen stören, obwohl sie aus verschiedenen A $\beta$  Spezies generiert wurden und im elektronenmikroskopischen Bild ungleich groß wirkten. Offenbar scheint die genaue Identität des LTP-störenden Oligomere unerheblich, da eine gemeinsame molekulare Struktur und nicht etwa die bestimmte Anzahl von zusammengelagerten Monomeren über die schädigende Wirkung der A $\beta$ -Aggregate entscheidet.

Diesem Postulat der toxischen Oligomerstruktur weiter folgend, müssen sich jedoch auch die A $\beta$  Fibrillen strukturell von den Oligomeren unterscheiden, denn in dieser Arbeit konnte keine LTP Störung durch fibrilläres A $\beta$  erfasst werden. Noch sind die genauen Unterschiede zwischen Oligomeren und Fibrillen nicht genau aufgeklärt, doch kürzlich wurde beschrieben, dass beide Aggregate zwar eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweisen, Oligomere jedoch eine antiparallele Struktur haben, die in Fibrillen nicht gefunden werden kann (Cerf et al., 2009). Dies könnte den unterschiedlichen Effekt auf die LTP erklären. Es muss jedoch eingeräumt werden, dass A $\beta$  Fibrillen auch bedingt durch ihre Molekülgröße von

über 100 kDa langsamer diffundieren und somit die Neurone des hippocampalen Schnitts wahrscheinlich verzögert erreichen. Arbeiten von anderen Forschungsgruppen zeigten bereits eine fehlende Toxizität von monomerem A $\beta$  (Shankar et al., 2007) oder gar eine protektive Wirkung des unaggregierten A $\beta$ -Peptids (Giuffrida et al. 2009). In dieser Arbeit wurde ebenfalls keine LTP störende Wirkung von frisch aufgelöstem A $\beta$  (25-35) und A $\beta$  (1-40) beobachtet. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass eine Oligomerisierung des A $\beta$  für die Ausübung früher schädigender Effekte notwendig ist.

Überraschenderweise wurde in alten Mäusen keine Beeinflussung der LTP durch A $\beta$  beobachtet, obwohl mit einer intrathekalen Injektion von A $\beta$  eine erhöhte Anfälligkeit für alte Ratten bereits beschrieben wurde (Minogue et al., 2007). Gründe für diese Diskrepanz könnten der Unterschied zwischen den verwendeten Tierspezies oder der unterschiedliche methodische Ansatz sein. Im Experiment von Minogue et al. wurde A $\beta$  für 10 Tage *in-vivo* appliziert und dadurch eine starke inflammatorische Antwort mit Ausschüttung von Interleukin 1 $\beta$  provoziert. Während der deutlich kürzeren *in-vitro* A $\beta$  Applikation in der vorliegenden Arbeit, ist eine starke inflammatorische Antwort unwahrscheinlich, denn dieser Prozess nimmt einen Zeitraum über mehrere Stunden bis Tage ein (Wunder et al., 2009). Anhand von anatomischen und elektrophysiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass alte Tiere bereits eine gestörte neuronale Funktion sowie Integration aufweisen (Geinisman et al., 1995). So ist im Hippokampus von alten Tieren ein Verlust funktioneller Synapsen, eine Reduktion der NMDA-Rezeptor-Aktivität und eine Verschiebung der Ca<sup>2+</sup> Regulation beschrieben (Rosenzweig und Barnes, 2003). Die vorliegenden Untersuchungen an alten Mäusen zeigten tatsächlich eine erniedrigte Input-Output-Kurve. Dies kann auf eine reduzierte Anzahl von Synapsen hindeuten. Anscheinend wurde die LTP-Störung durch akut appliziertes A $\beta$  von diesen altersabhängigen Effekten überlagert oder maskiert. Die Pathogenese des Alzheimers ist progressiv und wahrscheinlich multifaktoriell, wobei die Schädigung der neuronalen Plastizität durch oligomeres A $\beta$  eine der ersten Stufen des geistigen Verfalls darstellen könnte (Selkoe, 2002). Im späteren Verlauf der Krankheit kann eine Neuroinflammation und zunehmende Neuronenschädigungen bis hin zum Zelltod einsetzen. Die neuronalen Schädigungen dieser späteren Alzheimer Stadien würden deutlich über die altersabhängigen Störungen dominieren.

Ein interessanter Befund dieser Arbeit ist die Tetanus-abhängige Störung der LTP durch A $\beta$ . Die durch einen hochfrequenten Tetanus (100 Hz) ausgelöste LTP ist anfällig für den A $\beta$ -Effekt, während die mit einem Thetaburst (5 Hz Intervalle) ausgelöste LTP nicht beeinflusst wurde. In der Literatur sind die Studien vorherrschend, welche die LTP

Störung unter Applikation des hochfrequenten Tetanus in der CA1 Region des Hippokampus untersuchen (Chen et al., 2000; Costello und Herron, 2004; Gault und Holscher, 2008; Klyubin et al., 2009; Lee et al., 2007; Rönicke et al., 2008; Rowan et al., 2007; Schmid et al., 2008; Shankar et al., 2008; Tarun und Ahuja, 2007; Walsh et al., 2002; Wang et al., 2004; Zhao et al., 2004) und dabei eine Inhibition der LTP beschreiben. Hingegen beobachten deutlich weniger Labore den A $\beta$ -Effekt mit Hilfe des Thetabursts (Li et al., 2007; Nomura et al., 2005; Puzzo et al., 2005; Ye und Qiao, 1999). Die Gründe für die Diskrepanz unserer Daten zu den Ergebnissen der letztgenannten Gruppen können mannigfaltig sein und von der Tierzucht, bis hin zum Präparationsprotokoll der Hippokampusschnitte reichen. Unsere Beobachtung der selektiven LTP Hemmung durch A $\beta$  wurde kürzlich durch die Arbeit von Smith et al. 2009 bestätigt, die ebenfalls nur mit einem hochfrequenten Tetanus eine Inhibition der LTP durch A $\beta$  beobachten konnten. Die Ursache für die unterschiedliche Empfindlichkeit der zwei LTP Formen konnte von Smith et al. 2009 nicht erklärt werden und so wurde lediglich auf einen unbekanntem Faktor hingewiesen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Thetaburst und der hochfrequenten Stimulation ist die Aktivierung der Rezeptorkanäle. Durch Applikation des Thetabursts wird vorrangig der NMDA-Rezeptor aktiviert, während durch den hochfrequenten Tetanus neben dem NMDAR auch der spannungsabhängige Kalziumkanal (VGCC) vom L-Typ aktiviert wird (Grover und Teyler, 1990). Somit müsste A $\beta$  nur die VGCC beeinflussen, da nur diese für die durch den hochfrequenten Tetanus induzierte LTP relevant sind. Bisher wurde für das 56 kDa A $\beta$  Dodekamer eine Wirkung auf VGCC nachgewiesen, jedoch nur auf den P/Q Typ (Nimmrich et al., 2008). Für die Untersuchung des A $\beta$  Effekts auf die L-Typ VGCC könnte zum Beispiel deren Internalisierung nach A $\beta$  Behandlung untersucht werden, denn diese Kanäle werden bei elektrischer Aktivität durch Internalisierung reguliert (Green et al., 2007). Würde dieser Mechanismus durch A $\beta$  beeinflusst sein, wäre der partielle Effekt auf die hochfrequente Tetanus LTP zu erklären.

#### **4.2 Die Schädigung der LTP durch A $\beta$ geht nicht mit einer Beeinträchtigung der Redoxaktivität einher**

Wir konnten zeigen, dass die Behandlung von akut isolierten hippokampalen Schnitten mit oligomerem A $\beta$  keine Reduktion des MTT-Umsatzes auslöst. Unsere weiteren Untersuchungen an OHC und *in-vivo* ließen ebenfalls keine Beeinträchtigung des MTT-Umsatzes durch A $\beta$  erkennen. Dies ist insofern beachtenswert, als dass der MTT-Test eine sehr häufig verwendete und anerkannte Methode zur Messung früher A $\beta$ -vermittelter Toxizität ist (Yamazaki et al., 2009; Ma et al., 2009; Fisichella et al., 2009; Matharu et al., 2009).

Sie wurde bisher jedoch ausschließlich in Einzelzellkultur angewendet. In dieser Arbeit wurde der MTT-Test zum ersten Mal in neuronalen Gewebekulturen untersucht und es zeigte sich, dass der A $\beta$ -MTT-Effekt nicht in komplexem Gewebe auftritt (Rönicke et al., 2008). Anhand der immunhistochemischen Färbungen wurde die Anwesenheit von A $\beta$  in den Hippokampusschnitten, beziehungsweise im Gehirn, dargestellt und somit ausgeschlossen, dass der fehlende MTT-Effekt lediglich auf einer Diffusionsstörung des A $\beta$ -Peptids beruht. Desweiteren wurde mit der Störung der LTP in akut isolierten hippokampalen Schnitten und mit der Aktivierung der Astrozyten in den OHC eine physiologische Wirksamkeit von A $\beta$  angezeigt. Somit wäre eine Störung des MTT-Umsatzes wahrscheinlich gewesen, wenn sich die Gewebekulturen wie die vereinzelter Zellen verhalten hätten. Die gegensätzliche Beobachtung in den verschiedenen Modellsystemen kann verschiedene Ursachen haben. Anscheinend unterscheiden sich kultivierte vereinzelter Zellen von denen, die im intakten neuronalen Netzwerk verschaltet sind, wie es bei OHC und akut isolierten hippokampalen Schnitten größtenteils der Fall ist, hinsichtlich bestimmter Eigenschaften, die für den A $\beta$ -MTT-Effekt verantwortlich sind. Dies könnten zum Beispiel unterschiedliche Membranlipide sein (Lane et al., 2005) oder die Zell-Zell-Interaktion zwischen Neuronen und Astrozyten.

Schon 2005 wurde der MTT Test von Wogulis et al. als zuverlässigen Toxizitätsmarker im Zusammenhang mit A $\beta$  in Frage gestellt (Wogulis et al., 2005), denn die Resultate des MTT Tests konnten durch Zelltoxizitätstests nicht bestätigt werden. Darüberhinaus weisen unsere Daten darauf hin, dass die physiologischen Veränderungen, die in den reduzierten MTT Umsatz von Einzelzellen resultieren, nicht in komplexeren Gewebe auftreten und somit ein Einzelzellartefakt darstellen können.

### **4.3 Der Abfall der synaptischen Basisaktivität durch A $\beta$**

Es konnte gezeigt werden, dass A $\beta$  eine Reduktion des fEPSP bewirkt. Dieser Effekt trat etwa vier Stunden nach der A $\beta$ -Behandlung auf und erreichte sein Maximum etwa 6 Stunden nach Applikation des A $\beta$ . Da wir, wie bereits in Abschnitt 4.1 diskutiert, eine Tetanus-abhängige Störung der LTP beobachteten, kann dieser Basislinienabfall kein Grund für die verminderte LTP sein. Denn sonst wären alle Induktionsformen der LTP gleichermaßen von A $\beta$  beeinflusst. Somit stellt der Effekt von A $\beta$  auf das unpotenzierte fEPSP einen von der LTP unabhängigen Schädigungsmechanismus dar und soll im Folgenden erörtert werden. Für den Abfall der synaptischen Basisaktivität können mehrere Mechanismen verantwortlich sein.

Da mit den MTT-Versuchen eine Zytotoxizität des A $\beta$  bereits ausgeschlossen wurde, kann A $\beta$  die synaptische Aktivität nur funktionell stören. Dies ist über eine Verminderung der präsynaptische Transmitterausschüttung oder über eine Reduzierung der postsynaptischen Antwort möglich. Ersteres wurde im Zusammenhang mit A $\beta$  für die P/Q Kalziumkanäle beschrieben. Nimmrich et al. 2008 beobachtete mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik eine Inhibition der spontanen miniature EPSP (mEPSP) in Neuronen. Die kanalspezifische Analyse ergab eine Reduktion der P/Q Kalziumkanalströme, womit der Effekt auf die mEPSP erklärt wurde. Eine Reduktion der Aktivität der P/Q Kalziumkanäle würde im hippocampalen Schnitt zu einem verminderten Kalziumeinstrom in die Präsynapse und somit zu einer verringerten Transmitterausschüttung führen. Dies wäre als ein verkleinertes evoziertes synaptisches Potential, also einer reduzierten synaptischen Aktivität, messbar. Wir beobachteten jedoch einen Rückgang der synaptischen Aktivität etwa 1 h nach der A $\beta$  Applikation der sein Maximum nach etwa 3,5 h erreicht, während Nimmrich et al. einen sofortigen Effekt beobachtete. Dieser Unterschied könnte in einer verlangsamten Wirkung des A $\beta$  im hippocampalen Schnitt, bedingt durch eine erschwerte Diffusion, liegen. Neben der präsynaptischen Veränderung könnte auch die Postsynapse durch A $\beta$  beeinflusst sein. So wurde ein Rückgang von oberflächlichen AMPA-Rezeptoren in APP überexprimierenden Neuronen beobachtet (Hsieh et al., 2006). Dieser Effekt beruht auf eine erhöhte Internalisierung der AMPA Rezeptoren, der interessanterweise mechanistische Ähnlichkeiten mit der Langzeitdepression aufweist. Tatsächlich würde eine verringerte Verfügbarkeit von AMPA Rezeptoren im hippocampalen Schnitt zu einer reduzierten synaptischen Antwort führen, denn die Aktivierung der AMPA Rezeptoren ist mit einem Anteil von etwa 90 % die hauptsächliche Komponente des fEPSP. In der Arbeit von Hsieh et al. wurde nicht nur eine Internalisierung der AMPA Rezeptoren beschrieben, sondern diese wurde auch als Initiator für den Rückzug dendritischer Dornen dargestellt. Eine Reduktion dieser subzellulären Strukturen könnte ebenfalls für die Abnahme der synaptischen Basisaktivität verantwortlich sein, denn das fEPSP stellt das Summenpotential von einigen hundert synchron aktivierten Synapsen dar. Dendritische Dornen sind der postsynaptische Anteil von exzitatorischen Synapsen, weshalb ihr Rückzug das fEPSP verkleinern würde. Der Rückzug der dendritischen Dornen kann schon nach 6 h beobachtet werden (Shankar et al., 2007). Somit liefert dieses Phänomen ebenfalls eine plausible Erklärung für den Basislinienabfall in unserem Experiment.

Welcher der drei aufgezählten Mechanismen die Ursache für unsere Beobachtung ist, wurde experimentell nicht aufgeklärt, doch in primären Neuronenkulturen konnten wir tatsächlich eine Verminderung synaptischer Kontakte durch die Applikation oligomeren A $\beta$ s ermitteln.

#### **4.4 Die Reduzierung synaptischer Kontakte durch A $\beta$**

Die von uns beobachtete A $\beta$ -vermittelte Abnahme der synaptischen Kontakte steht im Einklang mit den Arbeiten anderer Gruppen (Shankar et al., 2007 Hsieh et al., 2006). Da die Störung der LTP in einem ähnlichen Zeitrahmen erfasst wurde, kann ein Zusammenhang zwischen der Schädigung synaptischer Plastizität und der Verminderung synaptischer Kontakte vermutet werden. Während die Induktion der LTP mit einer Vergrößerung von dendritischen Dornen einhergeht (Tanaka et al., 2008), konnte jedoch eine Störung der LTP durch A $\beta$  Applikation noch nicht mit einer Verkleinerung oder einem Rückgang der Spines korreliert werden. Ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen beiden Phänomenen besteht jedoch mit der Möglichkeit, dass A $\beta$  LTD-ähnliche Effekte auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass APP überexprimierende Neurone aufgrund der erhöhten A $\beta$ -Produktion eine reduzierte Aktivität aufwiesen und weniger empfindlich für die Induktion einer LTD waren (Hsieh et al. 2006). So wurde geschlussfolgert, dass sich die A $\beta$  Effekte und die LTD gegenseitig ausschließen und somit auf gemeinsamen Mechanismen beruhen könnten. Diese Theorie wird von der Beobachtung der Interaktion von A $\beta$  mit Signalkaskaden, welche von metabotropen Glutamaterezeptoren der Gruppe 1 und 5 (mGluR 1, 5) aktiviert werden, unterstützt (Tyszkiewicz und Yan 2005; Wang et al., 2004). Die Aktivierung des mGluR1, aber auch des mGluR5 kann eine LTD auslösen (Mulkey und Malenka, 1992; Schröder et al., 2008)

Interessanterweise beruht die LTD wahrscheinlich auf einer Internalisierung von synaptischen AMPA Rezeptoren (Carroll et al., 1999). Damit geht ein Rückzug von dendritischen Spines (Nägerl et al., 2004) sowie ein erniedrigtes Spinevolumen einher (Okamoto et al., 2004). Da A $\beta$  ebenfalls eine Internalisierung von AMPAR initiiert, führt dies durch die Ähnlichkeit zu den Mechanismen der LTD vermutlich zu einem Abbau von Spines. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein Rückzug von Spines zu einer Internalisierung von NMDA-Rezeptoren führt (Hsieh et al., 2006), was sich unmittelbar störend auf die LTP auswirken würde.

#### 4.5 Die Verminderung spontaner Netzwerkaktivität durch A $\beta$

In dieser Arbeit wurde ein experimenteller Ansatz entwickelt, um die neuronale Netzwerkaktivität einer primären Neuronenkultur *in-vitro* quantifizieren zu können. Dissoziierte Neurone vernetzen sich mit funktionell aktiven Synapsen innerhalb weniger Tage miteinander. Dann bildet sich ein neuronales Netzwerk aus, das erst spontane und später spontan-synchrone Aktivität entwickelt (Chiappalone et al., 2006). Dieses neuronale Verhalten *in-vitro* ähnelt dem im Gehirn, wo auch ohne externe Afferenzen komplexe Muster synchroner Aktivität generiert werden, wie zum Beispiel Theta- (4–8 Hz) oder Gamma-Wellen (30–70 Hz) (Freeman, 1983).

Die *in-vitro* Netzwerkaktivität kann zum einen mit Hilfe des Mikroelektrodenarrays quantifiziert werden (Eytan und Marom, 2006). Zum anderen wurde 2008 von Cohen et al. die Methode der Spike-assoziierten Kalziumwellenmessung als probate Methode für die Untersuchung und Quantifizierung von Netzwerkeigenschaften vorgestellt (Cohen et al., 2008). Die Methode aufgreifend, erfassten wir eine Reduktion der spontanen Netzwerkaktivität durch A $\beta$ . Diese Beobachtung ist konform mit den kürzlich erschienenen Ergebnissen von Gortz et al. (2009) die mittels Mikroelektrodenarrays ebenfalls eine Verminderung der Netzwerkaktivität durch Applikation von 1 $\mu$ M A $\beta$  (1-42) beschrieben haben.

Da die Neuronenkulturen, genau wie die Analyse der synaptischen Kontakte, 24 h nach der A $\beta$  Applikation auf ihre spontane Aktivität hin untersucht wurden, scheint die Retraktion der Synapsen mit der Abnahme der synchronen Netzwerkaktivität zu korrelieren. Es ist möglich, dass die beiden Phänomene auch in einem kausalen Zusammenhang stehen. Es können jedoch auch, ähnlich der abfallenden evozierten Basisaktivität im hippocampalen Schnitt, andere A $\beta$  Effekte, wie die Hemmung der P/Q Kalziumkanäle oder die Internalisierung der synaptischen AMPA-Rezeptoren, die Ursache für die reduzierte spontane Erregbarkeit der Neuronenkultur sein. Wenn der AMPAR Antagonist DNQX zu einer Neuronenkultur appliziert wird, ist die spontane Aktivität komplett unterdrückt, was die kritische Beteiligung dieser Rezeptoren bei der spontanen Netzwerkaktivität beweist (Cohen et al., 2008). Somit ist die Verminderung der spontanen Aktivität wahrscheinlich durch eine Verringerung der aktivierbaren AMPAR bedingt.

Die funktionelle Relevanz dieses A $\beta$  Effekts kann auf mehreren Ebenen liegen und reicht vom neuronalen Überleben, bis hin zur Kognition. So könnte A $\beta$  langfristig, einen indirekten zytotoxischen Effekt ausüben, indem zum Beispiel durch die Reduktion neuronaler Aktivität die Ausschüttung trophischer und das Überleben fördernder Faktoren (wie BDNF) vermindert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Blockade

der spontanen Netzwerkaktivität zu einem Neuronensterben führt (Fishbein und Segal 2007). Daneben wurde die synchrone Oszillation des neuronalen Netzwerkes im Gehirn als fundamentaler Mechanismus für höhere kognitive Funktionen dargestellt (Fries et al., 2007). So kann die rhythmische Gleichschaltung der Neurone bestimmte Zellen temporär in Verbände zusammenschließen, Umweltreize selektiv verarbeiten und die synaptische Plastizität erleichtern, was der Konsolidierung von Informationen dienen kann (Buzsaki und Draguhn 2004). Eine Verschiebung dieser Netzwerkaktivität durch A $\beta$  kann somit zu einer schnellen Störung der geistigen Leistung führen. Damit könnte es einen von der Fibrillen-Toxizität unabhängigen Weg anhaltenden Zellschädigung geben.

#### **4.6 Die A $\beta$ -vermittelte neuronale Dysfunktion ist abhängig von der Aktivierung NR2B-haltiger NMDA-Rezeptoren**

Wir beobachteten eine Aufhebung der schädigenden A $\beta$  Effekte durch Blockade des NR2B-haltigen NMDA-Rezeptor Subtyps durch Ifenprodil und Ro 25, 6981. Die Beobachtung der kritischen Beteiligung des NMDA(NR2B) bei der A $\beta$ -vermittelten Störung neuronaler Funktion wurde kürzlich von Hu et al. 2009 mit Hilfe von *in vivo* Experimenten bestätigt. Anscheinend bewirkte die Applikation der A $\beta$ -Oligomere eine Überaktivierung dieses Rezeptors, was wiederum entscheidend für die Induktion der neuronalen Dysfunktion war. Diese pathologische Aktivierung des NMDAR(NR2B) kann drei Ursachen haben. Entweder bewirkt A $\beta$  eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration (1), die den NMDAR(NR2B) übererregt, oder A $\beta$ -induziert eine direkte Aktivierung des NMDAR(NR2B) (2) oder die Aktivierung anderer Rezeptoren bewirkt eine seitliche Rezeptormodulation des NMDAR(NR2B) (3). Die erste Möglichkeit (1) gründet auf der Hypothese der Störung des Glutamathaushaltes bei Alzheimerpatienten zur Erklärung der neuronalen Dysfunktion (Abbildung 45).

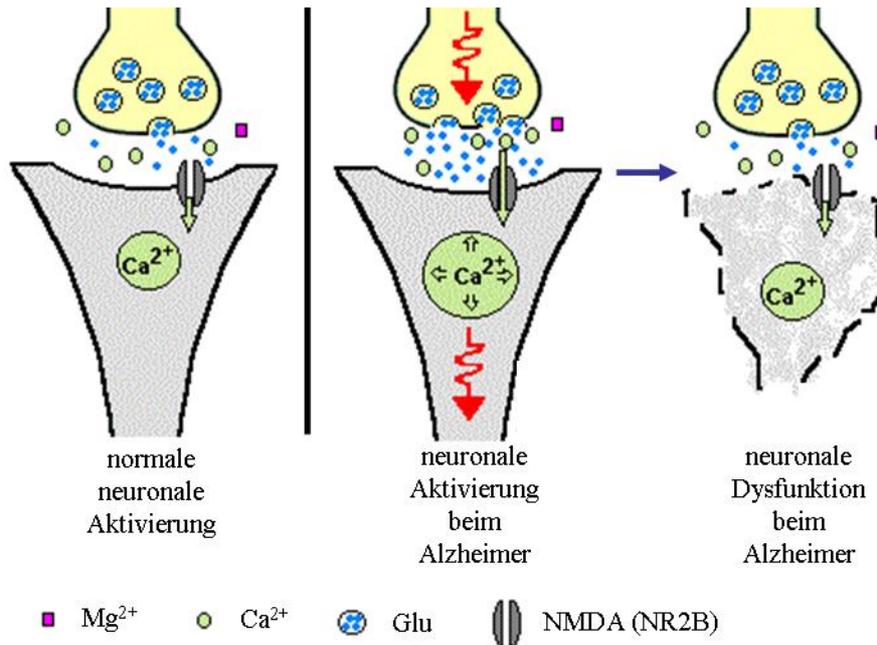


Abbildung 45: Die Störung des Glutamathaushaltes bei Alzheimerpatienten.

Eine erhöhte Glutamatausschüttung oder eine verminderte Glutamatwiederaufnahme führt zu einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration, die eine Übererregung des NMDAR bewirkt und somit eine Kalziumdysregulation auslöst. Dies bewirkt eine neuronale Dysfunktion. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der NR2B-haltige NMDA-Rezeptor maßgeblich an diesem Signalweg beteiligt ist (adaptiert von Butterfield und Pocernich 2003).

Diese erhöhte Glutamatkonzentration muss jedoch nicht zwangsläufig auf einer erhöhten Ausschüttung dieses Neurotransmitters beruhen, sondern kann auch mit seiner reduzierten Glutamatwiederaufnahme begründet werden. Eine der frühesten neuropathologischen Veränderungen im Alzheimergehirn ist die hohe Anzahl reaktiver Astrozyten. Da Astrozyten der wichtigste Zelltyp für die Aufrechterhaltung der synaptischen Glutamatkonzentration sind und ihre Aktivierung im Falle des Alzheimers sehr wahrscheinlich ihre Funktion beeinträchtigt (Frederickson, 1992), kann eine gestörte Glutamataufnahme durch Astrozyten im Alzheimer-geschädigten Gehirn vermutet werden. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Aβ die Aktivität des astrozytären Glutamattransporters 1 (GLT-1) hemmt, was eine deutlich reduzierte Glutamataufnahme durch die Zellen zur Folge hatte (Matos et al., 2008). Für die Experimente dieser Arbeit wurden mit den akut isolierten hippocampalen Schnitten, den organotypischen hippocampalen Schnitten, aber auch mit den neuronalen Primärkulturen, *in vitro* Modelle verwendet, die Astrozyten beinhalten. So ist bei der Messung der spontanen neuronalen Netzwerkaktivität (Abbildung 40) ein Vorhandensein von Astrozyten in der Zellkultur deutlich erkennbar.

Es ist möglich, dass die Applikation der A $\beta$ -Oligomere zu einer generellen Aktivierung der Astrozyten und somit zu einer verminderten Glutamataufnahmekapazität führte, was die extrazelluläre Glutamatkonzentration an den Neuronen erhöhte und den NR2B-haltigen NMDAR übererregte. Darüber hinaus könnte aber auch eine direkte Erhöhung der Glutamatausschüttung durch A $\beta$  für eine gesteigerte Erregung des NMDAR(NR2B) verantwortlich sein. So kann schon die Applikation von 10 nM A $\beta$  1-42 die Glutamataxozytose von neuronalen Axonterminalen signifikant steigern (Bobich et al., 2004). Beide Phänomene, die erniedrigte Glutamatwiederaufnahme, wie auch die erhöhte Glutamatausschüttung könnten die Ursache der A $\beta$  Oligomer-bedingten Glutamatdysregulation sein.

Die zweite Möglichkeit (2) der pathologischen NMDAR(NR2B) Übererregung durch A $\beta$  besteht in der direkten NMDAR Aktivierung durch das Alzheimerpeptid. Bisher konnte jedoch keine direkte Interaktion des A $\beta$ -Peptids mit dem NMDAR nachgewiesen werden, wenn es auch von De Felice et al., 2007 suggeriert wurde, da in dieser Arbeit eine direkte oder zumindest sehr nahe Bindung von A $\beta$  Oligomeren an NMDA-Rezeptoren beobachtet wurde.

(3) Neben dem NMDA-Rezeptor sind mehrere weitere Rezeptoren beschrieben, welche von A $\beta$  gebunden werden können. Dazu zählen der Serpin-Enzym-Komplex-Rezeptor (SEC-R), der Insulin-Rezeptor, RAGE (receptor for advanced glycosylation end-products), FPRL1 (formyl peptide receptor-like 1), APP, p75 Neurotrophin-Rezeptor, CLAC-P/Collagen typ XXV (collagen-like Alzheimer amyloid plaque component precursor/collagen XXV), die Scavenger-Rezeptoren A und BI sowie der nicotinsche Acetylcholin-Rezeptor  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$  nAChR) (Verdier et al. 2004). Die Wirkung der Bindung von A $\beta$  an den  $\alpha 7$  nAChR ist widersprüchlich beschrieben und reicht von einer Aktivierung bis zu einer Inhibition des Rezeptors (Buckingham et al., 2009). Im Allgemeinen wird jedoch von einer A $\beta$ -vermittelten Aktivierung des  $\alpha 7$  nAChR ausgegangen. Darüber hinaus ist kürzlich das zelluläre Prionen-Protein als Bindungsstelle des A $\beta$  beschrieben wurden. Die Bindung des A $\beta$  liegt im nanomolaren Bereich und bewirkt in der Maus eine Störung der neuronalen Plastizität (Laurén et al., 2009). Auch die Inhibierung des Adenosin A(2A) Rezeptors kann A $\beta$ -induzierte Synaptotoxizität verhindern (Canas et al., 2009). Inwieweit die Beeinflussung der einzelnen genannten Rezeptoren für eine LTP-Schädigung ausreicht oder mit der Aktivierung des NMDAR(NR2B) zusammenhängt ist bisher nicht bekannt und soll in nachfolgenden Studien aufgeklärt werden. Zumindest ist die alleinige Blockade des NMDAR(NR2B) ausreichend, den A $\beta$ -Effekt weitgehend zu verhindern.

Vor dem Hintergrund der NMDA-Rezeptorüberaktivierung durch A $\beta$  wird die Frage aufgeworfen, warum die neuronale Dysfunktion mit den subtypspezifischen NR2B-haltigen NMDA-Antagonisten Ifenprodil und Ro 25,6981 verhindert werden konnte. Anscheinend ist die Aktivierung dieses Rezeptors mit einer vornehmlich schädigenden Wirkung verbunden. Wenn dies der Fall ist, muss der NR2B-haltige NMDAR, im Gegensatz zu seinem NR2A-haltigen Gegenstück, hauptsächlich destruktive Signalkaskaden aktivieren. Bisher wurde im Zusammenhang mit der A $\beta$ -vermittelten Neuronenschädigung noch keine vergleichende Studie der NMDAR Subtypen durchgeführt. Hingegen ist ihre womöglich gegensätzliche Rolle bei der schlaganfallbedingten Exzitotoxizität ein zentraler Ansatz verschiedener Arbeiten. So wurde anhand von akut isolierten hippocampalen Schnitten gezeigt, dass eine NMDA-vermittelte Neurotoxizität mit Ifenprodil, jedoch nicht mit dem NR2A Antagonisten (R)-[(S)-1-(4-bromo-phenyl)-ethylamino]-(2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-quinoxalin-5-yl)-methyl]-phosphonic acid blockiert werden konnte (Zhou und Baudry, 2006). Vergleichbare Resultate wurden in einem *in vivo* Schlaganfallmodell der Ratte beschrieben. Die Aktivierung des NR2A haltigen NMDARs schützte die Neurone, während der NR2B Subtyp Zelltod auslöste (Liu et al., 2007). Mit Hilfe eines Modells für Hirntraumata wurde ebenfalls ein protektiver Effekt der NR2A Aktivierung und der NR2B Blockierung beschrieben (DeRidder et al., 2006)). Da die A $\beta$ -vermittelten zellschädigenden Effekte der Exzitotoxizität ähneln (Harkany et al., 2000), kann eine vergleichbare gegensätzliche Einbindung der NMDA-Rezeptorsubtypen in das neuronale Überleben bzw. in neurodegenerative Prozesse angenommen werden. Diese Analogie zwischen dem A $\beta$  Schaden und der Exzitotoxizität findet durch unsere Beobachtung der A $\beta$ -induzierten Aktivierung von Jacob weitere Bestätigung.

#### **4.7 Die A $\beta$ -vermittelte neuronale Dysfunktion korreliert mit der Aktivierung von Jacob**

Die Beschreibung des Proteins Jacob von Dietrich et al. 2008 war ein großer Schritt zum Verständnis der gegensätzlichen NMDAR Effekte bei der Exzitotoxizität. Innerhalb einer Serie von Experimente wurde gezeigt, dass Jacob durch extrasynaptische, NR2B-haltige NMDA-Rezeptoren aktiviert wird und in den Zellkern transloziert. Dort stößt Jacob den „CREB shut-off pathway“ an, das heißt, es bewirkt eine Dephosphorylierung von CREB (Dietrich et al., 2008). Der Transkriptionsfaktor CREB ist einer der wichtigsten nukleären Zielstrukturen des NMDAR, wobei seine Dephosphorylierung zellschädigend ist und somit einen destruktiven Signalweg des NMDAR vermittelt.

Interessanterweise bewirkt die Aktivierung synaptischer NMDAR keine nukleäre Translokation von Jakob und somit auch keine schädigende Dephosphorylierung von CREB. Somit bietet das unterschiedliche Verhalten von Jakob eine Erklärung für die gegensätzlichen NMDAR Effekte. Entscheidend für die Aktivierung von Jakob ist ein moderates Kalziumsignal, wie es durch den extrasynaptischen NMDAR ausgelöst wird. Der Kalziumanstieg durch die Aktivierung synaptischer NMDAR ist stärker und bewirkt somit eine Bindung von Jakob an Caldendrin, was seine Translokation in den Nukleus verhindert. Im Rahmen unserer Experimente konnten wir zeigen, dass Jakob durch A $\beta$ -Oligomere aktiviert wird und in den Zellkern transloziert. Da wir diesen Effekt in neuronalen Primärkulturen und in akut isolierten hippocampalen Schnitten nach A $\beta$  Behandlung beobachten konnten, ist die Aktivierung von Jakob mit den beschriebenen Facetten neuronaler A $\beta$ -vermittelter Dysfunktion korreliert. Wenn auch der Beweis für eine direkte Verbindung der Jakobaktivierung und der A $\beta$ -Effekte fehlt, so gibt es doch deutliche Parallelen zu den von Dietrich et al. beschriebenen neuronalen Konsequenzen des aktivierten Jacobs und den von uns beobachteten A $\beta$ -Wirkungen. Vorrangig dabei ist die Dephosphorylierung von CREB, die durch A $\beta$ -Applikation in neuronaler Primärkultur beschrieben wurde (Tong et al., 2001). Des Weiteren bewirkt Jakob eine Simplifizierung der dendritischen Verzweigungen, sowie eine Retraktion von Synapsen. Wir beobachteten ebenfalls eine Verringerung der Synapsenzahl durch A $\beta$ . Darüber hinaus sind alle A $\beta$ -Effekte durch die Inhibition des NR2B-haltigen NMDAR blockierbar. Eine Inhibition des NR2B-haltigen NMDAR verhindert ebenfalls eine Aktivierung von Jakob (Dietrich et al., 2008). Da gezeigt wurde, dass nur aktivierte extrasynaptische NMDA-Rezeptoren Jakob in den Zellkern treiben, kann auch als Grund für die A $\beta$  Effekte die Aktivierung extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren vermutet werden. Interessanterweise sind NR2B-haltige NMDA-Rezeptoren gleichermaßen synaptisch wie auch extrasynaptisch verteilt (Harris und Pettit, 2007). Da die Aktivierung synaptischer NMDA-Rezeptoren nicht zellschädigend, sondern vielmehr zellschützend ist (Hardingham und Bading, 2003), muss es im pathologischen Alzheimerfall zu einer vornehmlichen Überaktivierung extrasynaptischer NR2B-haltiger NMDAR mit der Konsequenz der CREB-Dephosphorylierung kommen.

Der "CREB shut-off" Signalweg wurde lange Zeit mit rein pathophysiologischen Prozessen wie Epilepsie oder Schlaganfall, die eine exzessive Glutamatausschüttung zur Folge haben, in Verbindung gebracht (Hardingham und Bading, 2003).

Neuere Ergebnisse weisen jedoch auch auf eine physiologische Rolle von extrasynaptischen NR2B-haltigen NMDAR hin. Die physiologische Aktivierung extrasynaptischer NMDAR(2B) bewirkt, wie bei der pathologischen Aktivierung dieses Rezeptors, ebenfalls eine Herunterregulierung der neuronalen Aktivität, jedoch in einem deutlich abgeschwächten Ausmaß. Dieser physiologische Vorgang gliedert sich in den Prozess der homeostatischen Plastizität ein, der unter der pathologischen Wirkung von A $\beta$  dysreguliert sein könnte.

#### **4.8 A $\beta$ als Vermittler homeostatischer Plastizität?**

Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine anhaltende synaptische Aktivierung im physiologischen Rahmen zu einer überhöhten Glutamatausschüttung führt, die auch extrasynaptische Bereiche beeinflussen kann (Pankratov und Krishtal, 2003). Des Weiteren kann eine starke synaptische Erregung zu einer extrasynaptischen Ausschüttung von Glutamat durch Astrozyten führen (Jourdain et al., 2007), die wiederum über die Aktivierung extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren neuronale Aktivität und Plastizität beeinflusst (Haydon und Carmignoto, 2006). Vor diesem Hintergrund wurde Jacob als ein Vermittler homeostatischer Plastizität postuliert (Dietrich et al., 2008). Das Konzept der homeostatischen Plastizität versucht zu erklären, wie ein Neuron über die Zeit in der (Erregungs-) Homeostase verbleiben kann. Neurone sind in Netzwerken verschaltet, die Plastizität nach der Hebb'schen Lernregel aufzeigen. Das heißt, Neurone, die sich gegenseitig häufig erregen, verstärken ihre Übertragungseffizienz und können sich somit noch besser erregen. Ein modellhaftes Beispiel dafür ist die LTP. Langfristig gesehen würde diese Art der Plastizität allein jedoch das gesamte Netzwerk destabilisieren, da die Hebb'schen Plastizität ein positiv rückgekoppeltes System darstellt. Es muss also einen kompensatorischen Mechanismus geben, der die Hebb'schen Plastizität zulässt, langfristig jedoch die neuronale Aktivität, am Beispiel der LTP, wieder herunterreguliert. Dies wird durch die homeostatische Plastizität gewährleistet. Neurone können durch dynamische Anpassung ihrer synaptischen Aktivitäten zu einer langfristigen Stabilisierung des Netzwerkes führen, indem sie sich innerhalb eines durchschnittlichen Erregungsniveaus halten (Abbildung 46).

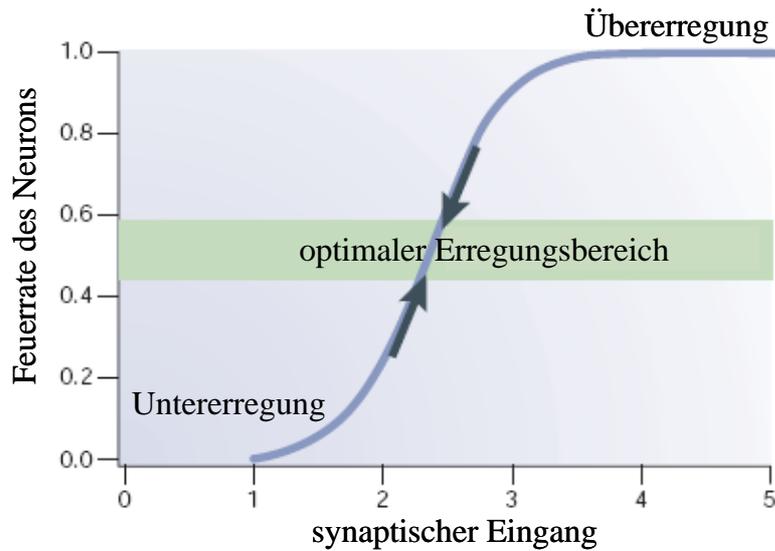


Abbildung 46: Stabilisierung der neuronalen Feuerrate über die globale Regulation der synaptischen Stärke

Dargestellt ist die Beziehung zwischen der synaptischen Stärke und der neuronalen Feuerrate eines Neurons. Wenn der synaptische Eingang ansteigt (zum Beispiel während der LTP durch den Einbau zusätzlicher AMPA Rezeptoren oder durch die Entstehung neuer Synapsen) wird die neuronale Feuerrate irgendwann über den optimalen Bereich steigen. Dann greifen homeostatische Mechanismen (hier durch Pfeile markiert), welche die Stärke aller synaptischen Eingänge herunterregulieren und das Neuron somit zurück in den optimalen Erregungsbereich bringen. Entsprechendes gilt für die synaptische Untererregung (wie zum Beispiel bei der LTD) Adaptiert von Turriano und Nelson 2004

Ein Beispiel dafür ist die anfangs erwähnte starke Glutamatausschüttung im physiologischen Bereich, die auch extrasynaptische NMDA-Rezeptoren aktiviert und eine Auslenkung des Systems in die Übererregung anzeigt. Als Kompensation wird Jacob aktiviert, welches dann CREB dephosphoryliert und somit die synaptische Aktivität herunterreguliert. Also dient dieser Mechanismus der Beibehaltung der neuronalen Homeostase. Interessanterweise könnte A $\beta$  im physiologischen Bereich ähnliche Funktionen erfüllen. Alle A $\beta$ -Effekte, die in dieser Arbeit beschrieben wurden, bedeuten eine Verminderung der generellen neuronalen Aktivität. Dagegen wurde gezeigt, dass eine Erhöhung der neuronalen Aktivität zu einer Steigerung der APP Expression (Tabuchi et al., 2004 ) und der APP Proteolyse führt (Kamenetz et al., 2003). Somit kann ein negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen dem APP und seinem Spaltprodukt A $\beta$  postuliert werden (Kamenetz et al., 2003). Hohe neuronale Aktivität bewirkt einen gesteigerten APP Umsatz, die durch die folglich erhöhte A $\beta$ -Produktion kompensiert wird. A $\beta$  würde diese neuronale Aktivitätsminderung über extrasynaptische NR2B-haltige NMDAR und Jacob vermitteln.

Eine pathologische Auslenkung dieser APP/A $\beta$  Regulation würde die neuronale Netzwerkfunktion beeinträchtigen und somit frühe kognitive Defizite der Alzheimerpatienten auslösen (Palop et al., 2006; Small, 2007).

Das folgende Schema fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen.

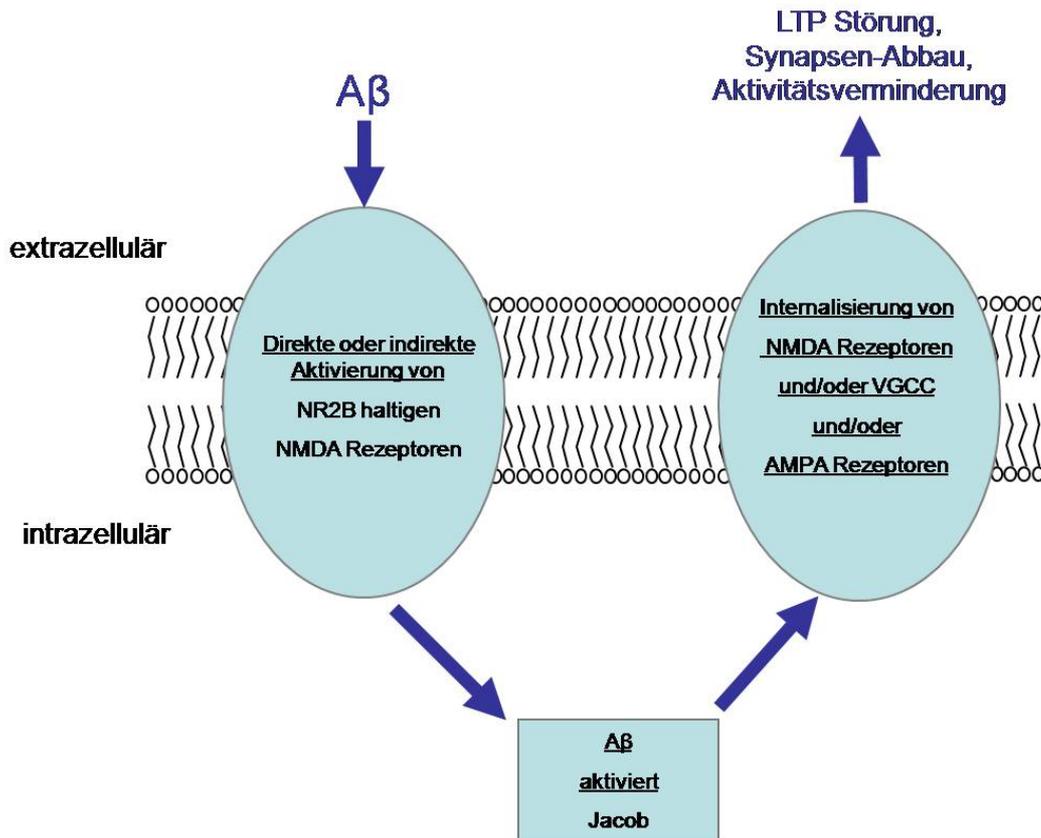


Abbildung 47: Zusammenfassung der A $\beta$  Schädigungskaskade

Neben anderen komplementären Mechanismen, bewirkt A $\beta$  die Übererregung des NR2B-haltigen NMDA. Über eine Aktivierung von Jacob werden (in dieser Arbeit nicht charakterisierte) Rezeptoren beeinflusst, was zu einer generellen Minderung der neuronalen Aktivität führt.

## 5 ABSTRACT

Alzheimer's disease is one of the most challenging health threats of the future society. A pronounced burden of extracellular beta amyloid (A $\beta$ ) Plaques is one pathological hallmark of that disease. Basing on findings in patients with inherited familial Alzheimer's disease, a disturbed metabolism of A $\beta$  is accepted to play a primary role in the disease. Although the metabolism of that protein is well understood, it is still elusive how A $\beta$  cause memory deficits. By means of animal models, A $\beta$  was shown to impair long-term potentiation (LTP), a cellular model of learning and memory. On the molecular level, overactivation of the NMDA-receptor appears to be crucially involved in the A $\beta$  mediated neuronal dysfunction. In the mammalian brain there are four NMDA-receptor subtypes. In pathological scenarios such as ischemia, the NR2B-containing NMDA-receptor subtype appears to be a key mediator of neuronal impairment. The role of that receptor subtype in Alzheimer's disease has not been investigated.

Utilizing acute isolated hippocampal slices from mice, we established and characterized the A $\beta$ -mediated impairment of long-term potentiation. While fibrillar and monomeric A $\beta$  did not affect LTP, the application of so called A $\beta$  oligomers, which are peptide aggregates containing only few A $\beta$  monomers, significantly disturbed LTP. Hence, we could demonstrate the particular potency of oligomeric A $\beta$  to cause neuronal dysfunction. The impairment of neuronal function did not correlate with a reduced cellular redox activity, measured with the MTT reduction assay. Further experiments using primary neuronal cell culture revealed a retraction of synaptic contacts caused by oligomeric A $\beta$ . As a consequence of that, the spontaneous activity of the neuronal network within the cell culture decreased. All these effects could be blocked with the NR2B-containing NMDA-receptor antagonist ifenprodil or Ro 25,6981 suggesting that activation of downstream effectors of these receptors is involved in detrimental actions of Abeta oligomers. In line we found that Jacob, a messenger that can couple extrasynaptic NMDA-receptor activity to neuronal impairment, accumulates in the nucleus after Abeta oligomer administration and that the nuclear accumulation of Jacob can be blocked by a simultaneous application of ifenprodil. Within that work we showed that A $\beta$  induce neuronal dysfunction mainly by activation of NR2B-containing NMDA-receptors. The accompanied activation of Jacob and the global down-regulation of neuronal activity may reflect a common pathological mechanism which down-regulates the neuronal network in an homeostatic way.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Alzheimer Demenz (AD) ist bisher unheilbar und gehört zu den schwerwiegendsten neuronalen Degenerationskrankheiten. Sie stellt mit der steigenden Zahl von Neuerkrankungen und dem hohen Pflegebedarf der Patienten eine der größten sozioökonomischen Herausforderung unserer Zeit dar. Kennzeichnend für die AD sind  $\beta$  amyloid Ablagerungen ( $A\beta$  Plaques) im Gehirn der Betroffenen. Aufgrund von vererbaren Alzheimerfällen wird ein gestörter  $A\beta$ -Metabolismus als primäre Ursache der Krankheit angesehen. Doch obwohl die Biochemie dieses Peptids gut untersucht und verstanden ist, bleibt ungeklärt, über welchen Mechanismus  $A\beta$  die Gedächtnisstörungen im Gehirn auslöst. Anhand von Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass  $A\beta$  die Langzeitpotentierung (LTP), ein zelluläres Korrelat des Lernens, stören kann. Auf der molekularen Ebene scheint eine Überaktivierung des NMDA-Rezeptors bei der Vermittlung der  $A\beta$ -induzierten neuronalen Dysfunktion von entscheidender Bedeutung zu sein. Dieser Rezeptor kommt im Säugerhirn in vier verschiedenen Subtypen vor. Bei pathologischer Schädigung, wie zum Beispiel dem Schlaganfall, wurde vor allem dem NR2B-haltigen NMDA-Rezeptorsubtyp eine zellschädigende Wirkung nachgewiesen. Inwieweit dieser Rezeptor in die  $A\beta$ -vermittelte LTP Störung involviert ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Verminderung der LTP durch  $A\beta$  an akut isolierten hippocampalen Schnitten der Maus etabliert und charakterisiert. Die LTP wurde nur durch Applikation von sogenannten oligomeren  $A\beta$ , einer Zusammenlagerung von wenigen  $A\beta$  Monomeren, gestört, während monomeres und fibrilläres  $A\beta$  keinen Effekt auf die neuronale Plastizität hatte. Somit wurde die besondere Potenz der  $A\beta$  Oligomere, neuronale Dysfunktion auszulösen, belegt. Diese Schädigung der neuronalen Funktion war jedoch nicht mit einer Verminderung der zellulären Redoxaktivität korreliert, was mit Hilfe des MTT Assays gemessen wurde. Weitere Experimente an neuronalen Primärkulturen zeigten einen Rückzug von synaptischen Kontakten durch  $A\beta$  Oligomere. Dies hatte eine Verminderung der spontanen Netzwerkaktivität innerhalb der Zellkultur zur Folge. Alle  $A\beta$  Oligomereffekte konnten mit dem Antagonisten des NR2B-haltigen NMDA-Rezeptors Ifenprodil bzw. Ro 25,6981 aufgehoben werden, womit eine kritische Beteiligung der induzierten Signale dieses Rezeptors bei den  $A\beta$  Effekten belegt wurde. Die besondere Rolle des NR2B-haltigen NMDA-Rezeptors bei der Vermittlung des  $A\beta$  Schadens, fand weitere Unterstützung durch die Beobachtung, dass das Protein Jacob, ein Signalprotein das über die Aktivierung extrasynaptischer NR2B-haltiger NMDA-Rezeptoren Zellschädi-

gung vermittelt, durch A $\beta$  in primären Neuronen, sowie akut isolierten hippocampalen Schnitten aktiviert wurde und in den Zellkern translozierte. Auch die Aktivierung von Jacob konnte durch Koapplikation von Ifenprodil blockiert werden.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass eine initiale A $\beta$  Wirkung mit der Aktivierung des NR2B-haltigen NMDAR einhergeht. Die damit verbundene Aktivierung von Jacob, sowie die generelle Aktivitätsminderung der beeinflussten Neurone kann als ein gemeinsamer Schädigungsmechanismus, der eine homeostatische Herabregulation des neuronalen Netzwerks bewirkt, verstanden werden.

## 7 REFERENZEN

Abbott JJ, Howlett DR, Francis PT, Williams RJ (2008) Abeta (1-42) modulation of Akt phosphorylation via alpha7 nAChR and NMDA receptors. *Neurobiol Aging* 29:992-1001.

Abe K, Saito H (1998) Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res* 31:295-305.

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95:834-847.

Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.

Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.

Bobich JA, Zheng Q, Campbell A (2004) Incubation of nerve endings with a physiological concentration of Abeta1-42 activates CaV2.2(N-Type)-voltage operated calcium channels and acutely increases glutamate and noradrenaline release. *J Alzheimers Dis* 6:243-255.

Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, Sattelle DB (2009) Nicotinic acetylcholine receptor signalling: roles in Alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev* 61:39-61.

Butterfield DA, Pocernich CB (2003) The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS Drugs* 17:641-652.

Buzsaki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304:1926-1929.

Canas PM, Porciúncula LO, Cunha GM, Silva CG, Machado NJ, Oliveira JM, Oliveira CR, Cunha RA (2009) Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*. 29:14741-14751

Carroll RC, Lissin DV, von Zastrow M, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci* 2:454-460.

Cerf E, Sarroukh R, Tamamizu-Kato S, Breydo L, Derclaye S, Dufrene Y, Narayanaswami V, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM, Raussens V (2009) Anti-parallel beta-sheet - a signature structure of the oligomeric amyloid-beta peptide. *Biochem J* 16:43-47

- Chen L, Yamada K, Nabeshima T, Sokabe M (2006) Alpha7 Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in beta-amyloid infused rats. *Neuropharmacology* 50:254-268.
- Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY, Xu L, Duan WH, Xiong ZQ (2008) Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke* 39:3042-3048.
- Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, Xie CW (2000) Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *J Neurosci Res* 60:65-72.
- Cheng IH, Scearce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puolivali J, Lesne S, Ashe KH, Muchowski PJ, Mucke L (2007) Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 282:23818-23828.
- Chiappalone M, Bove M, Vato A, Tedesco M, Martinoia S (2006) Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res* 1093:41-53.
- Clarke RM, O'Connell F, Lyons A, Lynch MA (2007) The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, attenuates the effects of acute administration of amyloid-beta1-42 in the rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacology* 52:136-145.
- Cohen E, Ivenshitz M, Amor-Baroukh V, Greenberger V, Segal M (2008) Determinants of spontaneous activity in networks of cultured hippocampus. *Brain Res* 1235:21-30
- Collingridge G, Bliss T (1995) Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 18:54-56.
- Costello DA, Herron CE (2004) The role of c-Jun N-terminal kinase in the Abeta-mediated impairment of LTP and regulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Neuropharmacology* 46:655-662.
- Dash P, Hebert A, Runyan J (2004) A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res Brain Res Rev* 45:30-37.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282:11590-11601.
- DeRidder MN, Simon MJ, Siman R, Auberson YP, Raghupathi R, Meaney DF (2006) Traumatic mechanical injury to the hippocampus in vitro causes regional caspase-3 and calpain activation that is influenced by NMDA receptor subunit composition. *Neurobiol Dis* 22:165-176.
- Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, Konig I, Landwehr M, Kreutz M, Smalla KH, Richter K, Landgraf P, Reissner C, Boeckers TM, Zuschratter W, Spilker C, Seidenbecher CI, Garner CC, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2008) Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol* 6:e34.

Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, Yan Y, Wang C, Zhang H, Molkenstein JD, Gunn-Moore FJ, Vonsattel JP, Arancio O, Chen JX, Yan SD (2008) Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med* 14:1097-1105.

Echeverria V, Ducatenzeiler A, Dowd E, Jänne J, Grant SM, Szyf M, Wandosell F, Avila J, Grimm H, Dunnett SB, Hartmann T, Alhonen L, Cuellar AC (2004) Altered mitogen-activated protein kinase signaling, tau hyperphosphorylation and mild spatial learning dysfunction in transgenic rats expressing the beta-amyloid peptide intracellularly in hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience* 129:583-592.

Eckert A, Hauptmann S, Scherping I, Meinhardt J, Rhein V, Dröse S, Brandt U, Fändrich M, Müller WE, Götz J (2008) Oligomeric and fibrillar species of beta-amyloid (A beta 42) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice. *J Mol Med* 86(11):1255-1267.

Eytan D, Marom S (2006) Dynamics and effective topology underlying synchronization in networks of cortical neurons. *J Neurosci* 26:8465-8476.

Fishbein I, Segal M (2007) Miniature synaptic currents become neurotoxic to chronically silenced neurons. *Cereb Cortex* 17:1292-1306.

Fisichella M, Dabboue H, Bhattacharyya S, Saboungi ML, Salvétat JP, Hevor T, Guerin M (2009) Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. *Toxicol In Vitro* 23:697-703.

Flavell SW, Greenberg ME (2008) Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31:563-590.

Frederickson RC (1992) Astroglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 13:239-253.

Freir DB, Holscher C, Herron CE (2001) Blockade of long-term potentiation by beta-amyloid peptides in the CA1 region of the rat hippocampus in vivo. *J Neurophysiol* 85:708-713.

Frey U, Morris RG (1998) Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends Neurosci* 21:181-188.

Gault VA, Holscher C (2008) GLP-1 agonists facilitate hippocampal LTP and reverse the impairment of LTP induced by beta-amyloid. *Eur J Pharmacol* 587:112-117.

Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE (1995) Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* 45:223-252.

Gengler S, Gault VA, Harriott P, Holscher C (2007) Impairments of hippocampal synaptic plasticity induced by aggregated beta-amyloid (25-35) are dependent on stimulation-protocol and genetic background. *Exp Brain Res* 179:621-630.

- Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A (2009) Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* 29:10582-10587.
- Gortz P, Opatz J, Siebler M, Funke SA, Willbold D, Lange-Asschenfeldt C (2009) Transient reduction of spontaneous neuronal network activity by sublethal amyloid beta (1-42) peptide concentrations. *J Neural Transm* 116:351-355.
- Freeman WJ (1983) The physiological basis of mental images. *Biol Psychiatry* 18:1107-1125.
- Fries P, Nikolić D, Singer W (2007) The gamma cycle. *Trends Neurosci* 30:309-316.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Gotz J, Ittner LM (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9:532-544.
- Green EM, Barrett CF, Bultynck G, Shamah SM, Dolmetsch RE (2007) The tumor suppressor eIF3e mediates calcium-dependent internalization of the L-type calcium channel CaV1.2. *Neuron* 55:615-632.
- Green KN, LaFerla FM (2008) Linking calcium to Aβeta and Alzheimer's disease. *Neuron* 59:190-194.
- Grover LM, Teyler TJ (1990) Two components of long-term potentiation induced by different patterns of afferent activation. *Nature* 347:477-479.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322-325.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-414.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81-89.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Harkany T, Abraham I, Konya C, Nyakas C, Zarandi M, Penke B, Luiten PG (2000) Mechanisms of beta-amyloid neurotoxicity: perspectives of pharmacotherapy. *Rev Neurosci* 11:329-382.
- Harris AZ, Pettit DL (2007) Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *J Physiol* 584:509-519.

Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009-1031.

Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G (2008) Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet* 17:1750-1761.

Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52:831-843.

Hu NW, Klyubin I, Anwyl R, Rowan MJ (2009) GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent Abeta-mediated synaptic plasticity disruption in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20504-20509.

Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45:583-595.

Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, et al. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331-339.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-937.

Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300:486-489.

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41:345-352.

Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, Spooner ET, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ, Rowan MJ (2005) Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med* 11:556-561.

Klyubin I, Wang Q, Reed MN, Irving EA, Upton N, Hofmeister J, Cleary JP, Anwyl R, Rowan MJ (2009) Protection against Abeta-mediated rapid disruption of synaptic plasticity and memory by memantine. *Neurobiol Aging* 66:153-158.

Knobloch M, Mansuy IM (2008) Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 37:73-82.

Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24:10191-10200.

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796-807.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453.

Lane RM, Farlow MR (2005) Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 134:46949-46968

Laurén J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM (2009) Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 457:1128-1132  
Lee CC, Kuo YM, Huang CC, Hsu KS (2007) Insulin rescues amyloid beta-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *Neurobiol Aging* 43:58-62.

Lee CC, Kuo YM, Huang CC, Hsu KS (2007) Insulin rescues amyloid beta-induced impairment of hippocampal long-term potentiation. *Neurobiol Aging* 43:58-62

Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD (1995) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269:970-973.

Li S, Feig LA, Hartley DM (2007) A brief, but repeated, swimming protocol is sufficient to overcome amyloid beta-protein inhibition of hippocampal long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 26:1289-1298.

Liu ML, Hong ST (2005) Early phase of amyloid beta42-induced cytotoxicity in neuronal cells is associated with vacuole formation and enhancement of exocytosis. *Exp Mol Med* 37:559-566.

Liu Y, Schubert D (1997) Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem* 69:2285-2293.

Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27:2846-2857.

Liu Y, Schubert D (1998) Steroid hormones block amyloid fibril-induced 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) formazan exocytosis: relationship to neurotoxicity. *J Neurochem* 71:2322-2329.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE and Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.

Luth HJ, Apelt J, Ihunwo AO, Arendt T, Schliebs R (2003) Degeneration of beta-amyloid-associated cholinergic structures in transgenic APP SW mice. *Brain Res* 977:16-22.

Lynch M (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.

Ma QL, Harris-White ME, Ubuda OJ, Simmons M, Beech W, Lim GP, Teter B, Frautschy SA, Cole GM (2007) Evidence of Abeta- and transgene-dependent defects in ERK-CREB signaling in Alzheimer's models. *J Neurochem* 103:1594-1607.

Ma R, Xiong N, Huang C, Tang Q, Hu B, Xiang J, Li G (2009) Erythropoietin protects PC12 cells from beta-amyloid(25-35)-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Neuropharmacology* 56:1027-1034.

Maelicke A, Schratzenholz A, Samochocki M, Radina M, Albuquerque EX (2000) Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 113:199-206.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.

Matharu B, Gibson G, Parsons R, Huckerby TN, Moore SA, Cooper LJ, Millichamp R, Allsop D, Austen B (2009) Galantamine inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity. *J Neurol Sci* 280:49-58.

Matos M, Augusto E, Oliveira CR, Agostinho P (2008) Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience* 156:898-910.

Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE (1992) Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 12:376-389.

Minogue AM, Lynch AM, Loane DJ, Herron CE, Lynch MA (2007) Modulation of amyloid-beta-induced and age-associated changes in rat hippocampus by eicosa-pentaenoic acid. *J Neurochem* 103:914-926.

Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-975.

Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44:759-767.

Nimmrich V, Grimm C, Draguhn A, Barghorn S, Lehmann A, Schoemaker H, Hillen H, Gross G, Ebert U, Bruehl C (2008) Amyloid beta oligomers (A00 beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J Neurosci* 28:788-797.

Nomura I, Kato N, Kita T, Takechi H (2005) Mechanism of impairment of long-term potentiation by amyloid beta is independent of NMDA receptors or voltage-dependent calcium channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 391:1-6.

- Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 7:1104-1112.
- Palop J, Chin J, Mucke L (2006) A network dysfunction perspective on neurodegenerative diseases. *Nature* 443:15-18.
- Pankratov YV, Krishtal OA (2003) Distinct quantal features of AMPA and NMDA synaptic currents in hippocampal neurons: implication of glutamate spillover and receptor saturation. *Biophys J* 85:3375-3387.
- Parsons CG, Stöffler A, Danysz W (2007) Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* 53:699-723.
- Pitschke M, Prior R, Haupt M, Riesner D (1998) Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med* 4:832-834.
- Pohle W, Reymann KG, Jork R, Malisch R (1986) The influence of experimental conditions on the morphological preservation of hippocampal slices in vitro. *Biomed Biochim Acta* 45:1145-1152.
- Puzzo D, Vitolo O, Trinchese F, Jacob JP, Palmeri A, Arancio O (2005) Amyloid-beta peptide inhibits activation of the nitric oxide/cGMP/cAMP-responsive element-binding protein pathway during hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 25:6887-6897.
- Puzzo D, Arancio O (2006) Fibrillar beta-amyloid impairs the late phase of long term potentiation. *Curr Alzheimer Res* 3:179-183.
- Reymann KG, Frey JU (2007) The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, 'synaptic tagging', 'late-associativity' and implications. *Neuropharmacology* 52:24-40.
- Rogawski MA, Wenk GL (2003) The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drug Rev* 9:275-308.
- Rönicke R, Klemm A, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reymann KG (2008) Abeta mediated diminution of MTT reduction-an artefact of single cell culture? *PLoS One* 3(9):e3236.
- Rosenzweig ES, Barnes CA (2003) Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol* 69:143-179.
- Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Hu NW, Anwyl R (2007) Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction. *Biochem Soc Trans* 35:1219-1223.
- Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S (1995) Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14:457-466.

Schmid AW, Freir DB, Herron CE (2008) Inhibition of LTP in vivo by beta-amyloid peptide in different conformational states. *Brain Res* 1197:135-142.

Schröder UH, Müller T, Schreiber R, Stolle A, Zuschratter W, Balschun D, Jork R, Reymann KG (2008) The potent non-competitive mGlu1 receptor antagonist BAY 36-7620 differentially affects synaptic plasticity in area cornu ammonis 1 of rat hippocampal slices and impairs acquisition in the water maze task in mice. *Neuroscience* 157:385-395.

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

Selkoe DJ. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866-2875.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-842.

Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL (1994) Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1470-1474.

Shen Y, He P, Zhong Z, McAllister C, Lindholm K (2006) Distinct destructive signal pathways of neuronal death in Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 12:574-579.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760.

Small DH (2007) Neural network dysfunction in Alzheimer's disease: a drug development perspective. *Drug News Perspect* 20:557-563.

Smith JP, Lal V, Bowser D, Cappai R, Masters CL, Ciccotosto GD (2009) Stimulus pattern dependence of the Alzheimer's disease amyloid-beta 42 peptide's inhibition of long term potentiation in mouse hippocampal slices. *Brain Res* 1269:176-184.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8:1051-1508.

Tabuchi A, Ishii A, Fukuchi M, Kobayashi S, Suzuki T, Tsuda M (2004) Activity-dependent increase in beta-amyloid precursor protein mRNA expression in neurons. *Neuroreport* 15:1329-1333.

Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H (2008) Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319:1683-1687.

Tarun K, Ahuja J (2007) Hippocampal slice cultures integrated with multi-electrode arrays: a model for study of long-term drug effects on synaptic activity. *Drug Dev Res* 68:84-93.

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

Tomba P, Baki A, Schad E, Friedrich P (1996) The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain. *J Biol Chem* 271:33161-33164.

Tong L, Thornton PL, Balazs R, Cotman CW (2001) Beta-amyloid-(1-42) impairs activity-dependent cAMP-response element-binding protein signaling in neurons at concentrations in which cell survival is not compromised. *J Biol Chem* 276:17301-17306.

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

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

Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5:97-107.

Tyszkiewicz JP, Yan Z (2005) Beta-Amyloid peptides impair PKC-dependent functions of metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortical neurons. *J Neurophysiol* 93:3102-3111.

Verdier Y, Zaránci M, Penke B (2004) Amyloid beta-peptide interactions with neuronal and glial cell plasma membrane: binding sites and implications for Alzheimer's disease. *J Pept Sci* 10:229-248.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.

Wang Q, Walsh DM, Rowan MJ, Selkoe DJ, Anwyl R (2004) Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci* 24:3370-3378.

Walsh D, Klyubin I, Shankar GM, Townsend M, Fadeeva JV, Betts V, Podlisny MB, Cleary JP, Ashe KH, Rowan MJ, Selkoe DJ (2005) The role of cell-derived

oligomers of Abeta in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention *Biochem.Soc.Trans* 33:1087-1090

Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101:1172-1184.

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215:1237-1239.

Wisniewski KE, Dalton AJ, McLachlan C, Wen GY, Wisniewski HM (1985) Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology* 35:957-961.

Wogulis M, Wright S, Cunningham D, Chilcote T, Powell K, Rydel RE (2005) Nucleation-dependent polymerization is an essential component of amyloid-mediated neuronal cell death. *J Neurosci* 25:1071-1080.

Wong PT, Schauerte JA, Wisser KC, Ding H, Lee EL, Steel DG, Gafni A (2009) Amyloid-beta membrane binding and permeabilization are distinct processes influenced separately by membrane charge and fluidity. *J Mol Biol* 386:81-96.

Wunder A, Klohs J, Dirnagl U (2009) Non-invasive visualization of CNS inflammation with nuclear and optical imaging. *Neuroscience* 158:1161-1173.

Wyss-Coray T (2006) Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med* 12:1005-1015.

Yamazaki M, Chiba K, Yoshikawa C (2009) Genipin suppresses a23187-induced cytotoxicity in neuro2a cells. *Biol Pharm Bull* 32:1043-1046.

Yan SD, Bierhaus A, Nawroth PP, Stern DM (2009) RAGE and Alzheimer's Disease: A Progression Factor for Amyloid-beta-Induced Cellular Perturbation? *J Alzheimers Dis* 16:833-843.

Yang Y, Zhou Q, (2009) Spine modifications associated with long-term potentiation. *Neuroscientist* 15:464-476.

Ye L, Qiao JT (1999) Suppressive action produced by beta-amyloid peptide fragment 31–35 on long-term potentiation in rat hippocampus is N-methyl-d-aspartate receptor-independent: it's offset by (-)huperzine A. *Neurosci Lett* 275:187-190.

Zhao D, Watson JB, Xie CW (2004) Amyloid  $\beta$  prevents activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor phosphorylation during hippocampal long-term potentiation. *J Neurophysiol* 92: 2853-2858.

Zhou M, Baudry M (2006) Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci* 26:2956-2963.

Zlokovic BV (2008) New therapeutic targets in the neurovascular pathway in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5:409-414.

## **DANKSAGUNG**

Die Mithilfe vieler Personen trug entscheidend zum Entstehen dieser Doktorarbeit bei.

Ich danke

Herrn Prof. Reymann für die vorbildliche und einsatzfreudige Betreuung meiner Arbeit, die erst durch sein stetiges Interesse am Fortgang, seine erfahrenen und hintergründigen Kommentare und Vorschläge und nicht zuletzt durch die Bereitstellung des interessanten Themas ermöglicht wurde.

Herrn Dr. Schröder für die ständige Diskussionsbereitschaft, unermüdliche Unterstützung und hervorragende Betreuung. Nicht nur sein umfangreiches Fachwissen, sondern auch sein großer beruflicher Erfahrungsschatz brachte mir das wissenschaftliche Denken und Handeln näher.

Frau Katrin Böhm für die unermüdliche technische Beratung und Unterstützung, sowie für die qualitativ stets hochwertigen Präparationen.

Meinen wissenschaftlichen Mitstreitern und Kollegen des FAN und der Projektgruppe Neuropharmakologie. Das freundliche und enthusiastische Arbeitsklima wirkte äußerst motivierend.

Meinen Kooperationspartnern Frau Dr. Mikhaylova, Frau Dr. Meinhardt, Herrn Dr. Fändrich, Herrn Prof. Reiser und Herrn Dr. Kreutz. Die Zusammenarbeit mit diesen exzellenten Wissenschaftlern eröffnete mir neue wissenschaftliche Wege und Perspektiven. Ganz besonders meiner Frau Sabine Rönicke und meiner Familie. Sie stützten und stärkten mich, auch jenseits des Labors. Der gemeinsame Alltag mit meiner Frau, ihre tröstenden Umarmungen, ihr geduldiges Zuhören und das beruhigende Wissen um ihre ständige Nähe halfen mir ungemein. Meine Familie Heidi und Helmut Rönicke sowie Jana Hoffmann waren während meiner gesamten Arbeit moralisches Rückgrat, spendeten seelischen Halt und familiäre Wärme.

Und nicht zuletzt meinen beiden Söhnen Marvin und Simen die mich als Biologen gelehrt haben, das Wunder der Natur mal ganz praktisch zu erfahren.

## PUBLIKATIONEN

1. Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of Abeta Pathogenicity.  
Friedrich RP, Tepper K, **Rönicke R**, Soom M, Westermann M, Reymann K, Kaether C, Fändrich M. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Feb 2;107(5):1942-7. Epub 2010 Jan 19.
2. Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors.  
**Rönicke R**, Mikhaylova M, Rönicke S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG.  
Neurobiol Aging. 2010 Feb 2.
3. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger modulates long-term potentiation in rat hippocampal slices.  
**Rönicke R**, Schröder UH, Böhm K, Reymann KG.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2009 Mar;379(3):233-9. Epub 2008 Oct 30.
4. Abeta mediated diminution of MTT reduction--an artefact of single cell culture?  
**Rönicke R**, Klemm A, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reymann KG.  
PLoS One. 2008 Sep 18;3(9):e3236.
5. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege.  
Neumann J, Sauerzweig S, **Rönicke R**, Gunzer F, Dinkel K, Ullrich O, Gunzer M, Reymann KG.  
J Neurosci. 2008 Jun 4;28(23):5965-75.

## LEBENS LAUF

Raik Rönicke  
Diplom-Biologe

\*27.01.1981 in Magdeburg

Sonnenallee 26  
39116 Magdeburg  
Tel.: 0391 6625105  
Email: [roenicke@zenit-magdeburg.de](mailto:roenicke@zenit-magdeburg.de)

**Nationalität**  
deutsch

**Familienstand**  
verheiratet, 2 Kinder

1991-1999

**Schule**  
Gymnasium mit Abitur in Magdeburg

1999-2000

**Grundwehrdienst**  
Sanitäter

Okt 2000- Okt 2002  
Okt 2002- Nov 2005

**Studium**  
Grundstudium Biologie in Halle  
Hauptstudium Neurobiologie in Magdeburg

Okt 2005-Dez 2005

**Auslandsaufenthalt**  
Laborpraktikum zur Erlernung der Patch-Clamp-Technik  
in Bristol/Großbritannien

Seit Jan 2006

**Promotion**  
FAN GmbH und IFN Magdeburg

Seit Feb 2010

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am DZNE Standort Magdeburg