

**Die Bedeutung der NMDA-Rezeptoruntereinheit
NR2B in der Vermittlung synaptotoxischer Effekte
verschiedener Amyloid β -Arten**

von

Franziska Katharina Seeser

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Die Bedeutung der NMDA-Rezeptoruntereinheit
NR2B in der Vermittlung synaptotoxischer Effekte
verschiedener Amyloid β -Arten**

von Franziska Katharina Seeser

aus München

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Angefertigt am Klinikum Rechts der Isar
in der Abteilung experimentelle Anästhesiologie
Mentor: Prof. Dr. Gerhard Rammes

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent: Prof. Dr. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 10. Februar 2018

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Die Alzheimer Krankheit	3
1.1.	Vorkommen	3
1.2.	Formen von Alzheimer	4
1.3.	Verlauf und Symptome	5
1.4.	Neuropathologie.....	7
1.4.1.	Neurofibrilläre Bündel	7
1.4.2.	Amyloid β	9
1.4.2.1.	Amyloid-Kaskaden-Hypothese.....	9
1.4.2.2.	Amyloid β -Arten und Amyloid-Plaques.....	11
2.	N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor	14
2.1.	Aufbau und Funktion des NMDA-Rezeptors	14
2.2.	Zusammenhang zwischen NMDA-Rezeptor und Amyloid β	17
2.3.	Die Bedeutung der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B als therapeutische Zielstruktur	19
3.	Lernen und Gedächtnis	22
3.1.	Synaptische Plastizität und Synaptotoxizität	22
3.2.	Dendritische Dornfortsätze	23
4.	Autophagie.....	26
4.1.	Ablauf und Funktion	26
4.2.	Zusammenhang zwischen Autophagie und Amyloid β	30
5.	Therapieansätze	31
6.	Zielsetzung der Arbeit	34
III.	MATERIAL UND METHODEN	37
1.	Material.....	37
1.1.	Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit	37
1.2.	Herstellung der Testsubstanzen	38
2.	Methoden	38
2.1.	Probengewinnung	38

2.1.1.	Transgene Tiere	38
2.1.2.	Inkubierte Schnitte	40
2.1.2.1.	Präparation von Gehirnschnitten.....	40
2.1.2.2.	Inkubation	40
2.2.	Western Blot	42
2.2.1.	Prinzip	42
2.2.2.	Probenaufbereitung	42
2.2.2.1.	Proteinextraktion.....	43
2.2.2.2.	Proteinbestimmung	43
2.2.2.3.	Probenvorbereitung.....	43
2.2.3.	Auftrennung der Proteine.....	44
2.2.3.1.	Herstellung der Gele	44
2.2.3.2.	Gelelektrophorese	44
2.2.4.	Blotten und Inkubation der Membranen	45
2.2.5.	Auswertung	47
2.3.	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)	48
2.3.1.	Prinzip	48
2.3.2.	Probenaufbereitung	48
2.3.3.	Detektion des humanen Amyloid β 1-42	49
2.4.	Plaque-Färbung	49
2.4.1.	Vorbereitung der Schnitte	49
2.4.2.	Färbung	49
2.4.3.	Mikroskopie und Auswertung.....	50
2.5.	Spine density	51
2.5.1.	Herstellung der Schnitte.....	51
2.5.2.	Mikroskopie und Auswertung der Dendriten	52
2.6.	Statistische Auswertung.....	53
IV.	ERGEBNISSE	54
1.	Transgene Tiere	54
1.1.	NMDA-Rezeptoruntereinheiten.....	54
1.2.	Amyloid β	58
1.2.1.	Humanes $A\beta_{1-42}$	58
1.2.2.	Amyloid-Plaques.....	59
1.3.	Autophagie.....	61

2.	Inkubierte Schnitte	69
2.1.	Autophagie	69
2.1.1.	Autophagiemarker.....	69
2.1.2.	Rapamycin	76
2.2.	Spine density	82
V.	DISKUSSION	89
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	102
VII.	SUMMARY	104
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
IX.	ANHANG	143
1.	Chemikalien und fertige Lösungen	143
2.	Hergestellte Puffer und Lösungen	146
3.	Geräte.....	148
4.	Verbrauchsmaterialien.....	149
5.	Software	150
6.	Graphiken.....	151
X.	LEBENS LAUF.....FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
XI.	DANKSAGUNG.....	163

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A β	Amyloid β
ACh	Acetylcholin
ACSF	<i>Artificial Cerebrospinal Fluid</i>
AD	<i>Alzheimer's Disease</i>
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
Arc	Arktische und schwedische Mutation
Atgs	Autophagie-assoziierte Proteine
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Erdbeschleunigung
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GSK-3b	Glykogensynthase-Kinase 3b
HFIP	Hexafluorisopropanol
HRP	Meerrettich-Peroxidase
kDa	Kilodalton
Klasse III-PI3K	Klasse III-Phosphatidylinositol3-Kinase
LBD	ligandenbindende Domäne
LTP	Langzeit-Potenzierung
LDP	Langzeit-Depression
LC3	<i>Mikrotubule-associated Protein 1 Light Chain 3</i>
MCI	<i>Mild Cognitive Impairment</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR1	NMDA-Rezeptoruntereinheit 1
NR2A	NMDA-Rezeptoruntereinheit 2A
NR2B	NMDA-Rezeptoruntereinheit 2B
NR2B _{het}	Heterozygot im NR2B- Rezeptor
NR2B _{het} /Arc	Heterozygot im NR2B- Rezeptor und mit einer Alzheimer Mutation
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PSEN	Präsenilin
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ulk	Unc-51-like-Kinase
Vps	<i>Vacuolar protein sorting</i>
WT	Wildtyp

I. EINLEITUNG

Bereits im Jahr 1907 entdeckte der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer bei der damals 51-jährigen Patientin Auguste Deter nach ihrem Tod in Gehirnschnitten eine „Einlagerung eines noch nicht näher erforschten pathologischen Stoffwechselproduktes in die Ganglienzelle“ (ALZHEIMER, 1907, S.148). Fast 80 Jahre später wurde dieses Stoffwechselprodukt von Glenner & Wong (1984) isoliert und gereinigt. Sie konnten zeigen, dass das Protein ein 4,2 Kilodalton (kDa) langes Peptid ist, meist bestehend aus 40 oder 42 Aminosäuren, und sie vermuteten, dass es aus einem größeren Vorläuferprotein abgespalten wird. Die Bestätigung erfolgte kurze Zeit später, als es Kang et al. (1987) gelang, das Amyloid-Vorläuferprotein, auch Amyloid-Precursor-Protein (APP) genannt, zu klonieren. Das Peptid, das 1984 isoliert wurde, heutzutage bekannt als Amyloid β ($A\beta$), ist ein Hauptbestandteil der $A\beta$ -Plaques, welche ein charakteristisches pathologisches Merkmal der Alzheimer Krankheit (engl. *Alzheimer's Disease* = AD) sind. Bereits im Jahr 1968 wurde über einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an senilen Plaques im Gehirn von alternden Menschen und dem Risiko, an Demenz zu erkranken, berichtet (BLESSED et al., 1968). Auch in Hunden wurde eine Verbindung zwischen $A\beta$ -Plaques und dem Verlust von kognitiven Fähigkeiten nachgewiesen (CUMMINGS et al., 1996a). Neueste Studien zeigen, dass auch in Schimpansen Amyloid-Plaques nachgewiesen werden können (EDLER et al., 2017). Die $A\beta$ -Peptide sind heutzutage eine der hauptsächlich erforschten Ursachen für die Entstehung der AD. Neuerdings wird jedoch angenommen, dass nicht die unlöslichen Plaques, sondern die löslichen $A\beta$ -Oligomere die eigentlich toxischen Bestandteile sind, die zum Verlust der synaptischen Funktion und letztlich zum Tod der Nervenzellen führen (LAMBERT et al., 1998; SELKOE, 2008).

Nach Schätzungen leiden derzeit in Deutschland ca. 1,6 Millionen Menschen an Demenz, weltweit sogar rund 46,8 Millionen Menschen, wovon ca. 60 % der Fälle durch die AD hervorgerufen werden (DEUTSCHE ALZHEIMER GESELLSCHAFT E.V., 2016). Mehrere Studien zeigen, dass der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor, ein ionotroper Glutamatrezeptor, an der toxischen Wirkung der $A\beta$ -Peptide beteiligt ist (PARSONS et al., 2007; RAMMES et al., 2011). Es wird vermutet, dass das $A\beta$ die Wiederaufnahme von Glutamat in die

Gliazelle verringert und infolgedessen die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt ansteigt. Die Erhöhung der Glutamatkonzentration führt zu einer gesteigerten Aktivierung des NMDA-Rezeptors und daraus folgend zu einem vermehrten Calcium(Ca^{2+})-Einstrom in die Nervenzelle. Die Ca^{2+} -Überladung der Zelle bewirkt einen Verlust der synaptischen Funktion, und letztendlich die Neurodegeneration der Zelle (PARSONS et al., 2007). Im Fokus der Forschung steht insbesondere die NMDA-Rezeptoruntereinheit 2B (NR2B) (RÖNICKE et al., 2011). Dieser wird vor allem in Gehirnarealen, die für Lernen und Gedächtnis verantwortlich sind, dem Kortex und dem Hippokampus, vermehrt exprimiert (GOEBEL & POOSCH, 1999). Eine erhöhte Expression der NR2B-Untereinheit in transgenen Mäusen hat eine verbesserte Gedächtnis- und Lernfähigkeit zur Folge und eine erniedrigte Expression der NR2B-Untereinheit korreliert mit einer reduzierten synaptischen Plastizität (HESTRIN, 1992). In Experimenten zur Langzeit-Potenzierung (engl. *Long Term Potentiation* = LTP) wurde gezeigt, dass selektive NR2B-Rezeptorantagonisten wie Ro-25-6981, Ifenprodil und Radiprodil die toxischen Eigenschaften von A β umkehren können (HU et al., 2009; LI et al., 2011; RAMMES et al., 2011; MATTUSCH et al., 2013).

Schwerpunkt dieser Arbeit sind die NR2B-Untereinheit, der NR2B-Rezeptorantagonist Radiprodil sowie synaptotoxische Effekte, die anhand der *spine density*, sprich der Anzahl an dendritischen Dornfortsätzen und der Autophagie untersucht werden. Die Autophagie, ein intrazellulärer Degradationsprozess, bei dem zytoplasmatische Bausteine in den Lysosomen abgebaut werden, ist entscheidend für die physiologische Funktion der Zelle, um etwa die Proteinhomöostase zu regeln und eine ausreichende Versorgung mit Aminosäuren sicherzustellen oder Energie bereitzustellen (HARRIS & RUBINSZTEIN, 2012). Sie spielt jedoch auch eine wichtige Rolle bei pathologischen Zuständen wie Infektionen, Entzündungen, Krebs oder neurologischen Störungen (WHITE, 2012; CHOI et al., 2013; DERETIC et al., 2013; NIXON, 2013). Es wird schon länger vermutet, dass die Autophagie einen Einfluss auf die Pathologie der AD haben könnte, jedoch wurde dies noch nicht im Detail erforscht (NIXON & YANG, 2011; NILSSON et al., 2013; NIXON, 2013; ULAMEK-KOZIOL et al., 2013; NILSSON & SAIDO, 2014).

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Die Alzheimer Krankheit

1.1. Vorkommen

Die AD ist mit knapp 80 % neben der vaskulären Demenz und sog. Mischformen die häufigste Form der Demenz in der heutigen Zeit (BLENNOW et al., 2006; KARANTZOULIS & GALVIN, 2011; ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). Unter Demenz (lat. *demens* „ohne Verstand“) versteht man ein klinisches Symptom, das durch einen kognitiven Verfall, wie Gedächtnisverlust, Beeinträchtigung der Sprache oder Schwierigkeiten bei der Lösung von Alltags- oder beruflichen Problemen, gekennzeichnet ist und einen starken Einfluss auf das soziale Leben hat. Der kognitive Verfall tritt nicht als Folge eines Deliriums auf und wird nicht primär durch einen anderen medizinischen, neurologischen oder psychiatrischen Zustand hervorgerufen (CHERTKOW et al., 2013). Nach Schätzungen leiden derzeit in Deutschland ca. 1,6 Millionen Menschen an Demenz, weltweit sogar rund 46,8 Millionen Menschen, wovon ca. 60 % der Fälle durch die AD hervorgerufen werden. Jedes Jahr sind rund 300.000 Menschen von der Diagnose Alzheimer betroffen und Experten erwarten einen Anstieg auf ca. 3 Millionen Erkrankte in Deutschland bis zum Jahr 2050 (DEUTSCHE ALZHEIMER GESELLSCHAFT E.V., 2016). Der Grund für den fortlaufenden Anstieg der Krankheit in den Industriestaaten liegt in der stetig älter werdenden Bevölkerung. Mit erhöhtem Alter wächst auch das Risiko, an Demenz zu erkranken. Im Alter von 65 bis 69 Jahren leiden etwa 1,6 % der Europäer an Demenz, ab 85 Jahren bereits mehr als 25 % (EUROPEAN COLLABORATION ON DEMENTIA, 2013). Das geschätzte Risiko, an AD zu erkranken, liegt bei Frauen über 65 Jahren bei etwa 20 % und bei Männern über 65 bei ca. 10% (SESHADRI & WOLF, 2007).

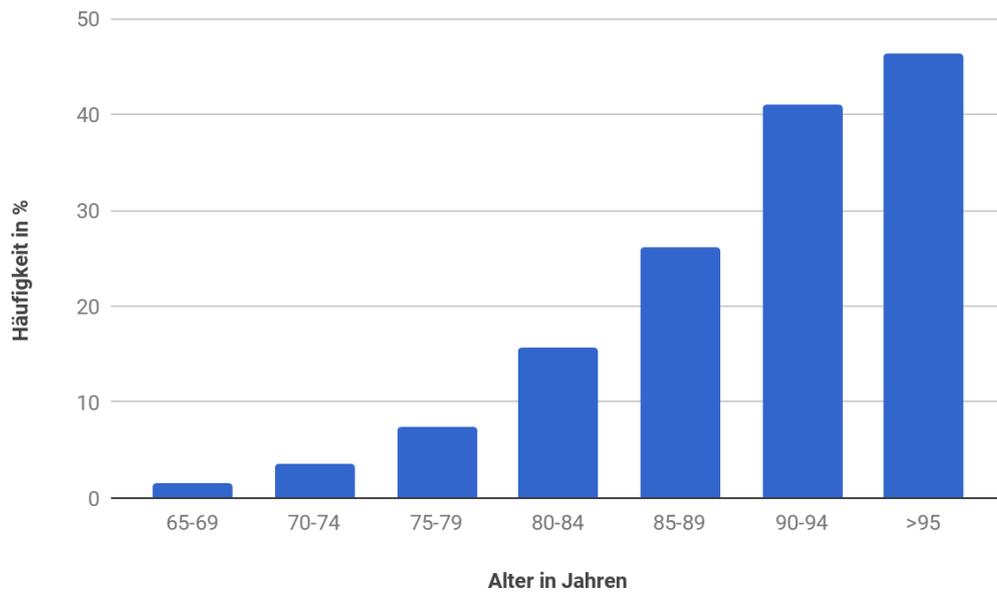


Abbildung 1: Altersabhängige Häufigkeit von Demenz in Europa. Zwischen 65-69 Jahren leiden ca. 1,6 % in Europa an Demenz, ab 85 Jahren bereits mehr als 25%. Eigene Darstellung basierend auf : European Collaboration on dementia (2013).

Die globalen Gesundheitskosten für alle Demenzformen belaufen sich auf rund 600 Milliarden US-Dollar (~ 509 Milliarden Euro) pro Jahr (WIMO et al., 2013). In den USA ist die AD die sechsthäufigste, bei Personen über 65 Jahren sogar die fünfthäufigste Todesursache (KOCHANNEK et al., 2016). Auch bei Tieren, besonders bei Hunden, kann es im Alter zu einer Form von neurodegenerativer Krankheit kommen, die viele Ähnlichkeiten zur AD beim Menschen aufweist (LANDSBERG, 2005). In Gehirnen von Hunden wurden allerdings ausschließlich diffuse Plaques nachgewiesen (CUMMINGS et al., 1993) und keine klassischen Plaques, die neben diffusen Plaques in Gehirnen von Menschen mit AD zu finden sind (PERL, 2010). Das Ausmaß der Plaqueablagerung im Hundehirn korreliert im Gegensatz zum Menschen zudem mit der Stärke der kognitiven Defizite (CUMMINGS et al., 1996b). Neueste Studien zeigen, dass eine AD-ähnliche A β - und Tau-Pathologie auch in Gehirnen von Schimpansen gefunden werden kann und somit nicht nur auf menschliche Gehirne beschränkt ist (EDLER et al., 2017).

1.2. Formen von Alzheimer

Es werden zwei Formen der AD unterschieden: die seltenere familiäre/präsenile Form, an der rund 1-5 % der Patienten leiden, und die häufigere sporadische/senile Form der AD, von der über 95% der Erkrankten betroffen sind (REITZ &

MAYEUX, 2014). Die familiäre Form der AD tritt größtenteils vor dem 65. Lebensjahr auf und ist vorwiegend auf eine von drei Mutationen zurückzuführen, die meist autosomal-dominant vererbt werden: eine Mutation im APP, ein Vorläuferprotein des A β (GOATE et al., 1991), oder eine Mutation entweder im Präsenilin 1 (PSEN1) (LEVY-LAHAD et al., 1995b; LEVY-LAHAD et al., 1995a) oder Präsenilin 2 (PSEN2) (DELABIO et al., 2014). Dabei handelt es sich um wichtige Komponenten der γ -Sekretase, die bei der Bildung von A β aus APP beteiligt ist (SHERRINGTON et al., 1996). Diese Mutationen führen zu einer Überproduktion von A β und den damit verbundenen typischen pathologischen Befunden.

Der größte Risikofaktor, die sporadische Form der AD zu entwickeln, ist das Alter (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). Deshalb wird diese Form der AD meist bei Personen über 65. Jahre, beobachtet. Zu weiteren Risikofaktoren zählen unter anderem Diabetes mellitus Typ II, Herz-Kreislauf-Störungen, Bluthochdruck, Übergewicht oder traumatische Kopfverletzungen (MAYEUX & STERN, 2012). Ein genetischer Risikofaktor, der sowohl zu einer sporadischen als auch zu einer familiären Form der AD führen kann (CHARTIER-HARLIN et al., 1994; HOULDEN et al., 1998), ist eine Modifikation am Apolipoprotein E (ApoE) ϵ 4-Allel (CORDER et al., 1993). ApoE hat einen großen Einfluss auf den A β -Metabolismus, seine Aggregation und Ablagerung. Mehrere Studien konnten zeigen, dass das ϵ 4-Allel, im Vergleich zu den anderen zwei Komponenten des ApoE, dem ϵ 2- und ϵ 3-Allel, weniger effizient arbeitet und den Abbau von A β hemmt (LADU et al., 1994; FITZ et al., 2012).

1.3. Verlauf und Symptome

1984 wurden erstmals diagnostische Kriterien veröffentlicht, die im Jahr 2011 neu überarbeitet wurden, nach denen die AD erkannt und in verschiedene Stadien eingeteilt werden kann (MCKHANN et al., 1984). Nach diesen Kriterien, erfolgt die Einteilung der AD in drei Stadien: eine vorklinische Phase, die leichte kognitive Beeinträchtigung (engl. *Mild Cognitive Impairment* = MCI) und die Alzheimer-Demenz (MCKHANN et al., 2011). Man vermutet, dass die Prozesse, die dazu führen, dass sich eine AD entwickelt, schon lange vor der klinischen Auffälligkeit der Krankheit, beginnen. Diese sog. vorklinische Phase kann mit Hilfe von Biomarkern erkannt werden (BERTI et al., 2016). A β -Ablagerungen können mittels Positronen-Emissions-Tomographie (KLUNK et al., 2004) oder in der

Cerebrospinalflüssigkeit (MATTSSON et al., 2009) nachgewiesen werden, noch bevor sich Symptome entwickeln. Als ein weiteres Diagnosekriterium können erhöhte Tau-Werte in der Cerebrospinalflüssigkeit gemessen werden, die auf eine Neurodegeneration hindeuten (MATTSSON et al., 2009). In der Übergangsphase zur MCI können teilweise schleichende kognitive Veränderungen auftreten (BERTI et al., 2016). Die MCI äußert sich durch eine Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten, die, wenn überhaupt, zu leichten Schwierigkeiten beim Bewältigen von Alltagsaufgaben führen. Um eine MCI infolge der AD zu diagnostizieren, muss diese von anderen Formen einer Demenz, wie z.B. durch vaskuläre, traumatische oder andere medizinische Ursachen, abgegrenzt werden. Des Weiteren muss mindestens einer der oben genannten Biomarker verändert sein (CHERTKOW et al., 2013). Der Unterschied zwischen der MCI und der Alzheimer-Demenz liegt im Schweregrad und Ausmaß der kognitiven Ausfälle und Verhaltensauffälligkeiten (CHERTKOW et al., 2013).

Das häufigste initiale Symptom der AD ist eine schrittweise Verschlechterung der Fähigkeit, sich neue Informationen merken zu können, da die ersten Neuronen, die zerstört werden, meist in Gehirnregionen liegen, die dafür zuständig sind, neue Erinnerungen zu bilden (JAHN, 2013). Später folgen Symptome wie Gedächtnisverluste, die das alltägliche Leben beeinträchtigen, Schwierigkeiten beim Lösen von Alltagsproblemen, Verwirrung in Bezug auf Zeit oder Ort bis hin zu einem Anstieg von Angst und Unruhe, Schlafstörungen, Rückzug aus der Arbeit und sozialen Aktivitäten, Veränderungen der Stimmung und der Persönlichkeit, Apathie und Depression. Im fortgeschrittenen Stadium brauchen Erkrankte Hilfe bei der Bewältigung von Alltagssituationen wie Baden, Anziehen und Essen und verlieren die Fähigkeiten, Familienangehörige zu erkennen oder mit anderen zu kommunizieren (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). Als häufigste Todesursachen von Patienten, die an AD erkrankt sind, gelten Infektionen, insbesondere Pneumonien. Diese treten durch mangelnde Abwehrfähigkeit des Immunsystems und Bewegungsschwierigkeiten auf, die verhindern, dass die Lungen sich richtig entfalten können oder durch Husten gereinigt werden. (BURNS et al., 1990). Eine Aspirationspneumonie, die verbreitetste Form der Pneumonie, kann zudem durch einen verzögerten Schluckreflex hervorgerufen werden, was meist nach Gabe von Neuroleptika auftritt (WADA et al., 2001).

1.4. Neuropathologie

Die Ursachen der AD sind noch weitgehend ungeklärt, Forscher vermuten jedoch als wichtigste Merkmale zwei pathologische Phänomene: hyperphosphoryliertes Tau innerhalb der Nervenzellen als neurofibrilläre Bündel und akkumuliertes A β außerhalb von Neuronen als Amyloid-/senile Plaques (GOEDERT & SPILLANTINI, 2006; REITZ & MAYEUX, 2014).

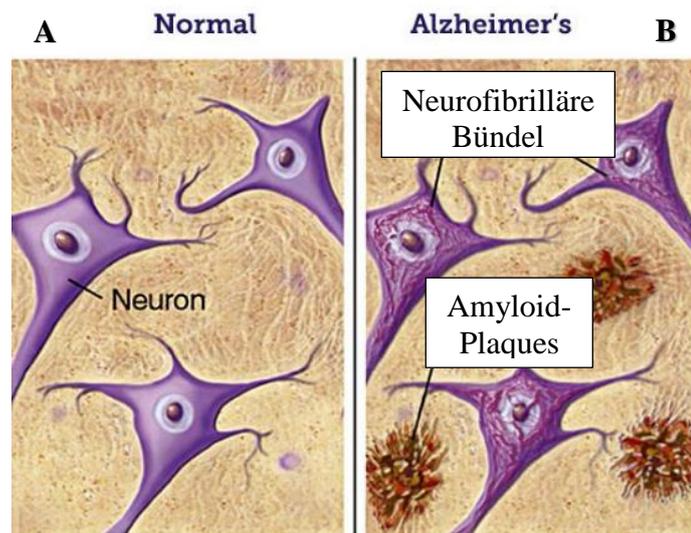


Abbildung 2: Schematische Darstellung der neurofibrillären Bündel und der Amyloid-Plaques. A normales Gehirngewebe ohne Ablagerungen B Gehirngewebe eines an AD erkrankten Menschen mit neurofibrillären Bündeln innerhalb der Neurone und extrazellulären Amyloid-Plaques (BRIGHTFOCUS FOUNDATION, 2017). Medizinische Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Alzheimer's Disease Research, ein BrightFocus Foundation Programm.

Meist wird als Initiator der AD-Pathogenese das A β favorisiert (TANZI & BERTRAM, 2005), und Forscher vermuten sogar, dass die neurofibrillären Bündel als Folge der A β -Pathologie entstehen (JIN et al., 2011). Deshalb wird an dieser Stelle kurz auf das Tau-Protein eingegangen und im weiteren Verlauf der Arbeit der Schwerpunkt auf die A β -Pathologie gelegt.

1.4.1. Neurofibrilläre Bündel

Tau-Proteine gehören zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (WEINGARTEN et al., 1975). Sie kommen vornehmlich in Neuronen vor (SCHOENFELD & OBAR, 1994), wo sie eine wichtige Rolle beim korrekten Zusammenbau von Tubulinmonomeren zu Mikrotubuli spielen (WEINGARTEN et al., 1975). Mikrotubuli sind ein Bestandteil des Zytoskeletts. Sie sind wichtig für

die Stabilität der Zelle und den axonalen Transport (CONDE & CACERES, 2009). Die Phosphorylierung des Tau-Proteins außerhalb der Mikrotubuli-bindenden Domäne, kann die Tubulinzusammenlagerung stark beeinflussen, indem die Affinität zwischen Tau und den Mikrotubuli verändert wird (BUÉE et al., 2000). Bei der AD wird vermutet, dass die Hyperphosphorylierung entweder durch eine erhöhte Kinaseaktivität oder eine Verringerung der Phosphataseaktivität ausgelöst wird (TROJANOWSKI & LEE, 1995). Es ist jedoch nicht geklärt, ob das hyperphosphorylierte Tau bzw. die Tauaggregation dazu führen, dass entweder weniger Tau vorhanden ist und somit pathogen wirkt, es seine Funktion als Stabilisator verliert und den Zusammenbau von Mikrotubuli nicht mehr begünstigen kann oder ob das Tau durch die Phosphorylierung bzw. die Aggregation toxische Eigenschaften erlangt, die zu neuronaler Dysfunktion und Zelldegeneration führt (WOLFE, 2012b).

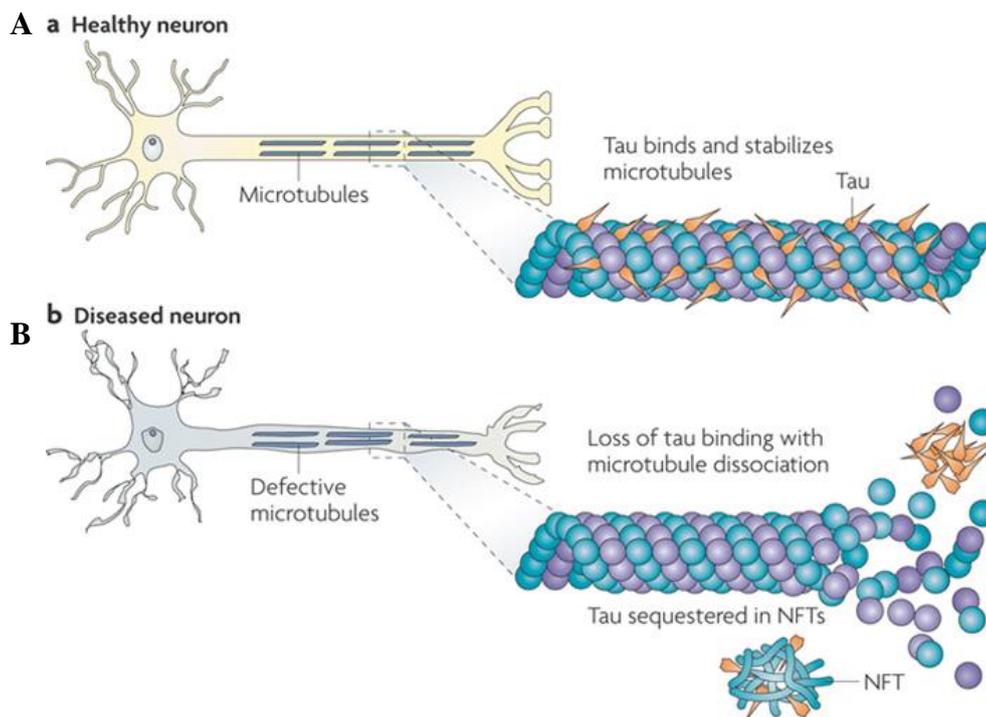


Abbildung 3: Tau in gesunden und in erkrankten Neuronen. A Tau ermöglicht die mikrotubuläre Stabilisation in Zellen und kommt gehäuft in Neuronen vor. Mikrotubuli dienen als Schienensystem für den axonalen Transport von zellulären Bestandteilen. B Beeinträchtigung der Tau-Funktion bei AD. Durch die Hyperphosphorylierung des Tau, wird die Bindungsaffinität zwischen Tau und den Mikrotubuli verändert; zudem lagert sich das hyperphosphorylierte Tau in neurofibrillären Bündeln ab, was zu einer mikrotubulären Instabilität und reduziertem axonalen Transport führt (BRUNDEN et al., 2009). Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

1.4.2. Amyloid β

A β ist ein Peptid, das durch das Schneiden eines Vorläuferproteins, dem APP, entsteht. Die physiologische Aufgabe des A β -Peptids ist noch nicht vollständig geklärt, es gibt jedoch Anhaltspunkte, die vermuten lassen, dass das A β eine wichtige Rolle in der Kontrolle der synaptischen Aktivität spielt (KAMENETZ et al., 2003; ABRAMOV et al., 2009). Eine Inhibition der endogenen A β -Produktion führt zu neuronalem Zelltod. Die Überlebensfähigkeit der Neurone kann jedoch durch physiologische pikomolare Konzentrationen von A β wieder rückgängig gemacht werden (PLANT et al., 2003). Puzzo et al. (2008) konnten nachweisen, dass das Erinnerungsvermögen von Mäusen und die synaptische Plastizität durch A β verbessert werden können. Wegen eines Ungleichgewichts zwischen der Produktion und der Beseitigung des Peptids, sammelt sich A β im Gehirn von AD Patienten an, was zu den charakteristischen Amyloid-Plaques in bestimmten Gehirnregionen führt (KUMMER & HENEKA, 2014).

In den achtziger Jahren wurde das A β -Peptid erstmals sequenziert und als ein potentieller Marker der AD erkannt. Glenner und Wong (1984) konnten zeigen, dass es ein 4,2-kDa langes Peptid ist, meist bestehend aus 40 oder 42 Aminosäuren, und sie vermuteten, dass es aus einem größeren Vorläuferprotein abgespalten wird. Die Bestätigung erfolgte kurze Zeit später, als es Kang et al. (1987) gelang, das APP zu klonieren. Die Identifikation des A β als Hauptbestandteil der extrazellulären Plaques erfolgte durch Wong et al. (1985). Diese Erkenntnisse führten 1992 zu der sogenannten Amyloid-Kaskaden-Hypothese (HARDY & HIGGINS, 1992), die bis heute die Grundlage für viele Forschungsansätze in der Alzheimer-Forschung darstellt.

1.4.2.1. Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese besagt, dass die Bildung, Aggregation und Ablagerung von den für die AD charakteristischen A β -Peptiden, grundlegende Ereignisse in der AD Pathologie darstellen und Neurotoxizität und Neurodegeneration auslösen können. Es wird beschrieben, wie das A β aus einem Vorläuferprotein, dem APP, gebildet wird (HARDY & HIGGINS, 1992; HAASS et al., 2012). Die Hypothese wurde durch die in Kapitel II.1.2. beschriebenen genetischen Störungen, die zu AD führen können, untermauert. Obwohl die Mutationen im genetischen Code des APP nur selten bei AD Patienten vorkommen, liefern sie grundlegende Beweise dafür, dass APP und A β eine entscheidende Rolle

in der Pathologie der AD spielen (THINAKARAN & KOO, 2008). Auch die Mutationen in den Proteinen PSEN 1 und 2, die bei der Bildung der γ -Sekretase von Bedeutung sind, und die Modifikation am ApoE-Gen tragen zu dieser Hypothese bei (HOLTZMAN et al., 2000; KIM et al., 2009; KARRAN et al., 2011). Das APP gehört zu einer Gruppe von *single-pass* Transmembranproteinen, die eine große extrazelluläre Domäne besitzen. Lediglich aus dem APP kann das A β durch weitere Aufspaltung mit Hilfe von zwei Enzymen entstehen (O'BRIEN & WONG, 2011). Die genaue Funktion des APP ist noch nicht im Detail erforscht. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine APP-Überexprimierung einen positiven Einfluss auf Zellgesundheit und -wachstum hat (YOUNG-PEARSE et al., 2007; OH et al., 2009). APP wird in großer Menge in Neuronen produziert (LEE et al., 2008). Je nachdem durch welche Enzyme das APP gespalten wird, kann dies zur Entstehung von A β -Peptiden führen (siehe Abb. 4). An der Zelloberfläche wird das APP durch die α - und γ -Sekretase weiterverarbeitet, was die Produktion von A β verhindert, da das APP innerhalb der A β -Domäne geschnitten wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als nicht-amyloiden Weg (KUHN et al., 2010; KUMMER & HENEKA, 2014). Beim amyloiden Weg wird das APP in Endosomen von der β -Sekretase vor Position eins der A β -Domäne geschnitten, was zur Entstehung einer großen Ektodomäne und eines β -C-terminalen Fragments führt (VASSAR et al., 1999). Durch weitere enzymatische Spaltung der Fragmente durch die α - bzw. γ -Sekretase, entstehen A β -Peptide unterschiedlicher Länge (O'BRIEN & WONG, 2011).

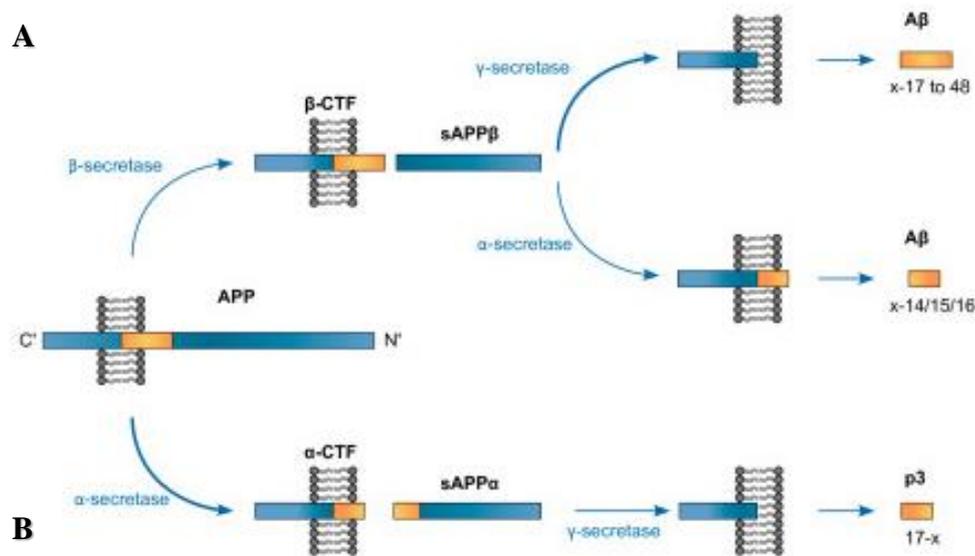


Abbildung 4: Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP). **A** Im amyloiden Weg: wird APP von der β -Sekretase in eine Ektodomäne ($sAPP\beta$) und in ein längeres C-terminales Fragment (β -CTF) geschnitten. Weitere enzymatische Spaltung des β -CTF durch γ - oder α -Sekretase führt zur Entstehung von $A\beta$ -Peptiden. **B** Meistens wird APP jedoch im nicht-amyloiden Weg von der α -Sekretase in eine große Ektodomäne ($sAPP\alpha$) und ein C-terminales Fragment (α -CTF) gespalten und von der β -Sekretase weiterverarbeitet. Dieser Weg führt nicht zur Bildung von $A\beta$, da das APP innerhalb der $A\beta$ -Domäne gespalten wird (KUMMER & HENEKA, 2014). Copyright © 2014 Kummer and Heneka; licensee BioMed Central Ltd., <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

1.4.2.2. Amyloid β -Arten und Amyloid-Plaques

Je nachdem, an welcher Stelle das APP enzymatisch gespalten wird, entstehen $A\beta$ -Arten unterschiedlicher Länge. Die Hälfte der $A\beta$ -Peptide enden an Aminosäure 40, 16 % an Aminosäure 38 und 10 % an Aminosäure 42 (BIBL et al., 2012). Die Länge hat auch einen erheblichen Einfluss auf das selbstaggregierende Potential des $A\beta$ und die daraus resultierende Pathogenität. Die $A\beta$ -Arten, die mit Alanin an Position 42 endet ($A\beta_{1-42}$), hat im Vergleich zu $A\beta_{1-40}$ eine deutlich höhere Tendenz zur Aggregation. Deswegen wird das $A\beta_{1-42}$ auch als treibende Kraft für die Bildung von senilen Plaques und die neurotoxischen Effekte angesehen (HAASS & SELKOE, 2007). Die $A\beta$ -Peptide können posttranslational weiter modifiziert werden. Eines dieser $A\beta$ -Arten ist das pyroglutamat-modifizierte $A\beta$ ($A\beta_{pE3-42}$), das aus einem $A\beta_{1-42}$ entsteht, welches am N-terminalen Ende um zwei Aminosäuren gekürzt und am terminalen Glutamat durch eine Dehydrierungsreaktion zu Pyroglutamat umgewandelt wird (SAIDO et al., 1996). Diese Reaktion kann durch das Enzym Glutaminylzyklase katalysiert werden (SCHILLING et al., 2004), welches bei der AD erhöht ist (SCHILLING et al., 2008). In vitro ist die Toxizität

des $A\beta_{pE3-42}$ ähnlich der des $A\beta_{1-42}$ (TEKIRIAN et al., 1999). Eine weitere modifizierte $A\beta$ -Arten ist das am Tyrosin an Stelle 10 nitrierte $A\beta$ (${}_{3NTyr10}A\beta$), welches eine erhöhte Neigung zur Aggregation besitzt. Es wurde in senilen Plaques nachgewiesen und war sogar in der Lage, die Plaquebildung in transgenen Mäusen zu initiieren, was auf eine zentrale Rolle in der frühen Phase der AD-Pathologie hinweist (KUMMER et al., 2011). Es wird davon ausgegangen, dass der Ursprung des Stickstoffmonoxids das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase 2 ist, welches in AD eine erhöhte Aktivität aufweist (VODOVOTZ et al., 1996; HENEKA et al., 2001). Die $A\beta$ -Varianten, die hauptsächlich in AD-Gehirnen gefunden werden, sind das $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$. Es liegt jedoch auch ein bedeutender Teil an N-terminalen $A\beta$ -Arten in AD-Gehirnen vor, von denen das $A\beta_{pE3-42}$ das am häufigsten vorkommende Peptid darstellt (PEREZ-GARMENDIA & GEVORKIAN, 2013).

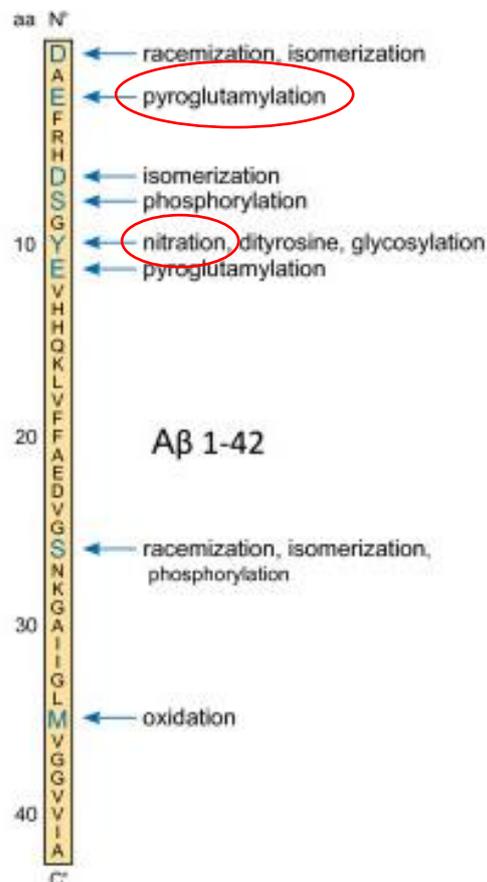


Abbildung 5: Darstellung der posttranslationalen Modifikation des $A\beta_{1-42}$. Die blau markierten Buchstaben stellen den Aminosäurerest dar, an dem die Modifizierung stattfindet. Mit rot sind die posttranslationalen Veränderungen gekennzeichnet, die zu $A\beta_{pE3-42}$ und ${}_{3NTyr10}A\beta$ führen (KUMMER & HENEKA, 2014). Copyright © 2014 Kummer and Heneka; licensee BioMed Central Ltd.,

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

A β -Monomere können aggregieren und verschiedene Arten von Zusammenlagerungen wie Oligomere, Protofibrillen und Amyloidfibrillen bilden. Im Gegensatz zu löslichen A β -Oligomeren, die sich im gesamten Gehirn verteilen, sind Amyloidfibrillen größer und unlöslich und lagern sich zu Amyloid-Plaques zusammen (FERREIRA et al., 2015). Abnormales oder fehlgefaltetes Protein, das im Zytoplasma, im Zellkern oder in extrazellulären Einschlüssen aggregiert, verursacht Schäden an den Organellen oder führt zu einer synaptischen Dysfunktion im Nervensystem (WALKER & LEVINE, 2000). Massive Ansammlungen von sowohl löslichem, als auch nicht-löslichem A β könnten nicht nur wegen der fehlenden APP-Weiterverarbeitung durch die Sekretasen, sondern auch durch ineffizienten Abbau und Neubildung von A β verursacht werden. Eine verringerte Aktivität der A β -abbauenden Enzyme könnten ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau des A β bewirken (HIGUCHI et al., 2005; NALIVAEVA et al., 2008; BATES et al., 2009; NALIVAEVA et al., 2012; FERREIRA et al., 2014; BARANELLO et al., 2015). Ein fehlender Nachweis für eine direkte Verbindung zwischen der Ablagerung der Amyloid-Plaques und dem Gedächtnisverlust bei AD-Patienten zeigt, dass die Neurotoxizität nicht allein durch das unlösliche A β zustande kommen kann (HIGUCHI et al., 2005; BARANELLO et al., 2015). In biochemischen Studien wurde sogar gezeigt, dass es einen klaren Zusammenhang zwischen der Menge an löslichen A β -Oligomeren im Gehirn von AD-Patienten und dem Grad der kognitiven Beeinträchtigung gibt (FERREIRA et al., 2014). Es deutet vieles daraufhin, dass nicht die unlöslichen Ablagerungen wie A β -Fibrillen und Plaques, sondern die löslichen A β -Oligomere die toxischeren Bestandteile darstellen und für die Beeinträchtigung der synaptischen Funktion und der Neurodegeneration verantwortlich sind (HARDY & SELKOE, 2002; KLEIN et al., 2004; GOLDE, 2006). Ein weiteres Indiz dafür, dass die Oligomere eine zentrale Rolle in der AD-Pathologie spielen, ist die durch A β -Oligomere ausgelöste Erhöhung der Phosphorylierung des Tau (DE FELICE et al., 2008).

2. N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor

2.1. Aufbau und Funktion des NMDA-Rezeptors

Synaptische Übertragung ist eine wichtige Funktion im zentralen Nervensystem, um Informationen zu verarbeiten und zu speichern. Synapsen sind spezialisierte Kontaktstellen zwischen Neuronen, bei denen die Freisetzung von Neurotransmittern am präsynaptischen Neuron die Rezeptoren an der postsynaptischen Membran aktiviert. Exzitatorische synaptische Transmission wird im Gehirn von Säugetieren vor allem durch die Aminosäure Glutamat vermittelt, welche zwei verschiedene Untergruppen von Glutamatrezeptoren aktiviert: ionotrope und metabotrope. Die für die AD-Pathologie wichtigen ionotropen Glutamatrezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, das heißt dass die Bindung von Glutamat eine Konformationsänderung der Rezeptoren bewirkt und durch den darauf folgenden Einstrom von Kationen eine Depolarisation in der postsynaptischen Zelle auslöst. Nach ihren pharmakologischen Eigenschaften können diese Rezeptoren weiter unterteilt werden in α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA)-Rezeptoren, Kainatrezeptoren und NMDA-Rezeptoren (TRAYNELIS et al., 2010; VYKLYCKY et al., 2014). Die Familie der NMDA-Rezeptoren, die eine besondere Bedeutung bei der AD hat, besteht aus drei Untereinheiten NR1-3, die wiederum in eine unterschiedliche Anzahl von Subtypen eingeteilt werden. Beim NR1-Rezeptor gibt es bis zu acht Varianten (NR1a-g) (MORIYOSHI et al., 1991), die NR2-Untereinheit wird durch vier (NR2A-D) und die NR3-Untereinheit durch zwei (NR3A und B) Gene kodiert (MONYER et al., 1992). Der NMDA-Rezeptor ist ein Heterotetramer, das aus zwei obligatorischen NR1-Untereinheiten und zwei NR2- und/oder NR3-Untereinheiten (ULBRICH & ISACOFF, 2008) aufgebaut ist. Eine extrazelluläre aminoterminal Domäne ist mit einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne (LBD) verbunden, welche wiederum mit einer transmembranen Domäne verknüpft ist, die den Ionenkanal formt. Die transmembrane Helix kommuniziert mit einer intrazellulären carboxyterminalen Domäne (TRAYNELIS et al., 2010).

Der Großteil der Daten, die zeigen, wie die Signaltransduktion an Glutamatrezeptoren funktioniert, wurde an Kainat- und AMPA-Rezeptoren gesammelt (ARMSTRONG & GOUAUX, 2000; MAYER, 2005). Das Öffnen eines Ionenkanals erfordert drei sequentielle Schritte: Ligandenbindung, Konformationsänderungen, die das Schließen der LBD zur Konsequenz haben und

das Öffnen des Ionenkanals (MAYER & ARMSTRONG, 2004; MAYER, 2006). Diese Prinzipien wurden auch für den NMDA-Rezeptor bestätigt, bei dem die parallele Anwesenheit von zwei Liganden, dem Agonisten Glutamat und dem Koagonisten Glycin oder D-Serin, benötigt wird, um den NMDA-Rezeptor zu aktivieren (FURUKAWA et al., 2005). Glutamat wird an präsynaptischen glutamatergen Synapsen in den synaptischen Spalt freigesetzt. Es aktiviert den NMDA-Rezeptor, indem es zwei Bindungsstellen in der LBD der NR2-Untereinheit besetzt (ERREGER et al., 2007). Das Glutamat im synaptischen Spalt erreicht eine Konzentration von ca. 1 mM, bevor es durch Diffusion und Wiederaufnahme in die Zelle, entfernt wird (BERGLES et al., 1999). Dieser kurzzeitige Glutamatkonzentrationsgradient führt zur phasenweisen Aktivierung des NMDA-Rezeptors. Die hocheffiziente Glutamatwiederaufnahme hält normalerweise die extrazelluläre Glutamatkonzentration in einem Grundzustand von wenigen nM (HERMAN & JAHR, 2007) und verhindert so eine NMDA-Rezeptor-Aktivierung im Ruhezustand.

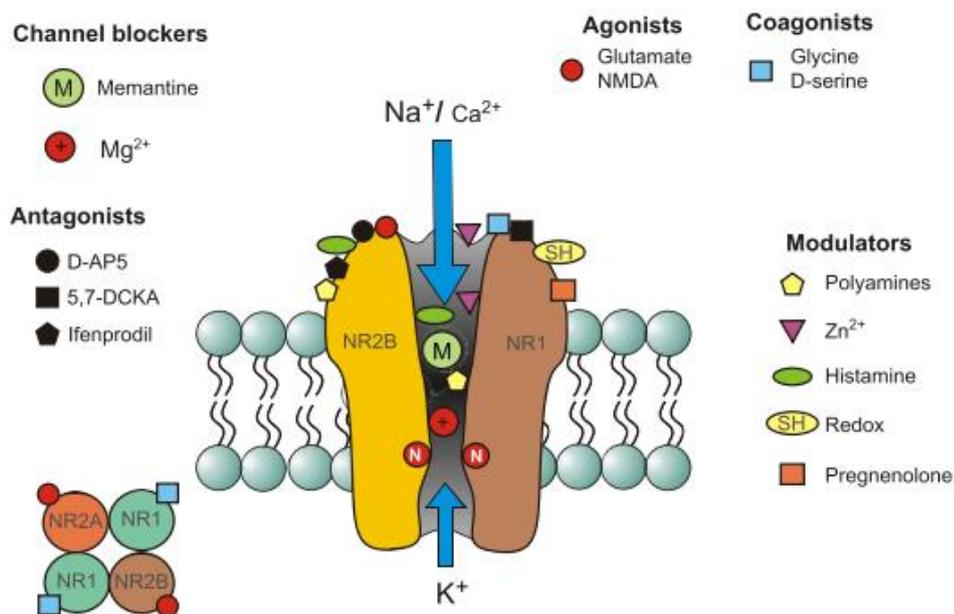


Abbildung 6: Aufbau des NMDA-Rezeptors. Der NMDA-Rezeptor ist ein Tetramer, das aus Zusammenlagerung der Subtypen der NR1-, NR2- oder NR3-Untereinheiten aufgebaut ist. Es sind Bindungsstellen für Agonisten, Koagonisten, Antagonisten und andere Faktoren, die den NMDA-Rezeptor beeinflussen können, dargestellt (PARSONS et al., 2007). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Während sich das Membranpotential im Ruhezustand befindet, wird der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors durch ein Magnesium(Mg^{2+})-Ion blockiert. Eine repetitive Stimulation der AMPA-Rezeptoren führt zu einer Vordepolarisation der Zelle. Sobald der Koagonist und der Agonist an den NMDA-Rezeptor gebunden haben, kommt es durch die starke Depolarisation der postsynaptischen Membran zu einer Verminderung der ladungsbedingten Blockierung des Ionenkanals durch Mg^{2+} (NOWAK et al., 1984), und der Ionenkanal öffnet sich selektiv für Kationen, vor allem Natrium- (Na^+), Kalium- (K^+) und Ca^{2+} -Ionen. Da die relative Permeabilität des Ionenkanals für Ca^{2+} 10 mal höher ist, als die von Na^+ , strömt eine beträchtliche Menge an Ca^{2+} in die Zelle ein (MAYER & WESTBROOK, 1987) und löst so die Signaltransduktion aus. Die physiologische Blockade des NMDA-Rezeptors durch Mg^{2+} ist wichtig für eine fehlerfreie Funktion des Nervensystems, da so die Signale, die durch Lernen entstehen, vom Hintergrundrauschen unterschieden werden können.

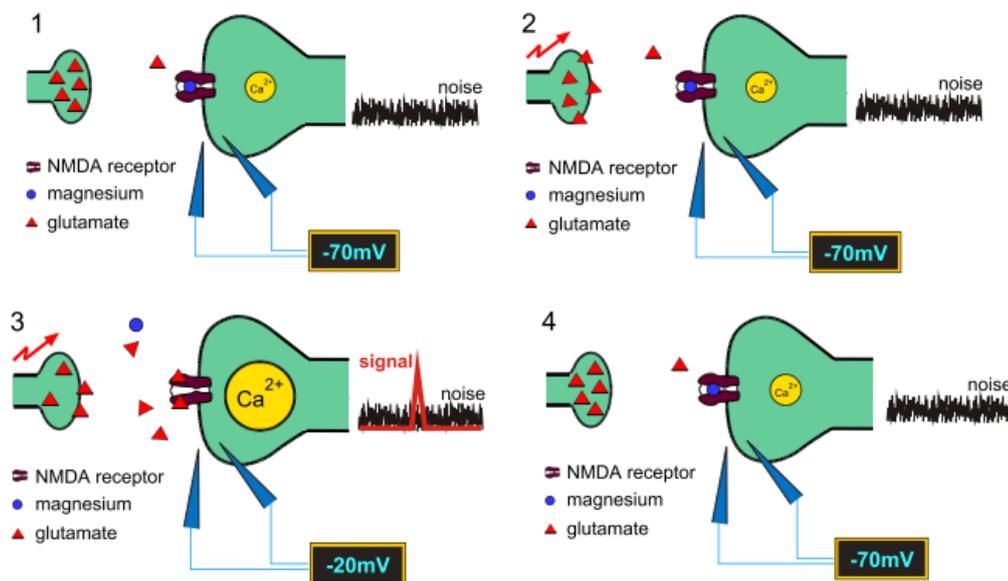


Abbildung 7: Signal-Rauschen und Lernen. Unter normalen Bedingungen ist die synaptische Plastizität abhängig von der Unterscheidung von relevanten Signalen im Gegensatz zu Hintergrundrauschen (PARSONS et al., 2007). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Eine Blockade des NMDA-Rezeptors führt zu einer Beeinträchtigung der neuronalen Plastizität und somit des Lernprozesses (COLLINGRIDGE & BLISS, 1995), während eine Überaktivierung den Zelltod durch einen Ca^{2+} -Überschuss zur Folge hat (CHOI, 1992). Es gibt jedoch Beweise dafür, dass die gestörte NMDA-Rezeptor-Überaktivierung, die z.B durch eine pathologisch bedingte, leichte Erhöhung der Glutamatkonzentration erfolgt, auch Störungen der Plastizität hervorrufen könnte, sogar noch vor der Entwicklung einer Exzitotoxizität (PARSONS et al., 2007).

2.2. Zusammenhang zwischen NMDA-Rezeptor und Amyloid β

Viele neurologische Krankheiten sind mit einer fehlregulierten Glutamatfreisetzung und -aufnahme verbunden (MATTSON, 2003; NYITRAI et al., 2006), die zu einer langfristigen Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration im mikromolaren Bereich führen (PHILLIS & O'REGAN, 2003; HEINRICH et al., 2012). Dieser stetig erhöhte Glutamat Spiegel verursacht eine exzessive tonische Aktivierung der Rezeptoren, die Exzitotoxizität hervorrufen kann (VYKLICKY et al., 2014). Im pathologischen Fall werden NMDA-Rezeptoren durch zwar niedrige, aber unphysiologisch erhöhte Glutamatkonzentrationen dauerhaft aktiviert (BENVENISTE et al., 1984; ANDINE et al., 1991; GLOBUS et al., 1991; BUISSON et al., 1992; MITANI et al., 1992). Durch diese Überaktivierung des Rezeptors wird das Signal-Rauschen erhöht und relevante Signale durch Lernen können vom pathologisch erhöhten Hintergrundrauschen nicht unterschieden und gefiltert werden (PARSONS et al., 2007). Es ist allgemein akzeptiert, dass eine phasische synaptische NMDA-Rezeptoraktivierung notwendig für lernbezogene synaptische Plastizität ist und das glutamaterge System deswegen eine gut regulierte homöostatische Kontrolle braucht (PARSONS et al., 2007). Zahlreiche Hinweise deuten an, dass $\text{A}\beta$ die glutamaterge Aktivität vor allem durch den NMDA-Rezeptor, erhöhen kann (DANYSZ et al., 2000; DANYSZ & PARSONS, 2003; KLEIN et al., 2004; WALSH & SELKOE, 2004).

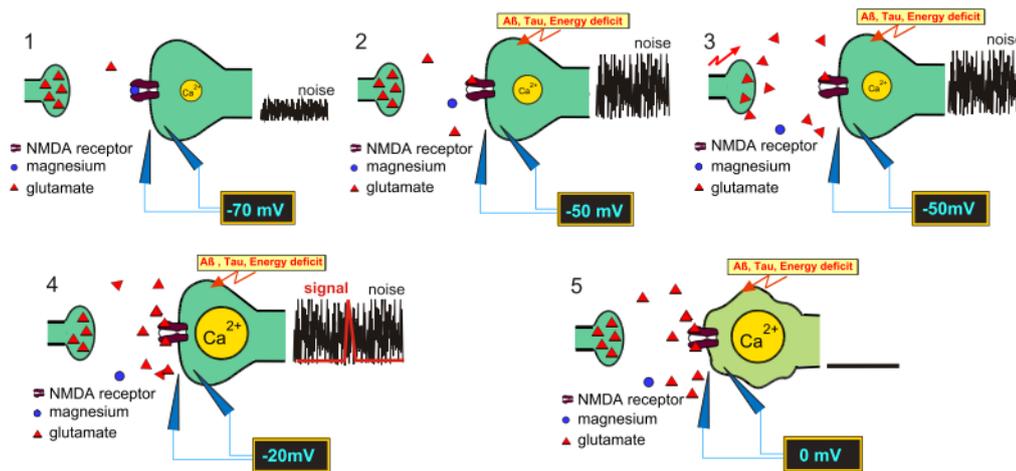


Abbildung 8: Überaktivierung des NMDA-Rezeptors bei AD führt zu erhöhtem Hintergrundrauschen und Verlust von Erkennen relevanter Signale. Durch die tonische Überaktivierung des glutamatergen Systems, wird die Blockade des NMDA-Rezeptors durch Mg²⁺ aufgehoben und relevante Signale durch Lernen können vom pathologisch erhöhten Hintergrundrauschen nicht unterschieden und gefiltert werden (PARSONS et al., 2007). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Unter physiologischen Bedingungen hat APP funktional gesehen antagonistische Effekte auf den NMDA-Rezeptor (FURUKAWA & MATTSON, 1998). Es verbessert die Glutamattransportaktivität und entfernt Glutamat aus dem synaptischen Spalt (MASLIAH et al., 1998). Wenn APP nun wie bei AD vermehrt u.a. zu Aβ metabolisiert wird, entfällt dessen indirekte antagonistische Wirkung, was in einem gesteigerten Glutamatgehalt im synaptischen Spalt resultiert (MATTSON et al., 1993; WU et al., 1995). Aβ kann den NMDA-Rezeptor auch direkt aktivieren (TEXIDÓ et al., 2011) oder die Glutamatfreisetzung erhöhen bzw. die -aufnahme verringern, was, wie bereits erwähnt, zu einer erhöhten Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt führt (HARRIS et al., 1996; NODA et al., 1999) und so die Sensitivität des NMDA-Rezeptors erhöht (PARSONS et al., 2007).

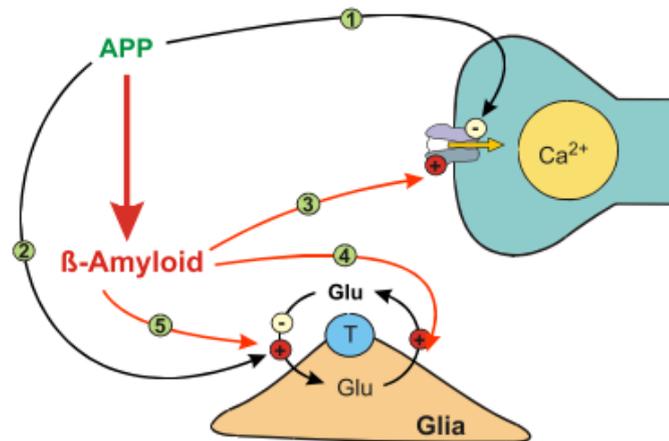


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen A β und dem NMDA-Rezeptor. Schematische Darstellung, wie A β die glutamaterge Aktivität und/oder NMDA-Rezeptoraktivität erhöht, während APP gegenteilige Effekte erzielen könnte (PARSONS et al., 2007). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Des Weiteren wird vermutet, dass eine A β -vermittelte Entzündungsreaktion ebenso die NMDA-Rezeptoraktivität steigern kann. A β aktiviert die Mikroglia und führt zu einer Erhöhung des Tumornekrosefaktors α , was wiederum zur Aktivierung der Mikroglia und zu oxidativem Stress führt. Dadurch wird die Glutamataufnahme erniedrigt und die -abgabe erhöht, was eine Sensitivierung und somit gesteigerte Aktivierung des NMDA-Rezeptors und letztendlich den Tod der Nervenzelle bewirkt (WENK et al., 2006). Zudem konnten Lesne et al. (2005) zeigen, dass eine subtoxische Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch z.B. A β die Expression einer bestimmten Domäne von Proteaseinhibitoren steigert. Diese Domäne bevorzugt die Prozessierung des APP durch die β -Sekretase, wobei die α -Sekretase zudem inhibiert wird, was zu einer weiteren Erhöhung des A β s führt und somit in einem Teufelskreis endet.

2.3. Die Bedeutung der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B als therapeutische Zielstruktur

Wie in Kapitel II.2.1. bereits besprochen, ist der NMDA-Rezeptor ein Heterotetramer, das aus zwei obligatorischen NR1- und zwei NR2 und/oder NR3-Untereinheiten besteht. Die NR1-Untereinheit ist essenziell für den Rezeptor, weswegen Rezeptoren, denen diese Untereinheit fehlt, nicht funktionsfähig sind (CULL-CANDY & LESZKIEWICZ, 2004). Die NR2-Untereinheit dagegen verleiht dem Rezeptor Heterogenität und beeinflusst die charakteristischen Eigenschaften, wie die Öffnungszeit des Kanals, die Ca²⁺-Permeabilität oder die

Sensitivität gegenüber pharmakologischen Substanzen (PAOLETTI et al., 2013). Die meisten NMDA-Rezeptoren sind aus zwei NR1- und mindestens einer NR2-Untereinheit aufgebaut (CULL-CANDY et al., 2001). Die vier NR2-Subtypen haben eine spezielle Aufteilung im Gehirn, die sich im Laufe der Entwicklung verändert. Im embryonalen Stadium findet man den NR2B-Subtyp in den meisten Gehirnregionen, wohingegen der NR2D-Subtyp im Dienzephalon und Hirnstamm ausgeprägt ist. Im ausgewachsenen Gehirn ist der NR2A-Subtyp in den meisten Regionen exprimiert, der NR2C-Subtyp ist auf das Cerebellum beschränkt (NEYTON & PAOLETTI, 2006). Der NR2B-Rezeptor wird im adulten Gehirn primär im Prosencephalon exprimiert (YASHIRO & PHILPOT, 2008) mit hoher Ausprägung im zerebralen Kortex und Hippokampus (MONYER et al., 1994; GOEBEL & POOSCH, 1999; LOFTIS & JANOWSKY, 2003). Der NR2B-Rezeptor kommt somit vor allem in Gehirnregionen vor, die wichtig für den Lernprozess und die Bildung von Erinnerungen sind. Eine erhöhte Expression der NR2B-Untereinheit in transgenen Mäusen hat eine verbesserte Gedächtnis- und Lernfähigkeit zur Folge, eine erniedrigte Expression der NR2B-Untereinheit korreliert mit einer reduzierten synaptischen Plastizität (HESTRIN, 1992).

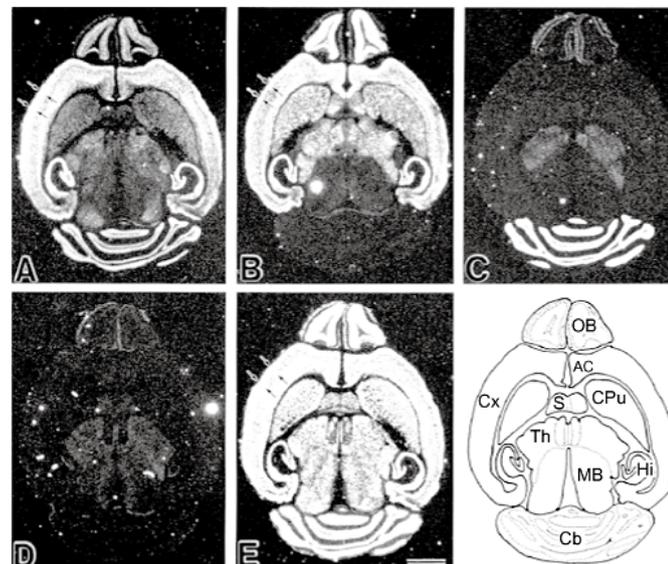


Abbildung 10: Verteilung der NMDA-Rezeptoruntereinheiten im Mausgehirn am Tag 21 postnatal. A NR2A B NR2B: beschränkte Expression der NR2B-Untereinheit auf das Prosencephalon C NR2C D NR2D E NR1

AC Pars anterior des Gyrus cinguli, Cx cerebraler Kortex, Cb Cerebellum, CPu Caudate-Putamen, Hi Hippokampus (MONY et al., 2009). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Es existieren Nachweise, die vermuten lassen, dass Substanzen, die die NR2B-Untereinheit spezifisch blockieren, besser wirken könnten, als solche, die nicht zwischen den Untereinheiten unterscheiden (HARDINGHAM et al., 2002; AMADORO et al., 2006), da die neurotoxischen Signale sehr wahrscheinlich von der Stimulation extrasynaptischer NR2B-enthaltender NMDA-Rezeptoren, stammen (AMADORO et al., 2006; RÖNICKE et al., 2011). Diese extrasynaptischen NR2B-enthaltenden NMDA-Rezeptoren, auch Todesrezeptoren genannt, aktivieren eine Signaltransduktionskaskade, die zum Zelltod führen kann (HARDINGHAM et al., 2002). Des Weiteren wurde bereits bewiesen, dass NR2B-Antagonisten den Lernprozess unter bestimmten Bedingungen verbessern können (HIGGINS et al., 2005). Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine vollständige Eliminierung der NR2B-Untereinheit im Prosencephalon Defizite in der LTP hervorruft (ZHAO et al.; VON ENGELHARDT et al., 2008; RAMMES et al., 2011), während eine heterozygote Expression sogar die negativen Effekte von $A\beta_{1-42}$ auf die synaptische Plastizität umkehren kann (RAMMES et al., 2011). Auch die Zugabe von allosterischen NR2B-Antagonisten wie Ro 25-6981 und Radiprodil konnte die negative Wirkung von $A\beta_{1-42}$ auf die LTP umkehren. Diese Anhaltspunkte lassen vermuten, dass eine moderate negative allosterische Modulation der NR2B-Untereinheit eine Alternative in der Behandlung von AD sein könnte. (HU et al., 2009; LI et al., 2011; RAMMES et al., 2011; MATTUSCH et al., 2013; RAMMES et al., 2015)

Wichtige Aspekte der NR2B-Rezeptoruntereinheit als therapeutische**Zielstruktur:**

NR2B-Rezeptor v.a. in Gehirnregionen exprimiert, die wichtig sind für Lernen & Gedächtnis

→ zerebraler Kortex, Hippokampus (MONYER et al., 1994; GOEBEL & POOSCH, 1999; LOFTIS & JANOWSKY, 2003)

spezifische therapeutische Effekte durch selektive NR2B-Rezeptorantagonisten

→ NR2B-Überexpression erhöht kognitive Fähigkeiten in Mäusen (TANG et al., 1999)

→ NR2B-Antagonisten können Lernprozesse unter bestimmten Bedingungen verbessern (HIGGINS et al., 2005)

→ neurotoxische Signale stammen wahrscheinlich von der Stimulation extrasynaptischer NR2B-Untereinheiten enthaltender NMDA-Rezeptoren, auch „Todesrezeptoren“ (engl. *death receptors*) genannt (AMADORO et al., 2006; RÖNICKE et al., 2011)

→ NR2B-Antagonisten wie Ro 25-6981 und Radiprodil konnte die negative Wirkung von A β ₁₋₄₂ auf die LTP umkehren

3. Lernen und Gedächtnis

3.1. Synaptische Plastizität und Synaptotoxizität

Das menschliche Gehirn besteht aus etwa 86 Milliarden Nervenzellen (HERCULANO-HOUZEL, 2009), die durch neuronale Kontaktstellen, sog. Synapsen, verbunden sind und durch chemische Transmitter miteinander kommunizieren. So können Informationen weitergeleitet und gespeichert werden. Unter synaptischer Plastizität versteht man die Eigenschaft von Synapsen, sich aktivitätsabhängigen Veränderungen zu unterziehen und so vergängliche Erfahrungen zu integrieren und in bleibende Erinnerungen umzuwandeln (CITRI & MALENKA, 2008). Diese Veränderungen in der synaptischen Plastizität sind grundlegend für kognitive Funktionen wie das Lernen und die Speicherung von Informationen. Zwei Mechanismen, die Veränderungen in der synaptischen Plastizität bewirken können, sind die LTP und die Langzeit-Depression (LTD). Unter der LTP versteht man eine langandauernde Aktivitätssteigerung in der synaptischen Transmission durch Stimulation der präsynaptischen Neurone und die

darauf folgende Depolarisation der postsynaptischen Zelle. Die Depolarisation wird durch die Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat ausgelöst, der an postsynaptische Rezeptoren wie dem NMDA-Rezeptor bindet und durch Konformationsänderungen einen Einstrom von Ionen in die postsynaptische Zelle bewirkt (SHORS & MATZEL, 1997). Auf zellulärer Ebene ist die Speicherung von Erinnerungen des Langzeitgedächtnisses mit Genexpression, Synthese neuer Proteine und der Bildung synaptischer Verbindungen assoziiert (LYNCH, 2004). Durch eine LTD kommt es zu einer Abschwächung der synaptischen Übertragung. Eine LTP-Induktion fördert die Bildung von dendritischen Dornfortsätzen (engl. *spines*), während eine LTD den Schwund von dendritischen Dornfortsätzen und Verlust von Synapsen zur Folge hat (KULLMANN & LAMSA, 2007). Terry und Kollegen (1991) konnten zeigen, dass der Verlust von Synapsen als pathologisches Merkmal, sogar noch besser als die Bildung der Amyloid-Plaques, dem Ausmaß des Gedächtnisverfalls bei AD entsprechen. Physiologische pikomolare Konzentrationen von A β -Oligomeren haben einen positiven Effekt auf die synaptische Plastizität (PUZZO et al., 2008), toxische Konzentrationen wie sie bei AD zu finden sind, beeinträchtigen jedoch die LTP im Hippokampus und die synaptische Übertragung negativ (CULLEN et al., 1997; WALSH et al., 2002) und erhöhen die Auslösung von LTDs und somit den Verlust von Synapsen (LI et al., 2009).

3.2. Dendritische Dornfortsätze

Dendritische Dornfortsätze sind membranöse Ausläufer an der neuronalen Oberfläche. Sie bestehen aus einem Kopf, der über einen dünnen Hals mit dem Neuron verbunden ist (HARRIS & KATER, 1994). Das menschliche Gehirn besitzt über 10^{13} *spines* (NIMCHINSKY et al., 2002). Sie sind spezialisierte Strukturen, an deren Oberfläche Rezeptoren für die Neurotransmission zu finden sind (NUSSER et al., 1998) und wodurch Neuronen Informationen erhalten und verarbeiten können (FU & ZUO, 2011). Dendritische Dornfortsätze entsprechen morphologischen Korrelaten der exzitatorischen Postsynapsen (FU & ZUO, 2011).

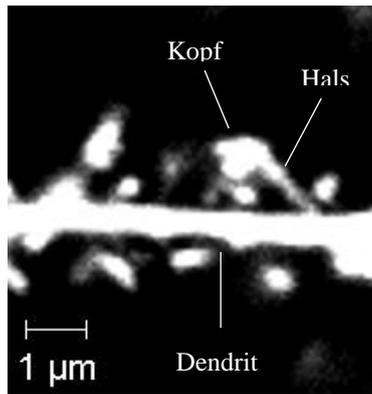


Abbildung 11: Darstellung eines Dendriten.

Dendritische Dornfortsätze (*spines*) sind membranöse Ausläufer an der neuronalen Oberfläche von Dendriten. Sie bestehen aus einem Kopf, der durch einen Hals mit dem Neuron verbunden ist. Eigene Darstellung.

Unter *spine density* versteht man die Anzahl der *spines* pro Mikrometer eines Dendriten. Bis zu den 60er Jahren glaubte man, dass *spines*, sobald sie einmal gebildet wurden, ein Leben lang bestehen. Später gab es jedoch Anzeichen dafür, dass *spines* eliminiert werden können, ohne offensichtliche Veränderungen am Dendriten selbst hervorzurufen. Verschiedene Studien zeigen, dass sich die *spine density* unter bestimmten Umständen verringert, sich aber auch wieder in ihren Ursprungszustand zurückführen lässt (GLOBUS & SCHEIBEL, 1966; VALVERDE, 1967; PARNAVELAS et al., 1974).

Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die anfängliche Verringerung der *spines* nicht nur ein Zeichen von Schäden am postsynaptischen Neuron, sondern eine adaptive Antwort auf Veränderungen des afferenten Inputs darstellen (NIMCHINSKY et al., 2002). Die synaptische Plastizität wird unter anderem durch die Veränderung der Anzahl an bestimmten Rezeptoren vermittelt, die wiederum von morphologischen Veränderungen der *spines*, wie die Anzahl oder Form, begleitet werden (FU & ZUO, 2011). Es wurde beobachtet, dass diese Veränderungen innerhalb von Minuten auftreten können (LENDVAI et al., 2000). Die Störung der physiologischen *spine*-Homöostase liegt einigen neuropsychiatrischen Krankheiten zugrunde (PENZES et al., 2011). Das auffälligste Beispiel ist der Verlust an dendritischen *spines*, der bei den meisten neurodegenerativen Erkrankungen zu finden ist. *Spine*-Verluste korrelieren mit kognitiven Beeinträchtigungen (SCHEFF et al., 2007), was darauf hinweist, dass *spine*-Veränderungen, als einer der entscheidenden Faktoren, zu den bei der AD auftretenden kognitiven Fehlfunktionen beitragen (PENAZZI et al., 2016). Pathologische *spine*-Verluste können durch veränderten präsynaptischen Input, durch neuron-autonome oder extra-neuronale Ursachen hervorgerufen werden (DOROSTKAR et al., 2015). Zu neuron-autonomen Ursachen zählen zum Beispiel eine pathologische Überaktivierung des NMDA-Rezeptors während der

Exzitotoxizität (HALPAIN et al., 1998; HASBANI et al., 2001), die Beeinträchtigung des dendritischen Transports oder eine Störung in der lokalen Proteinsynthese (TOLINO et al., 2012). Beispiele für extra-neuronal verursachte *spine*-Verluste sind unter anderem Traumata oder Entzündungen (CAMPBELL et al., 2012; TONG et al., 2012). Lacor et al. (2007) konnten zeigen, dass eine chronische Exposition von hippocampalen Kulturen mit löslichen A β -Oligomeren eine abnormale *spine*-Morphologie und eine Abnahme der *spine density* zur Folge hat. Dies konnte durch den Wirkstoff Memantin, ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist, verhindert werden.

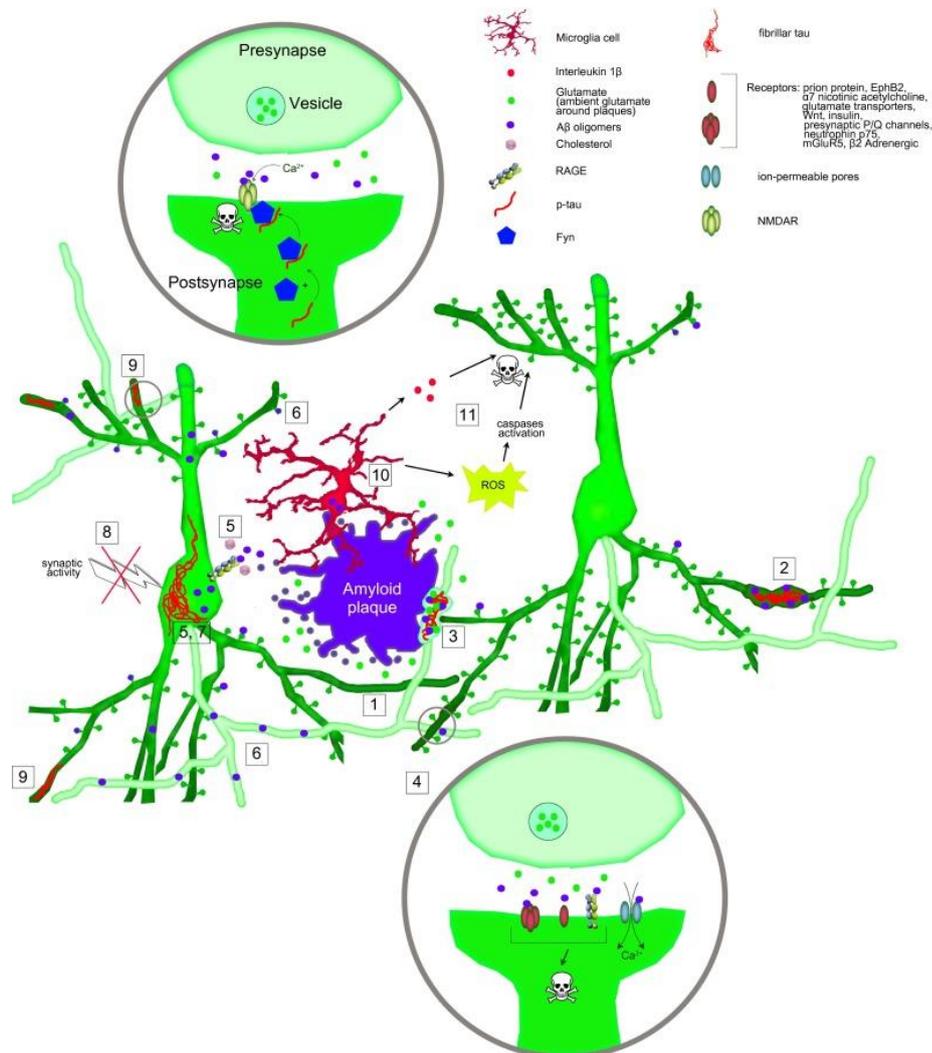


Abbildung 12: Pathophysiologische Mechanismen für dendritische *spine*-Verluste. 1 fibrilläre Amyloid-Plaques verursachen *spine*-Verluste in ihrer direkten Umgebung 2 *spine*-Verluste an dystrophischen Dendriten 3 sekundäre *spine*-Verluste durch präsynaptische Defekte 4 A β -Oligomere, die synaptische Ziele angreifen 5 A β -Aufnahme 6 axonales A β 7 hyperphosphoryliertes Tau 9 NMDA-Rezeptor mediierte Exzitotoxizität 8,10,11 weitere Mechanismen für *spine*-Verluste (DOROSTKAR et al., 2015). Copyright © The Author(s) 2015, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

4. Autophagie

Die Autophagie oder Autophagozytose (griech. *auto* = selbst, *phagien* = essen) ist ein intrazellulärer Degradationsprozess, bei dem zytoplasmatische Bausteine in den Lysosomen abgebaut werden. Es gibt drei verschiedene Arten von Autophagie: Makro-, Mikro- und Chaperon-vermittelte Autophagie. Der Begriff „Autophagie“ bezeichnet in den meisten Fällen (MIZUSHIMA, 2007), wie auch in dieser Arbeit, die Makroautophagie.

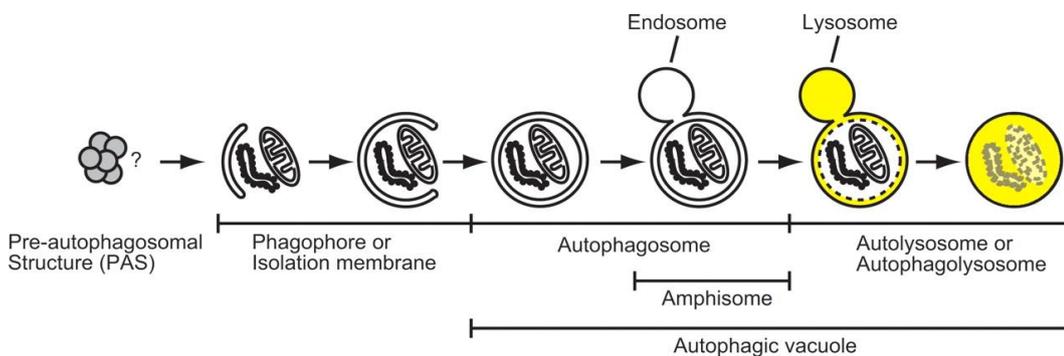


Abbildung 13: Der Prozess der Makroautophagie in Zellen von Säugetieren. Ein Teil des Zytoplasmas inklusive der Zellorganelle wird durch eine Phagophore umschlossen, um ein Autophagosom zu bilden. Die äußere Membran des Autophagosoms fusioniert mit einem Lysosom zum Autolysosom, und das umschlossene Material wird abgebaut (MIZUSHIMA, 2007). Copyright © 2007, Cold Spring Harbor Laboratory Press, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Die Autophagie findet grundsätzlich in jeder Zelle auf einem basalen Level statt (KLIONSKY & CODOGNO, 2013), kann jedoch durch verschiedene Formen von zellulären Stress, wie Hypoxie, reaktive Sauerstoffderivate, beschädigte DNA oder beschädigte Zellorganelle, intrazelluläre Pathogene oder Proteinaggregate hochreguliert werden. Zellen können durch die Autophagie beschädigte oder schädliche Bestandteile eliminieren, um die Nährstoff- und Energiehomöostase aufrechtzuerhalten (LEVINE & KROEMER, 2008; MIZUSHIMA et al., 2008; KROEMER et al., 2010).

4.1. Ablauf und Funktion

Die Autophagie ist entscheidend für die physiologische Funktion der Zelle, um etwa die Proteinhomöostase zu regeln (HARRIS & RUBINSZTEIN, 2012) und eine ausreichende Versorgung mit Aminosäuren sicherzustellen oder Energie bereitzustellen. Sie spielt jedoch auch eine wichtige Rolle bei pathologischen

Zuständen wie Infektionen, Entzündungen, Krebs oder neurologischen Störungen (WHITE, 2012; CHOI et al., 2013; DERETIC et al., 2013; NIXON, 2013). Die Autophagie beginnt mit der Bildung des Autophagosomen und umfasst insgesamt drei wichtige Schritte: die Initiierung, den Einschluss des Vesikel (Bildung der Autophagophore) und die Ausdehnung des Vesikels (Bildung des Autophagosomen).

Im ersten Schritt der Autophagosomenbildung werden zytoplasmatische Bestandteile wie Zellorganelle und Proteine durch eine spezielle Membran, die Phagophore, sequestriert. Die vollständige Absonderung des Materials durch die sich ausdehnende Membran, resultiert in der Bildung des Autophagosomen, welches typischerweise ein doppel-membranöses Zellorganell ist (LAMB et al., 2013; KAUR & DEBNATH, 2015). Anschließend fusioniert die äußere Membran des Autophagosomen mit dem Lysosom zum Autolysosom/Autophagolysosom, was zur Hydrolyse der eingeschlossenen zytosolischen Proteine und Zellorganelle durch die Enzyme des Lysosoms führt (LAMB et al., 2013). In Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden 31 Autophagie-assoziierte Proteine (engl. *Autophagy-Related Genes* = Atgs) identifiziert, die an dem Prozess der Autophagie beteiligt sind (HE & KLIONSKY, 2009). Für viele dieser Atgs wurden orthologe Gene in Säugetieren gefunden (NAKATOGAWA et al., 2009; YANG & KLIONSKY, 2009). Unter den Atg-Proteinen gibt es eine Gruppe, bei denen vermutet wird, dass sie am Anfang des Signalprozesses eine wichtige Rolle spielen, wobei die genaue Funktion noch nicht bekannt ist. In Hefen ist häufig vom Atg1-Kinase-Komplex die Rede, zu dem unter anderem die in Säugetieren homologen Uncoordinated-51-like-Kinase 1 (Ulk1) und Ulk2 gehören (KLIONSKY & CODOGNO, 2013). Die Regulierung der Ulk1 erfolgt einerseits durch die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) bei Glukoseentzug, die die Autophagie fördert, indem es die Ulk1 direkt durch Phosphorylierung an Serin 317 und 777 aktiviert. Und andererseits durch die Serin/Threonin-Kinase TOR (engl. *Target of Rapamycin* = mTOR), einem zentralen Inhibitor der Autophagie. Die Inhibition des mTOR durch Nahrungsüberschuss oder der Behandlung mit Rapamycin verhindert die Ulk1-Aktivierung durch die AMPK durch Phosphorylierung der Ulk1 an Serin 757 (KIM et al., 2011). Durch die Aktivierung des Ulk1 wird die Kinaseaktivität des Ulk1 gesteigert (GLICK et al., 2010) und die Bindungsaktivität zu den anderen Komponenten des Komplexes erhöht (KAMADA et al., 2000). Dadurch wird die Bildung des Atg1-Komplexes und

somit die Autophagosomformierung und letzten Endes die Induktion der Autophagie initiiert (CHEONG et al., 2008). Ulk1 induziert auch die Autophagie, indem es Beclin-1 phosphoryliert und *Vacuolar protein sorting* (Vps) 34 aktiviert (RUSSELL et al., 2013).

Eine wichtige Funktion der Autophagie ist unter anderem die Beseitigung von zytosolischen ubiquitinierten Substraten und von zur Aggregation neigenden Proteinen. Neuere Studien zeigen, dass dieser zersetzende Vorgang selektiv funktioniert und über das in Säugetieren vorhandene Protein p62/Sequestom1, das homolog zum Atg8 ist, gesteuert wird (BJORKOY et al., 2005; POHL & JENTSCH, 2009). p62 bindet direkt an die ubiquitinierten Substrate durch seine ubiquitin-assoziierte Domäne und *Mikrotubule-associated protein 1 light chain 3* (LC3) (PANKIV et al., 2007; KIM et al., 2008) und verbindet so die ubiquitinierten Materialien direkt mit dem Autophagiemechanismus zur autophagischen Degradation. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Autophagie mit einem erhöhten Level an p62 korreliert (WANG et al., 2006; KOMATSU et al., 2007).

Die Autophagosomenbildung ist sehr wahrscheinlich der komplexeste Schritt der Autophagie. Viele verschiedene Atg-Proteine binden an die Phagophore, damit diese zu einem Autophagosomen umgebildet werden kann (HE & KLIONSKY, 2009). Die Nukleierung und die Zusammenlagerung der Phagophorenmembran benötigen den Klasse III-Phosphatidylinositol3-Kinase (Klasse III PI3K)-Komplex, der unter anderem aus dem Klasse III-PI3K/Vps 34 und dem Atg6/Vps30 besteht, der homolog ist zu Beclin-1 in Säugetieren (LIANG et al., 1999; KIHARA et al., 2001; ITAKURA et al., 2008). Die Funktion von Beclin-1 wird durch ein antiapoptotisches Protein reguliert, welches die Autophagie dadurch inhibiert, dass es Beclin-1 unter nährstoffreichen Konditionen bindet. Der Klasse III-PI3K-Komplex rekrutiert neben weiteren Proteinen zwei zusammenhängende Konjugationssysteme, das Atg12-Atg5-Atg16 und das Atg8(LC3)-Phosphatidylinositol (SUZUKI et al., 2001; SUZUKI et al., 2007). Atg12 wird kovalent an das Substratprotein Atg5 gebunden, damit es an die Phagophore binden kann (MIZUSHIMA et al., 2003). Der größte Teil des Atg8, das LC3B-I, ist unter nahrungsreichen Konditionen zytosolisch. Durch die Autophagieinduktion wird es in eine lipid-konjugierte Form (=LC3B-II) umgewandelt (GHAVAMI et al., 2012) und ist an beiden Seiten der Phagophore zu finden (KABEYA et al., 2000), um dort die Größe des Autophagosomen zu kontrollieren (XIE et al., 2008). Die

Fertigstellung des Autophagosomen ist gekennzeichnet durch die Freisetzung des LC3B-II, welches dann wiederverwertet wird. Folglich sind sowohl LC3B-II als auch das Verhältnis zwischen LC3B-I und LC3B-II markante Marker, um den autophagischen Fluss zu beobachten (KOIKE et al., 2005; GLICK et al., 2010; GONG et al., 2013).

Nach der Fusion der Vesikel wird das Innere des Autophagosomen durch spezielle Hydrolasen vor allem zu Aminosäuren abgebaut, die zurück in das Zytosol transportiert werden und dort für die Proteinsynthese oder das Erhalten der zellulären Funktionen unter Nährstoffmangel zur Verfügung stehen (TANIDA et al., 2005; HE & KLIONSKY, 2009).

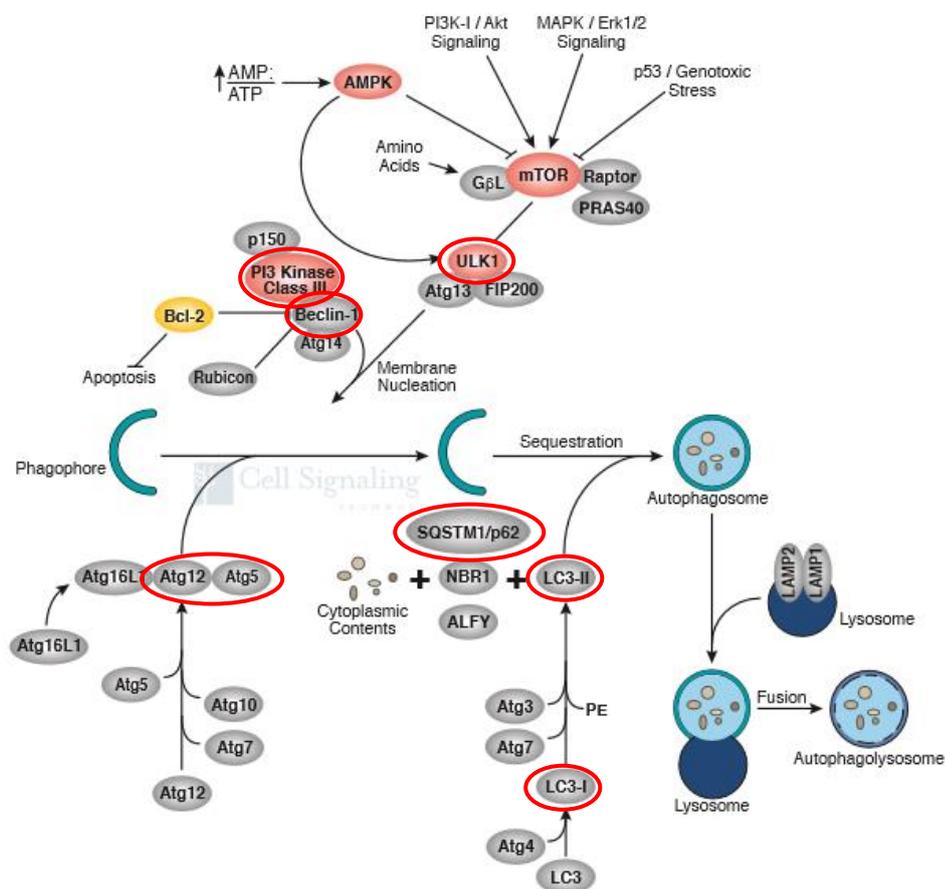


Abbildung 14: Ablauf der Autophagie mit Darstellung der Autophagie assoziierten Gene (Atgs). Bildung des Autophagosomen durch Einschluss von zellulären Bestandteilen durch die Phagophore. Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom zum Autophagolysosom. **Rot** umrandet wichtige Autophagiemarkers, die in den Experimenten nachgewiesen werden: Ulk1, Klasse III PI3K, Beclin-1, Atg5 gebundenes Atg12, SQSTM1/p62, LC3B-I und LC3B-II (CELLSIGNALING TECHNOLOGY, 2017). Abbildung modifiziert nach Cell Signaling, mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology, Inc.

4.2. Zusammenhang zwischen Autophagie und Amyloid β

Die Autophagie regelt die Proteinhomöostase in Zellen (HARRIS & RUBINSZTEIN, 2012) und erhält die Zelle, indem sie zellulären Abfall wie toxische Proteinaggregate beseitigt, was wiederum freie Aminosäuren generiert, die zur Synthese neuer Proteine genutzt werden können (NILSSON & SAIDO, 2014). Fehlerhaft gefaltete Proteine, wie bei der AD zu finden, verursachen, wenn sie aggregieren, Zellorganellschäden und synaptische Funktionsstörungen im Nervensystem (WALKER & LEVINE, 2000). Neuronen könnten wegen ihrer hohen Polarisierung, ihrer Größe und ihrer postmitotischen Veranlagung besonders empfindlich gegenüber der Akkumulation von aggregiertem oder zerstörtem zytosolischem Material sein. Sie sind deshalb auf die Autophagie zum Überleben der Zelle angewiesen (TOOZE & SCHIAVO, 2008). Da der Großteil der intrazellulär aggregierten Proteine durch Autophagie beseitigt wird, wurde in den letzten Jahren viel daran geforscht, ob eine Aktivierung der Autophagie stattfindet, um die aggregierten Proteine zu entfernen oder ob die Existenz der Aggregate zu einer Fehlfunktion der Autophagie beiträgt (GHAVAMI et al., 2014). Auf der anderen Seite gibt es sogar Studien darüber, ob die Aggregate selbst zum neuroprotektiven Schutz beitragen könnten (ARRASATE et al., 2004; RUBINSZTEIN, 2006). Im Allgemeinen wird die Autophagie im Alter weniger effizient, was direkt zum Verfall der Gewebeleistung beiträgt (MARTINEZ-VICENTE et al., 2010).

Messungen haben gezeigt, dass es einen hocheffizienten Autophagieumsatz in Neuronen gibt (BOLAND et al., 2008). Die Abhängigkeit der Neuronen von der Autophagie wird außerdem dadurch gezeigt, dass die Abwesenheit von Autophagie zu Neurodegeneration inklusive Axonverlusten und Zelltod führen kann (HARA et al., 2006; KOMATSU et al., 2006; KOMATSU et al., 2007). Bei der AD ist die Autophagie beeinträchtigt, was durch die Ansammlung von Autophagosomen in dystrophischen Neuriten gezeigt wurde (NIXON et al., 2005). Eine Inhibition der lysosomalen Proteolyse verursacht in kultivierten Neuronen eine AD-ähnliche Ansammlung von Autophagosomen und axonaler Dystrophie, was vermuten lässt, dass eine beeinträchtigte lysosomale Aktivität die Akkumulation der Autophagosomen verursachen könnte (LEE et al., 2011). Diese Hypothese wird zudem unterstützt von der Beobachtung, dass lysosomale Hydrolasen in AD-Gehirnen erhöht und ungewöhnlich verteilt sind, was auf beeinträchtigte Lysosomen schließen lässt (CATALDO et al., 1991). Das bei der Induktion der

Autophagie mitwirkende Beclin-1 ist in frühen Stadien der AD reduziert, was darauf hinweist, dass die Induktion der Autophagie verringert ist (PICKFORD et al., 2008). Andere transkriptionelle Daten lassen vermuten, dass autophagieaktivierende Faktoren in AD-Gehirnen erhöht sind und somit die Autophagie gesteigert ist (LIPINSKI et al., 2010). Diese etwas konträren Ergebnisse könnten auf einen kompensatorischen Effekt auf der transkriptionellen Ebene hindeuten oder darauf, dass die Initiation der Autophagie in verschiedenen Stadien der Krankheit variiert (NILSSON & SAIDO, 2014).

Neuerdings wird sogar vermutet, dass die Autophagie im A β -Metabolismus involviert ist und somit einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt darstellen könnte (NILSSON & SAIDO, 2014). Nilsson et al. (2013) fanden kürzlich heraus, dass die Autophagie, neben ihrer degradativen Funktion, die Sekretion des A β in den extrazellulären Raum vermittelt und folglich direkt zur extrazellulären A β -Plauebildung beiträgt. Dementsprechend bewirkt ein Mangel an Autophagie eine intrazelluläre A β -Akkumulation und somit eine verringerte extrazelluläre Plauebildung (NILSSON & SAIDO, 2014). A β wiederum könnte die durch die Autophagie ausgelöste Degeneration noch verschlimmern (NILSSON et al., 2013) und die Autophagie hemmen, was somit in einem Teufelskreis enden würde (CACCAMO et al., 2010). Spilman et al. (2010) zeigten, dass Rapamycin, welches unter anderem als Autophagiestimulator wirkt, eine Verringerung der A β -Akkumulation in einem transgenen AD-Mausmodell herbeiführen und Gedächtnisdefizite verzögern kann. Somit könnte die Autophagiestimulation einen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung von AD darstellen.

5. Therapieansätze

AD ist heutzutage eine der größten Herausforderungen für das Gesundheitswesen der Industriestaaten. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine effektive Therapie zur Behandlung der AD. Viele Medikamente sind für die Behandlung von AD für die verschiedenen Stadien der Krankheit zugelassen, jedoch zeigen alle eine geringe Wirkung (FOLCH et al., 2016).

Im Moment sind die einzigen bewährten Therapien der AD Cholinesteraseinhibitoren und NMDA-Rezeptorantagonisten (LLEÓ, 2007; GALIMBERTI & SCARPINI, 2010; PARSONS et al., 2013). Frühe Forschung, die zeigte, dass bei der Krankheit eine Störung der cholinergen (DAVIES & MALONEY, 1976) bzw. glutamatergen (BLEICH et al., 2003) Neurotransmitter

vorliegt, führte zu den heute verfügbaren Medikamenten, durch die die Krankheit symptomatisch behandelt werden kann.

Acetylcholinesterase-Inhibitoren (ACh-Inhibitor) waren einige der ersten Medikamente, die durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) genehmigt und in der Behandlung von AD eingesetzt wurden. Der erste ACh-Inhibitor, Tacrin, zugelassen 1993 von der FDA, wird wegen seiner hepatotoxischen Wirkung nicht für die Behandlung von AD eingesetzt (WU et al., 2010). Ein weiterer ACh-Inhibitor, Donepezil, hat einen länger wirkenden Effekt als Tacrin und wird zudem von Patienten besser toleriert, da weniger Nebenwirkungen auftreten. Er wird verwendet, um milde bis moderate AD-Fälle zu behandeln (BENJAMIN & BURNS, 2007; TSUNO, 2009; HOWARD et al., 2012). Andere zugelassenen ACh-Inhibitoren sind Rivastigmin, Galantamin und Huperzine A, die alle bei milder bis moderater AD eingesetzt werden (SUN et al., 2012). Eine weitere Gruppe von Wirkstoffen sind die M1-Rezeptor-Agonisten wie Xanomelin und Milamelin. Diese können AD-Symptome verbessern und das Voranschreiten der Krankheit verlangsamen, da M1 Muskarinrezeptoren in Gehirnen von AD-Patienten noch weitgehend intakt bleiben. Der M1 Muskarinrezeptor ist ein ACh-Rezeptor, der vor allem im Kortex und Hippokampus zu finden ist (QUIRION et al., 1989; JAKUBIK et al., 2008). In Kontrollstudien wurde gezeigt, dass die Behandlung mit ACh-Inhibitoren zwar wirkungsvoll ist, jedoch die Effekte limitiert sind bzw. eine gewisse Anzahl an Patienten überhaupt nicht reagieren (LANCTOT et al., 2003; BIRKS, 2006; BURNS et al., 2006).

Ein anderes Ziel der AD-Behandlung ist das glutamaterge System. Die Forschung hat gezeigt, dass die Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch einen erhöhten Glutamatspiegel, wie es bei der AD zu finden ist, zum Zelltod führen kann (SHAH et al., 2008). Frankiewicz und Parsons (1999) fanden heraus, dass Memantin, ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist, eine neuroprotektive Funktion durch das Erhalten und Wiederherstellen von LTPs *in vitro* hat. In einer gesammelten Analyse zeigten Emre et al. (2008), dass Memantin im Vergleich zu Placebo nach 24 Wochen eine signifikante Verbesserung von kognitiven Fähigkeiten, insbesondere Gedächtnis und Sprache, hervorruft. Bis zum jetzigen Zeitpunkt, ist Memantin eines der wenigen Medikamente, die zur Behandlung von moderater bis schwerer AD eingesetzt werden (LANCTÔT et al., 2009).

Eine weitere vielversprechende Gruppe sind die anti-A β -Medikamente, die die Effekte von A β wie Neurotoxizität und -degeneration verringern sollen. Ca²⁺-

Antagonisten wie Nimodipin und Verapamil können einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle blockieren, da eine Überladung oder Ineffizienz von Ca^{2+} in Nervenzellen zu einer Störung in der Produktion und Freisetzung von Neurotransmittern führen kann (LOPEZ-ARRIETA & BIRKS, 2002; DISTERHOFT & OH, 2006). Antioxidantien können die Degeneration von Nervenzellen unterbinden, indem sie freie Radikale eliminieren oder deren Bildung verhindern. Vitamin E ist ein lipophiles Vitamin, welches den durch A β ausgelösten zellulären Tod und die Toxizität reduzieren kann (MAS et al., 2006). Inhibitoren und Modulatoren der β - (VASSAR & KANDALEPAS, 2011; MENTING & CLAASSEN, 2014; YAN & VASSAR, 2014; MAY et al., 2015) und γ -Sekretase (IMBIMBO & GIARDINA, 2011; WOLFE, 2012a; DOODY et al., 2013) konnten die A β -Produktion massiv reduzieren, bei den Versuchspersonen kam es jedoch zu schwerwiegenden Nebenwirkungen (FOLCH et al., 2016).

Ein primäres Ziel im Tau-Phosphorylierungsprozess ist die Glykogensynthase-Kinase-3b (GSK-3b), die mit einem erhöhten Risiko, an AD zu erkranken, in Verbindung steht (SCHAFFER et al., 2008). Behandlungen mit GSK-3b-Inhibitoren haben in einem Rattenmodell gezeigt, dass diese phosphoryliertes Tau verringern können (SELENICA et al., 2007).

Auch die Immuntherapie scheint eine vielversprechende Behandlungsoption zu sein, um die Aggregation des A β zu verhindern (XING et al., 2011). Die Impftherapie gegen AD wurde von Dale Schenk und seinen Kollegen (1999) entwickelt. Sie fanden heraus, dass Amyloidablagerungen signifikant verringert wurden, als sie junge APP transgene Mäuse mit A β und einem Adjuvanz immunisierten. Impfungen für Menschen sind derzeit noch in der klinischen Testphase (LAMBRAHT-WASHINGTON & ROSENBERG, 2013).

6. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zum einen die Rolle der NR2B-Rezeptoruntereinheit in der A β -induzierten Pathophysiologie der AD zu untersuchen. Des Weiteren soll die NR2B-Untereinheit als mögliche pharmakologische Zielstruktur identifiziert werden, deren Modulation es erlaubt, A β -vermittelte Synaptotoxizität zu mindern oder zu reversieren. Zudem soll die Stärke der synaptotoxischen Wirkung verschiedener A β -Arten und die Auswirkung eines NR2B-Rezeptor Antagonismus auf die Reversibilität dieser Mechanismen bestimmt werden. Insgesamt sollen dadurch potentielle Behandlungsoptionen aufgezeigt werden, die durch eine pharmakologische Verringerung der Aktivität der NR2B-Untereinheit erzielt werden können.

In einem murinen AD-Tiermodell soll geklärt werden, ob eine genetisch herbeigeführte Reduktion der NR2B-Rezeptoren eine Verringerung des löslichen A β bzw. der amyloiden Plaques bewirkt und inwieweit die Funktion der Autophagie beeinträchtigt wird.

Wie in Kapitel II.1.4.2.2. besprochen, liegt der Fokus in der AD-Forschung nicht mehr nur auf den unlöslichen A β -Plaques, sondern zunehmend auch auf den löslichen A β -Oligomeren. Deswegen wird in einem weiteren Versuchsaufbau die synaptotoxische Wirkung von verschiedenen A β -Oligomeren (A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂, _{3NTyr10}A β , A β _{pE3-42}) auf die *spine density* und die Autophagie untersucht.

Memantin, ein nicht-kompetitiver Rezeptorantagonist, ist wie in Kapitel II.1.5. erwähnt, eines der wenigen Medikamente, das zur Behandlung von AD zugelassen ist. Jedoch haben unspezifische NMDA-Rezeptorantagonisten auch viele Nebenwirkungen wie etwa Halluzinationen, geistige Verwirrung und Schwindel. Es besteht großes Interesse darin, klinisch relevante NMDA-Rezeptorantagonisten zu entwickeln, die die exzitotoxische NMDA-Rezeptoraktivierung blockieren können, ohne die Rezeptorfunktionen zu beeinträchtigen, die für die physiologische synaptische Transmission und Plastizität notwendig sind, um somit die Risiken von Nebenwirkungen zu verringern (BARTLETT et al., 2007; VYKLYCKY et al., 2014).

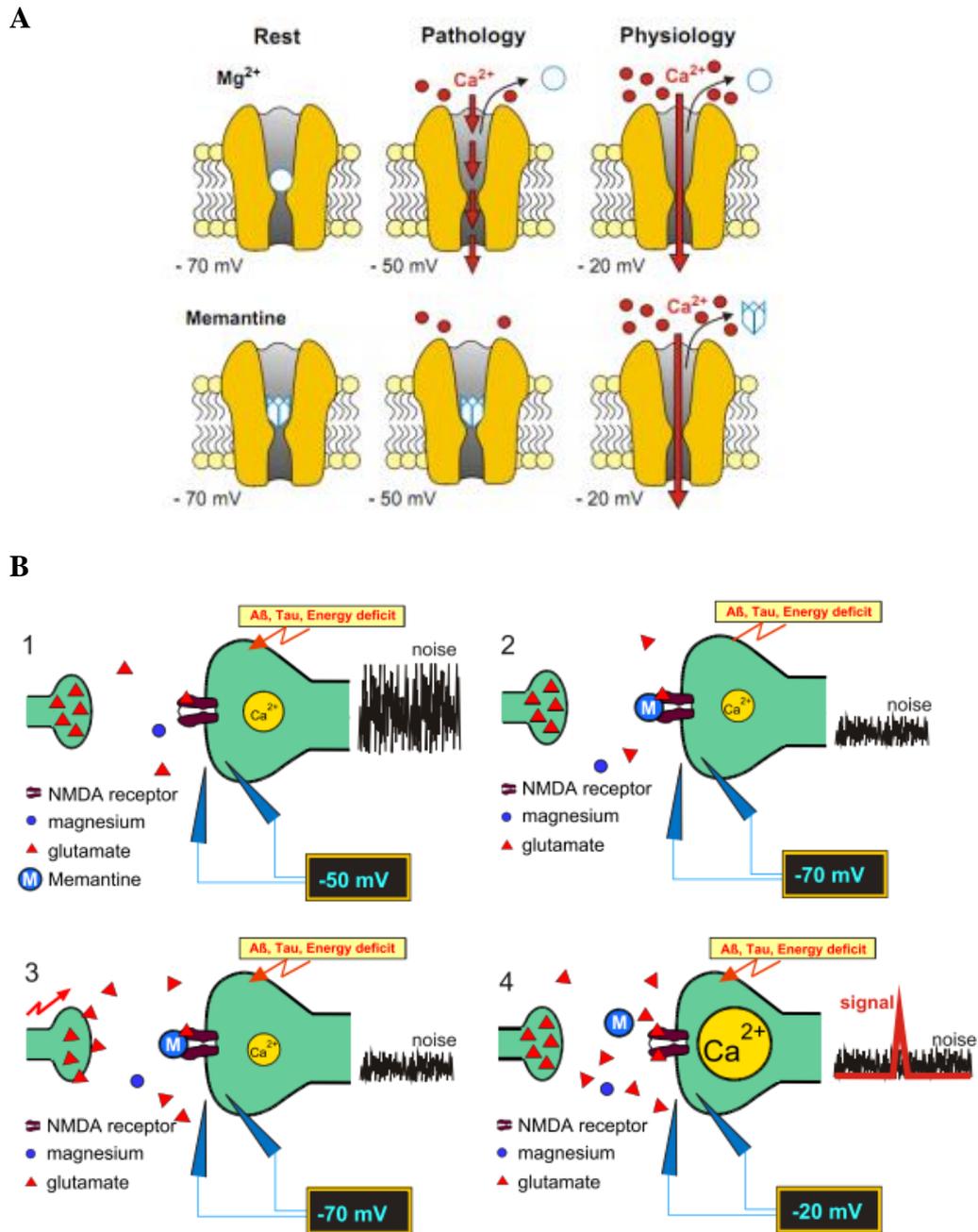


Abbildung 15: A Blockade des NMDA-Rezeptors. Sowohl Mg^{2+} als auch Memantin blockieren den NMDA-Rezeptor im Ruhezustand. Wegen der kontinuierlichen Überaktivierung des Rezeptors bei AD, wird die Blockade durch Mg^{2+} ohne ein eingehendes Signal aufgehoben. Memantin wird dagegen aus dem Ionenkanal nur dann freigesetzt, wenn es zu einer starken Depolarisation wegen eines eingehenden Lernsignals kommt. **B Darstellung der Wirkungsweise von NMDA-Rezeptorantagonisten wie Memantin** Allosterische NMDA-Rezeptorantagonisten wirken als Filter, indem sie den NMDA-Rezeptor blockieren und so das erhöhte Hintergrundrauschen auf ein normales Level senken, sodass relevante Signale vom allgemeinen Signal-Rauschen unterschieden werden können (PARSONS et al., 2007). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Radiprodil, ein allosterischer NR2B-Rezeptorantagonist soll auf seine neuroprotektive Eigenschaft untersucht werden. In einer vorhergehenden Arbeit am Institut wurde bereits untersucht, ob Radiprodil eine LTP konzentrationsabhängig wiederherstellen kann, die durch 50 nM $A\beta_{1-42}$ inhibiert wurde. Die Experimente konnten zeigen, dass Radiprodil in zu hohen Konzentrationen, wie etwa 1 μ M oder 300 nM, die LTP in hippokampalen Gehirnschnitten von Mäusen blockiert. Da dadurch die physiologische Funktion des NMDA-Rezeptors zu sehr beeinträchtigt wird, sind diese Konzentrationen eher ungeeignet. Eine geringe Dosierung von Radiprodil (10 nM) hingegen konnte der $A\beta$ induzierten Blockade von LTP entgegenwirken.

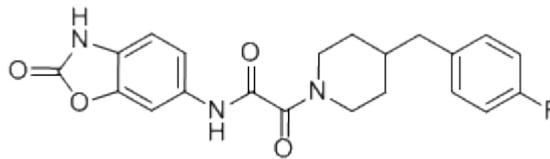


Abbildung 16: Chemische Struktur von Radiprodil. Radiprodil (2-[4-(4-Fluoro-benzyl)-piperidin-1-yl]-2-oxo-N-(2-oxo-2,3-dihydro-benzoxazol-6-yl)-acetamide) ist ein selektiver NR2B-Rezeptorantagonist (AXON MEDCHEM, 2016). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Axon Medchem.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit

Der künstliche Liquor cerebrospinalis (engl. *Artificial Cerebrospinal Fluid* = ACSF) hilft den zu verabreichenden Testsubstanzen in die Zellen der Gehirnschnitte zu diffundieren; somit dient er als Trägermedium für das Aß und Radiprodil.

Die Ionenzusammensetzung (siehe Tabelle) und der pH-Wert (7,4) der ACSF sind dem der physiologischen Cerebrospinalflüssigkeit angeglichen. In dieser Flüssigkeit werden die Präparation des Gehirns und der Gehirnschnitte angefertigt, sowie die Inkubation der Schnitte durchgeführt. Die ACSF wird vor Benutzung eine Stunde bei -67°C gekühlt und während der gesamten Dauer der Präparation und der Inkubation mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) begast.

Tabelle 1: Komponenten zur Herstellung von ACSF

Substanz	Molekulargewicht (g/mol)	Konzentration (mM)
CaCl₂-Dihydrat	147,01	0,5
D-(+)-Glucose-Monohydrat	198,17	25
KCl	74,55	2,5
MgCl₂-Hexahydrat	203,30	6
NaCl	58,44	124
NaHCO₃	84,01	25
NaH₂PO₄- Monohydrat	137,99	1,25

1.2. Herstellung der Testsubstanzen

A β ₁₋₄₂, A β _{pE3-42} und *scrambled* A β ₁₋₄₂ werden in 100 % Hexafluorisopropanol (HFIP) mit 1 mg/ml gelöst und bei 37°C in einem Eppendorf-Röhrchen für 90 Minuten monomerisiert. Anschließend wird das Suspendat auf 20 Portionen à 20 μ l aliquotiert. Das A β wird bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Das aliquotierte A β ₁₋₄₂ und *scrambled* A β ₁₋₄₂ werden in 111 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) mit Hilfe eines Ultraschallbades gelöst und so auf eine Stock-Konzentration von 100 μ M gebracht.

A β ₁₋₄₀ wird in destilliertem H₂O (dH₂O) gelöst und auf eine Stock-Konzentration von 100 μ M verdünnt.

Das _{3NTyr10}A β wird in einer Stocklösung von 50 μ M vom Department der Neurologie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt.

Während des Versuchs wird das A β in die ACSF-Lösung pipettiert, sodass die Schnitte in einer Endkonzentration von 50 nM inkubiert werden.

Radiprodil wird in DMSO gelöst und so entsteht eine Stockkonzentration von 100 μ M. Diese wird aliquotiert und bei -20 °C bis zur Nutzung aufbewahrt. Es wird mit einer Endkonzentration von 10 nM Radiprodil in der ACSF gearbeitet.

2. Methoden

2.1. Probengewinnung

Zur Durchführung der Versuche wurden zwei Tiermodelle verwendet.

Alle Organentnahmen erfolgten gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere sowie den Paragraphen des deutschen Tierschutzgesetzes.

2.1.1. Transgene Tiere

Für den ersten Versuchsaufbau werden vier transgene Tiergruppen, männlich und zwischen neun und 18 Monaten, verwendet.

NR2B^{+/*flox*} Mäuse fungieren als Wildtypen (WT).

Für eine Deletion des NR2B-Gens speziell im Prosencephalon, werden NR2B^{+/*flox*} Mäuse (VON ENGELHARDT et al., 2008) mit CaMKIIa-Cre Mäusen

(MINICHELLO et al., 1999) gepaart. Aus dieser Kreuzung entsteht eine Mauslinie, die die NR2B-Untereinheit im Prosencephalon heterozygot exprimiert, im Folgenden als **NR2B_{het}** bezeichnet.

Tiere mit einer Überexprimierung von humanem APP mit arktischer und schwedischer Mutation (siehe Abb. 17) dienen als AD Mausmodell der A β Pathologie (**Arc**). Die Kombination von beiden Mutationen in einer Mauslinie führt zu einer erhöhten Sekretion und Aggregation von A β (KNOBLOCH et al., 2007).

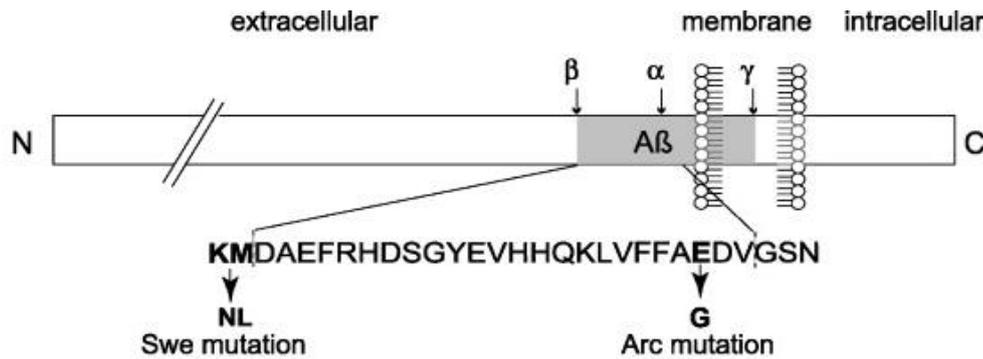


Abbildung 17: Schematische Darstellung von APP mit der schwedischen (Swe) und arktischen (Arc) Mutation. Die Kombination von beiden Mutationen führt zu einer erhöhten Sekretion und Aggregation von A β (KNOBLOCH et al., 2007). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Eine Kreuzung der NR2B_{het}- und der Arc-Mausgruppe resultiert in der Doppelmutation **NR2B_{het}/Arc**.

Ein Teil der Tiere wurde bereits für vorausgegangene LTP-Experimente verwendet (RAMMES et al., 2017).

Tabelle 2: Transgene Tiergruppen

Gruppe 1	= WT	Wildtypen (NR2B ^{+/floX})
Gruppe 2	= Arc	AD Mausmodell (Arctic)
Gruppe 3	= NR2B _{het}	NR2B heterozygote Mäuse
Gruppe 4	= NR2B _{het} /Arc	Kreuzung aus Arctic (Gruppe 2) und NR2B _{het} Mäusen (Gruppe 3)

Für die Organentnahme werden die Mäuse nach vorheriger Betäubung mit Isofluran mit einer Tischguillotine (World Precision Instruments Inc. Sarasota, FL, USA) dekapitiert. Die Präparation des Gehirns erfolgt in einer Petrischale, die mit eiskalter ACSF gefüllt ist. Mithilfe einer Schere und einer Pinzette wird die Schädeldecke entlang der Fontanelle eröffnet und das Gehirn aus der Schädelkalotte herauspräpariert. Das Gehirn sollte, nachdem es mit einer Rasierklinge sagittal in zwei Gehirnhemisphären geteilt wurde, zügig in frische ACSF transferiert und mit Carbogen begast werden.

Eine Hirnhemisphäre wird bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren, die andere wird in Kortex, Hippokampus und Resthirngewebe getrennt und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

2.1.2. Inkubierte Schnitte

2.1.2.1. Präparation von Gehirnschnitten

Für die Präparation von sagittalen Gehirnschnitten werden sieben bis acht Wochen alte, männliche Mäuse des Zuchttyps C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet.

Nach der Organentnahme, wie im Kapitel III.2.1.1. bereits beschrieben, und der Teilung des Gehirns in zwei Hälften, werden die Hemisphären mit der Schnittfläche nach unten auf einem Untersatz mit Histoakrylkleber (B.Braun Melsungen AG, Tuttlingen, Deutschland) befestigt und mit einem Mikrotom (Leica VT 1000S, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) in $350\ \mu\text{m}$ dicke sagittale Schnitte geteilt. Die Präparation findet in eiskalter ACSF, die mit Carbogen begast wird, statt.

2.1.2.2. Inkubation

Die Schnitte werden in ein Becherglas überführt, das mit ACSF gefüllt ist, und bei 37°C für 30 Minuten in einem Wasserbad (Köttermann GmbH und Co. KG, Uetze, Deutschland) inkubiert. Anschließend erfolgt eine weitere Ruhezeit für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur. Dies soll gewährleisten, dass die Zellen sich regenerieren können und für das weitere Experiment vital bleiben.

Nach einem bestimmten Inkubationsschema (siehe Abb. 18) werden vier verschiedene Gruppen erstellt. Die Schnitte der **Gruppe 1**, die als Kontrollgruppe dienen soll, werden für weitere zweieinhalb Stunden in der ACSF bei

Raumtemperatur inkubiert (**Kontrolle**).

Zur **Gruppe 2** wird nach der Erholungszeit für zweieinhalb Stunden Radiprodil mit einer Endkonzentration von 10 nM in die ACSF pipettiert (**Radiprodil**).

Gruppe 3: nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wird eine von vier A β -Arten (A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂, A β _{3pE3-42}, _{3NTyr}A β) zur ACSF pipettiert. Die Schnitte werden für eineinhalb Stunden in der mit 50 nM A β versetzten Lösung belassen (**A β**).

Bei **Gruppe 4** wird direkt nach der Erholungsphase Radiprodil beigegeben (Endkonzentration 10 nM) und nach einer weiteren Stunde eine der A β -Arten (Endkonzentration 50 nM) zugefügt (**Radiprodil + A β**).

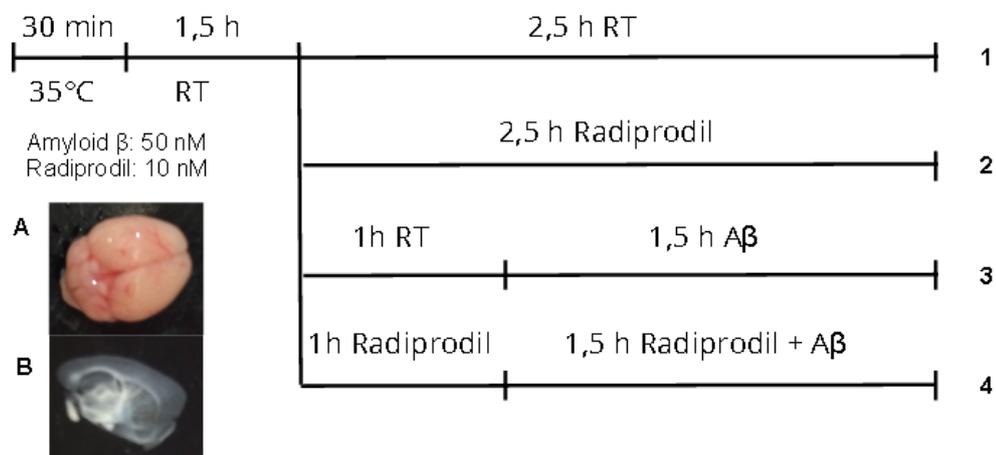


Abbildung 18: Inkubationsschema Nach insgesamt zwei Stunden Ruhezeit entstehen vier Gruppen: **1 Kontrolle** zweieinhalb Stunden Inkubation bei Raumtemperatur **2 Radiprodil** zweieinhalb Stunden Inkubation in 10 nM Radiprodil **3 A β** eine Stunde Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend eineinhalb Stunden Inkubation in 50 nM A β **4 Radiprodil + A β** eine Stunde Inkubation in 10 nM Radiprodil, anschließend eineinhalb Stunden Inkubation in 10 nM Radiprodil und 50 nM A β **A** herauspräpariertes murines Gehirn **B** sagittaler Gehirnschnitt

Für die Durchführung des Western Blots werden die Gehirnschnitte nach der Inkubation in eine mit ACSF gefüllte Petrischale überführt und der Kortex und der Hippokampus mithilfe eines Skalpells und einer Kanüle vom restlichen Gewebe separiert.

2.2. Western Blot

2.2.1. Prinzip

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren, durch das Proteine getrennt und identifiziert werden können. Nachdem die Proteine aus den Zellen extrahiert wurden, erfolgt eine Auftrennung ihrer Größe entsprechend in einer Gelelektrophorese. Anschließend werden die Proteine auf eine Membran geblottet und mit spezifischen Antikörpern detektiert. (MAHMOOD & YANG, 2012)

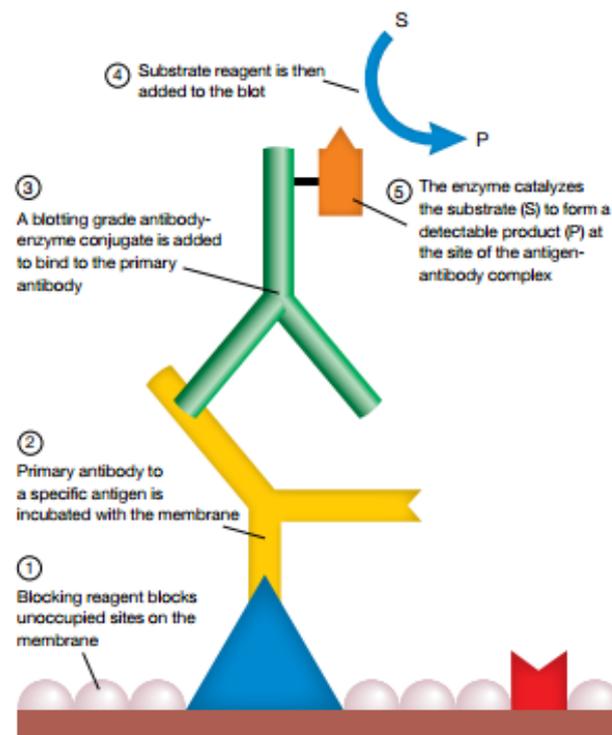


Fig. 5.4. Specific enzymatic detection of membrane-bound antigens.

Abbildung 19: Schema der Detektion des Antigens beim Western Blot. Blaues Dreieck: Antigen (Protein) auf Western Blot Membran **1** Blocklösung besetzt unspezifische Bindungsstellen auf der Membran **2** Membran wird mit primärem Antikörper, der spezifisch für gesuchtes Protein ist, inkubiert **3** sekundärer Antikörper bindet an primären Antikörper **4** Enzym katalysiert Farbreaktion, die mit Hilfe einer UV-Kamera detektiert werden kann (BIO-RAD, 2017). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Bio-Rad Laboratories, Inc.

2.2.2. Probenaufbereitung

Damit Proteine mittels Western Blot detektiert werden können, müssen diese zunächst aus den Zellen extrahiert werden. Anschließend wird die Gesamtmenge an Protein in den einzelnen Proben mittels einer Konzentrationsbestimmung photometrisch bestimmt.

2.2.2.1. Proteinextraktion

Die Proben werden in ein 1,5 ml großes Eppendorf-Röhrchen überführt, mit 300 μ l *radioimmunoprecipitation assay* (RIPA)-Puffer (RIPA-buffer; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA, 20 μ l/ml 50x Complete, 1 mM PMSF und 1 μ g/ml Pepstatin, Roche, Basel, Switzerland) versetzt, und mit einem Mörser aus dem Amersham Sample Grinding Kit (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) für ca. 2-3 Minuten auf Eis homogenisiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation der Proben bei 13000 G für 30 Minuten bei 4°C (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland), um das lösliche Protein zu isolieren. Die im Überstand zu findende Zellfraktion wird in ein frisches Eppendorf-Röhrchen pipettiert und das Pellet verworfen.

2.2.2.2. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Proben erfolgt mit der Methode nach Bradford. Dazu werden die Proben in Triplets auf eine 96-Well Platte zusammen mit einer BSA-Standardreihe (Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Anhand einer Farbreaktion mit dem DC Protein Assay von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) wird die Blaufärbung in den einzelnen Proben mittels Photometrie bei 650 nm quantitativ bestimmt (sunrise™ Reader, Tecan Trading AG Männedorf, Schweiz) und die Proteinkonzentration an der Standardkurve abgelesen.

2.2.2.3. Probenvorbereitung

Im Anschluss an die Proteinbestimmung wird die Probe auf eine Konzentration von 2 μ g/ μ l, mit Hilfe des Ladepuffers, eingestellt, sodass beim Auftragen der Proben auf das Gel, die gleiche Menge an Gesamtprotein in jeder Probe vorhanden ist und die Ergebnisse somit verglichen werden können. Dazu wird die berechnete Probenmenge mit einem zweifachen Ladepuffer (NuPage LDS Sample Buffer, Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA) und einem Reduktionsmittel (NuPage Reducing Agent, Invitrogen AG) gemischt. Der Ladepuffer enthält zum einen Glycerol, welches die Dichte der Proteinlösung erhöht und somit die Proben in die Geltaschen sinken lässt und zum anderen Coomassie G250 und Phenolrot, Farbmarker, die die Fliesmittelfront des Proteingemischs im Gel anzeigen. Um die Proteine zu denaturieren und somit die Sekundär- und Tertiärstruktur aufzubrechen,

wird zum einen das Reduktionsmittel Dithiothreitol verwendet und zum anderen werden die Lysate bei 95°C für fünf Minuten in einem Wärmeblock erhitzt (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

2.2.3. Auftrennung der Proteine

2.2.3.1. Herstellung der Gele

Für die Herstellung der Gele wird ein 10% Stain Free Gel Kit von Bio-Rad verwendet (TGX Stain Free Fast Cast Acrylamide Kit 10%, Bio-Rad). Die Lösungen aus dem Kit werden, wie im Anhang abgebildet, hergestellt und mit Hilfe der Gelkammer von Bio-Rad gegossen.

Ein Gel besteht aus zwei Komponenten: dem Sammelgel und dem Trenngel. Im Sammelgel werden durch Einsetzen von Kämmen Gelkammern geformt, in die später die Proteinlösung pipettiert wird. Durch eine geringe Vernetzung des Gels und die niedrige Spannung (100 Volt) wird das Protein zunächst gesammelt. Die zweite Komponente ist das Trenngel. Hier findet, durch die engere Vernetzung, die Auftrennung der Proteine nach Größe statt (200 Volt).

Die Lagerung der Gele erfolgt bis zur Verwendung im Kühlschrank.

2.2.3.2. Gelelektrophorese

Die Elektrophoresekammer (Bio-Rad) wird zu Beginn mit Laufpuffer (24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS) gefüllt und die einzelnen Proben nach angeglicherer Proteinmenge in die Slots pipettiert. Auf Position eins wird bei jedem Gel eine Standardprobe aufgetragen, die zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Gele dient. Position 10 ist mit einem Größenmarker (Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) versehen.

Nachdem die negativ geladenen Proteine der Proben der Größe nach durch die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) anhand eines elektrischen Feldes in einzelne Proteinbanden aufgetrennt wurden, erfolgt die Aktivierung der Gele durch eine UV-Kamera (Chemi Doc™ XRS, Bio-Rad), um später das Gesamtprotein auf den Membranen bestimmen zu können.

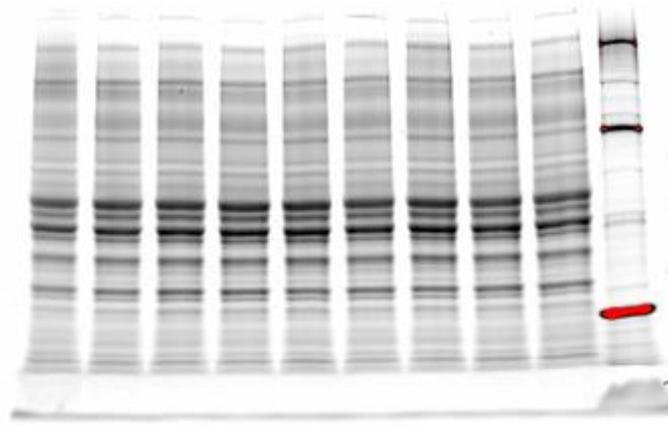


Abbildung 20: aufgetrennte Proteine auf einem Gel. Aktivierung der Proben auf dem Gel durch eine UV-Kamera

2.2.4. Blotten und Inkubation der Membranen

Das aufgetrennte Protein im SDS-Gel, wird mit Hilfe eines Tank-Blot-Systems (Bio-Rad) in einem Transferpuffer (Blotting Puffer 10x: 247,93 mM Tris, 920 mM Glycin) bei 80 Volt für eine Stunde auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Amersham Hybond low fluorescence 0,2 μm PVDF, GE Healthcare Europe GmbH Freiburg, Deutschland) transferiert.

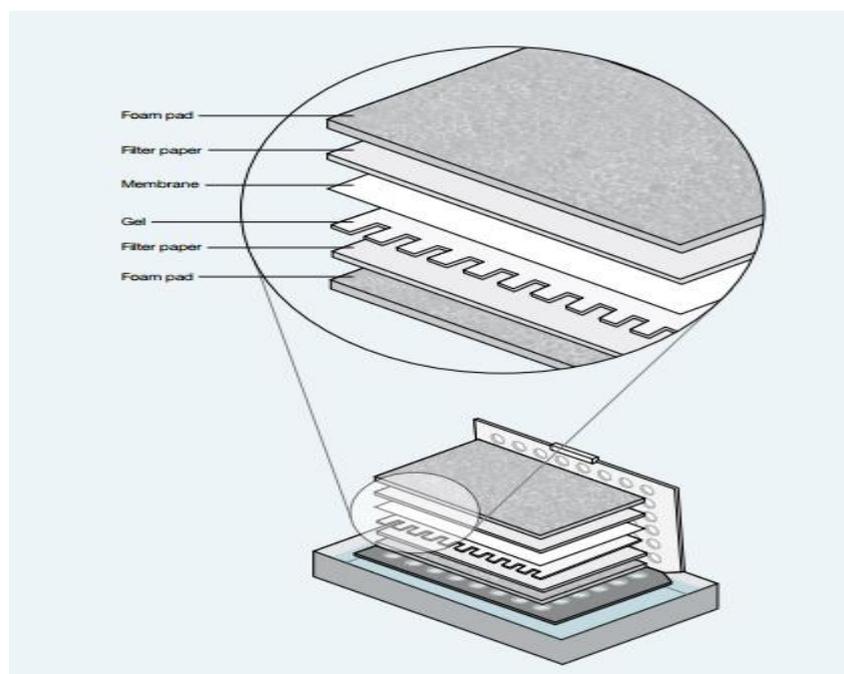


Abbildung 21: Western Blot. Der Zusammenbau der Western Blot-Kammer erfolgt immer nach demselben Prinzip: Schwamm-Filterpapier-Membran-Gel-Filterpapier-Schwamm (BIO-RAD, 2017). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Bio-Rad.

Um das Gesamtprotein später für die Auswertung nutzen zu können, wird die Membran mit der ChemiDoc-Kamera von Bio-Rad aufgenommen und anschließend für eine Stunde in einer 10 % Blocklösung (Roti®-Block, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert, um unspezifische Bindungen zwischen Protein und Antikörper auf der Membran zu verhindern.

Die Membranen werden nach dem Blocken dreimal für 10 Minuten in einer mit Tris gepufferten Kochsalzlösung mit Zugabe von 0,1 % Tween 20 (TBS/T: 24,8 mM Tris, 190 mM NaCl, 0,1% Tween 20) gewaschen und über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit dem ersten Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS/T am nächsten Tag, wird die Membran in einem mit Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppelten zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Das zu identifizierende Protein wird durch die Peroxidaseaktivität mit Hilfe eines *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Zusatzes (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad) detektiert und die Membranen mit dem gesuchten Protein mit der Kamera von Bio-Rad aufgenommen.

Tabelle 3: verwendete Antikörper und Verdünnung

Produkt	Verdünnung	Hersteller
Atg12 (D88H11) Rabbit mAb	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
Beclin-1 (D40C5) Rabbit mAb	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
LC3B Antibody	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
NMDAR1 Antibody	1:1000	Chemicon Temecula, CA, USA
NMDAR2A Antibody	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
NMDAR2B Antibody	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA

PI3K Kinase Class III (D9A5) Rabbit mAb	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
Phospho-ULK1 (Ser555) (D1H4) Rabbit mAb	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
SQSTM1/p62 (D5E2) Rabbit mAb	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
ULK1 (D8H5) Rabbit mAb	1:500	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:10 000	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA

2.2.5. Auswertung

Mithilfe des Programms ImageLab von BioRad erfolgt die Auswertung der Western Blot-Daten. Die Menge des gesuchten Proteins wird durch die Intensität (Grauwerte) der Bande bestimmt und anschließend mit dem Gesamtprotein der einzelnen Proben normalisiert. Die verschiedenen Blots können, anhand des Standards auf jeder Membran, verglichen und in einer Exceldatei ausgewertet werden.

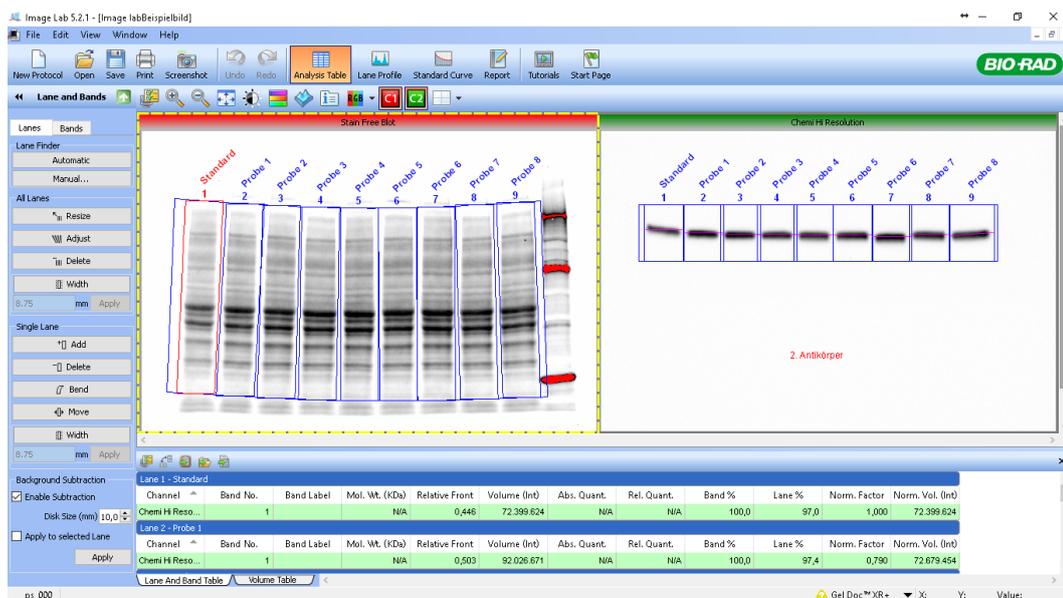


Abbildung 22: Auswertung der Western Blot Ergebnisse. Die Intensität der Banden entspricht der Menge des gesuchten Proteins (rechts im Bild). Dieses wird mit dem Gesamtprotein der einzelnen Proben (links im Bild) normalisiert. Dies wird mit Hilfe des Programms ImageLab von BioRad durchgeführt.

2.3. Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay (ELISA)

2.3.1. Prinzip

Der *Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay* (ELISA) bezeichnet ein serologisches Verfahren, durch das Antigene oder Antikörper anhand einer enzymatischen Farbreaktion erkannt werden können. Es gibt unterschiedliche ELISA-Techniken; zur Detektion des gesuchten Proteins wurde in dieser Arbeit ein Sandwich-ELISA (Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex) verwendet. Das Prinzip besteht darin, dass ein Antikörper auf einer Mikrotiterplatte gebunden ist und das gesuchte Protein an den ersten Antikörper auf der Platte bindet. Der zweite HRP-konjugierte Detektionsantikörper bindet dann am gesuchten Protein. Anschließend wird mit einer speziellen Substratlösung eine Farbreaktion ausgelöst, durch welche die Menge des gesuchten Proteins bestimmt werden kann (XIA et al., 2009).

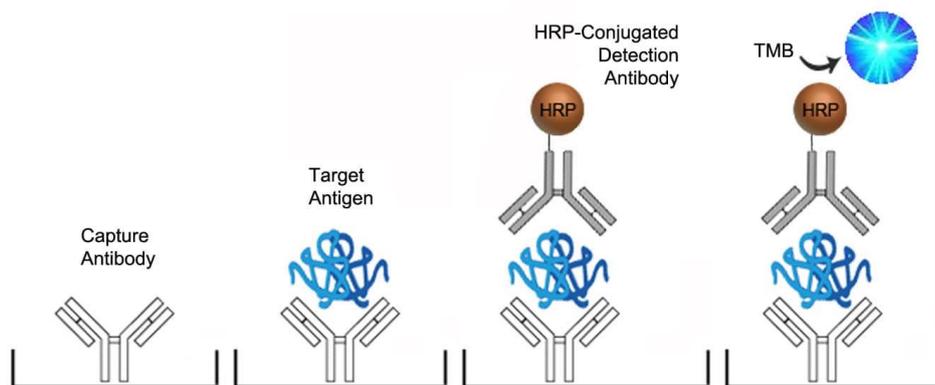


Abbildung 23: Prinzip ELISA. Platte beschichtet mit einem Antikörper, der spezifisch für das gesuchte Antigen (Protein) ist. Gesuchtes Protein bindet an den Antikörper auf der Platte und wird mit Hilfe eines zweiten spezifischen markierten Antikörpers detektiert. Durch eine Farbreaktion kann die Proteinmenge des gesuchten Antigens bestimmt werden (LIFESPAN BIOSCIENCES, 2017). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von LifeSpan BioSciences.

2.3.2. Probenaufbereitung

Um das Protein aus Zellen zu extrahieren, wird von jeder Probe ein Teil des gefrorenen Gehirngewebes abgewogen, mit der achtfachen Menge an 5 M Guanidine HCl/50 mM Tris HCl-Lösung in einem Eppendorf-Röhrchen vermischt und mit einem Handmörser zerstoßen. Das Homogenat wird anschließend für drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Proben werden 1:10 mit einem kalten Reaktionspuffer (Phosphatgepufferte Salzlösung = PBS, 1x Protease Inhibitor Cocktail, 5 % BSA, 0,03 % Tween 20) verdünnt und im Anschluss bei 4°C und

13000 G für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und auf Eis gelagert, bis er mit einem A β ₁₋₄₂ ELISA Kit (Human/Rat β Amyloid (42) ELISA Kit, Wako) verwendet wird.

2.3.3. Detektion des humanen Amyloid β 1-42

Je 100 μ l der Standardlösungen und der zu testenden Proben werden jeweils in Doppelbestimmung in ein Well einer beschichteten Platte pipettiert. Nach Verschließen der Platte erfolgt die Inkubation über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Am nächsten Tag werden die Lösungen aus der Platte abgekippt und die Wells fünf Mal mit der Waschlösung gewaschen. Danach wird ein HRP-konjugierter Antikörper in die Wells pipettiert und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgt erneut ein fünfmaliger Waschschrift. Nach 30-minütiger Inkubation der Wells mit 100 μ l der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Lösung bei Raumtemperatur im Dunkeln, wird die Stopplösung beigefügt, um die Farbreaktion zu beenden. Das Ergebnis wird bei 450 nm innerhalb von 30 Minuten mit einem Spektrometer (sunrise) bestimmt, die Konzentration an A β ₁₋₄₂ der Proben anhand der Standardkurve berechnet und in einer Exceldatei ausgewertet.

2.4. Plaque-Färbung

2.4.1. Vorbereitung der Schnitte

Die bei -80°C gefrorenen Gehirnhemisphären werden im Kryomikrotom (Thermo Scientific Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific Inc.) in 50 μ m dicke Schnitte zerteilt, auf Objektträger aufgezogen und bis zur Benutzung bei -80°C gelagert.

2.4.2. Färbung

Die Gehirnschnitte auf dem Objektträger werden in eiskaltem Aceton für 20 Minuten fixiert und im Anschluss für 10-20 Minuten getrocknet. Danach erfolgt ein zweimaliges Waschen für 20 Minuten in einer einfachen PBS-EtOH-Lösung. Nachdem die Schnitte für 30 Minuten im Dunkeln auf einem Schüttler mit Methoxy-X04 in einer PBS-EtOH-Lösung gefärbt wurden, werden diese erneut dreimal für 10 Minuten in der PBS-EtOH-Lösung gewaschen, bevor sie im Dunkeln zum Trocknen ausgelegt werden. Zuletzt werden die Schnitte mit einem speziellen Fluoreszenzmedium (Mounting medium hard set, BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH Eching, Deutschland) eingedeckt und erneut im Dunkeln zum Trocknen

gelagert. Die Aufbewahrung bis zur Mikroskopie erfolgt im Dunkeln bei 4°C, um einen Verlust der Fluoreszenz zu vermeiden.

2.4.3. Mikroskopie und Auswertung

Mit einem Apotom *Axiolmager.M2* von Zeiss (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem 10fachen Objektiv und einem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Reflektor werden sechslagige Bilddateien der Gehirnschnitte angefertigt. Die Bearbeitung der Rohdateien erfolgt mit dem Bildprogramm *ZEN blue* von Zeiss. Zunächst wird der Ansichtsmodus von „optischer Schnitt“ auf „konventionelle Fluoreszenz“ umgestellt. Danach wird eine „Normalisierung“ durchgeführt, die „Phasenkorrekturen“ und „lokales Bleichen“ angewendet und der „Fourier-Filter“ auf „mittel“ eingestellt, um das Bild zu optimieren. Die neu erzeugten Bildebenen werden mit der Funktion „orthogonale Projektion“ in ein Bild projiziert und als jpg-Datei abgespeichert.

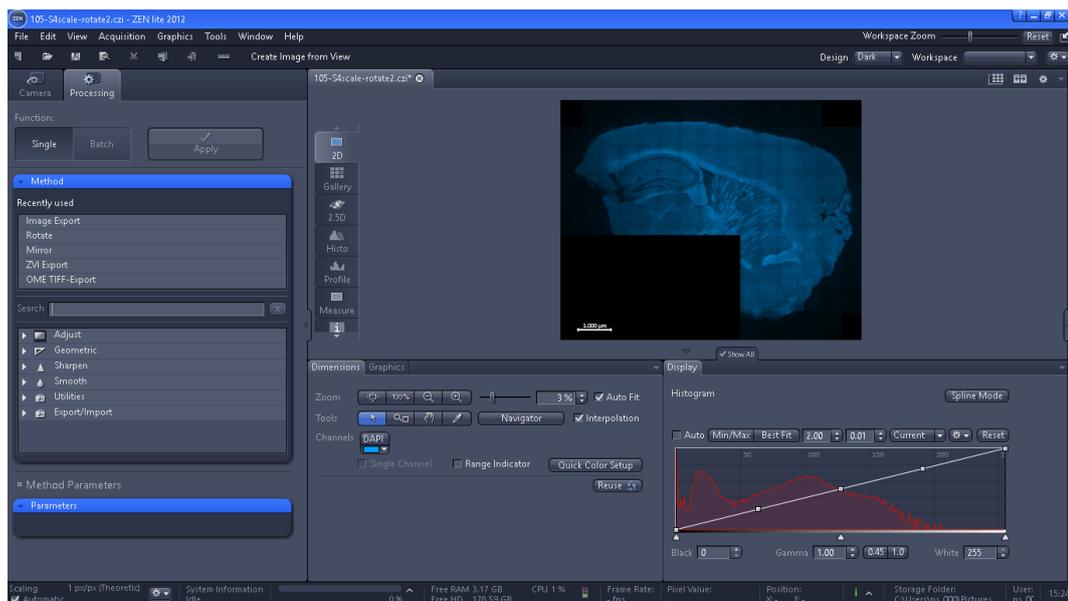


Abbildung 24: Zen blue. Die Aufnahme der Gehirnschnitte erfolgt mit einem Apotom und der Software *Zen blue* von Zeiss. Mit Hilfe dieser Software können die Bilder zudem bearbeitet werden.

Die Auswertung der Schnitte erfolgt mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Image J*. Die jpg-Datei wird geöffnet und die Helligkeit und der Kontrast gegebenenfalls angepasst. Mit dem Werkzeug „*freehand selection*“ wird jeweils der gesamte Kortex, der präfrontale Kortex (ermittelt anhand eines Gehirnatlas der Maus „*The mouse brain*“ von K. Franklin und G. Paxinos) und der Hippokampus abgegrenzt. Anschließend wird der Hintergrund subtrahiert mit der Funktion „*subtract background*“ → *rolling ball radius 5 pixels, sliding paraboloid*“ und der ausgewählte

Gehirnteil mit der Funktion „*clear outside*“ ausgeschnitten. Mit dem Werkzeug „*colour threshold*“ wird die Farbschwelle (hier *brightness* 70-255) gesetzt und die durch das Programm erkannten Plaques ausgewählt. Sowohl die Gesamtfläche als auch die Fläche der ausgewählten Plaques wird analysiert und in einer Exceldatei ausgewertet.

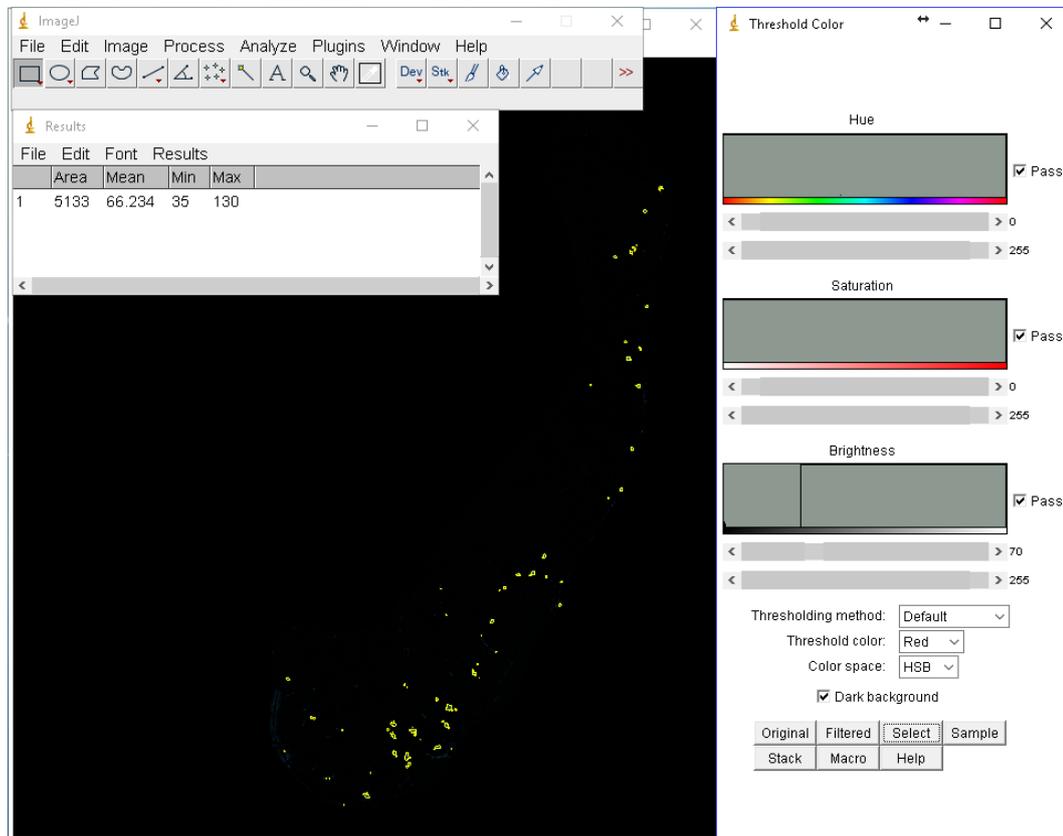


Abbildung 25: Image J. Die Auswertung der Plaques erfolgt mit der Software *Image J*. Die Gesamtfläche des Kortex, präfrontaler Kortex und Hippokampus wird bestimmt und die prozentuale Fläche der Plaques berechnet.

2.5. Spine density

Für diesen Versuch werden spezielle transgene Mäuse verwendet, sogenannte grünfluoreszierendes Protein (GFP)-M (try1-eGFP)-Mäuse (FENG et al., 2000). Diese Tiere tragen ein grünfluoreszierendes Protein in sich, das bestimmte Strukturen bei Anregung durch blaues Licht grün fluoreszieren lässt. In diesem Versuch werden so die Neuronen im Gehirn mit ihren Ausläufern sichtbar gemacht.

2.5.1. Herstellung der Schnitte

Nach der Organentnahme (siehe Kapitel III.2.1.1.), wird das Gehirn mit einem Mikrotom in 100 µm dicke, sagittale Schnitte geteilt.

Durch das in Kapitel III.2.2.1. gezeigte Inkubationsschema entstehen die verschiedenen Gruppen. Nach der Inkubation mit den Testsubstanzen werden die Schnitte in einer Wellplatte mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für ca. 12-24 Stunden über Nacht fixiert. Die fixierten Schnitte können direkt am nächsten Tag weiterverarbeitet, oder in einer Lösung aus PBS und 0,05 % Natriumazid bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt werden.

Die Darstellung der Neuronen wird durch eine Immunfärbung intensiviert. Dafür werden die Schnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in einer Lösung aus PBS, 0,5% Triton X-100 und 10 % NGS (*normal goat serum*) inkubiert, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren. Danach erfolgt die Immunfärbung in einem 1:200 in PBS verdünnten GFP spezifischen Antikörper (GFP rabbit IgG Antibody fraction-Alexa fluor 488 Conjugate) für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Nach dreimaligem je 10 minütigen Waschen in PBS werden die Schnitte auf einem Objektträger aufgezogen und mit einem Fluoreszenzmedium (Mounting medium hard set) eingedeckt. Nach der Trocknung im Dunkeln erfolgt die Aufbewahrung bei 4°C ebenfalls im Dunkeln, um einen Verlust der Fluoreszenz zu vermeiden.

2.5.2. Mikroskopie und Auswertung der Dendriten

Die Darstellung der Dendriten erfolgt mit einem konfokalen Mikroskop (lsm780, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland), mit einem 40-fachen Öobjektiv und der Software *Zen black* von Zeiss. Es werden 12-lagige Bilddateien angefertigt und ebenfalls mit der *Zen black* Software von Zeiss ausgewertet. Pro Schnitt werden bis zu 25 Dendriten des Gyrus dentatus im Hippokampus gemessen und die *spines* ausgezählt. Dazu wird mit der Funktion „*open bezier*“ die Länge des Dendriten bestimmt und mit dem Werkzeug „*circle*“ die *spines* in jeder Z-Position markiert. Somit kann im Anschluss die Anzahl der *spines* pro µm Dendrit berechnet und in einer Exceltabelle ausgewertet werden.

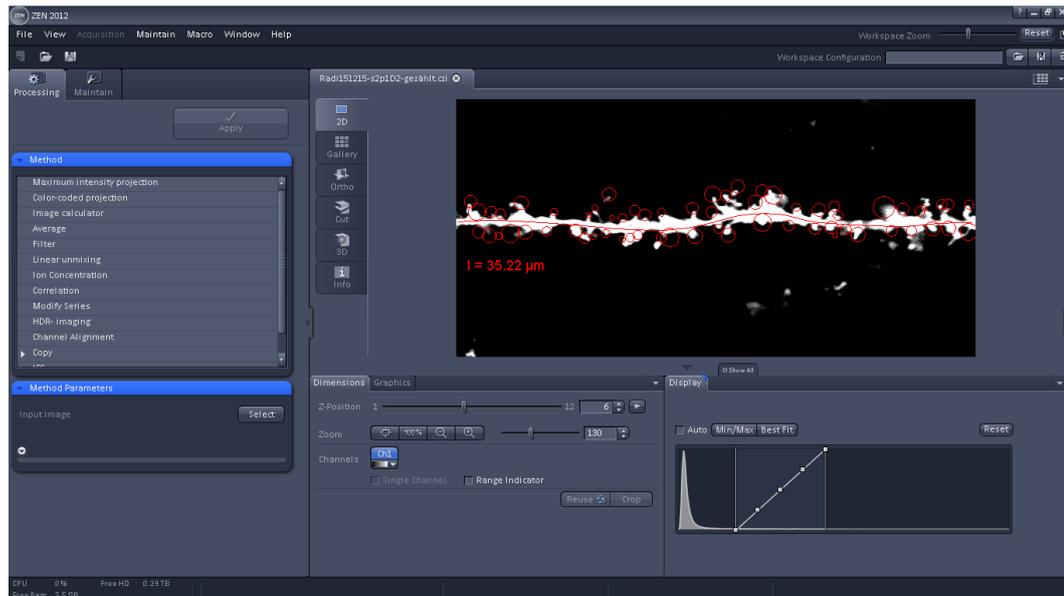


Abbildung 26: Zen black. Die Dendriten werden mit einem konfokalen Mikroskop und der Software *Zen black* von Zeiss aufgenommen. Zur Messung der Länge der Dendriten und Auszählung der *spines* wird ebenfalls diese Software verwendet.

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gesamten Daten und die Darstellung der Graphiken erfolgt mit der Software *GraphPad Prism* der Firma GraphPad Software Inc.

Die statistische Analyse wurde mit einem t-Test beim Vergleich zweier Gruppen bzw. einem One-Way-ANOVA zwischen mehreren Gruppen mit nachfolgendem Bonferroni Post-hoc Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug α -Fehler = 0.05, auf das mittels Sternchen hingewiesen wird (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Die abgebildeten Daten zeigen alle den Mittelwert \pm Standardfehler (engl. *Standard Error of the Mean* = SEM).

IV. ERGEBNISSE

1. Transgene Tiere

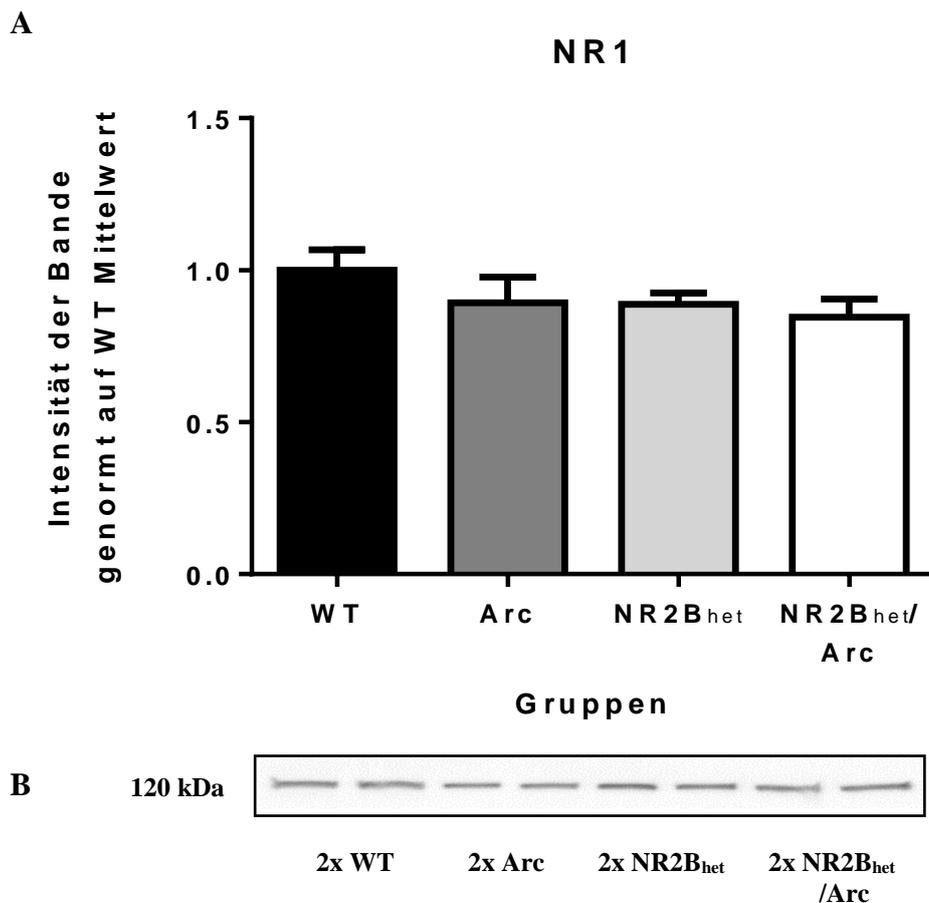
In einer Pilotstudie sollen die vier transgenen Mausgruppen WT, Arc, NR2B_{het} und NR2B_{het}/Arc bezüglich ihrer NMDA-Rezeptoruntereinheiten, der Menge an löslichem A β ₁₋₄₂ und der Anzahl der gebildeten Plaques verglichen werden. Des Weiteren wird überprüft, ob es einen Unterschied im Proteinexpressionsmuster der Autophagiemarker in den vier Tiergruppen gibt.

1.1. NMDA-Rezeptoruntereinheiten

Die transgenen Tiergruppen WT (n=4), Arc (n=3), NR2B_{het} (n=4) und NR2B_{het}/Arc (n=4) wurden bezüglich ihrer Proteinexpression der NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1, NR2A und NR2B im Kortex verglichen. Der Nachweis erfolgte mittels Western Blot.

NR1

Die Gruppen weisen keinen signifikanten Unterschied in der Proteinexpression der NR1-Untereinheit auf ($p > 0.9999$ bzw. $p = 0.68$ bei der NR2B_{het}/Arc-Gruppe im Vergleich zu WT-Gruppe). Die Intensitäten der NR1-Banden betragen für die WT-Gruppe 1.0 ± 0.07 , für die Arc-Gruppe 0.89 ± 0.08 , für die NR2B_{het}-Gruppe 0.89 ± 0.04 und für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe 0.85 ± 0.06 (mean \pm SEM).

**Abbildung 27: kein signifikanter Unterschied der NR1-Untereinheit zwischen Gruppen.**

A Die Intensitäten der Western Blot-Banden wurden auf den Mittelwert der WT-Gruppe normalisiert. Die Menge der NR1-Untereinheit ist in den jeweiligen Gruppen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p > 0.9999$ bzw. $p = 0.68$ in NR2B_{het}/Arc-Gruppe) nicht reduziert. Die normalisierten Intensitäten der Western Blot Banden betragen für die WT-Gruppe 1.0 ± 0.07 , für die Arc-Gruppe 0.89 ± 0.08 , für die NR2B_{het}-Gruppe 0.89 ± 0.04 und für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe 0.85 ± 0.06 (mean \pm SEM). **B** Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der NR1-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 120 kDa.

NR2A

Die Menge der NR2A-Untereinheit ist ebenfalls in den unterschiedlichen Tiergruppen nicht reduziert ($p > 0.9999$ im Vergleich zu WT-Gruppe). Die Intensitäten der NR2A-Banden betragen für die WT-Gruppe 1.0 ± 0.12 , für die Arc-Gruppe 0.94 ± 0.07 , für die NR2B_{het}-Gruppe 1.05 ± 0.14 und für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe 1.03 ± 0.1 (mean \pm SEM).

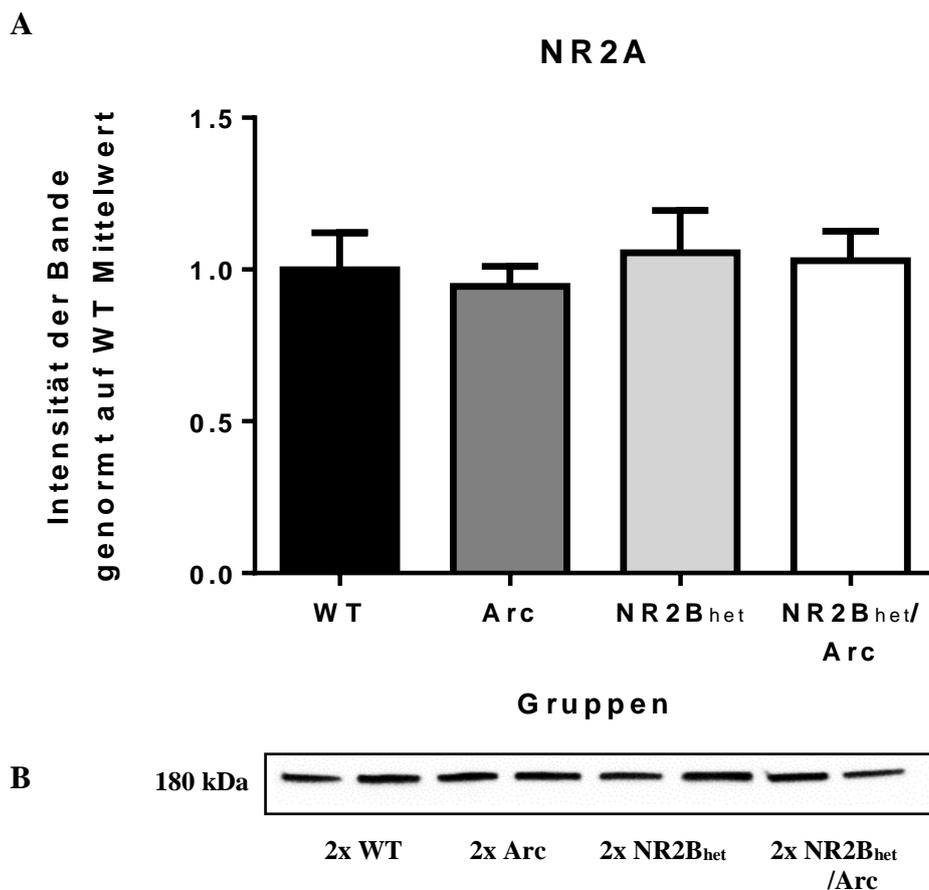


Abbildung 28: kein signifikanter Unterschied der NR2A-Untereinheit zwischen Gruppen.

A Die Intensitäten der Western Blot-Banden wurden auf den Mittelwert der WT-Gruppe normalisiert. Die Menge der NR2A-Untereinheit ist in den jeweiligen Gruppen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p > 0.9999$) nicht reduziert. Die normalisierten Intensitäten der Western Blot Banden betragen für die WT-Gruppe 1.0 ± 0.12 , für die Arc-Gruppe 0.94 ± 0.07 , für die NR2B_{het}-Gruppe 1.05 ± 0.14 und für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe 1.03 ± 0.1 (mean \pm SEM). **B** Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der NR2A-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 180 kDa.

NR2B

Der NR2B-Rezeptor ist in der Arc-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe nicht erniedrigt ($p=0.576$). Die Proteinexpression der NR2B-Untereinheit ist im Vergleich zur WT- bzw. zur Arc-Gruppe in der NR2B_{het}- ($p<0.0001$ bzw. $p<0.001$) und der NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p<0.0001$ bzw. $p<0.001$) signifikant verringert. Die Intensität der Bande der WT-Gruppe beträgt 1.0 ± 0.03 , die der Arc-Gruppe 0.87 ± 0.03 . Die Intensitäten der NR2B_{het}- und NR2B_{het}/Arc-Gruppen betragen 0.38 ± 0.03 und 0.38 ± 0.08 (mean \pm SEM).

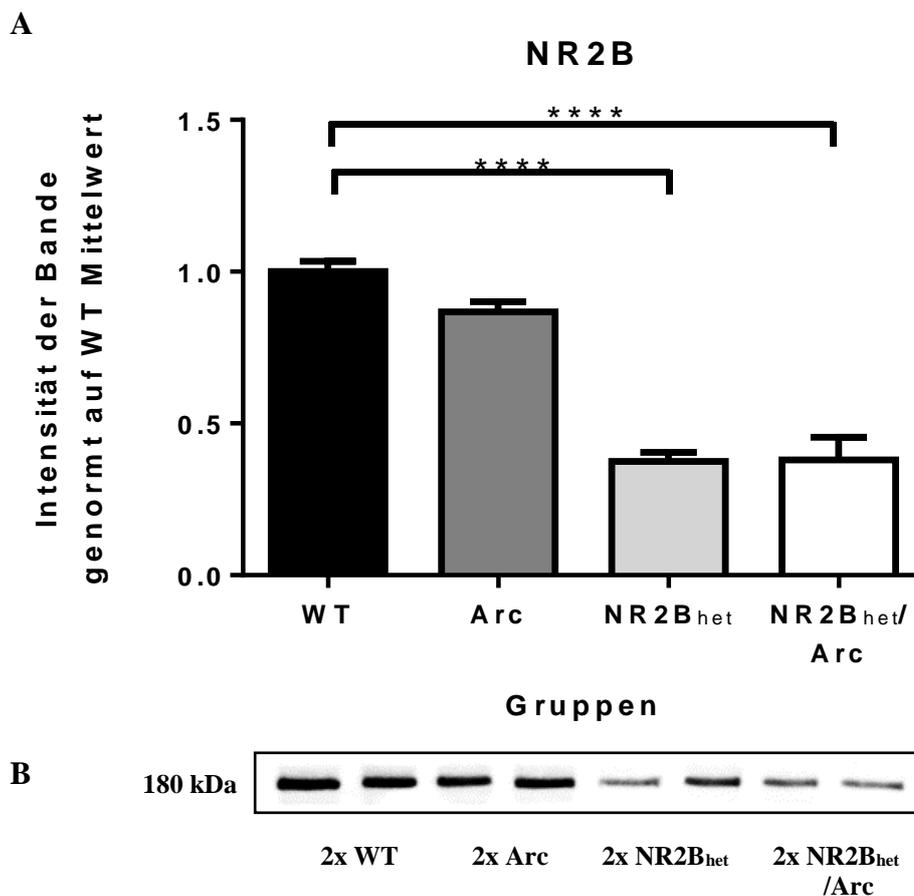


Abbildung 29: NR2B-Untereinheit signifikant erniedrigt in NR2B_{het} und NR2B_{het}/Arc.

A Die Intensitäten der Western Blot-Banden wurden auf den Mittelwert der WT-Gruppe normalisiert. Der NR2B-Rezeptor ist in der Arc-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe nicht verringert ($p=0.58$). Die normalisierte Intensität der Bande der NR2B-Untereinheit ist in der NR2B_{het} (0.38 ± 0.03) und NR2B_{het}/Arc-Gruppe (0.38 ± 0.08) signifikant verringert im Vergleich zur WT-Gruppe (1.0 ± 0.03) (mean \pm SEM). **B** Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der NR2B-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 180 kDa. **** p -Wert $< 0,0001$

1.2. Amyloid β

1.2.1. Humanes $A\beta_{1-42}$

Die transgenen Tiergruppen WT (n=4), Arc (n=4), NR2B_{het} (n=5) und NR2B_{het}/Arc (n=5) werden bezüglich ihres Gehalts an humanem $A\beta_{1-42}$ im Gehirngewebe verglichen. Der Nachweis erfolgt anhand eines ELISA.

Die Menge an humanem $A\beta_{1-42}$ ist in der Arc- (p=0.0012) und der NR2B_{het}/Arc-Gruppe (p=0.0014) im Vergleich zu WT signifikant erhöht. Die Werte betragen 0.36 ± 0.03 nmol/l in der WT-Gruppe, 15.34 ± 3.37 nmol/l in der Arc-Gruppe, 0.42 ± 0.03 nmol/l in der NR2B_{het}-Gruppe und 14.31 ± 2.4 nmol/l in der NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). Es existiert kein signifikanter Unterschied zwischen der Menge an $A\beta$ in der Arc- und der NR2B_{het}/Arc-Gruppe (p>0.9999).

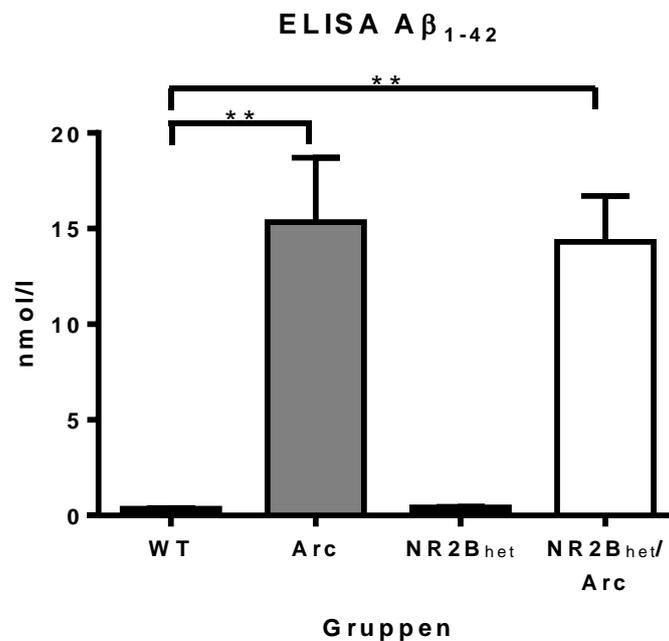


Abbildung 30: signifikanter Unterschied an humanem $A\beta_{1-42}$ in der Arc- und NR2B_{het}/Arc-Gruppe im Vergleich zu WT. Ergebnisse der humanen $A\beta_{1-42}$ ELISA. Die Menge an humanem $A\beta_{1-42}$ ist in der Arc- (p=0.0012) und der NR2B_{het}/Arc-Gruppe (p=0.0014) signifikant erhöht. Die Werte betragen 0.36 ± 0.03 nmol/l in der WT-Gruppe, 15.34 ± 3.37 nmol/l in der Arc-Gruppe, 0.42 ± 0.03 nmol/l in der NR2B_{het}-Gruppe und 14.31 ± 2.4 nmol/l in der NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). Es existiert kein signifikanter Unterschied zwischen der Menge an $A\beta$ in der Arc- und der NR2B_{het}/Arc-Gruppe (p>0.9999). ** p<0.01

1.2.2. Amyloid-Plaques

Fluoreszenzbilder der mit Methoxy-X04 gefärbten Schnitte der verschiedenen transgenen Gruppen WT (n=2), NR2B_{het} (n=2), Arc (n=3) und NR2B_{het}/Arc (n=3) werden zur Kontrolle angefertigt, um zu überprüfen, ob auch eine Plaquebildung (engl. *Plaque Load*) stattgefunden hat und ein Vergleich der Gruppen untereinander stattfinden kann.

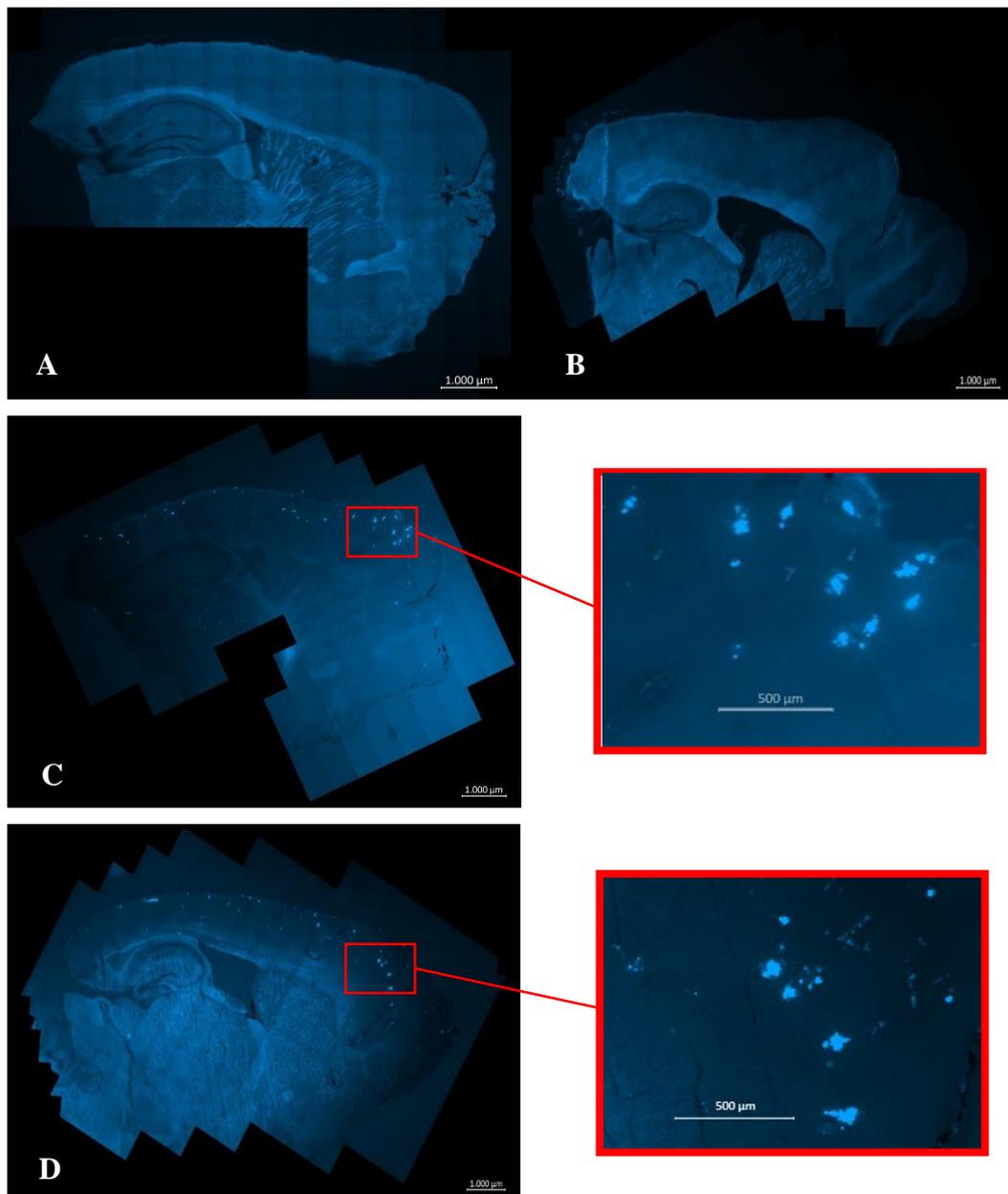


Abbildung 31: Plaquefärbung. Sagittale Gehirnschnitte werden mit Methoxy X04 gefärbt und mit einem Apotom aufgenommen A WT B NR2B_{het} → keine Plaquebildung C Arc D NR2B_{het}/Arc → deutliche Plaquebildung

Im gesamten Kortex beträgt die Menge der vorhandenen Plaques in den Arc-Tieren $0.24 \pm 0,1$ % der gesamten Kortexfläche, in den NR2B_{het}/Arc-Tieren 0.32 ± 0.07 %. In den WT- und NR2B_{het}-Gruppen ist der *Plaque load* unter 0,0005 %. Der *Plaque load* beträgt im präfrontalen Kortex im Durchschnitt in den Arc-Tieren 0.16 ± 0.05 % und 0.25 ± 0.03 % in den NR2B_{het}/Arc-Tieren. In der WT-Gruppe ist der *Plaque load* unter 0.002 % und in der NR2B_{het}-Gruppe unter 0.0003 % des präfrontalen Kortex. Im Hippokampus beträgt der *Plaque load* im Durchschnitt 0.042 ± 0.01 % in der Arc- und 0.05 ± 0.02 % in der NR2B_{het}/Arc-Gruppe. In den WT- und NR2B_{het}-Gruppen ist der *Plaque load* unter 0.003 % (mean \pm SEM).

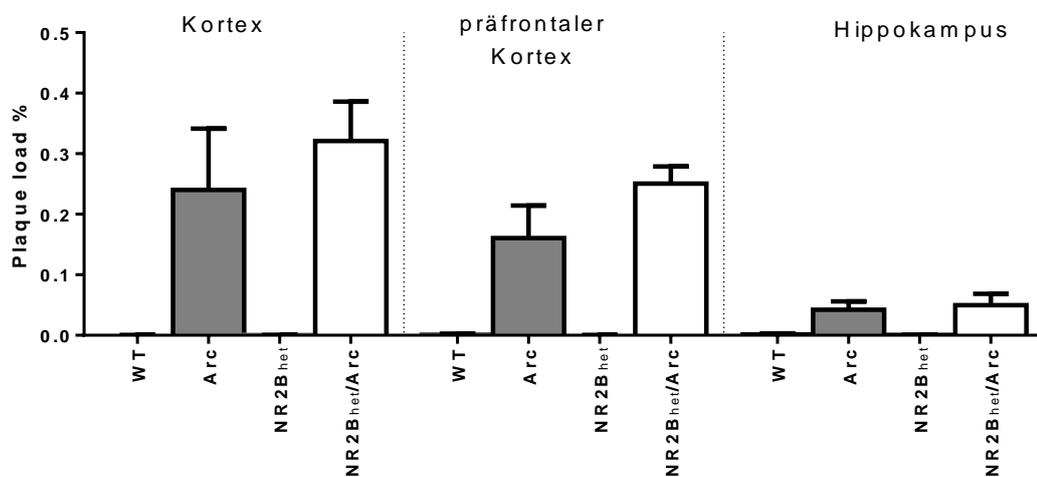


Abbildung 32: *Plaque load* im gesamten Kortex, im präfrontalen Kortex und im Hippokampus. Messung der *Plaque load* mit dem Programm *Image J*. Im gesamten Kortex beträgt der *Plaque load* in den Arc-Tieren $0.24 \pm 0,1$ % der gesamten Kortexfläche, in den NR2B_{het}/Arc-Tieren 0.32 ± 0.07 %. In den WT- und NR2B_{het}-Gruppen ist der *Plaque load* unter 0,0005 %. Der *Plaque load* beträgt im präfrontalen Kortex im Durchschnitt in den Arc-Tieren 0.16 ± 0.05 % und 0.25 ± 0.03 % in den NR2B_{het}/Arc-Tieren. In der WT-Gruppe ist der *Plaque load* unter 0.002 % und in der NR2B_{het}-Gruppe unter 0.0003 % des präfrontalen Kortex. Im Hippokampus beträgt der *Plaque load* im Durchschnitt 0.042 ± 0.01 % in der Arc- und 0.05 ± 0.02 % in der NR2B_{het}/Arc-Gruppe. In den WT- und NR2B_{het}-Gruppen ist der *Plaque load* unter 0.003 % (mean \pm SEM).

1.3. Autophagie

Die Autophagiemarker pUlk/Ulk, Klasse III PI3K, Beclin-1, Atg5 gebundenes Atg12 (Atg12), LC3B-II/LC3B-I, LC3B-II, und p62 wurden bei den transgenen Tieren der WT- (n=4), der Arc- (n=4), der NR2B_{het}- (n=4) und der NR2B_{het}/Arc-Gruppe (n=4) verglichen. Die Proben wurden wie im Kapitel „Methoden“ beschrieben, auf das Gesamtprotein der jeweiligen Probe normalisiert und auf den Mittelwert der WT-Proben genormt. Es soll festgestellt werden, ob die Mutation in der Arc-Gruppe durch die erhöhte Sekretion und Aggregation von A β eine veränderte Aktivität der Autophagie auslöst und ob diese durch die zusätzliche Mutation im NR2B-Rezeptor wieder aufgehoben werden kann.

pUlk/Ulk

Die Aktivierung des Ulk1 durch Phosphorylierung (= pUlk) führt zu einer erhöhten Kinaseaktivität des Ulk1 und somit zu einer Induktion der Autophagie. Eine reduzierte Aktivität der Autophagie zeigt sich in einem erniedrigten Verhältnis von pUlk zu Ulk.

Für das Verhältnis von pUlk/Ulk betragen die Werte für die Intensität der WB-Bande 1.0 ± 0.07 für die WT-Gruppe, 0.88 ± 0.07 für die Arc-Gruppe, 1.02 ± 0.04 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.16 ± 0.13 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). Die Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p > 0.9999$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p = 0.2347$) keinen signifikanten Unterschied.

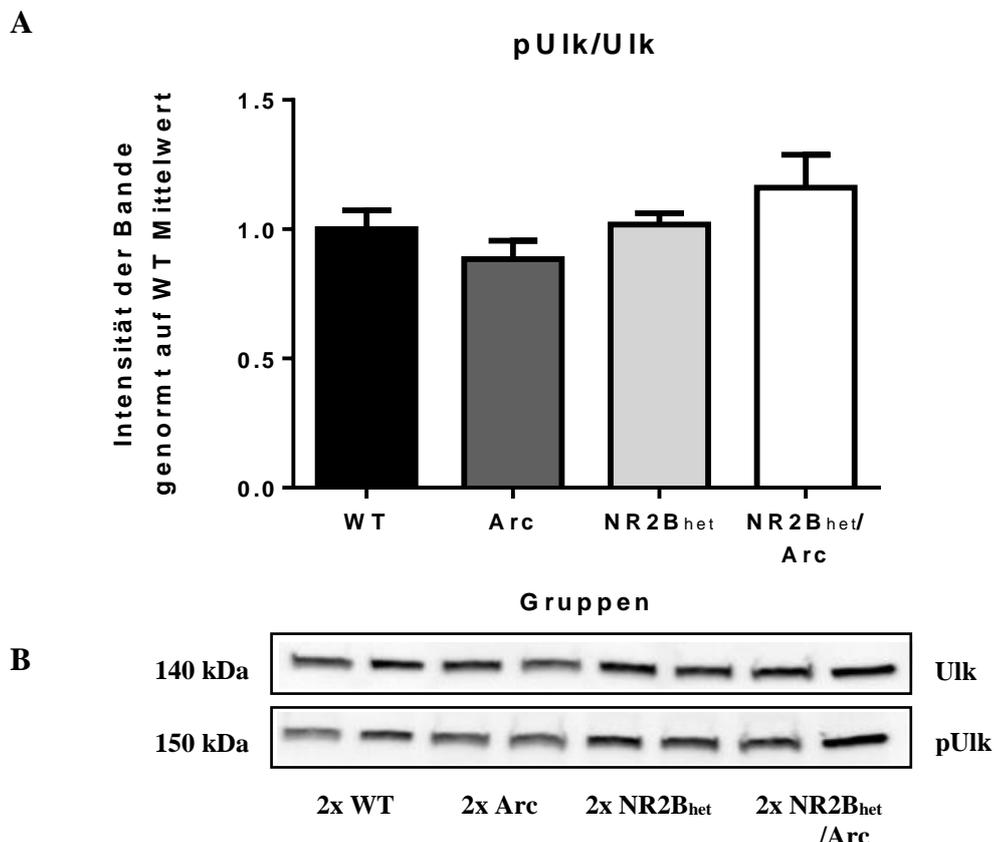


Abbildung 33: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers pUlk/Ulk. **A** Die Western Blot Ergebnisse der Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p > 0.9999$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p = 0.2347$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.07 für die WT-Gruppe, 0.88 ± 0.07 für die Arc-Gruppe, 1.02 ± 0.04 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.16 ± 0.13 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). **B** Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der pUlk-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 140 kDa, der Ulk-Antikörper auf Höhe 150 kDa.

Klasse III-PI3K

Die Nukleierung und die Zusammenlagerung der Phagophorenmembran benötigen den Klasse III-PI3K-Komplex, der unter anderem aus dem Klasse III-PI3K/Vps 34 und dem Atg6/Vps30, das zu dem in Säugetieren homologen Beclin-1, besteht. Eine reduzierte Aktivität der Autophagie zeigt sich in einer niedrigeren Intensität der Autophagiemarker Klasse III-PI3K und Beclin-1.

Die Werte für den Autophagiemarker Klasse III-PI3K betragen 1.0 ± 0.11 für die WT-Gruppe, 0.86 ± 0.1 für die Arc-Gruppe, 1.03 ± 0.15 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.2 ± 0.16 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). Die Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p > 0.9999$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p = 0.5322$) keinen signifikanten Unterschied.

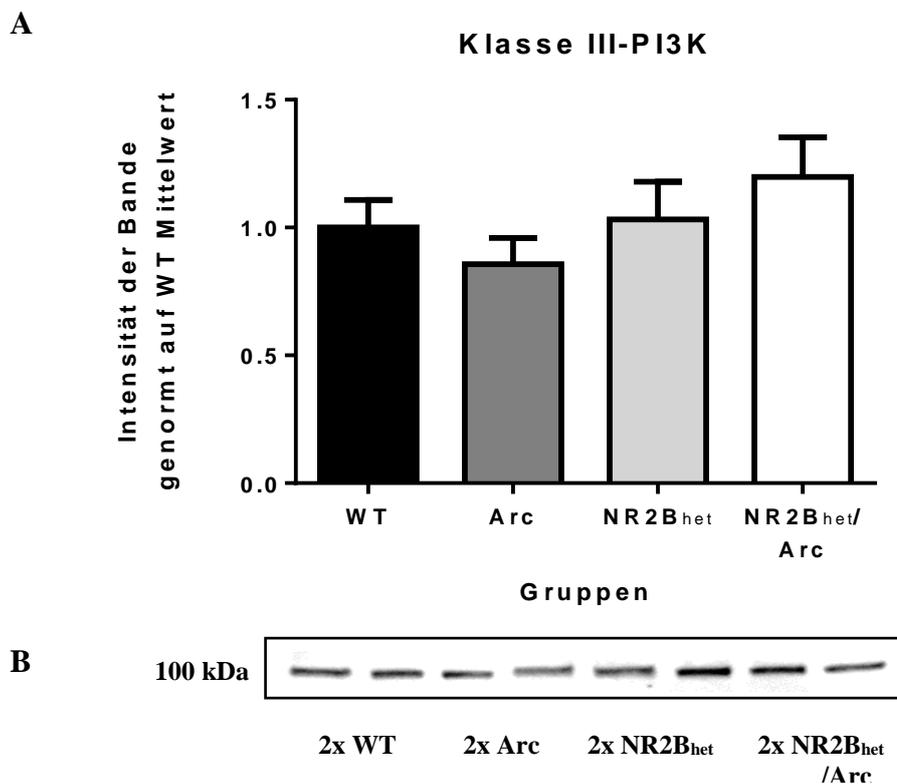


Abbildung 34: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Klasse III-PI3K. **A** Die Western Blot Ergebnisse der Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p > 0.9999$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p = 0.5322$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.11 für die WT-Gruppe, 0.86 ± 0.1 für die Arc-Gruppe, 1.03 ± 0.15 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.2 ± 0.16 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). **B** Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der Klasse III-PI3K-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 100 kDa.

Beclin-1

Die Werte für den Autophagiemarker Beclin-1 betragen 1.0 ± 0.05 für die WT-Gruppe, 0.83 ± 0.09 für die Arc-Gruppe, 0.98 ± 0.06 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.04 ± 0.07 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). Die Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p=0.6401$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p=0.3175$) keinen signifikanten Unterschied.

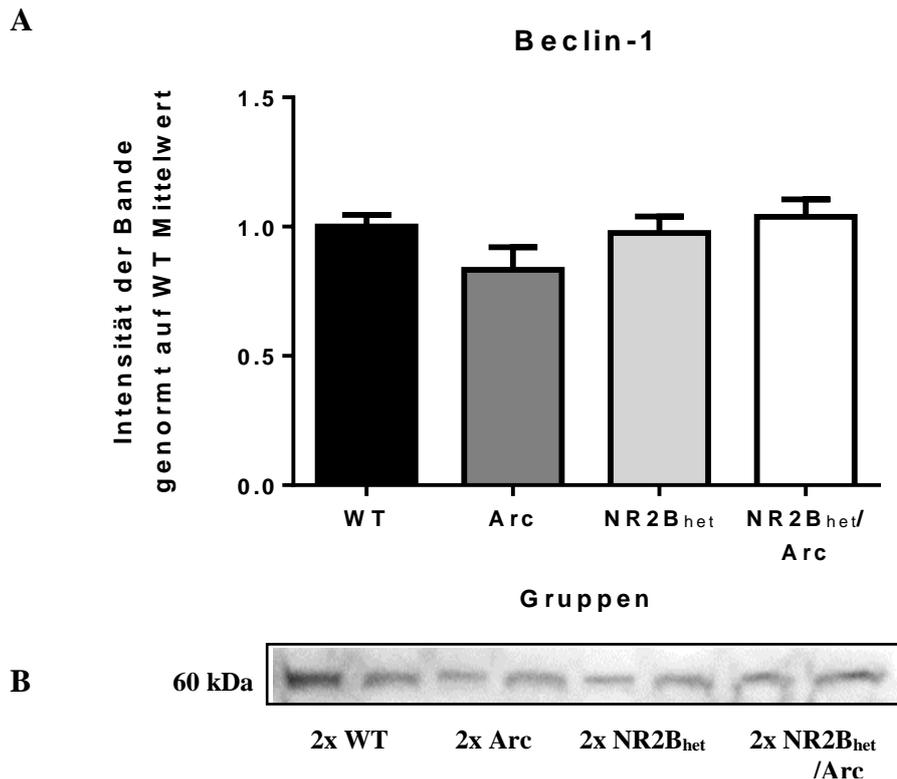


Abbildung 35: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Beclin-1.

A Die Western Blot Ergebnisse der Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p=0.6401$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p=0.3175$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.05 für die WT-Gruppe, 0.83 ± 0.09 für die Arc-Gruppe, 0.98 ± 0.06 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.04 ± 0.07 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). **B** Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der Beclin 1-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 60 kDa.

Atg12

Der Klasse III-PI3K-Komplex rekrutiert neben weiteren Proteinen zwei zusammenhängende Konjugationssysteme, das Atg12-Atg5-Atg16. Atg12 wird kovalent an das Substratprotein Atg5 gebunden, damit es an die Phagophore binden kann. Eine reduzierte Aktivität der Autophagie zeigt sich in einer niedrigeren Intensität des Autophagiemarkers Atg12 (Atg5 gebundenes Atg12).

Die Werte für den Autophagiemarker Atg12 betragen 1.0 ± 0.05 für die WT-Gruppe, 0.74 ± 0.06 für die Arc-Gruppe, 0.89 ± 0.07 für die NR2B_{het}-Gruppe und 0.87 ± 0.09 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe. Die Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p=0.1484$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied.

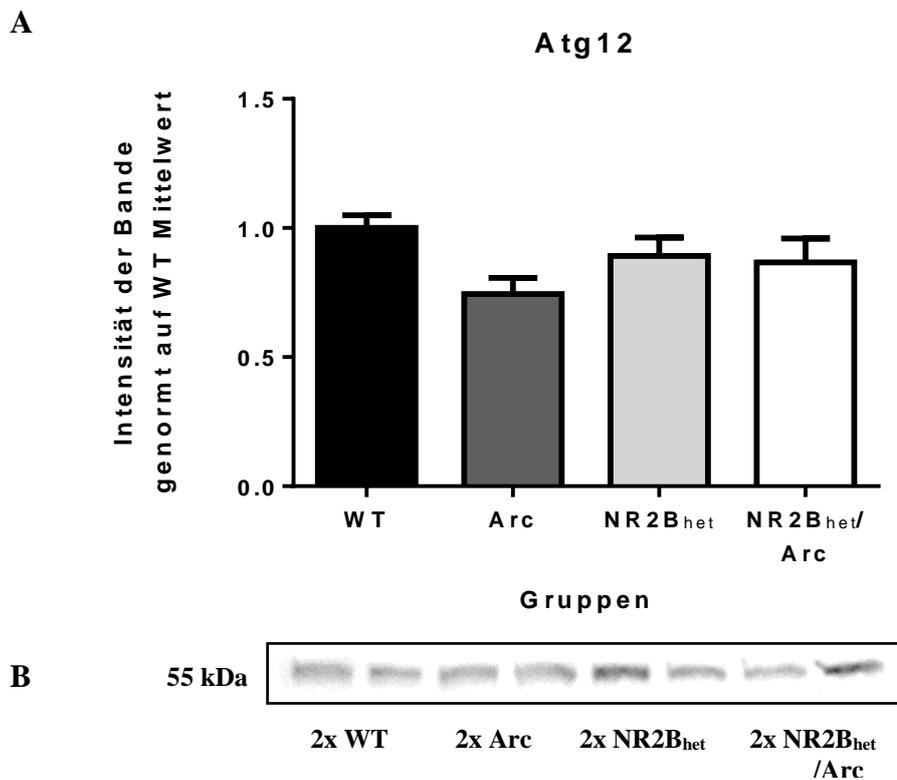


Abbildung 36: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Atg12.

A Die Western Blot Ergebnisse der Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p=0.1484$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.05 für die WT-Gruppe, 0.74 ± 0.06 für die Arc-Gruppe, 0.89 ± 0.07 für die NR2B_{het}-Gruppe und 0.87 ± 0.09 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM).

B Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der Atg12-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 55 kDa.

LC3B-II/LC3B-I

Durch die Autophagieinduktion wird das LC3B-I in eine lipid-konjugierte Form umgewandelt (LC3B-II) und ist an beiden Seiten der Phagophore zu finden, um dort die Größe des Autophagosoms zu kontrollieren. Die Fertigstellung des Autophagosoms ist gekennzeichnet durch die Freisetzung des LC3B-II, welches dann wiederverwertet wird. Eine reduzierte Aktivität der Autophagie zeigt sich in einem erniedrigten Verhältnis von LC3B-II zu LC3B-I bzw. einer niedrigeren Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II.

Für das Verhältnis von LC3B-II/LC3B-I betragen die Werte für die Intensität der WB-Bande 1.0 ± 0.13 für die WT-Gruppe, 0.79 ± 0.07 für die Arc-Gruppe, 1.01 ± 0.09 für die NR2B_{het}-Gruppe und 0.93 ± 0.1 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). Die Arc- zeigen im Vergleich zu den anderen Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

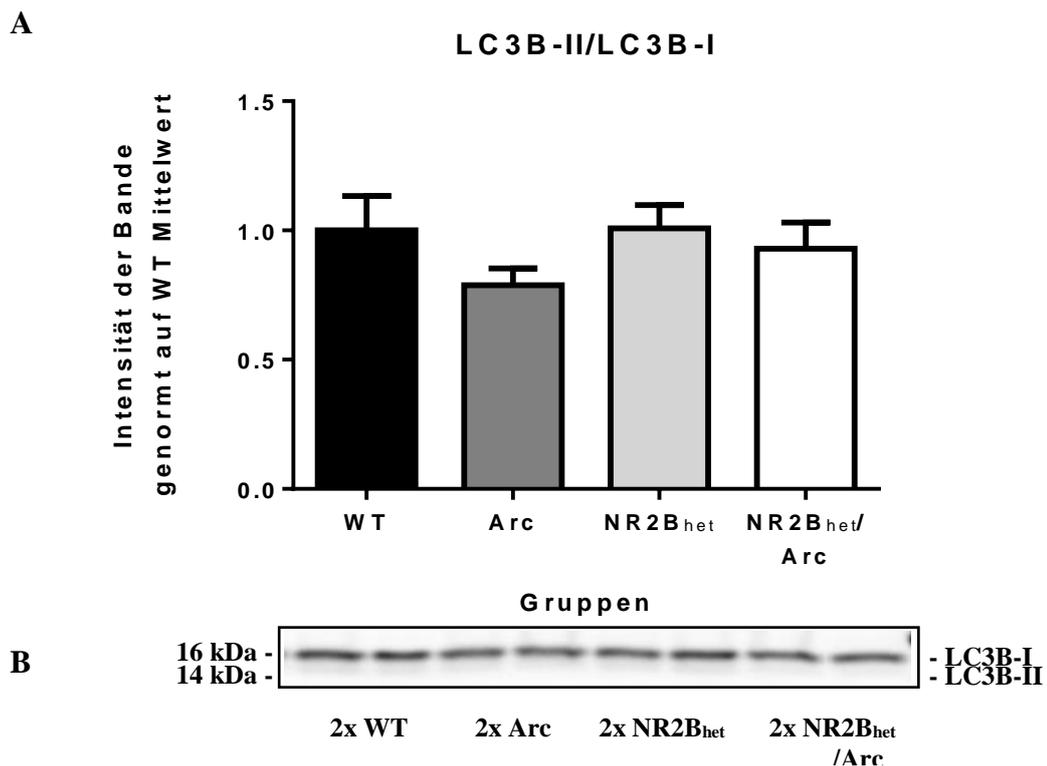


Abbildung 37: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II/LC3B-I. **A** Die Western Blot Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Unterschied der Arc- im Vergleich zu den anderen Gruppen beim Autophagiemarker LC3B-II/LC3B-I. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.13 für die WT-Gruppe, 0.79 ± 0.07 für die Arc-Gruppe, 1.01 ± 0.09 für die NR2B_{het}-Gruppe und 0.93 ± 0.1 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). **B** Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der LC3B-I-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 16 kDa (obere Bande), der LC3B-II-Antikörper auf Höhe 14 kDa (untere Bande).

LC3B-II

Die Werte für den Autophagiemarker LC3B-II betragen 1.0 ± 0.03 für die WT-Gruppe, 0.74 ± 0.05 für die Arc-Gruppe, 1.08 ± 0.07 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.03 ± 0.11 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). Die Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p=0.1482$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p=0.0921$) keinen signifikanten Unterschied. Es ist eine leichte Tendenz zu erkennen, dass die Arc-Tiere eine erniedrigte Expression des LC3B-II-Markers im Vergleich zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe zeigen.

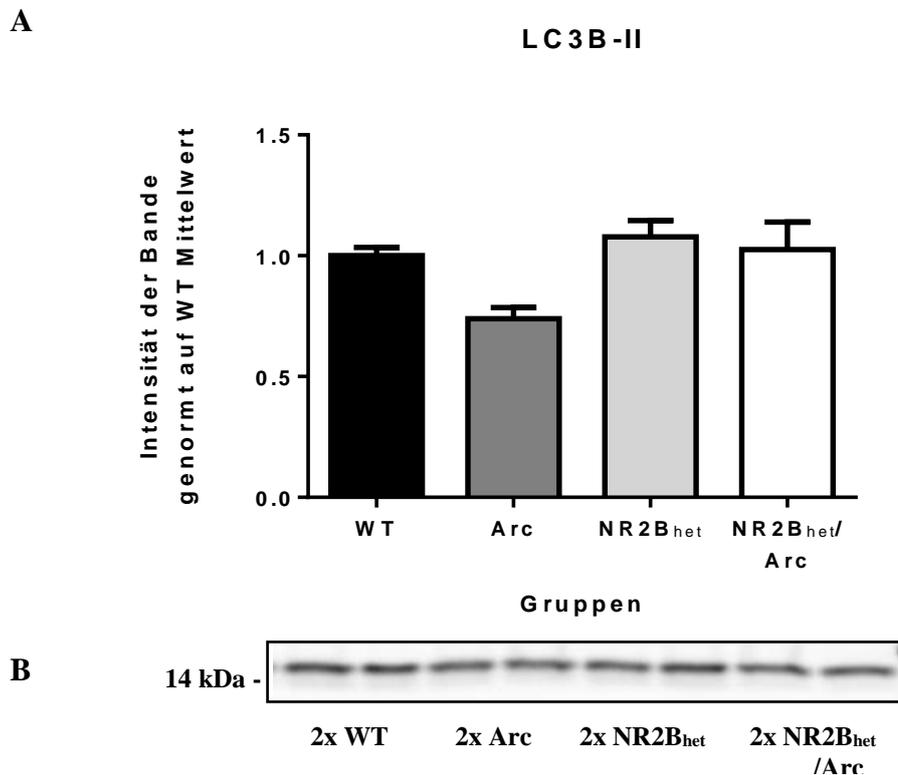


Abbildung 38: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II.

A Die Western Blot Ergebnisse der Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p=0.1482$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p=0.0921$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.03 für die WT-Gruppe, 0.74 ± 0.05 für die Arc-Gruppe, 1.08 ± 0.07 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.03 ± 0.11 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM).

B Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der LC3B-II-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 14 kDa (untere Bande).

p62

p62 bindet an die ubiquitinierten Substrate und verbindet sie so direkt mit dem Autophagiemechanismus zur autophagischen Degradation. Somit wird p62 während der Autophagieinduktion als Substratbinder verbraucht. Eine reduzierte Aktivität der Autophagie zeigt sich in einer erhöhten Intensität des Autophagiemarkers p62.

Die Werte für den Autophagiemarker p62 betragen 1.0 ± 0.24 für die WT-Gruppe, 1.02 ± 0.13 für die Arc-Gruppe, 1.11 ± 0.09 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.19 ± 0.26 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM). Die Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p > 0.9999$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied.

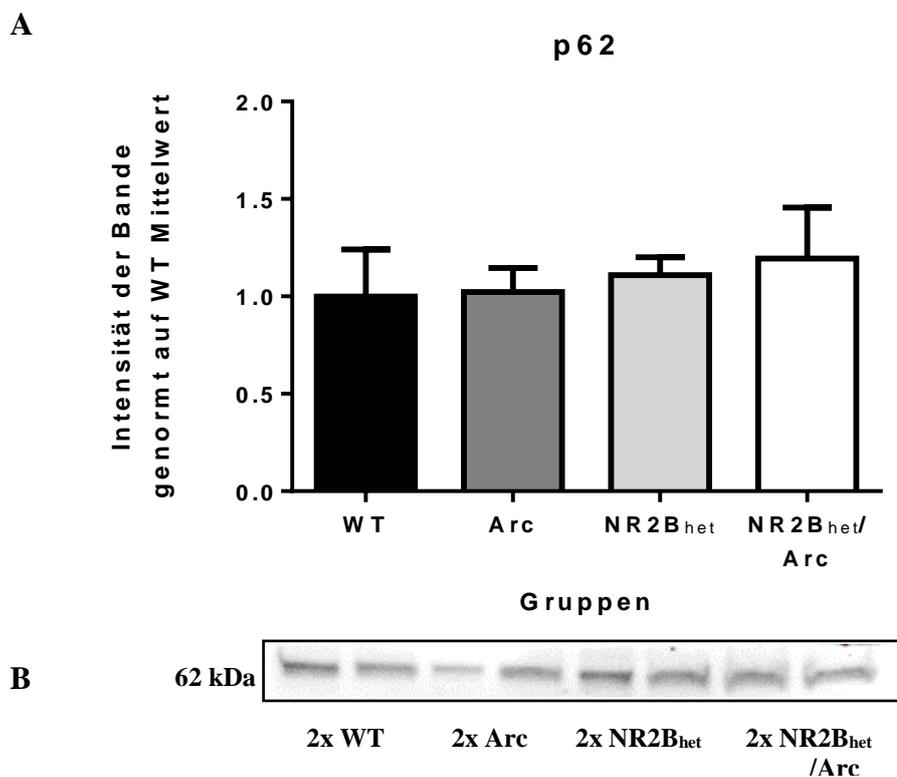


Abbildung 39: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers p62. A

Die Western Blot Ergebnisse der Arc-Tiere zeigen im Vergleich zur WT-Gruppe ($p > 0.9999$) und zur NR2B_{het}/Arc-Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.24 für die WT-Gruppe, 1.02 ± 0.13 für die Arc-Gruppe, 1.11 ± 0.09 für die NR2B_{het}-Gruppe und 1.19 ± 0.26 für die NR2B_{het}/Arc-Gruppe (mean \pm SEM).

B Exemplarische Darstellung des Western Blots. Der p62-Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe 62 kDa.

2. Inkubierte Schnitte

Wie in Kapitel III.2.2.1. besprochen, entstehen durch die Inkubation mit verschiedenen A β -Arten (50 nM) und Radiprodil (10 nM) vier verschiedene Versuchsgruppen: A = Kontrolle, B = Radiprodil, C = A β , D = Radiprodil + A β .

Die Aktivität der Autophagie soll anhand des Proteinexpressionsmusters der Autophagiemarker in einem Pilotprojekt überprüft werden.

Des Weiteren findet ein Vergleich der vier Gruppen bezüglich der *spine density* statt.

2.1. Autophagie

Die Autophagiemarker Klasse III-PI3K, Beclin-1, Atg12, LC3B-II/LC3B-I, LC3B-II, und p62 werden bei den inkubierten Schnitten der Kontrolle (n=12), der Radiprodil-Gruppe mit 10 nM (n=12), und den vier A β -Arten (50 nM A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂, ^{3Ntyr10}A β , A β _{pE3-42}), jeweils ohne vorherige Inkubation mit Radiprodil (n=4) und mit vorheriger Inkubation mit 10 nM Radiprodil (n=4) verglichen. Die Proben wurden wie im Kapitel III.2.2. beschrieben, auf das Gesamtprotein der jeweiligen Probe normalisiert und auf den Mittelwert der Kontroll-Gruppe genormt.

2.1.1. Autophagiemarker

Es wurde kein signifikanter Unterschied der Autophagiemarker zwischen den Gruppen weder im Kortex noch im Hippokampus gefunden. In diesem Kapitel sind die Ergebnisse zusammengefasst und in Balkendiagrammen dargestellt. Die ausführlichen Daten sind im Anhang zu finden.

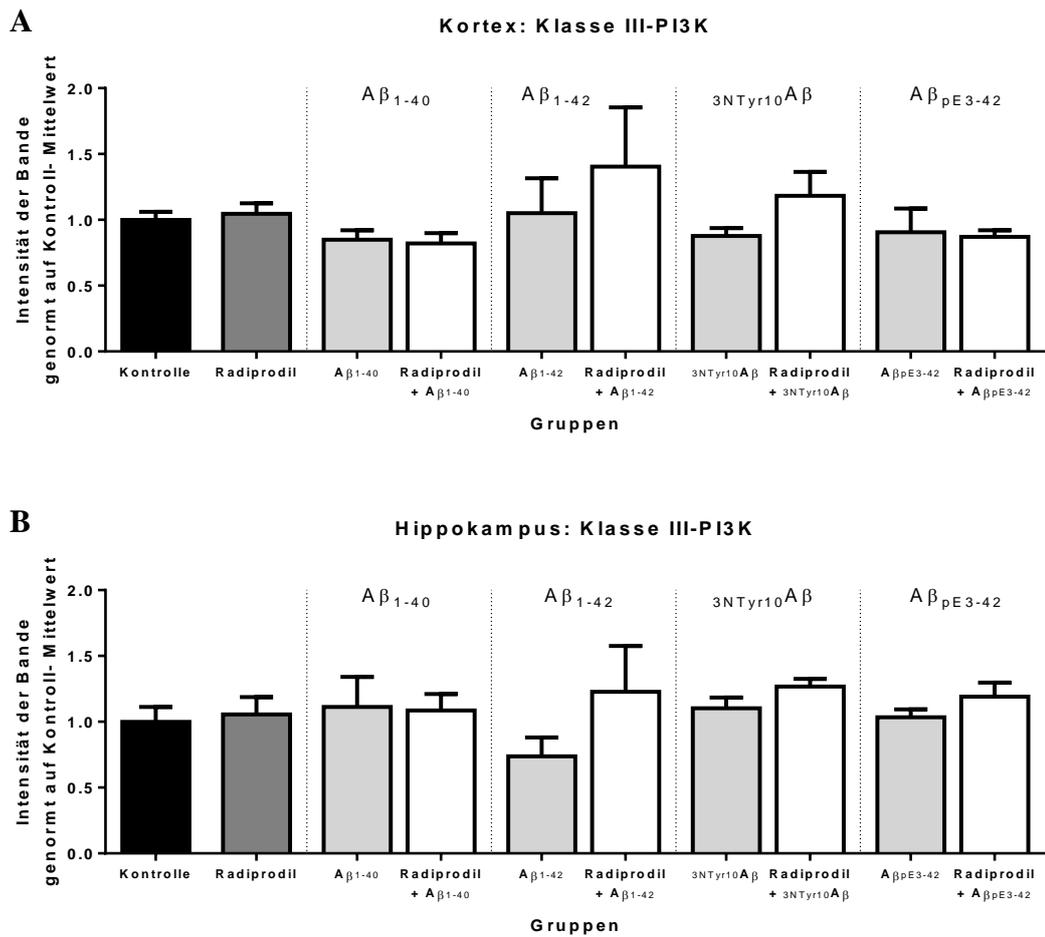


Abbildung 40: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Klasse III-PI3K. **A** Die Western Blot-Ergebnisse des Kortex zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Die Western Blot-Ergebnisse des Hippokampus zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. (ausführliche Ergebnisse siehe Anhang)

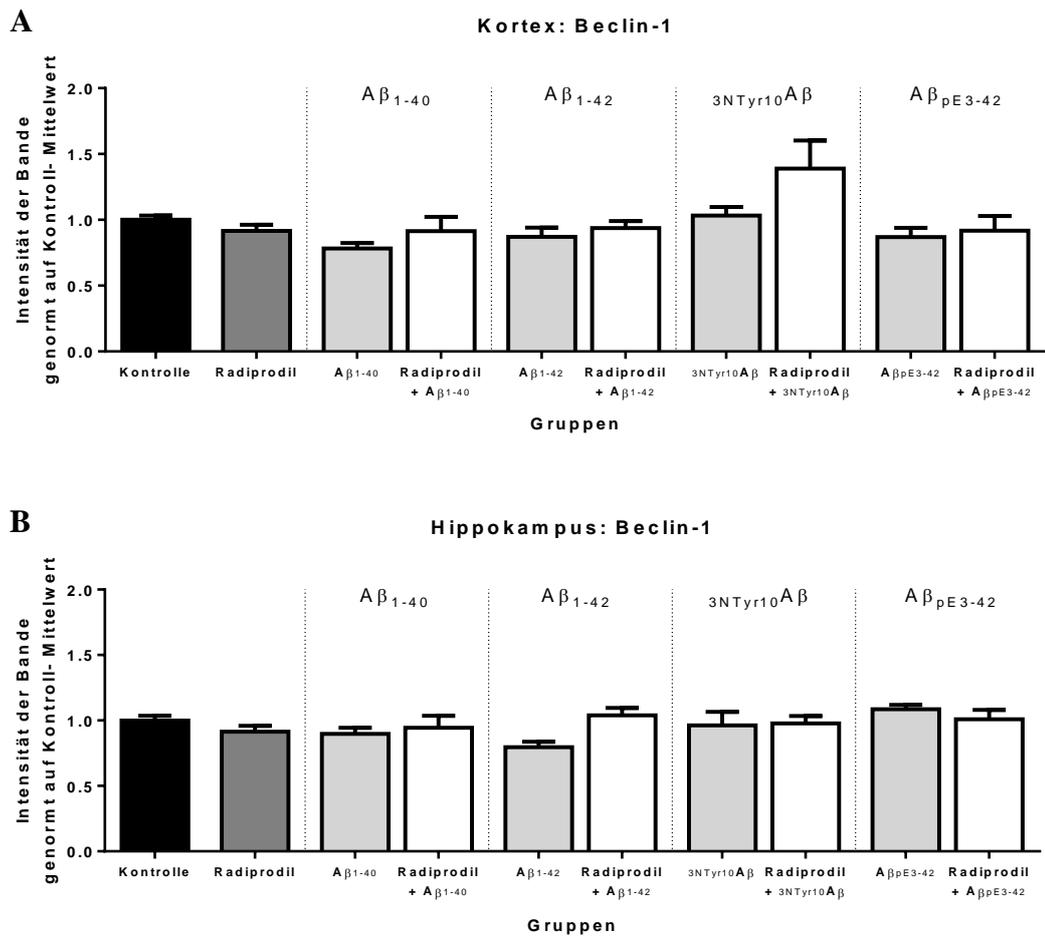


Abbildung 41: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Beclin-1.

A Die Western Blot-Ergebnisse des Kortex zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Die Western Blot-Ergebnisse des Hippokampus zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. (ausführliche Ergebnisse siehe Anhang)

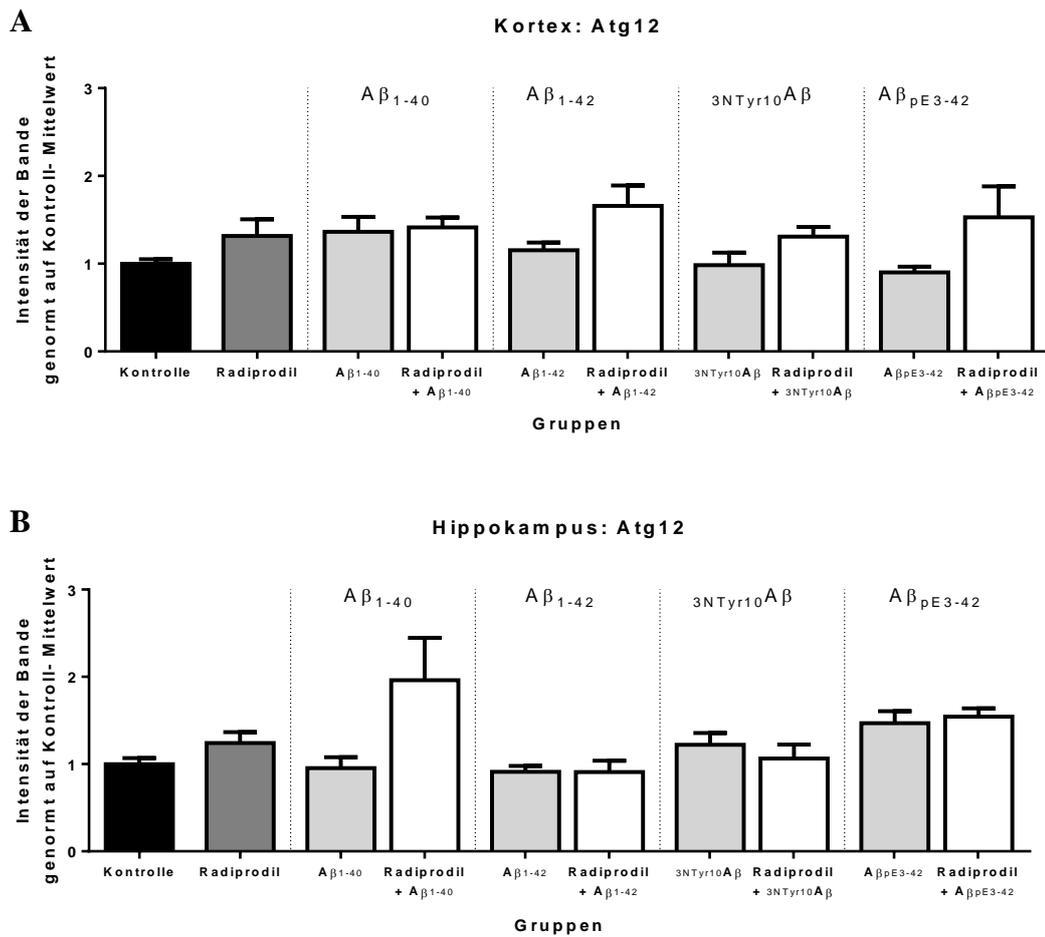


Abbildung 42: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Atg12.

A Die Western Blot-Ergebnisse des Kortex zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Die Western Blot-Ergebnisse des Hippokampus zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. (ausführliche Ergebnisse siehe Anhang)

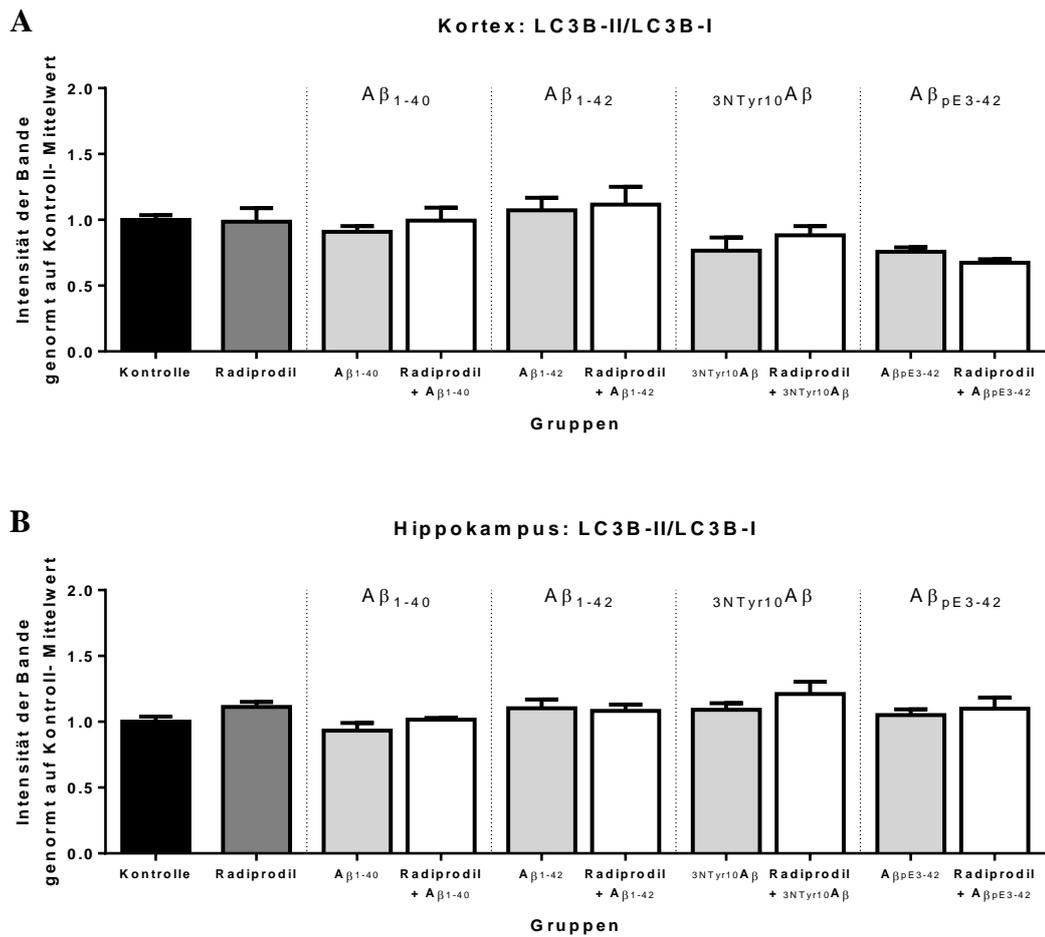


Abbildung 43: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II/LC3B-I. **A** Die Western Blot-Ergebnisse des Kortex zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Die Western Blot-Ergebnisse des Hippokampus zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. (ausführliche Ergebnisse siehe Anhang)

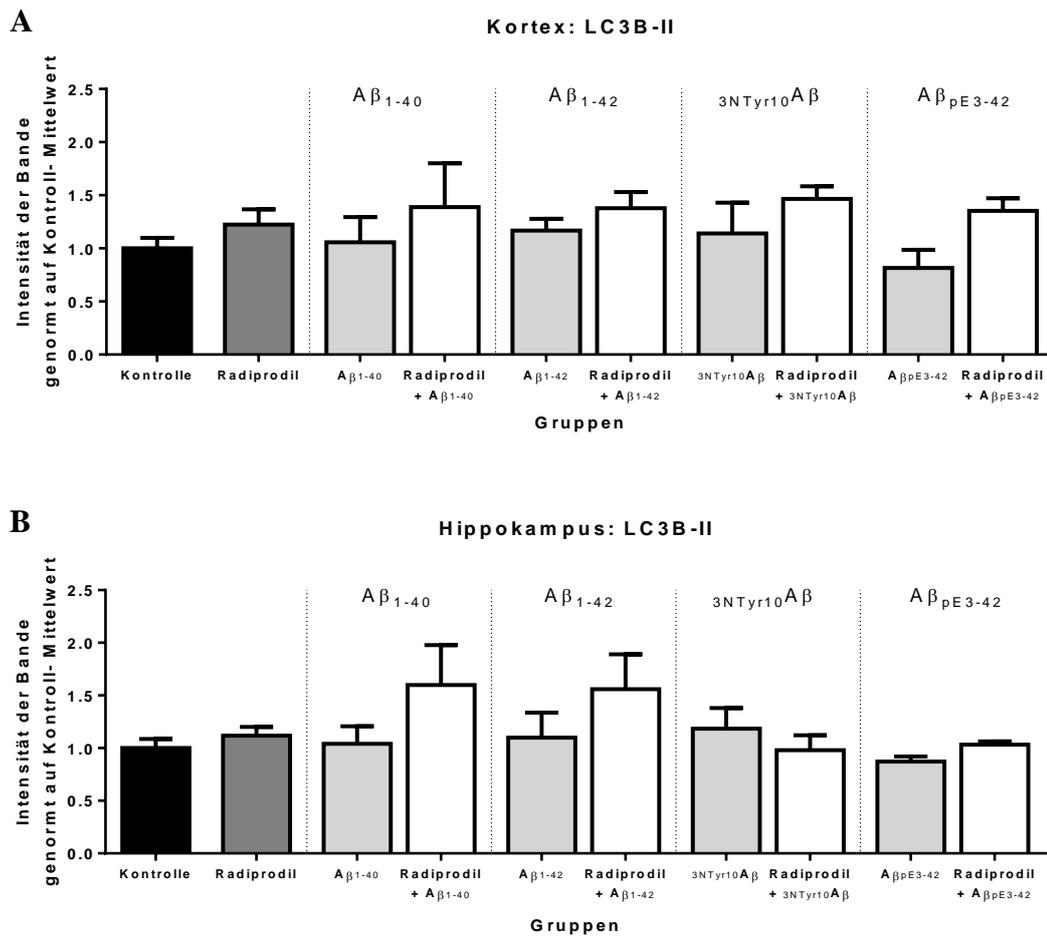


Abbildung 44: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II.

A Die Western Blot-Ergebnisse des Kortex zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Die Western Blot-Ergebnisse des Hippokampus zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. (ausführliche Ergebnisse siehe Anhang)

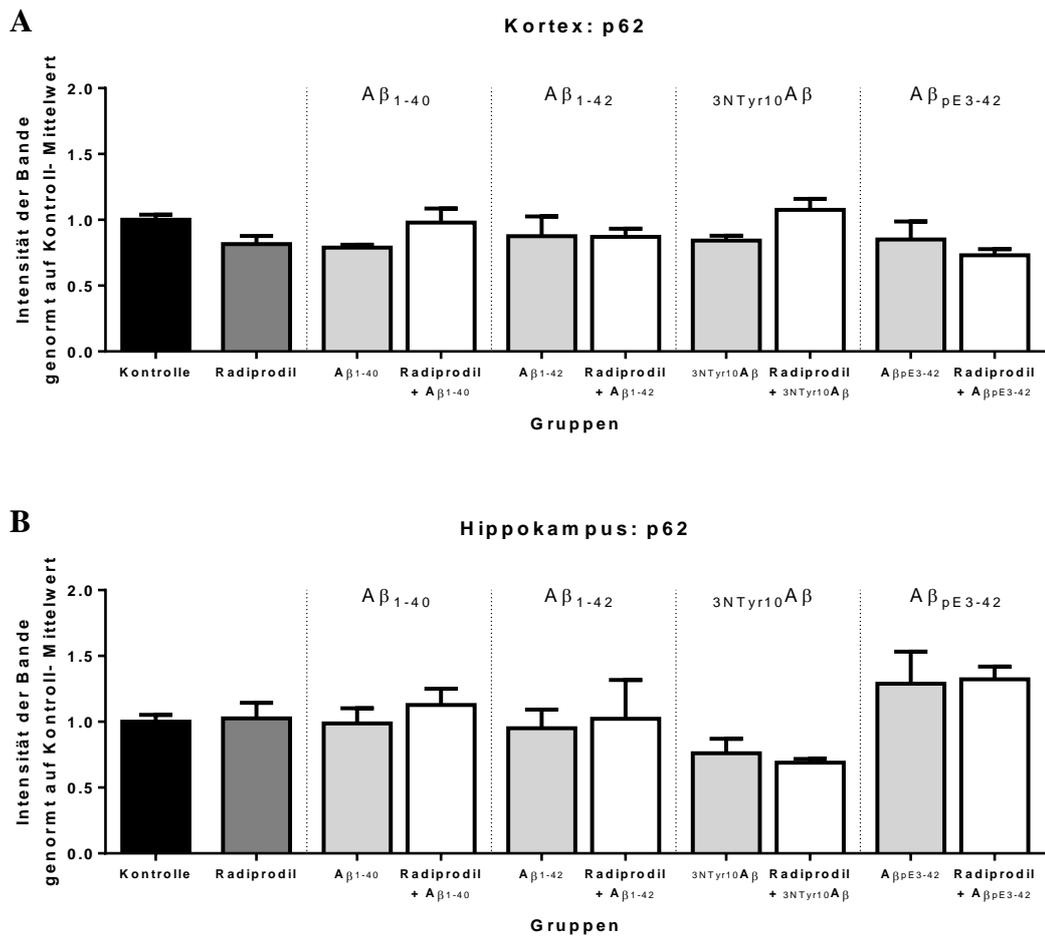


Abbildung 45: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers p62.

A Die Western Blot-Ergebnisse des Kortex zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. **B** Die Western Blot-Ergebnisse des Hippokampus zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. (ausführliche Ergebnisse siehe Anhang)

2.1.2. Rapamycin

Um zu überprüfen, ob ein Autophagie-Inducer nach gleicher Inkubationszeit wie für A β , einen Einfluss auf das Expressionsmuster der Autophagiemarker hat, werden die Schnitte für eineinhalb Stunden mit 10 nM bzw. 100 nM Rapamycin inkubiert. Die Autophagiemarker im Kortex (n=4) und Hippokampus (n=4) werden mit einer Kontrollgruppe (n=4) verglichen. Rapamycin ist ein direkter Inhibitor des mTOR und aktiviert somit auch die Autophagie (siehe Kapitel II.3.1.).

Es wurde kein signifikanter Unterschied im Proteinexpressionsmuster der Autophagiemarker im Kortex festgestellt.

Im Hippokampus zeigten einige der Autophagiemarker (LC3B-II/LC3B-I, LC3B-II, Klasse III-PI3K) eine signifikante Erhöhung bei Zugabe von Rapamycin.

Klasse III-PI3K

Der Autophagiemarker Klasse III-PI3K ist im Hippokampus bei Zugabe von Rapamycin signifikant erhöht ($p=0.0023$). Die Werte betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.06 und der Rapamycin-Gruppe 1.64 ± 0.11 . Im Kortex existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.9203$).

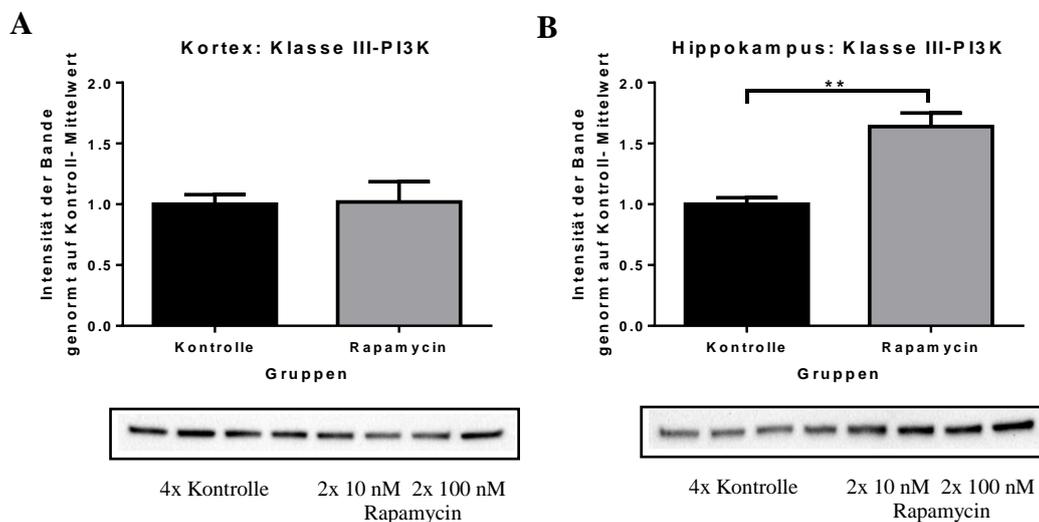


Abbildung 46: Vergleich des Expressionsmusters des Autophagiemarkers Klasse III-PI3K zwischen Kontrolle und Rapamycin. Vergleich der Kontrollgruppe (n=4) und der Gruppe, die für eineinhalb Stunden mit Rapamycin (10 nM n=2, 100 nM n=2) inkubiert wurde.

A Kortex Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.08 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.02 ± 0.15 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.9203$). **B Hippokampus** Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.06 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.64 ± 0.11 . Es existiert ein signifikanter Unterschied ($p=0.0023$). ** p-Wert < 0.01

Beclin-1

Der Autophagiemarker Beclin-1 ist sowohl im Kortex ($p=0.4926$), als auch im Hippokampus ($p=0.4$) nicht signifikant verändert.

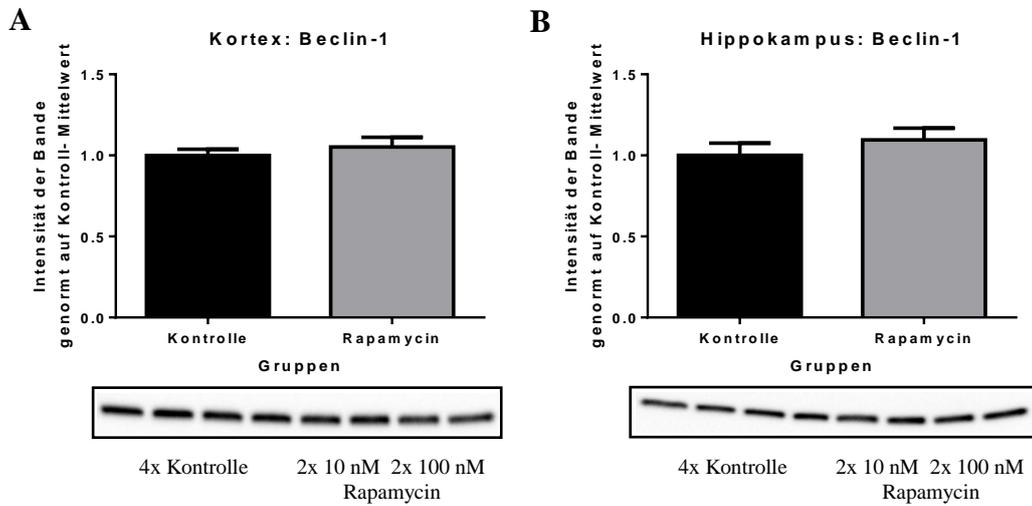


Abbildung 47: Vergleich des Expressionsmusters des Autophagiemarkers Beclin-1 zwischen Kontrolle und Rapamycin. Vergleich der Kontrollgruppe ($n=4$) und der Gruppe, die für eineinhalb Stunden mit Rapamycin (10 nM $n=2$, 100 nM $n=2$) inkubiert wurde.

A Kortex Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.04 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.05 ± 0.06 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.4926$). **B Hippokampus** Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.08 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.1 ± 0.07 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.4$).

Atg12

Es existiert kein signifikanter Unterschied in der Intensität des Atg12 im Kortex ($p=0.6081$) oder Hippokampus ($p=0.1460$).

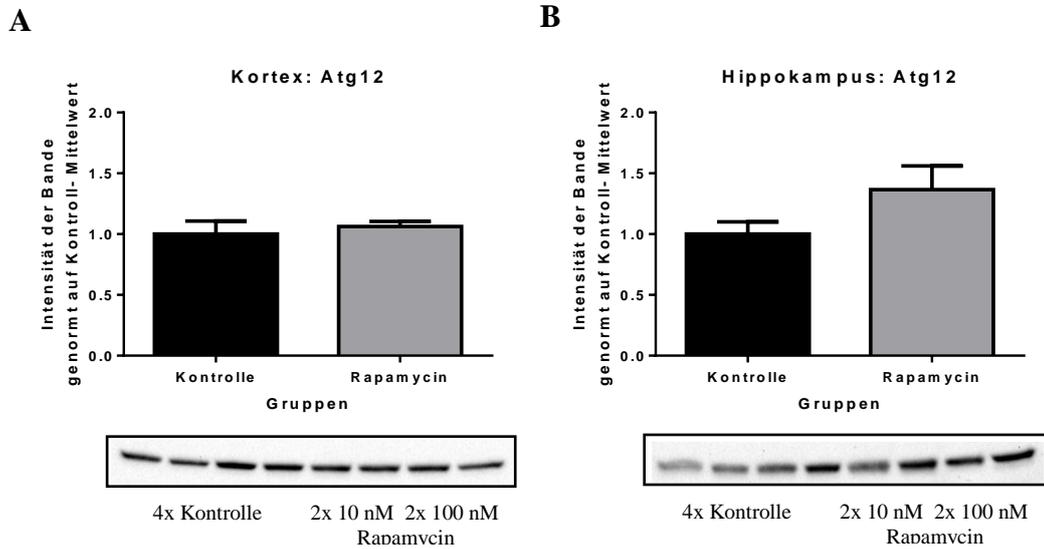


Abbildung 48: Vergleich des Expressionsmusters des Autophagiemarkers Atg12 zwischen Kontrolle und Rapamycin. Vergleich der Kontrollgruppe ($n=4$) und der Gruppe, die für eineinhalb Stunden mit Rapamycin (10 nM $n=2$, 100 nM $n=2$) inkubiert wurde.

A Kortex Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.11 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.06 ± 0.04 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.6081$). **B Hippokampus** Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.1 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.37 ± 0.19 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.1460$).

LC3B-II/LC3B-I

Das Verhältnis von LC3B-II/LC3B-I ist im Hippokampus bei Zugabe von Rapamycin signifikant erhöht ($p=0.0021$). Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.1 und der Rapamycin-Gruppe 1.55 ± 0.03 . Im Kortex ist dieser Autophagiemarker nicht signifikant verändert ($p=0.4205$).

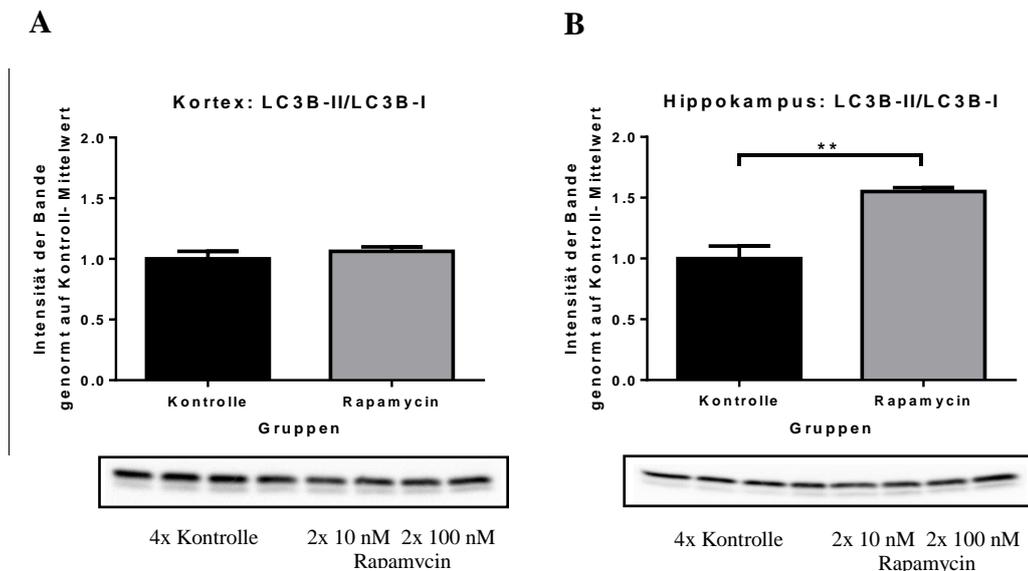


Abbildung 49: Vergleich des Expressionsmusters des Autophagiemarkers LC3B-II/LC3B-I zwischen Kontrolle und Rapamycin. Vergleich der Kontrollgruppe ($n=4$) und der Gruppe, die für eineinhalb Stunden mit Rapamycin (10 nM $n=2$, 100 nM $n=2$) inkubiert wurde.

A Kortex Für das Verhältnis der Intensität der Western Blot-Bande betragen die Werte der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.06 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.06 ± 0.04 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.4205$). **B Hippokampus** Für das Verhältnis der Intensität der Western Blot-Bande betragen die Werte der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.1 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.55 ± 0.03 . Es existiert ein signifikanter Unterschied ($p=0.0021$). ** p -Wert < 0.01

LC3B-II

Auch die Werte des Autophagiemarkers LC3B-II sind im Hippokampus bei der Rapamycin-Gruppe signifikant erhöht ($p=0.0029$). Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.1 und der Rapamycin-Gruppe 1.50 ± 0.04 .

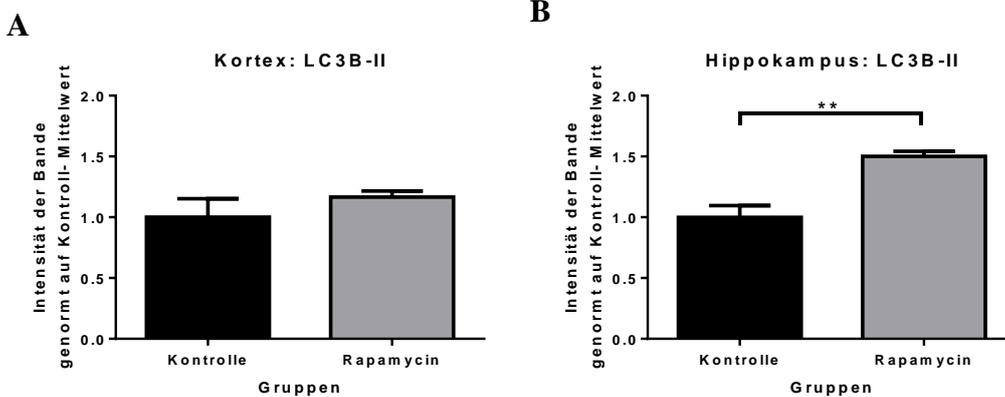


Abbildung 50: Vergleich des Expressionsmusters des Autophagiemarkers LC3B-II zwischen Kontrolle und Rapamycin. Vergleich der Kontrollgruppe ($n=4$) und der Gruppe, die für eineinhalb Stunden mit Rapamycin (10 nM $n=2$, 100 nM $n=2$) inkubiert wurde.

A Kortex Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.15 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.17 ± 0.05 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.3418$). **B Hippokampus** Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.1 und bei der Rapamycin-Gruppe 1.50 ± 0.04 . Es existiert ein signifikanter Unterschied ($p=0.0029$). ** p-Wert < 0.01

p62

Der Autophagiemarker p62 ist sowohl im Kortex ($p=0.2602$), als auch im Hippokampus ($p=0.7558$) nicht signifikant verändert.

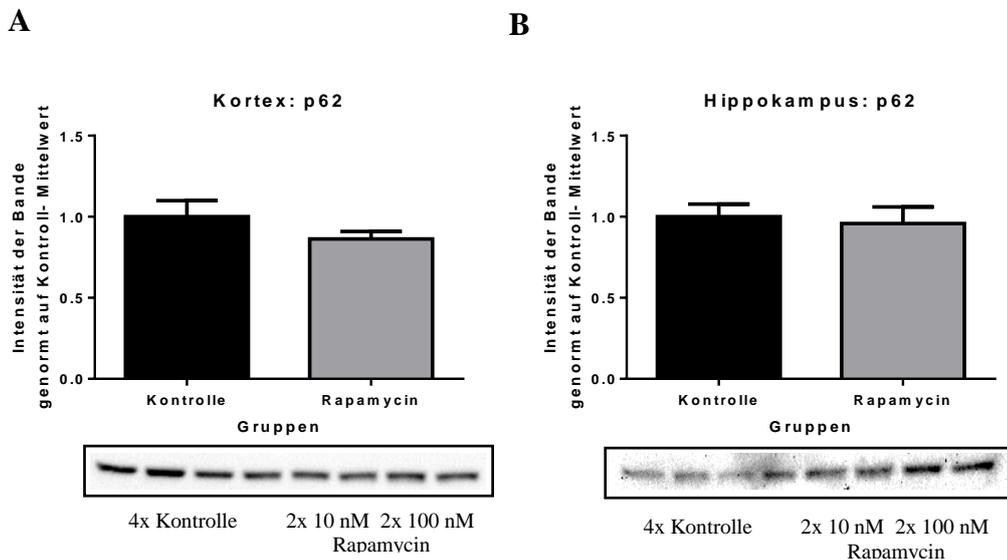


Abbildung 51: Vergleich des Expressionsmusters des Autophagiemarkers p62 zwischen Kontrolle und Rapamycin. Vergleich der Kontrollgruppe ($n=4$) und der Gruppe, die für eineinhalb Stunden mit Rapamycin (10 nM $n=2$, 100 nM $n=2$) inkubiert wurde.

A Kortex Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.1 und bei der Rapamycin-Gruppe 0.86 ± 0.04 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.2602$). **B Hippokampus** Die Werte der Intensität der Western Blot-Bande betragen bei der Kontrollgruppe 1.0 ± 0.08 und bei der Rapamycin-Gruppe 0.96 ± 0.1 . Es existiert kein signifikanter Unterschied ($p=0.7558$).

2.2. Spine density

Die *spine density* wurde in den verschiedenen Gruppen verglichen, um zu überprüfen, ob lösliches A β (50 nM) durch seine synaptotoxischen Effekte die *spine density* in murinen Gehirnschnitten verringern kann. Durch die Applikation von Radiprodil (10 nM) soll kontrolliert werden, ob Radiprodil per se eine Veränderung der *spine density* bewirkt bzw. gegebenenfalls die Wirkung von A β auf die *spine density* beeinflusst.

Die durchschnittliche *spine density* in der Kontrollgruppe (n=9) (viereinhalb Stunden Inkubation ohne Zugabe von Substanzen) beträgt 1.67 ± 0.02 spines/ μm . In den Schnitten, die zweieinhalb Stunden in 10 nM Radiprodil inkubierten (n=6), beträgt die *spine density* im Durchschnitt 1.7 ± 0.05 spines/ μm (mean \pm SEM). Zwischen der Kontrollgruppe und der Radiprodil-Gruppe existiert kein signifikanter Unterschied ($p > 0,9999$).

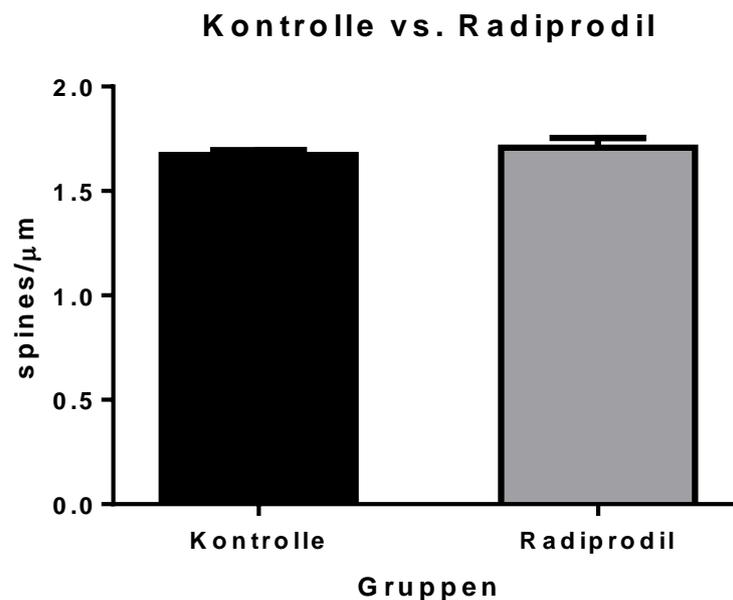


Abbildung 52: kein Unterschied in der *spine density* zwischen Kontrollgruppe und Radiprodil.

Die durchschnittliche *spine density* in der Kontrollgruppe (n=9) (zweieinhalb Stunden Inkubation ohne Zugabe von Substanzen) beträgt 1.67 ± 0.02 spines/ μm . In den Schnitten, die zweieinhalb Stunden in 10 nM Radiprodil inkubierten (n=6), beträgt die *spine density* im Durchschnitt 1.7 ± 0.05 spines/ μm (mean \pm SEM). Zwischen der Kontrollgruppe und der Radiprodil-Gruppe existiert kein signifikanter Unterschied ($p > 0,9999$).

A β_{1-40}

Die Zugabe von 50 nM A β_{1-40} für eineinhalb Stunden (n=5) verringert die *spine density* signifikant ($p < 0.0001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit Radiprodil + A β_{1-40}) auf 1.34 ± 0.05 spines/ μm . Bei Zugabe von 10 nM Radiprodil eine Stunde vor Zugabe von A β_{1-40} wird die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verringert ($p > 0.9999$) und beträgt 1.67 ± 0.02 spines/ μm .

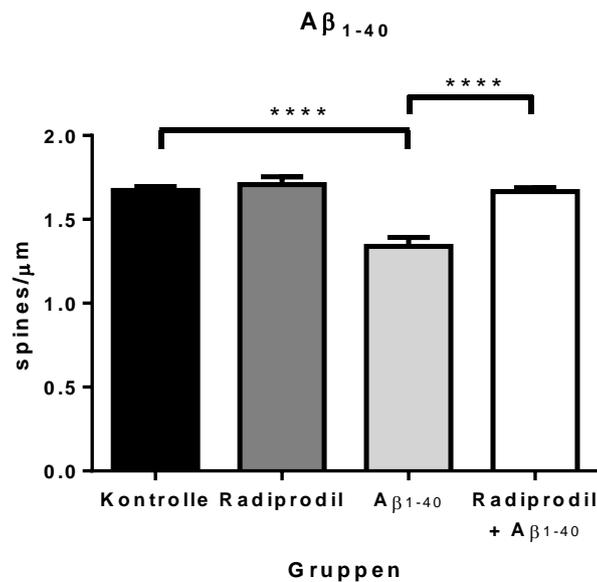
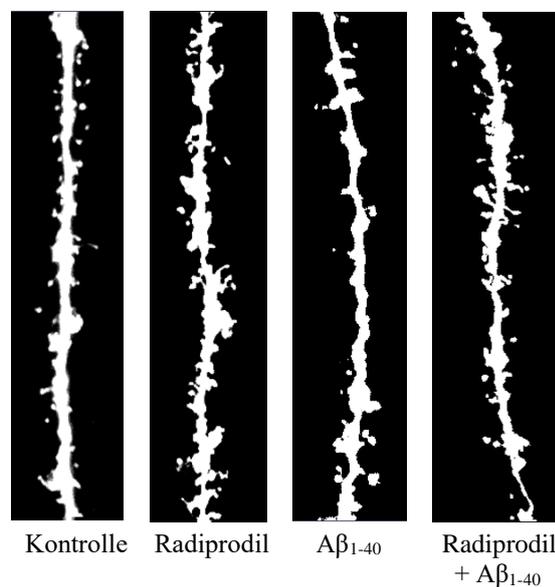
A**B**

Abbildung 53: Signifikante Verringerung der *spine density* durch A β_{1-40} . A Die *spine density* wird durch Zugabe von 50 nM A β_{1-40} signifikant verringert ($p < 0.0001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit Radiprodil + A β_{1-40}). Durch vorherige Zugabe von 10 nM Radiprodil ändert sich die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht ($p > 0.9999$). B Abbildung der Dendriten der verschiedenen Gruppen. Man sieht eine deutliche Verringerung der *spines* bei der Gruppe mit Zugabe von A β_{1-40} . **** p-Wert < 0.0001

A β_{1-42}

Durch die Zugabe von 50 nM A β_{1-42} für eineinhalb Stunden (n=5) wird die *spine density* signifikant ($p=0.0016$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und $p=0.0001$ zur Gruppe mit Radiprodil + A β_{1-42}) auf 1.41 ± 0.06 *spines*/ μm verringert. Bei Zugabe von 10 nM Radiprodil eine Stunde vor Zugabe von A β_{1-42} bleibt sie im Vergleich zur Kontrollgruppe gleich ($p=0.5913$) und beträgt 1.78 ± 0.05 *spines*/ μm .

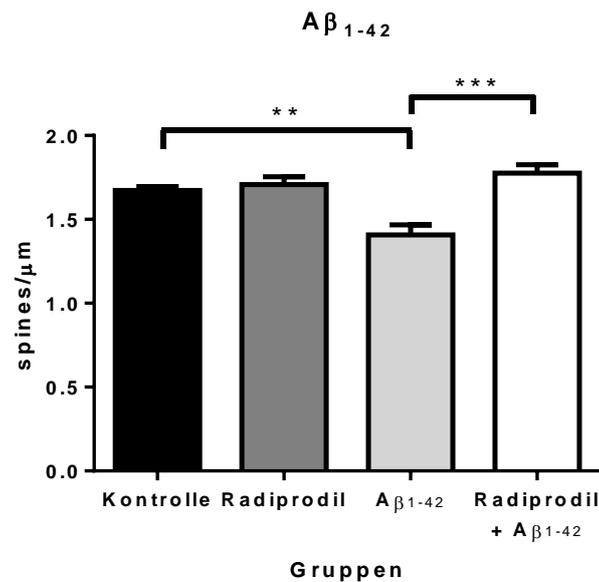
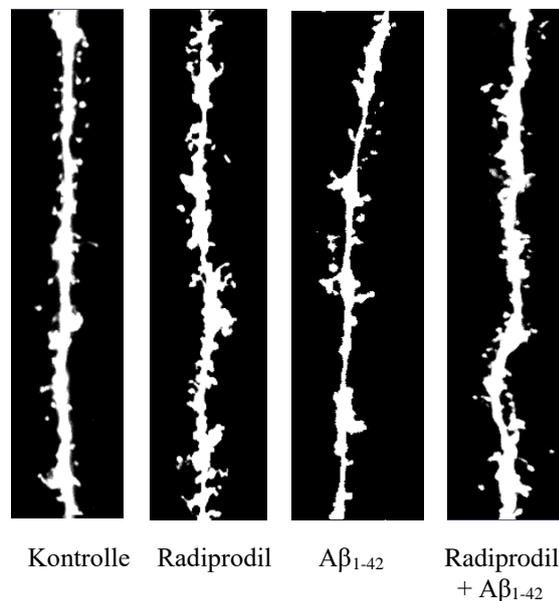
A**B**

Abbildung 54: Signifikante Verringerung der *spine density* durch A β_{1-42} . **A** Die *spine density* wird durch Zugabe von 50 nM A β_{1-42} signifikant verringert ($p=0.0016$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und $p=0.0001$ zur Gruppe mit Radiprodil + A β_{1-42}). Durch vorherige Zugabe von 10 nM Radiprodil ändert sich die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht ($p=0.5913$). **B** Abbildung der Dendriten der verschiedenen Gruppen. Man sieht eine deutliche Verringerung der *spines* bei der Gruppe mit Zugabe von A β_{1-42} . ** p-Wert < 0.01, *** p-Wert < 0.001

$3\text{NTyr10A}\beta$

Die Zugabe von 50 nM $3\text{NTyr10A}\beta$ für eineinhalb Stunden ($n=5$) verringert die *spine density* signifikant ($p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit Radiprodil + $3\text{NTyr10A}\beta$) auf 1.28 ± 0.03 *spines*/ μm . Bei Zugabe von 10 nM Radiprodil eine Stunde vor Zugabe von $3\text{NTyr10A}\beta$ wird sie im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht verringert ($p>0,9999$) und beträgt 1.63 ± 0.02 *spines*/ μm .

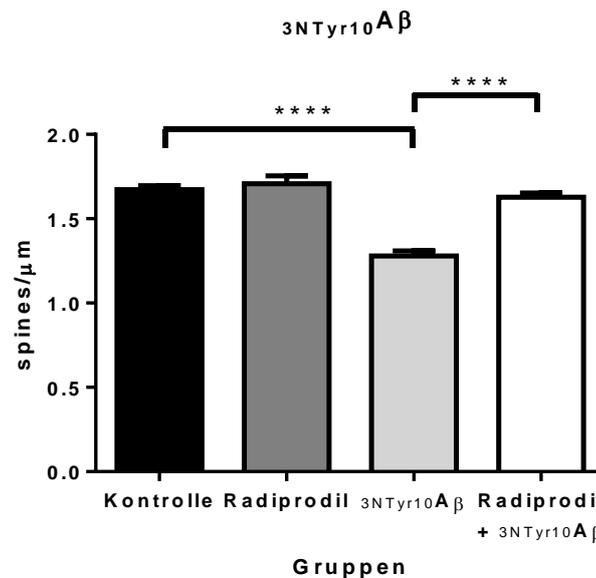
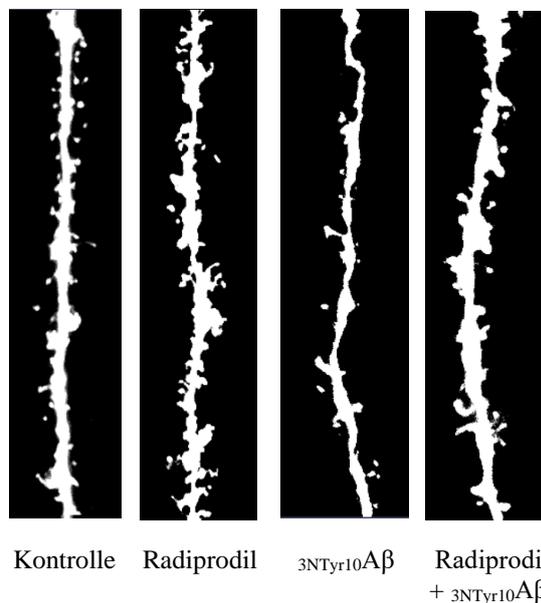
A**B**

Abbildung 55: Signifikante Verringerung der *spine density* durch $3\text{NTyr10A}\beta$. **A** Die *spine density* wird durch Zugabe von 50 nM $3\text{NTyr10A}\beta$ signifikant verringert ($p<0,0001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe mit Radiprodil + $3\text{NTyr10A}\beta$). Durch vorherige Zugabe von 10 nM Radiprodil ändert sich die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht ($p>0,9999$). **B** Abbildung der Dendriten der verschiedenen Gruppen. Man sieht eine deutliche Verringerung der *spines* bei der Gruppe mit Zugabe von $3\text{NTyr10A}\beta$. **** p -Wert $< 0,0001$

A β_{pE3-42}

Durch die Zugabe von 50 nM A β_{pE3-42} für eineinhalb Stunden (n=5) wird die *spine density* signifikant ($p < 0,0001$) auf 1.43 ± 0.01 *spines*/ μm verringert. Bei Zugabe von 10 nM Radiprodil eine Stunde vor Zugabe von A β_{pE3-42} wird die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe auch signifikant verringert ($p < 0,0001$) und beträgt 1.43 ± 0.01 *spines*/ μm .

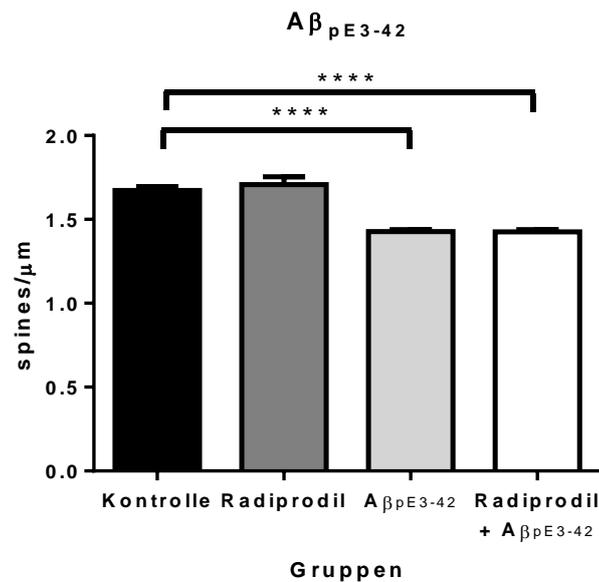
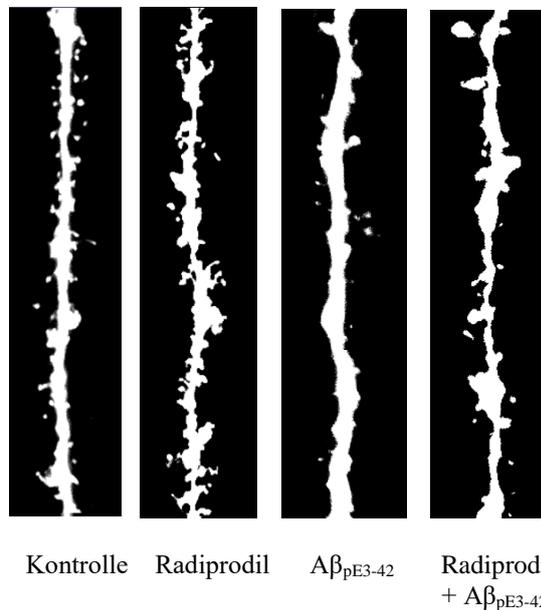
A**B**

Abbildung 56: Signifikante Verringerung der *spine density* durch A β_{pE3-42} . **A** Die *spine density* wird durch Zugabe von 50 nM A β_{pE3-42} signifikant verringert ($p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrollgruppe). Durch vorherige Zugabe von 10 nM Radiprodil ändert sich die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant ($p < 0,0001$). **B** Abbildung der Dendriten der verschiedenen Gruppen. Man sieht eine deutliche Verringerung der *spines* bei der Gruppe mit Zugabe von A β_{pE3-42} und bei der Gruppe mit Radiprodil + A β_{pE3-42} . **** p -Wert $< 0,0001$

***scrambled* A β ₁₋₄₂**

Um zu überprüfen, ob die Reduktion der *spine density* einen unspezifischen Effekt darstellt, werden Schnitte (n=2) mit 50 nM *scrambled* A β ₁₋₄₂ inkubiert. Dieses Kontrollpeptid weist die gleiche Aminosäurezusammensetzung wie A β ₁₋₄₂ auf, jedoch sind die Aminosäuren in zufälliger Reihenfolge angeordnet. Die Zugabe von *scrambled* A β ₁₋₄₂ für eineinhalb Stunden (n=2) verringert die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht ($p > 0.9999$). Diese beträgt 1.65 ± 0.03 *spines*/μm.

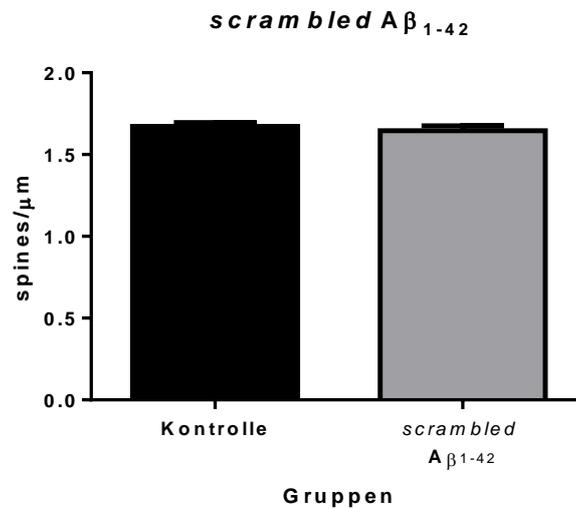
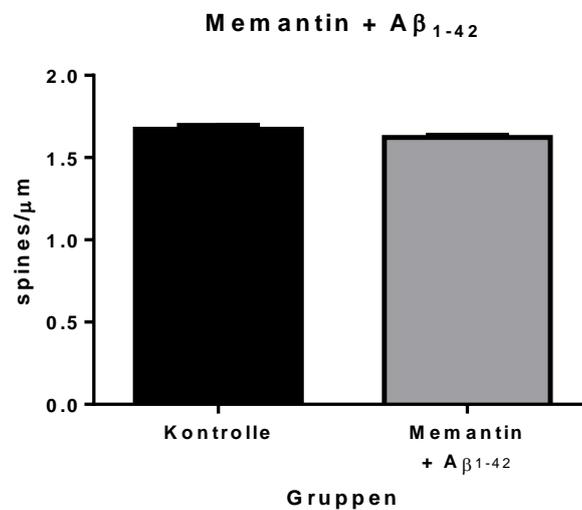
A**B**

Abbildung 57: kein Unterschied in der *spine density* durch *scrambled* A β ₁₋₄₂. **A** Die *spine density* wird durch Zugabe von 50 nM *scrambled* A β ₁₋₄₂ nicht verringert ($p > 0.9999$ im Vergleich zur Kontrollgruppe). **B** Abbildung der Dendriten der verschiedenen Gruppen. Man sieht keine Verringerung der *spines* bei der Gruppe mit Zugabe von *scrambled* A β ₁₋₄₂.

Memantin

Memantin, zugelassen für die Behandlung von moderater bis schwerer AD, ist ein unspezifischer NMDA-Rezeptorkanal Blocker mit niedriger Affinität. Um einen Zusammenhang zu einem schon klinisch erprobten NMDA-Rezeptorantagonisten herzustellen, wurde zudem überprüft, ob Memantin in Anwesenheit von $A\beta_{1-42}$ die *spine density* stabilisieren kann. Durch die Zugabe von Memantin ($1\mu\text{M}$) drei Stunden vor Zugabe von $A\beta_{1-42}$ ($n=2$) bleibt die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe gleich ($p>0,9999$) und beträgt 1.62 ± 0.01 *spines*/ μm .

A



B

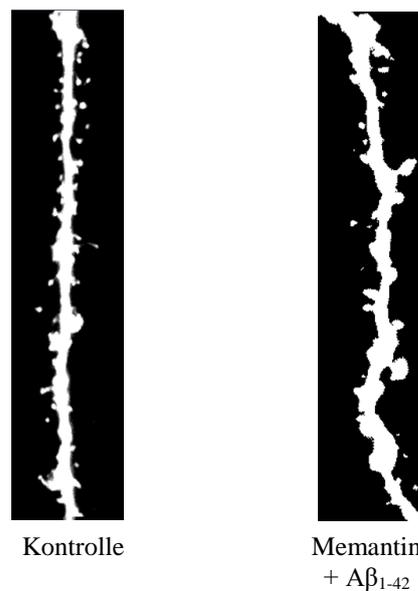


Abbildung 58: kein Unterschied in der *spine density* durch Memantin + $A\beta_{1-42}$. **A** Die *spine density* wird durch Zugabe von $1\mu\text{M}$ Memantin + 50 nM $A\beta_{1-42}$ nicht verringert ($p>0.9999$ im Vergleich zur Kontrollgruppe). **B** Abbildung der Dendriten der verschiedenen Gruppen. Man sieht keine Verringerung der *spines* bei der Gruppe mit Zugabe von Memantin + $A\beta_{1-42}$.

V. DISKUSSION

Die AD ist eine altersbedingte Krankheit und mit knapp 80 % die häufigste Form der Demenz in der heutigen Zeit. Die hohe Prävalenzrate kann auf die steigende Lebenserwartung, vor allem in westlich orientierten Ländern, zurückgeführt werden (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016). Auch in Hunden wurde eine Verbindung zwischen A β -Plaques und dem Verlust von kognitiven Fähigkeiten nachgewiesen (CUMMINGS et al., 1996a). Neueste Studien zeigen sogar, dass auch Schimpansen pathologische Merkmale der AD entwickeln können (EDLER et al., 2017). Seit den 80er Jahren ist bekannt, dass A β als Hauptbestandteil der Amyloid-Plaques und somit als Ursache der Symptome wie kognitiver Verfall und Gedächtnisverlust in Frage kommt (GLENNER & WONG, 1984; WONG et al., 1985), die genauen Zusammenhänge sind allerdings bis heute noch nicht vollständig geklärt. Neuerdings stehen nicht nur die unlöslichen Amyloid-Plaques, sondern lösliche A β -Oligomere im Fokus der Forschung, und es wird angenommen, dass sie die eigentlich toxischen Bestandteile sind, die zum Verlust der synaptischen Funktion und letztlich zum Tod einer Nervenzelle führen (SELKOE, 2008). Bei vielen neurologischen Erkrankungen, wie auch bei der AD, tritt eine fehlregulierte Glutamataufnahme bzw. -abgabe auf, die zu einer langfristig erhöhten Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und somit zu einer Überaktivierung des NMDA-Rezeptors führt (VYKLICKY et al., 2014). Durch diese Überaktivierung des Rezeptors wird das Signal-Rauschen erhöht, und relevante Signale durch Lernen können vom pathologisch erhöhten Hintergrundrauschen nicht unterschieden und gefiltert werden (PARSONS et al., 2007). Zahlreiche Hinweise deuten an, dass A β die glutamaterge Aktivität vor allem durch die Wirkung auf den NMDA-Rezeptor, erhöhen kann (KLEIN et al., 2004; WALSH & SELKOE, 2004; DANYSZ & PARSONS, 2012).

Um AD zu behandeln, gibt es unterschiedliche Therapieansätze auf dem Markt, die jedoch alle nur symptomatisch wirken. Die bereits zugelassenen und verfügbaren AD-Medikamente stammen aus der Gruppe der Cholinesteraseinhibitoren und der NMDA-Rezeptorantagonisten (YIANNOPOULOU & PAPAGEORGIOU, 2013). Es besteht großes Interesse daran, klinisch relevante NMDA-Rezeptorantagonisten zu entwickeln, die die exzitotoxische NMDA-Rezeptoraktivierung blockieren können, ohne die physiologische Rezeptoraktivität und damit die synaptische

Transmission und Plastizität zu beeinträchtigen (BARTLETT et al., 2007; VYKLYCKY et al., 2014). Nachweise existieren, die vermuten lassen, dass Substanzen, die die NR2B-Untereinheit spezifisch blockieren, eine bessere Wirkung zeigen, als solche, die nicht zwischen den Untereinheiten unterscheiden (HARDINGHAM et al., 2002; AMADORO et al., 2006). Die hohe Bedeutung der NR2B-Untereinheit bei AD wurde durch Versuche mit spezifischen NR2B-Rezeptorantagonisten gezeigt. Die Zugabe von allosterischen NR2B-Antagonisten wie Ro 25-6981, Ifenprodil und Radiprodil in sehr geringen pathophysiologischen Konzentrationen konnte die negative Wirkung von $A\beta_{1-42}$ auf die LTP reversieren. Somit könnte eine moderate negative allosterische Modulation der NR2B-Untereinheit eine Alternative in der Behandlung von AD sein (HU et al., 2009; LI et al., 2011; RAMMES et al., 2011; MATTUSCH et al., 2013; RAMMES et al., 2015).

Im Rahmen dieser Studie wurde die Rolle der NMDA-Rezeptoruntereinheit 2B in der Pathophysiologie der AD untersucht und eine mögliche Behandlungsoption eruiert, die die NR2B-Untereinheit als Ziel hat. Zudem wurden synaptotoxische Effekte wie der Einfluss auf die Autophagie und auf die *spine density*, die durch verschiedene $A\beta$ -Arten ausgelöst werden, erforscht.

Heterozygoter Knock-down der NR2B-Rezeptoruntereinheit in Verbindung mit einer AD-Mutation im transgenen Mausmodell und der Einfluss auf die $A\beta$ -Pathologie

Um zu erforschen, ob eine permanente heterozygote Deletion der NR2B-Rezeptoruntereinheit einen Einfluss auf die Pathologie der AD hat, wurden für die vorliegende Studie transgene Mäuse mit einem heterozygoten Knock-down der NR2B-Rezeptoruntereinheit und ein Mausmodell mit einer $A\beta$ -Pathologie gezüchtet. Im Mausmodell für AD wurden zwei Mutationen im APP eingeführt, die arktische und die schwedische Mutante. Diese führen zu einer erhöhten Sekretion und Aggregation von $A\beta$ in den Tieren (KNOBLOCH et al., 2007). Teil dieser Arbeit war es, die heterozygote Expression des NR2B-Rezeptors zu bestätigen und die $A\beta$ -Bildung in den AD-Mutationen zu untersuchen und zu vergleichen. Die Western Blot-Ergebnisse zeigten im Expressionsmuster der NR2B-Untereinheit deutliche Unterschiede zwischen den vier Mauslinien. Sowohl in der NR2B_{het} als auch der NR2B_{het}/Arc-Gruppe war der NR2B-Rezeptor im Vergleich zur WT- und zur Arc-Gruppe um etwa die Hälfte verringert. Die

Reduktion der NR2B-Untereinheit hatte dabei keinen Einfluss auf die weiteren NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1- und NR2A. Die AD-Mutation konnte auch keine Veränderung im Expressionsmuster der NMDA-Rezeptoruntereinheiten auslösen. Das wird auch durch die Ergebnisse von Snyder et al. (2005) unterstützt, die zeigen, dass eine AD-Mutation in Mäusen zwar die Oberflächenexpression des NMDA-Rezeptors verringert, nicht jedoch die Gesamtmenge des Rezeptors verändert.

Der A β ₁₋₄₂-ELISA zeigte eine massive Bildung von A β in der Arc- und der NR2B_{het}/Arc-Gruppe. Knobloch et al. (2007) konnten bereits nachweisen, dass eine AD-Mutation in Mäusen zu einer massiven Ansammlung von A β führt und diese Tiere ab einem Alter von sechs Monaten bereits kognitive Defizite aufweisen und ab einem Alter von neun Monaten schon eine Plaquebildung zu sehen ist. In der WT- und der NR2B_{het}-Gruppe wurde nur eine minimale Menge an A β ₁₋₄₂ detektiert. In anderen Forschungsarbeiten wurde festgestellt, dass A β das intrazelluläre Ca²⁺ erhöhen kann, indem es den NMDA-Rezeptor direkt aktiviert (TEXIDÓ et al., 2011) und die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt erhöht (NODA et al., 1999), was wiederum die Sensitivität des NMDA-Rezeptors steigert (PARSONS et al., 2007). Zudem konnten Lesne et al. (2005) zeigen, dass eine subtoxische Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch z.B. A β die Expression einer wichtigen Domäne von Proteaseinhibitoren steigert. Diese Domäne bevorzugt die Prozessierung des APP durch die β -Sekretase, wobei die α -Sekretase zudem inhibiert wird, was zu einer weiteren Erhöhung des A β s führt. Deswegen sollte überprüft werden, ob die Reduktion der NR2B-Untereinheit eine Veränderung bei der A β -Bildung hervorruft. Die ELISA-Ergebnisse weisen jedoch keine Unterschiede in der Menge des gebildeten A β ₁₋₄₂ zwischen der NR2B_{het}/Arc- und der Arc-Gruppe auf. Somit zeigen unsere Ergebnisse, dass eine Reduzierung der NR2B-Untereinheit keine verminderte A β ₁₋₄₂-Produktion zur Folge und somit ausschließlich eine neuroprotektive Wirkung hat.

Für die Darstellung der Amyloid-Plaques wurden die Gehirnschnitte der transgenen Mäuse mit Methoxy-X04, einem fluoreszierenden Farbstoff gefärbt, da dieser eine gute Spezifität für Amyloid-Plaques aufweist (KLUNK et al., 2002). Die postmortalen Gehirnschnitte zeigten eine deutliche Plaquebildung im Kortex und Hippokampus der Arc- und NR2B_{het}/Arc-Gruppe. In der WT- und der NR2B_{het}-Gruppe war so gut wie keine Plaquebildung zu finden. In unserem Versuch sollte zudem überprüft werden, ob speziell in den Gehirnstrukturen, die wichtig für den

Lernprozess und das Gedächtnis sind, dem präfrontalen Kortex (MONACO et al., 2015) und dem Hippokampus (PRESTON & EICHENBAUM), die Plaquebildung einen Unterschied zwischen der Arc- und der NR2B_{het}/Arc-Gruppe zeigt. Auch hier wurden keine Unterschiede gefunden, was zeigt, dass die Verringerung des NR2B-Rezeptors keinen Einfluss auf die Plaquebildung und somit einen rein neuroprotektiven Effekt hat.

Heterozygoter Knock-down der NR2B-Rezeptoruntereinheit in Verbindung mit einer AD-Mutation im transgenen Mausmodell und der Einfluss auf Autophagiemarker

Die Autophagie ist ein intrazellulärer Degradationsprozess, bei dem zytoplasmatische Bausteine in den Lysosomen abgebaut werden. Die Autophagie findet grundsätzlich in jeder Zelle auf einem basalen Level statt (KLIONSKY & CODOGNO, 2013), kann jedoch durch verschiedene Formen von zellulärem Stress, wie etwa einer Ansammlung von Proteinaggregaten, hochreguliert werden (KROEMER et al., 2010). Fehlerhaft gefaltete Proteine, wie bei der AD zu finden, verursachen nach Aggregation Zellorganellschäden und synaptische Funktionsstörungen im Nervensystem (WALKER & LEVINE, 2000). Die toxischen Proteinaggregate können durch die Autophagie beseitigt und aus ihnen neue Aminosäuren generiert werden, was zu einer homöostatischen Kontrolle der Zelle beiträgt (HARRIS & RUBINSZTEIN, 2012). Bei der AD ist die Autophagie beeinträchtigt, was durch die Ansammlung von Autophagosomen in dystrophischen Neuriten gezeigt wurde (NIXON et al., 2005). Zudem ist das bei der Induktion der Autophagie mitwirkende Beclin-1 in frühen Stadien der AD reduziert, was darauf hinweist, dass die Induktion der Autophagie verringert ist (PICKFORD et al., 2008). Spilman et al. (2010) konnten zeigen, dass Rapamycin, ein Autophagiestimulator, eine Verringerung der A β -Akkumulation in einem transgenen AD-Mausmodell herbeiführen und Gedächtnisdefizite verzögern kann. Somit könnte die Autophagiestimulation einen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung von AD darstellen.

Es wurden verschiedene Autophagiemarker bestimmt, um die Autophagieaktivität im Rahmen der AD zu untersuchen. Die Autophagiemarker pUlk/Ulk, Klasse III-PI3K, Beclin-1, Atg12, LC3B-II/LC3B-I, LC3B-II und p62 wurden hierfür verglichen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den vier transgenen Tiergruppen gefunden werden. Jedoch waren bei den Autophagiemarkern

pUlk/Ulk, Klasse III-PI3K, Atg12, LC3B-II/LC3B-I und LC3B-II in den durchgeführten Experimenten in der Arc-Gruppe Auffälligkeiten erkennbar. Der Autophagiemarker p62 zeigt keine Veränderung in der Proteinexpression. In einer Studie zu Autophagiemarkern in einer Zellkultur konnte gezeigt werden, dass während einer Hungerperiode sich der LC3B-Marker schon nach einer halben Stunde verändert, während der p62-Marker erst nach zwei Stunden einen Unterschied in der Expression zeigt (MIZUSHIMA & YOSHIMORI, 2007).

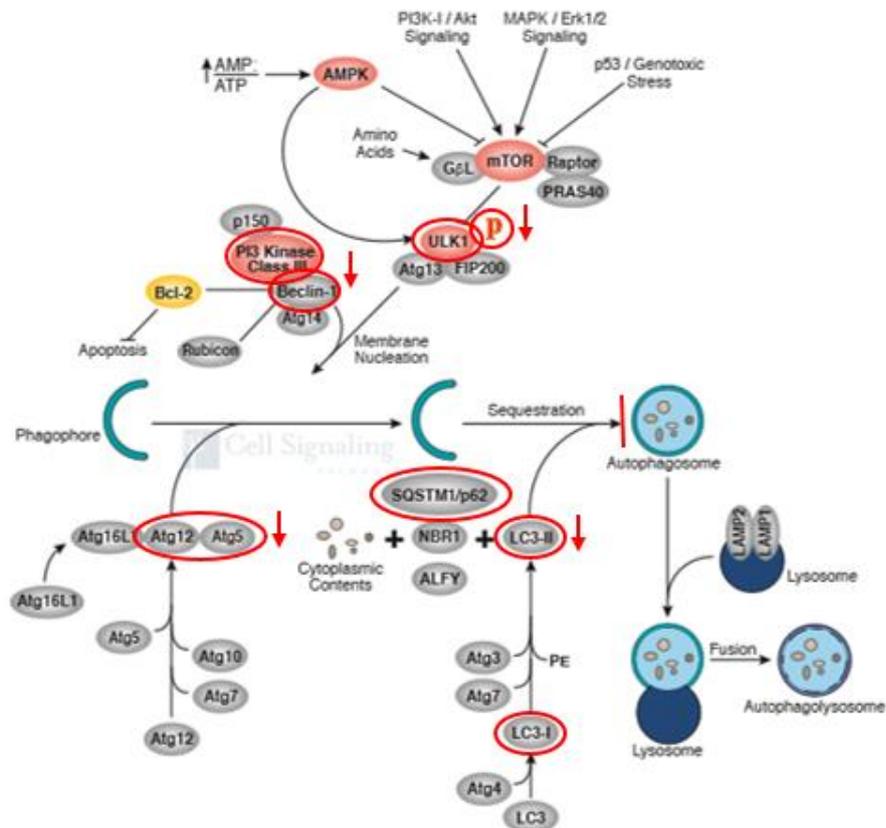


Abbildung 59: verwendete Autophagiemarker und deren Proteinexpression in Arc-Tieren
 Gewisse Auffälligkeiten sind bei den Autophagiemarkern pUlk/Ulk, Klasse III-PI3K, Atg5 gebundenes Atg12 (Atg12), LC3B-II/LC3B-I und LC3B-II in den durchgeführten Experimenten in der Arc-Gruppe, wenn man die Balkendiagramme vergleicht, erkennbar. Dies ist jedoch statistisch nicht aussagekräftig. (CELLSIGNALING TECHNOLOGY, 2017). Abbildung modifiziert nach Cell Signaling, mit freundlicher Genehmigung von Cell Signaling Technology, Inc.

Untersuchungen von Pickford et al. (2008) ergaben stark verringerte Beclin-1-Werte in humanen AD-Gehirnen, was auf eine inhibierte Autophagiefunktion hindeutet. Im Kortex von Patienten im 2. Stadium der AD, der MCI, war der Beclin-1-Marker auf 70 % des Kontrollwertes der gesunden Gehirne gefallen, bei Gehirnen

von Patienten mit schwerer AD-Demenz ist der Wert sogar weiter gesunken auf 30 % der Kontrollwerte. In einer heterozygoten Beclin-1 Knock-down Mauslinie, die mit einer AD-Linie gekreuzt wurde, konnte eine erhöhte A β -Akkumulation beobachtet werden. Diese konnte durch eine genetische Wiederherstellung des Beclin-1 aufgehoben werden (PICKFORD et al., 2008; JAEGER et al., 2010). Dies deutet auch darauf hin, dass die Beseitigung von A β -Aggregaten in AD durch eine Fehlfunktion der Autophagie gestört ist. Jedoch konnte in dieser Studie kein Unterschied der Proteinexpression des Beclin-1 bei einer Mauslinie mit A β -Pathologie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gefunden werden. Die Tiere waren zwei bzw. drei Jahre alt.

Gründe für das Fehlen einer Signifikanz in den hier vorgestellten Ergebnissen, könnten unter anderem die niedrige Stichprobenzahl (n=4) oder die relativ weite Streubreite des Alters (9-18 Monate) sein. Die Ergebnisse von VILLAMIL-ORTIZ & CARDONA-GOMEZ (2015) deuten an, dass sich die Autophagiemarker im Laufe der AD-Pathologie ändern. Sie berichten, dass der Autophagiemarker Beclin-1 und das Verhältnis zwischen LC3B-II/LC3B-I bei sechs Monate alten Mäusen signifikant erhöht sind, mit 12 Monaten etwa wieder auf das Niveau der Kontrollmäuse sinken und mit 18 Monaten sogar signifikant erniedrigt sind. Somit könnte das ein möglicher Grund sein, weswegen in unseren Experimenten die Werte so stark variieren. Um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten oder zu zeigen, dass die Unterschiede in den Markern nur zufällig entstanden sind, wäre es sinnvoll, die Tiere dem Alter entsprechend zu vergleichen und gegebenenfalls eine höhere Stichprobenzahl auszuwerten. Die widersprüchlichen Ergebnisse der angesprochenen Forschungsarbeiten bezüglich der Autophagiemarker könnten auch durch die unterschiedlichen Mutationen im APP der verwendeten Mauslinien zustande kommen (PICKFORD et al., 2008: J20 und T41-Mäuse; VILLAMIL-ORTIZ & CARDONA-GOMEZ, 2015: 3xTg-AD Mäuse mit PS1(M146V), APP (Swe), und tau (P301L) Transgenen).

Um genaue Aussagen über den Autophagiestatus geben zu können, wäre es sinnvoll weitere Methoden wie Elektronenmikroskopie von Autophagosomen oder Fluoreszenzmikroskopie von LC3 zur Bestimmung der Autophagiefunktion anzuwenden (KLIONSKY et al., 2008). Es ist zudem oft schwer zu interpretieren, ob eine erniedrigte Proteinexpression z.B. des Autophagiemarkers LC3B auf eine Inhibition der autophagischen Aktivität oder auf einen erhöhten Abbau von Autophagosomen zurückzuführen ist. Hierzu wäre es von Vorteil, das Gewebe mit

Inhibitoren wie Bafilomycin A1 zu behandeln, die den Abbau von Zellbestandteilen in Autolysosomen durch die Inhibition von Proteasen stoppen (RUBINSZTEIN et al., 2009). Eine Akkumulation von LC3II-positiven Autophagosomen würde dann auf einen funktionierenden autophagischen Fluss hindeuten. Wohingegen keine Ansammlung von LC3II in Anwesenheit von Inhibitoren ein Hinweis auf einen Defekt vor dem Abbau durch das Autolysosom sein könnte (BARTH et al., 2010). Sollte es sich herausstellen, dass die Autophagiemarker tatsächlich einen signifikanten Unterschied aufweisen, würde dies bedeuten, dass die Autophagieaktivität in der AD verringert ist und durch eine heterozygote Expression des NR2B-Rezeptors wieder hergestellt werden kann.

Effekt von löslichen A β -Oligomeren und dem NR2B-Rezeptorantagonist Radiprodil auf die Autophagie in murinen Gehirnschnitten

Die Ergebnisse vieler aktueller Publikationen weisen daraufhin, dass nicht die unlöslichen Ablagerungen wie A β -Fibrillen und Plaques, sondern die löslichen A β -Oligomere die toxischen Bestandteile darstellen und für die Beeinträchtigung der synaptischen Funktion und der Neurodegeneration der AD verantwortlich sind (HARDY & SELKOE, 2002; KLEIN et al., 2004; GOLDE, 2006). In einer Vorgängerarbeit am Institut wurde bereits erforscht, dass eine Konzentration von 50 nM A β ₁₋₄₂ die LTP im Hippokampus im Vergleich zur Kontrollgruppe massiv blockiert (RAMMES et al., 2011; RAMMES et al., 2015). Deshalb wurde in dieser Arbeit die gleiche Konzentration und Inkubationsdauer verwendet, um murine sagittale Gehirnschnitte auf Veränderungen der Autophagiemarker zu untersuchen. Um die kontinuierliche Überaktivierung des NMDA-Rezeptors durch glutamaterge Dysfunktion zu verhindern, können NMDA-Rezeptorantagonisten eingesetzt werden und sogar bei extremer Glutamatfreisetzung in den synaptischen Spalt die Aktivierung des NMDA-Rezeptors blockieren (PARSONS et al., 2007). Studien zeigen, dass die inhibierende Wirkung von A β ₁₋₄₂ auf die LTP durch Memantin aufgehoben werden kann (RAMMES et al., 2011). Wie oben bereits erwähnt, konnte die Inkubation mit allosterischen NR2B-Antagonisten wie Ro 25-6981, Ifenprodil und Radiprodil die negative Wirkung von A β ₁₋₄₂ auf die LTP reversieren. In einer noch nicht veröffentlichten Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde zur Dosisfindung untersucht, ob Radiprodil die LTP konzentrationsabhängig wiederherstellen kann, die durch 50 nM A β ₁₋₄₂ inhibiert wurde. Die Experimente konnten zeigen, dass Radiprodil in zu hohen Konzentrationen, wie etwa 1 μ M oder

300 nM, die LTP in hippokampalen Gehirnschnitten von Mäusen blockiert. In diesen Konzentrationen sollte Radiprodil nicht angewendet werden, da es die physiologische Funktion des NMDA-Rezeptors zu sehr beeinflusst. Die Inkubation der Schnitte in 10 nM Radiprodil konnte dem negativen Effekt durch A β auf die LTP entgegenwirken.

Die Autophagiemarker in diesem Experiment zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll-, der A β - und der Radiprodil+A β -Gruppe.

Die Zugabe von Rapamycin diente dazu herauszufinden, ob eine Inkubation mit A β für 90 Minuten ausreichend ist, die Proteinexpression der Autophagiemarker zu beeinflussen. Die Autophagiemarker Klasse III-PI3K, das Verhältnis von LC3B-II zu LC3B-I und LC3B-II waren im Hippokampus signifikant verändert. Im Kortex zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Proteinexpressionsmuster der Autophagiemarker. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation der Schnitte für eineinhalb Stunden mit einem Autophagiestimulator gewisse Autophagiemarker, zumindest im Hippokampus, erhöhen kann. Der überwiegende Teil von Rapamycin-Experimenten bzw. Autophagieaktivierungen wurde an Zellkulturen durchgeführt. Boland et al. (2008) konnten zeigen, dass die Behandlung von primären kortikalen Neuronen mit 10 nM Rapamycin den Autophagiemarker LC3B-II/LC3B-I und LC3B-II nach nur einer Stunde erhöht. In anderen Forschungsarbeiten wurde festgestellt, dass 25 nM Rapamycin den Autophagiemarker LC3B-II/LC3B-I in Schwann-Zellen von Mäusen nach zwei Stunden signifikant erhöht und p62 signifikant erniedrigt, was auch auf eine Aktivierung der Autophagie durch Rapamycin hindeutet (RANGARAJU et al., 2010).

Um stärkere Unterschiede detektieren zu können, müssten die Schnitte längeren Inkubationszeiten mit Rapamycin ausgesetzt werden. Die Vermutung besteht, dass es bei Gewebeschnitten, im Gegensatz zu einschichtigen Zellkulturen, länger dauert, bis die Substanzen an den Zielort diffundiert sind. Dann könnte auch gegebenenfalls die Inkubationszeit des A β angepasst werden, um so Unterschiede der Autophagiemarker besser detektieren zu können. In einer Studie von Lipinski et al. (2010) an Zellkulturen konnten nach frühestens vier Stunden Unterschiede in den Autophagiemarkern Atg12 und im Verhältnis LC3B-II/LC3B-I nach Behandlung mit 5 μ M A β festgestellt werden, was auch darauf hindeutet, dass die Inkubation mit A β für eineinhalb Stunden ein zu kurzes Zeitintervall darstellt, um Veränderungen in den Autophagiemarkern hervorzurufen. Auch die höhere

Konzentration des A β wird dazu beigetragen haben, dass in dieser Veröffentlichung ein signifikanter Unterschied in den Markern sichtbar ist. Die pathologischen Ausfälle bei AD wie kognitiver Verfall und Gedächtnisschwund können jedoch schon durch weitaus geringere A β -Konzentration ausgelöst werden (NASLUND et al., 2000; RELIGA et al., 2003). Deshalb wurden in unserem Experiment die Konzentrationen so gering gewählt, da es interessant ist zu erforschen, ob ein Einfluss auf die Autophagie auch bei diesen geringen pathophysiologischen Konzentrationen besteht. In dieser Studie wurden die Zeitintervalle und Konzentrationen zudem so gewählt, dass sie mit den vorangegangenen Experimenten der LTPs und mit den *spine density* Experimenten vergleichbar sind, bei denen signifikante Unterschiede sichtbar wurden.

Effekt von löslichen A β -Oligomeren und dem NR2B-Rezeptorantagonist Radiprodil auf die spine density in murinen Gehirnschnitten

Dendritische Dornfortsätze (engl. *spines*) sind membranöse Ausläufer an der neuronalen Oberfläche (HARRIS & KATER, 1994). Unter *spine density* versteht man die Anzahl der *spines* pro Mikrometer eines Dendriten. Die Störung der physiologischen *spine*-Homöostase liegt einigen neuropsychiatrischen Krankheiten zugrunde (PENZES et al., 2011). Das auffälligste Beispiel ist der Verlust an dendritischen *spines*, der bei den meisten neurodegenerativen Erkrankungen zu finden ist. Der Verlust von *spines* kann gleichgesetzt werden mit dem Verlust von synaptischen Funktionen, vor allem exzitatorischer Synapsen (DOROSTKAR et al., 2015), was wiederum zum Verlust von kognitiven Fähigkeiten und Gedächtnisverlust führt. Die pathologische Überaktivierung des NMDA-Rezeptors während der Exzitotoxizität kann diese *spine*-Verluste herbeiführen (HALPAIN et al., 1998; HASBANI et al., 2001).

Im Versuch zur *spine density* wurden murine Gehirnschnitte Substanzen ausgesetzt, um festzustellen, ob sie eine Veränderung der *spine density* auslösen können. Es sollte überprüft werden, ob die Inkubation der Schnitte in verschiedenen A β -Arten eine Reduktion der *spine density* hervorruft und ob Radiprodil, ein selektiver NR2B-Rezeptorantagonist, diesem Effekt gegebenenfalls entgegenwirken kann.

Die Inkubation mit Radiprodil veränderte die *spine density* im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht. Vergleichbare Studien an murinen Gehirnschnitten konnten derzeit nicht gefunden werden. Eine Veröffentlichung von Ruddy et al. (2015) zu einem nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonist weist jedoch ähnliche

Ergebnisse auf. Hier wurde gezeigt, dass MK-801 bei akuter Behandlung von Mäusen *in vivo* keine Veränderung der *spine density* hervorruft. In einer noch nicht veröffentlichten Arbeit unserer Arbeitsgruppe, bei der die Auswirkung auf die LTP in murinen Gehirnschnitten untersucht wurde, hatten 10 nM Radiprodil einen positiveren Effekt auf die LTP im Gegensatz zu höheren Konzentrationen wie etwa 300 nM, die die LTP reduzierten (MATTUSCH et al., 2013). Deswegen wurde für das Experiment eine Konzentration von 10 nM Radiprodil gewählt. Die Inkubation von Gehirnschnitten mit 50 nM der A β -Arten A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂, _{3NTyr10}A β oder A β _{pE3-42} verringerte die *spine density* signifikant.

Schon in anderen Experimenten an Zellkulturen oder organotypischen Schnittkulturen konnte beobachtet werden, dass eine chronische Exposition von Zellen mit löslichen A β -Oligomeren eine Abnahme der *spine density* zur Folge hat (LACOR et al., 2007; SHANKAR et al., 2007). Shankar et al. (2007) konnten durch einen spezifischen Antikörper gegen A β zeigen, dass die Reduktion der *spines* explizit durch die A β -Oligomere ausgelöst werden. Auch in den LTP-Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde die LTP durch A β ₁₋₄₂ (50 nM) massiv verringert (RAMMES et al., 2011).

Durch die vorherige Inkubation der Schnitte mit Radiprodil, konnte die synaptotoxische Wirkung des A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ oder _{3NTyr10}A β auf die *spine density* aufgehoben werden. Lediglich bei A β _{pE3-42} zeigte Radiprodil keinen Effekt. Hier war die *spine density* trotz vorheriger Inkubation mit Radiprodil signifikant verringert. Diese Ergebnisse stimmen mit den LTP-Experimenten von Mattusch et al. (2013) überein. Bei diesen konnte gezeigt werden, dass die vorherige Inkubation der Schnitte mit Radiprodil die negative Wirkung des A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ und _{3NTyr10}A β auf die LTP aufhebt, nicht aber in der Gegenwart von A β _{pE3-42}. Diese Ergebnisse lassen zumindest für A β _{pE3-42} einen für die neurotoxische Wirkung verantwortlichen Zielort vermuten, der sich vom NR2B-Rezeptor unterscheidet. Dies könnte erklären, warum Radiprodil die durch A β _{pE3-42} ausgelöste Reduktion der *spines* nicht reversieren kann.

Memantin, ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist und ein zugelassenes AD-Medikament, wurde auch auf seine Wirkung überprüft, sodass ein Vergleich mit einem klinisch erprobten NMDA-Rezeptorantagonisten erfolgen kann. Die toxische Wirkung von A β ₁₋₄₂, die durch eine signifikante Reduzierung der *spine density* gekennzeichnet war, konnte durch die vorherige Inkubation mit 1 μ M Memantin aufgehoben werden. Auch Lacor et al. (2007) stellten fest, dass

eine chronische Exposition von hippocampalen Kulturen mit löslichen A β -Oligomeren eine abnormale *spine*-Morphologie und eine Abnahme der *spine density* zur Folge hat und diese durch das Medikament Memantin verhindert werden kann. Um zu überprüfen, ob Proteine im Allgemeinen eine Beeinflussung der *spine density* verursachen, wurden Schnitte mit 50 nM *scrambled* A β_{1-42} inkubiert. Dieses Kontrollpeptid weist die gleiche Aminosäurezusammensetzung wie A β_{1-42} auf, jedoch sind die Aminosäuren in zufälliger Reihenfolge angeordnet. Die Zugabe von *scrambled* A β_{1-42} zeigte keine Wirkung auf die *spine density*. Dies zeigt, dass die durch die verschiedenen A β -Arten induzierte Verringerung der *spine density* eine spezifische Wirkung zur Ursache hat und nicht durch ein beliebiges Protein ausgelöst werden kann.

In vielen Forschungsarbeiten wird die *spine density* entweder mit Hilfe von Zellkulturen (PAPA et al., 1995; HASBANI et al., 2001) oder in vivo an Mausmodellen (LENDVAI et al., 2000; BITTNER et al., 2010) gemessen, bzw. die zu testenden Substanzen werden den Tieren in vivo verabreicht (RUDDY et al., 2015). Die anhand von inkubierten murinen organotypischen Gehirnschnitten gemessene *spine density* wie bei den Experimenten dieser Arbeit hat jedoch gewisse Vorteile. Im Gegensatz zu reinen Zellkulturen, können hier Substanzen in einem noch lebenden Zellverbund innerhalb einer noch einigermaßen intakten neuronalen Verschaltung getestet werden. Die Gewebestruktur kann bewahrt und die neuronale Aktivität mit den synaptischen Schaltkreisen weitgehend erhalten werden (CHO et al., 2007). Bei reinen Zellkulturen können nur isolierte Zellen beobachtet werden und spiegeln nicht die Komplexität des Gesamtorganismus wieder, da sie nicht in Wechselwirkung mit anderen Zellen stehen (CHO et al., 2007; HUMPEL, 2015). Somit sind organotypische Schnitte eine Annäherung an in vivo-Systeme. Desweiteren kann diese Präparationsmethode die Anzahl der benötigten Versuchstiere verringern und Experimente an noch lebenden Tieren reduzieren, indem an einem Gehirn durch die Aufteilung in viele Schnitte unterschiedliche Substanzen getestet werden können. Durch das Einsetzen definierter Konzentrationen können zudem kontrollierte pharmakologische Experimente durchgeführt werden, ohne die Problematik der Eliminierung und Metabolisierung, die im lebenden Organismus besteht. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Ergebnisse der Experimente zur *spine density* durch den ähnlichen Versuchsaufbau gut mit den Ergebnissen der LTP-Experimente verglichen werden können.

Insgesamt zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die NR2B-Rezeptoruntereinheit eine bedeutende Rolle in der Pathologie der AD spielt. Gerade durch die Ergebnisse zur *spine density* ist gut ersichtlich, dass die durch verschiedene A β -Arten herbeigeführte synaptotoxische Wirkung durch vorherige Behandlung mit Radiprodil, einem NR2B-Rezeptorantagonisten, verhindert werden kann. Zusammen mit den an unserem Institut durchgeführten LTP-Experimenten und diversen Experimenten von anderen Forschungsgruppen, ist dies eine gute Grundlage, um den NR2B-Rezeptor und seine Antagonisten als eine mögliche Behandlungsoption weiter zu untersuchen.

Die klinischen Untersuchungen mit Radiprodil und andere NR2B-Rezeptorantagonisten wie Ifenprodil und Ro 25-6981 gingen nicht über Phase-II-Studien hinaus, da festgestellt wurde, dass sie an hERG-Kanäle (engl. *human-Ether-a-go-go Related Gene*) im Herzen binden und so als begleitende Nebenwirkung Herzrhythmusstörungen auftreten können (MONAGHAN DT, 2009; RUPPA et al., 2012). Es besteht jedoch noch immer ein großes Interesse, oral applizierbare subtypspezifische NMDA-Rezeptorantagonisten zu entwickeln. Es wird davon ausgegangen, dass allosterische NR2B-Rezeptorantagonisten am ehesten einen verbesserten therapeutischen Index aufweisen könnten (RUPPA et al., 2012).

Durch das massiv erhöhte A β und die Bildung der Amyloid-Plaques in den transgenen Tiergruppen kann die A β -Pathologie und der Zusammenhang zwischen der NR2B-Untereinheit und der AD studiert werden. Durch die Kreuzung mit Tieren mit einer heterozygoten Deletion der NR2B-Untereinheit konnte der Einfluss einer Verringerung der NR2B-Rezeptoren auf die A β -Pathologie untersucht werden. Da keine Veränderung des A β oder der Amyloid-Plaques herbeigeführt werden konnte, kann ausgeschlossen werden, dass die langfristige Reduzierung des NR2B-Rezeptors die Ansammlung und Ablagerung des A β beeinflusst und somit einen rein neuroprotektiven Effekt hat.

Die Experimente zur Autophagieregulierung bei der AD müssen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, weiter ausgebaut und verbessert werden. Wie oben bereits erwähnt, wäre es sinnvoll bei den Studien mit transgenen Tieren auf eine deutliche Trennung der Altersgruppen zu achten, da die Autophagie in den verschiedenen Stadien der AD anscheinend unterschiedlich ausgeprägt ist und somit zu gegensätzlichen Ergebnissen führt. Um die akute Wirkung von A β auf die Autophagie zu untersuchen, sollten die murinen Gehirnschnitte längeren

Inkubationszeiten ausgesetzt werden, da durch die sehr geringe Konzentration in der kurzen Zeit keine Veränderungen hervorgerufen werden können. Von einer Erhöhung der A β -Konzentration ist abzuraten, da diese nicht mehr der bei AD wirkenden pathologischen A β -Konzentration entsprechen würde und die Ergebnisse somit nicht mehr mit dem Krankheitsbild verglichen werden können.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Alzheimer Krankheit (AD) ist mit knapp 80 % die häufigste Form der Demenz in der heutigen Zeit und ist nicht nur auf den Menschen beschränkt. Ähnliche pathologische Merkmale wie bei der AD des Menschen können sich auch bei Hunden und Schimpansen entwickeln. Die Ursachen der AD sind noch weitgehend ungeklärt, Forscher vermuten jedoch, dass akkumuliertes Amyloid β ($A\beta$), welches postmortem in Gehirnen von AD Patienten nachweisbar ist, verantwortlich ist. Allerdings deutet vieles daraufhin, dass lösliche $A\beta$ -Oligomere die eigentlich toxischen Pathogene sind, die zum Verlust der synaptischen Funktion und letztlich zum Tod der Nervenzellen führen. N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisvorgängen, aber auch bei neurodegenerativen Prozessen. Besonders involviert ist hier die NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B, deren exzessive Aktivierung zum Zelltod führen kann. In dieser Studie wurde untersucht, ob eine pharmakologische oder gentechnisch-induzierte Reduzierung der NR2B-Aktivität die $A\beta$ -Oligomer-induzierte toxische Wirkung auf Autophagie, einem intrazellulärer Degradationsprozess, und Anzahl dendritischer Dornfortsätze (*spine density*) reversieren kann.

Untersucht wurden transgene AD Mausmodelle mit entweder einem heterozygoten NR2B knockout (NR2B_{het}) oder einer *Arctic* und *Swedish* Mutation im Amyloid-Vorläuferprotein (Arc) oder einer Kreuzung beider Mutanten (NR2B_{het}/Arc). In den Arc und NR2B_{het}/Arc Mäusen konnte eindeutig eine Erhöhung von monomeren $A\beta_{1-42}$ und Amyloid-Plaques nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass eine Reduzierung der NR2B Aktivität keinen Einfluss auf die $A\beta$ -Produktion oder Plaquebildung hat.

Die Autophagieprozesse waren zwar nicht signifikant unterschiedlich; bei der Expression der Autophagiemarker pUlk/Ulk, Klasse III-PI3K, Atg5 gebundenes Atg12, LC3B-II/LC3B-I und LC3B-II waren aber in der Arc-Gruppe Auffälligkeiten erkennbar, was darauf hindeuten könnte, dass die Autophagieaktivität in der AD verändert ist und durch eine heterozygote Expression der NR2B-Untereinheit wieder hergestellt werden kann. Gründe für das Fehlen einer Signifikanz könnten die niedrige Stichprobenzahl oder die relativ weite Streubreite des Alters sein.

Des Weiteren wurden murine hippocampale Hirnschnitte mit $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$,

${}^3\text{NTyr10A}\beta$ oder $\text{A}\beta_{\text{pE3-42}}$, inkubiert und untersucht, ob Radiprodil, ein spezifischer NR2B-Antagonist, die synaptotoxische Wirkung der verschiedenen A β -Arten reversieren kann. Die Analyse der Autophagiemarker ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede für alle A β -Arten. Interessanterweise reduzierten $\text{A}\beta_{1-40}$, $\text{A}\beta_{1-42}$, ${}^3\text{NTyr10A}\beta$ oder $\text{A}\beta_{\text{pE3-42}}$ die *spine density* in den Dendriten signifikant. Eine vorangehende Inkubation mit Radiprodil, konnte diese degenerativen Prozesse reversieren. Lediglich bei $\text{A}\beta_{\text{pE3-42}}$ zeigte Radiprodil keinen Effekt. Dies deutet zumindest für $\text{A}\beta_{\text{pE3-42}}$ auf einen zu NR2B unterschiedlichen Wirkort verantwortlich für die neurotoxische Wirkung hin.

Insgesamt unterstreichen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass NR2B eine bedeutende Rolle in der A β -vermittelten Pathophysiologie der AD spielt und die Verminderung der NR2B-Aktivität eine neuroprotektive Wirkung vermittelt. Gleichzeitig wird die Bedeutung des NR2B als möglicher pharmakologischer Wirkort für die Behandlung der AD hervorgehoben.

VII. SUMMARY

Alzheimer's disease (AD) is with almost 80 % today's most common form of dementia and is not only seen in humans. Similar pathological hallmarks as in the AD of humans can also be seen in dogs and monkeys. Although the pathophysiological mechanisms of AD are not yet fully clarified, scientists indicate that accumulated β -amyloid ($A\beta$), which is found postmortem in brains of AD patients, plays an important role in the aetiology of the disease. More recent evidence indicates that the soluble $A\beta$ oligomers are the more toxic pathogens, which lead to a loss of synaptic function and ultimately to the death of neural cells. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors are known to play a crucial role in learning and memory, and also in neurodegenerative processes. The most important subunit is the extracellular expressed NMDA-subunit NR2B, which excessive activation can lead to cell death. In this study we assessed, whether a reduction of the NR2B activity through pharmacological or genetic modification, can reverse the $A\beta$ oligomer induced toxic effect on autophagy, an intracellular degradation process, and spine density.

Transgenic mouse models with a heterozygous NR2B knockout (NR2B_{het}), an arctic or swedish mutation in the amyloid precursor protein (Arc) or a crossbred between both mutations (NR2B_{het}/Arc) were analysed for this study. In the Arc and NR2B_{het}/Arc mice we could find a clear increase of monomeric $A\beta_{1-42}$ and amyloid plaques. This result demonstrates that a reduction of the NR2B activity does not have any influence on $A\beta$ production or plaque load.

The autophagy processes did not show any significance; but the expression of the autophagy markers pUlk/Ulk, class III-PI3K, Atg12-Atg5 conjugate, LC3B-II/LC3B-I and LC3B-II showed a conspicuity in the Arc group. This could indicate, that the autophagy activity is altered in AD and that it can be reestablished through a heterozygous expression of the NR2B subunit. Reasons for the lack of significance could be the low amount of samples or that the age range of the mice was too high.

Furthermore murine hippocampal brain slices were incubated with $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, ${}_{3NTYR10}A\beta$ or $A\beta_{pE3-42}$ and it was analysed, if Radiprodil, a specific NR2B antagonist, can reverse the synaptotoxic effects of the different $A\beta$ species. However, the evaluation of the autophagy marker did not show significant differences for all $A\beta$

species. Interestingly, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$, ${}_{3N}Tyr10A\beta$ or $A\beta_{pE3-42}$ did reduce the spine density in the dendrites significantly. A preincubation with Radiprodil could reverse this degenerative process. Radiprodil did not show an effect in the experiment when $A\beta_{pE3-42}$ was used. This points out that at least for $A\beta_{pE3-42}$ there is another site of action responsible for the neurotoxic effect, rather than the NR2B subunit. In summary, the presented results underline, that NR2B plays an important role in the $A\beta$ induced pathophysiology of AD and that a decrease of the NR2B activity can convey a neuroprotective effect. At the same time the importance of the NR2B subunit as a possible pharmacological site of action for the treatment of AD is confirmed.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2009; 12: 1567-76.

Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, (Berlin) 1907; 64: 146-148.: 148.

Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* 2016; 12: 459-509.

Amadoro G, Ciotti MT, Costanzi M, Cestari V, Calissano P, Canu N. NMDA receptor mediates tau-induced neurotoxicity by calpain and ERK/MAPK activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2892-7.

Andine P, Sandberg M, Bagenholm R, Lehmann A, Hagberg H. Intra- and extracellular changes of amino acids in the cerebral cortex of the neonatal rat during hypoxic-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 1991; 64: 115-20.

Armstrong N, Gouaux E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 2000; 28: 165-81.

Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004; 431: 805-10.

Axon Medchem. RGH 896 - Radiprodil. 2016:
<https://www.axonmedchem.com/product/1434>. 24.09.2017.

Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, Pappolla

MA, Sambamurti K. Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2015; 12: 32-46.

Barth S, Glick D, Macleod KF. Autophagy: assays and artifacts. *The Journal of pathology* 2010; 221: 117-24.

Bartlett TE, Bannister NJ, Collett VJ, Dargan SL, Massey PV, Bortolotto ZA, Fitzjohn SM, Bashir ZI, Collingridge GL, Lodge D. Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in LTP and LTD in the CA1 region of two-week old rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2007; 52: 60-70.

Bates KA, Verdile G, Li QX, Ames D, Hudson P, Masters CL, Martins RN. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry* 2009; 14: 469-86.

Benjamin B, Burns A. Donepezil for Alzheimer's disease. *Expert review of neurotherapeutics* 2007; 7: 1243-9.

Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43: 1369-74.

Bergles DE, Diamond JS, Jahr CE. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Current Opinion in Neurobiology* 1999; 9: 293-8.

Berti V, Polito C, Lombardi G, Ferrari C, Sorbi S, Pupi A. Rethinking on the concept of biomarkers in preclinical Alzheimer's disease. *Neurological Sciences* 2016; 37: 663-72.

Bibl M, Gallus M, Welge V, Lehmann S, Sparbier K, Esselmann H, Wiltfang J. Characterization of cerebrospinal fluid aminotermally truncated and oxidized

amyloid-beta peptides. *Proteomics Clin Appl* 2012; 6: 163-9.

Bio-Rad. Protein Blotting Guide. 2017;

Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006: Cd005593.

Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Ochs SM, Hoffmann N, Mitteregger G, Kretschmar H, LaFerla FM, Herms J. Multiple Events Lead to Dendritic Spine Loss in Triple Transgenic Alzheimer's Disease Mice. *PLoS One* 2010; 5: e15477.

Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005; 171: 603-14.

Bleich S, Romer K, Wiltfang J, Kornhuber J. Glutamate and the glutamate receptor system: a target for drug action. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18: S33-40.

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

Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 1968; 114: 797-811.

Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2008; 28: 6926-37.

BrightFocus Foundation. Amyloid Plaques and Neurofibrillary Tangles. 2017: <http://www.brightfocus.org/alzheimers/infographic/amyloid-plaques-and-neurofibrillary-tangles>. 24.09.2017.

Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VMY. Advances in Tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nature reviews. Drug discovery* 2009; 8: 783-93.

Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders¹. *Brain Research Reviews* 2000; 33: 95-130.

Buisson A, Callebert J, Mathieu E, Plotkine M, Boulu RG. Striatal Protection Induced by Lesioning the Substantia Nigra of Rats Subjected to Focal Ischemia. *Journal of Neurochemistry* 1992; 59: 1153-7.

Burns A, Jacoby R, Luthert P, Levy R. Cause of death in Alzheimer's disease. *Age Ageing* 1990; 19: 341-4.

Burns MP, Vardanian L, Pajooesh-Ganji A, Wang L, Cooper M, Harris DC, Duff K, Rebeck GW. The effects of ABCA1 on cholesterol efflux and A β levels in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry* 2006; 98: 792-800.

Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem* 2010; 285: 13107-20.

Campbell JN, Register D, Churn SB. Traumatic brain injury causes an FK506-sensitive loss and an overgrowth of dendritic spines in rat forebrain. *J Neurotrauma* 2012; 29: 201-17.

Cataldo AM, Paskevich PA, Kominami E, Nixon RA. Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10998-1002.

CellSignaling Technology. Autophagy Signaling Interactive Pathway. 2017: <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research->

[autophagy/autophagy-signaling-pathway/pathways-autophagy](#). 24.09.2017.

Chartier-Harlin MC, Parfitt M, Legrain S, Perez-Tur J, Brousseau T, Evans A, Berr C, Vidal O, Roques P, Gourlet V, et al. Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 569-74.

Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ. The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 668-81.

Chertkow H, Feldman HH, Jacova C, Massoud F. Definitions of dementia and predementia states in Alzheimer's disease and vascular cognitive impairment: consensus from the Canadian conference on diagnosis of dementia. *Alzheimer's Research & Therapy* 2013; 5: S2-S.

Cho S, Wood A, Bowlby MR. Brain Slices as Models for Neurodegenerative Disease and Screening Platforms to Identify Novel Therapeutics. *Current Neuropharmacology* 2007; 5: 19-33.

Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 651-62.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *Journal of neurobiology* 1992; 23: 1261-76.

Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 18-41.

Collingridge GL, Bliss TV. Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 1995; 18: 54-6.

Conde C, Caceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons

and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 319-32.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-3.

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Current Opinion in Neurobiology* 2001; 11: 327-35.

Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004; 2004: re16.

Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, Rowan MJ. Block of LTP in rat hippocampus in vivo by beta-amyloid precursor protein fragments. *Neuroreport* 1997; 8: 3213-7.

Cummings BJ, Su JH, Cotman CW, White R, Russell MJ. β -Amyloid accumulation in aged canine brain: A model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 1993; 14: 547-60.

Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW. The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging* 1996a; 17: 259-68.

Cummings BJ, Head E, Afagh AJ, Milgram NW, Cotman CW. Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiol Learn Mem* 1996b; 66: 11-23.

Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler A, Quack G. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res* 2000; 2: 85-97.

Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a

symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry* 2003; 18: S23-32.

Danzysz W, Parsons CG. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *Br J Pharmacol* 2012; 167: 324-52.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976; 2: 1403.

De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG, Klein WL. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A β oligomers. *Neurobiol Aging* 2008; 29

Delabio R, Rasmussen L, Mizumoto I, Viani GA, Chen E, Villares J, Costa IB, Turecki G, Linde SA, Smith MC, Payao SL. PSEN1 and PSEN2 gene expression in Alzheimer's disease brain: a new approach. *J Alzheimers Dis* 2014; 42: 757-60.

Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 722-37.

Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. 2016;

Disterhoft JF, Oh MM. Pharmacological and molecular enhancement of learning in aging and Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 2006; 99: 180-92.

Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R. A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* 2013; 369: 341-50.

Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathologica* 2015; 130: 1-19.

Edler MK, Sherwood CC, Meindl RS, Hopkins WD, Ely JJ, Erwin JM, Mufson EJ, Hof PR, Raghanti MA. Aged chimpanzees exhibit pathologic hallmarks of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2017;

Emre M, Mecocci P, Stender K. Pooled analyses on cognitive effects of memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2008; 14: 193-9.

Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, Yuan H, Le P, Lyuboslavsky PN, Micale N, Jorgensen L, Clausen RP, Wyllie DJ, Snyder JP, Traynelis SF. Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 2007; 72: 907-20.

European Collaboration on Dementia. Prevalence of dementia in Europe. 2013: <http://www.alzheimer-europe.org/Research/European-Collaboration-on-Dementia/Prevalence-of-dementia/Prevalence-of-dementia-in-Europe>. 24.09.2017.

Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 2000; 28: 41-51.

Ferreira ST, Clarke JR, Bomfim TR, De Felice FG. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2014; 10: S76-83.

Ferreira ST, Lourenco MV, Oliveira MM, De Felice FG. Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 191.

Fitz NF, Cronican AA, Saleem M, Fauq AH, Chapman R, Lefterov I, Koldamova R. Abca1 deficiency affects Alzheimer's disease-like phenotype in human ApoE4 but not in ApoE3-targeted replacement mice. *The Journal of Neuroscience* 2012; 32: 13125-36.

Folch J, Petrov D, Ettcheto M, Abad S, Sánchez-López E, García ML, Olloquequi J, Beas-Zarate C, Auladell C, Camins A. Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. *Neural plasticity* 2016; 2016

Frankiewicz T, Parsons CG. Memantine restores long term potentiation impaired by tonic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation following reduction of Mg²⁺ in hippocampal slices. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1253-9.

Fu M, Zuo Y. Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci* 2011; 34: 177-87.

Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 2005; 438: 185-92.

Furukawa K, Mattson MP. Secreted amyloid precursor protein alpha selectively suppresses N-methyl-D-aspartate currents in hippocampal neurons: involvement of cyclic GMP. *Neuroscience* 1998; 83: 429-38.

Galimberti D, Scarpini E. Treatment of Alzheimer's disease: symptomatic and disease-modifying approaches. *Curr Aging Sci* 2010; 3: 46-56.

Ghavami S, Cunnington RH, Yeganeh B, Davies JJ, Rattan SG, Bathe K, Kavosh M, Los MJ, Freed DH, Klonisch T, Pierce GN, Halayko AJ, Dixon IM. Autophagy regulates trans fatty acid-mediated apoptosis in primary cardiac myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823: 2274-86.

Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, Christoffersson J, Chaabane W, Moghadam AR, Kashani HH, Hashemi M, Owji

AA, Los MJ. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 2014; 112: 24-49.

Glennner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1984; 120: 885-90.

Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* 2010; 221: 3-12.

Globus A, Scheibel AB. Loss of dendrite spines as an index of pre-synaptic terminal patterns. *Nature* 1966; 212: 463-5.

Globus MYT, Busto R, Martinez E, Valdés I, Dietrich WD, Ginsberg MD. Comparative Effect of Transient Global Ischemia on Extracellular Levels of Glutamate, Glycine, and γ -Aminobutyric Acid in Vulnerable and Nonvulnerable Brain Regions in the Rat. *Journal of Neurochemistry* 1991; 57: 470-8.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991; 349: 704-6.

Goebel DJ, Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Molecular Brain Research* 1999; 69: 164-70.

Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science* 2006; 314: 777-81.

Golde TE. Disease modifying therapy for AD? *J Neurochem* 2006; 99: 689-707.

Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, Nicolas V, Zhu Y, Domergue

V, Marin-Esteban V, Tharinger H, Delbos L, Gary-Gouy H, Morel AP, Ghavami S, Song E, Codogno P, Mehrpour M. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene* 2013; 32: 2261-72, 72e.1-11.

Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8

Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a006270.

Halpain S, Hipolito A, Saffer L. Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J Neurosci* 1998; 18: 9835-44.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; 441: 885-9.

Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 2002; 5: 405-14.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-6.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184.

Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 108-17.

Harris KM, Kater SB. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 341-71.

Harris ME, Wang Y, Pedigo NW, Jr., Hensley K, Butterfield DA, Carney JM. Amyloid beta peptide (25-35) inhibits Na⁺-dependent glutamate uptake in rat hippocampal astrocyte cultures. *J Neurochem* 1996; 67: 277-86.

Hasbani MJ, Schlieff ML, Fisher DA, Goldberg MP. Dendritic spines lost during glutamate receptor activation reemerge at original sites of synaptic contact. *J Neurosci* 2001; 21: 2393-403.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 67-93.

Heinrich A, Ando RD, Turi G, Rozsa B, Sperlagh B. K⁺ depolarization evokes ATP, adenosine and glutamate release from glia in rat hippocampus: a microelectrode biosensor study. *Br J Pharmacol* 2012; 167: 1003-20.

Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L, Riederer P, Feinstein DL, Klockgether T. Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 906-16.

Herculano-Houzel S. The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain. *Frontiers in Human Neuroscience* 2009; 3: 31.

Herman MA, Jahr CE. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci* 2007; 27: 9736-41.

Hestrin S. Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. *Nature* 1992; 357: 686-9.

Higgins GA, Ballard TM, Enderlin M, Haman M, Kemp JA. Evidence for improved performance in cognitive tasks following selective NR2B NMDA receptor antagonist pre-treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 179: 85-98.

Higuchi M, Iwata N, Saido TC. Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1751: 60-7.

Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 2892-7.

Houlden H, Crook R, Backhovens H, Prihar G, Baker M, Hutton M, Rossor M, Martin JJ, Van Broeckhoven C, Hardy J. ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset Alzheimer's disease families. *Am J Med Genet* 1998; 81: 117-21.

Howard R, McShane R, Lindesay J, Ritchie C, Baldwin A, Barber R, Burns A, Denning T, Findlay D, Holmes C, Hughes A, Jacoby R, Jones R, Jones R, McKeith I, Macharouthu A, O'Brien J, Passmore P, Sheehan B, Juszcak E, Katona C, Hills R, Knapp M, Ballard C, Brown R, Banerjee S, Onions C, Griffin M, Adams J, Gray R, Johnson T, Bentham P, Phillips P. Donepezil and Memantine for Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* 2012; 366: 893-903.

Hu NW, Klyubin I, Anwyl R, Rowan MJ. GluN2B subunit-containing NMDA receptor antagonists prevent Abeta-mediated synaptic plasticity disruption in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 20504-9.

Humpel C. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience* 2015; 305: 86-98.

Imbimbo BP, Giardina GA. gamma-secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 1555-70.

Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct

phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 5360-72.

Jaeger PA, Pickford F, Sun C-H, Lucin KM, Masliah E, Wyss-Coray T. Regulation of Amyloid Precursor Protein Processing by the Beclin 1 Complex. *PLoS One* 2010; 5: e11102.

Jahn H. Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2013; 15: 445-54.

Jakubik J, Michal P, Machova E, Dolezal V. Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists. *Physiol Res* 2008; 57 Suppl 3: S39-47.

Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108

Kabaya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19: 5720-8.

Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 2000; 150: 1507-13.

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

Kang J, Lemaire H-G, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik K-H, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325: 733-6.

Karantzoulis S, Galvin JE. Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia. *Expert review of neurotherapeutics* 2011; 11: 1579-91.

Karran E, Mercken M, Strooper BD. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 698-712.

Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16: 461-72.

Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 2001; 152: 519-30.

Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron* 2009; 63: 287-303.

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 132-41.

Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 20567-74.

Klein WL, Stine WB, Jr., Teplow DB. Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004; 25: 569-80.

Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clave C, Cleveland JL,

Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Devenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difiglia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Droge W, Dron M, Dunn WA, Jr., Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fesus L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, Gonzalez-Estevez C, Gorski S, Gottlieb RA, Haussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Hoyer-Hansen M, Hu X, Huang WP, Iwasaki A, Jaattela M, Jackson WT, Jiang X, Jin S, Johansen T, Jung JU, Kadowaki M, Kang C, Kelekar A, Kessel DH, Kiel JA, Kim HP, Kimchi A, Kinsella TJ, Kiselyov K, Kitamoto K, Knecht E, Komatsu M, Kominami E, Kondo S, Kovacs AL, Kroemer G, Kuan CY, Kumar R, Kundu M, Landry J, Laporte M, Le W, Lei HY, Lenardo MJ, Levine B, Lieberman A, Lim KL, Lin FC, Liou W, Liu LF, Lopez-Berestein G, Lopez-Otin C, Lu B, Macleod KF, Malorni W, Martinet W, Matsuoka K, Mautner J, Meijer AJ, Melendez A, Michels P, Miotto G, Mistiaen WP, Mizushima N, Mograbi B, Monastyrska I, Moore MN, Moreira PI, Moriyasu Y, Motyl T, Munz C, Murphy LO, Naqvi NI, Neufeld TP, Nishino I, Nixon RA, Noda T, Nurnberg B, Ogawa M, Oleinick NL, Olsen LJ, Ozpolat B, Paglin S, Palmer GE, Papassideri I, Parkes M, Perlmutter DH, Perry G, Piacentini M, Pinkas-Kramarski R, Prescott M, Proikas-Cezanne T, Raben N, Rami A, Reggiori F, Rohrer B, Rubinsztein DC, Ryan KM, Sadoshima J, Sakagami H, Sakai Y, Sandri M, Sasakawa C, Sass M, Schneider C, Seglen PO, Seleverstov O, Settleman J, Shacka JJ, Shapiro IM, Sibirny A, Silva-Zacarin EC, Simon HU, Simone C, Simonsen A, Smith MA, Spanel-Borowski K, Srinivas V, Steeves M, Stenmark H, Stromhaug PE, Subauste CS, Sugimoto S, Sulzer D, Suzuki T, Swanson MS, Tabas I, Takeshita F, Talbot NJ, Talloczy Z, Tanaka K, Tanaka K, Tanida I, Taylor GS, Taylor JP, Terman A, Tettamanti G, Thompson CB, Thumm M, Tolkovsky AM, Tooze SA, Truant R, Tumanovska LV, Uchiyama Y, Ueno T, Uzcategui NL, van der Klei I, Vaquero EC, Vellai T, Vogel MW, Wang HG, Webster P, Wiley JW, Xi Z, Xiao G, Yahalom J, Yang JM, Yap G, Yin XM, Yoshimori T, Yu L, Yue Z, Yuzaki M, Zahirnyk O, Zheng X, Zhu X, Deter RL. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4: 151-75.

Klionsky DJ, Codogno P. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun* 2013; 5: 427-33.

Klunk WE, Bacsikai BJ, Mathis CA, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Debnath ML, Holt DP, Wang Y, Hyman BT. Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61: 797-805.

Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 2004; 55: 306-19.

Knobloch M, Konietzko U, Krebs DC, Nitsch RM. Intracellular A β and cognitive deficits precede β -amyloid deposition in transgenic arcA β mice. *Neurobiology of Aging* 2007; 28: 1297-306.

Kochanek KD, Murphy SL, Xu J, Tejada-Vera B. Deaths: Final Data for 2014. *Natl Vital Stat Rep* 2016; 65: 1-122.

Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotow T, Peters C, von Figura K, Mizushima N, Saftig P, Uchiyama Y. Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 2005; 167: 1713-28.

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441: 880-4.

Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Jr., Iwata J, Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 14489-94.

Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell* 2010; 40: 280-93.

Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 2010; 29: 3020-32.

Kullmann DM, Lamsa KP. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 687-99.

Kummer MP, Hermes M, Delekarte A, Hammerschmidt T, Kumar S, Terwel D, Walter J, Pape HC, König S, Roeber S, Jessen F, Klockgether T, Korte M, Heneka MT. Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron* 2011; 71: 833-44.

Kummer MP, Heneka MT. Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther* 2014; 6: 28.

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

LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE. Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem* 1994; 269: 23403-6.

Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 759-74.

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. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6448-53.

Lambracht-Washington D, Rosenberg RN. Advances in the Development of Vaccines for Alzheimer's Disease. *Discovery medicine* 2013; 15: 319-26.

Lanctot KL, Herrmann N, Yau KK, Khan LR, Liu BA, LouLou MM, Einarson TR. Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Cmaj* 2003; 169: 557-64.

Lanctôt KL, Rajaram RD, Herrmann N. Review: Therapy for Alzheimer's disease: how effective are current treatments? *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 2009; 2: 163-80.

Landsberg G. Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 471-9.

Lee J, Retamal C, Cuitino L, Caruano-Yzermans A, Shin JE, van Kerkhof P, Marzolo MP, Bu G. Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *J Biol Chem* 2008; 283: 11501-8.

Lee S, Sato Y, Nixon RA. Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *The Journal of Neuroscience* 2011; 31: 7817-30.

Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 2000; 404: 876-81.

Lesne S, Ali C, Gabriel C, Croci N, MacKenzie ET, Glabe CG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C, Vivien D, Buisson A. NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. *J Neurosci* 2005; 25: 9367-77.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27-42.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 1995a; 269: 970-3.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995b; 269: 973-7.

Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 2009; 62: 788-801.

Li S, Jin M, Koeglsperger T, Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Soluble A β oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci* 2011; 31: 6627-38.

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402: 672-6.

LifeSpan BioSciences. Monkey Insulin ELISA Kit (Sandwich ELISA). 2017: <https://www.lsbio.com/elisakits/monkey-insulin-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-f10306/10306>. 24.09.2017.

Lipinski MM, Zheng B, Lu T, Yan Z, Py BF, Ng A, Xavier RJ, Li C, Yankner BA, Scherzer CR. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107: 14164-9.

Lleó A. Current Therapeutic Options for Alzheimer's Disease. *Current Genomics* 2007; 8: 550-8.

Loftis JM, Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol Ther* 2003; 97: 55-85.

Lopez-Arrieta JM, Birks J. Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2002: Cd000147.

LYNCH MA. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews* 2004; 84: 87-136.

Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012; 4: 429-34.

Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D, Cuervo AM. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* 2010; 13: 567-76.

Mas E, Dupuy AM, Artero S, Portet F, Cristol JP, Ritchie K, Touchon J. Functional Vitamin E deficiency in ApoE4 patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006; 21: 198-204.

Masliah E, Raber J, Alford M, Mallory M, Mattson MP, Yang D, Wong D, Mucke L. Amyloid protein precursor stimulates excitatory amino acid transport. Implications for roles in neuroprotection and pathogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273: 12548-54.

Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE. beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 1993; 16: 409-14.

Mattson MP. Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med* 2003; 3: 65-94.

Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, Herukka SK, van der Flier WM, Blankenstein MA, Ewers M, Rich K, Kaiser E, Verbeek M, Tsolaki M, Mulugeta E, Rosen E, Aarsland D, Visser PJ, Schroder J, Marcusson J, de Leon M, Hampel H, Scheltens P, Pirtila T, Wallin A, Jonhagen ME, Minthon L, Winblad B, Blennow K. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *Jama* 2009; 302: 385-93.

Mattusch K, Haas L, Kummer M, Heneka M, Parsons CG, Rammes G (2013) The NMDA receptor antagonist radiprodil reverses the synaptotoxic effects of different amyloid-beta (A β) species on long-term potentiation (LTP)

May PC, Willis BA, Lowe SL, Dean RA, Monk SA, Cocke PJ, Audia JE, Boggs LN, Borders AR, Brier RA, Calligaro DO, Day TA, Ereshefsky L, Erickson JA, Gevorkyan H, Gonzales CR, James DE, Jhee SS, Komjathy SF, Li L, Lindstrom TD, Mathes BM, Martenyi F, Sheehan SM, Stout SL, Timm DE, Vaught GM, Watson BM, Winneroski LL, Yang Z, Mergott DJ. The potent BACE1 inhibitor LY2886721 elicits robust central A β pharmacodynamic responses in mice, dogs, and humans. *J Neurosci* 2015; 35: 1199-210.

Mayer ML, Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The Journal of Physiology* 1987; 394: 501-27.

Mayer ML, Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 161-81.

Mayer ML. Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores: molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. *Neuron* 2005; 45: 539-52.

Mayer ML. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 2006; 440: 456-62.

Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012; 2: a006239.

McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-44.

McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, Mohs RC, Morris JC, Rossor MN, Scheltens P, Carrillo MC, Thies B, Weintraub S, Phelps CH. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 2011; 7: 263-9.

Menting KW, Claassen JA. beta-secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 165.

Minichiello L, Korte M, Wolfer D, Kuhn R, Unsicker K, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Lipp HP, Bonhoeffer T, Klein R. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 1999; 24: 401-14.

Mitani A, Andou Y, Kataoka K. Selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons cannot be explained in terms of an increase in glutamate concentration during ischemia in the gerbil: brain microdialysis study. *Neuroscience* 1992; 48: 307-13.

Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 2003; 116: 1679-88.

- Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; 21: 2861-73.
- Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; 3: 542-5.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451: 1069-75.
- Monaco SA, Gulchina Y, Gao WJ. NR2B subunit in the prefrontal cortex: A double-edged sword for working memory function and psychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2015; 56: 127-38.
- Monaghan DT JD (2009) *Pharmacology of NMDA Receptors*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL)
- Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol* 2009; 157: 1301-17.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 1992; 256: 1217-21.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12: 529-40.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 1991; 354: 31-7.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 458-67.

Nalivaeva N, Belyaev N, Zhuravin I, Turner A. The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012; 2012

Nalivaeva NN, Fisk LR, Belyaev ND, Turner AJ. Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2008; 5: 212-24.

Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *Jama* 2000; 283: 1571-7.

Neyton J, Paoletti P. Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach. *J Neurosci* 2006; 26: 1331-3.

Nilsson P, Loganathan K, Sekiguchi M, Matsuba Y, Hui K, Tsubuki S, Tanaka M, Iwata N, Saito T, Saido TC. Abeta secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell Rep* 2013; 5: 61-9.

Nilsson P, Saido TC. Dual roles for autophagy: degradation and secretion of Alzheimer's disease Abeta peptide. *Bioessays* 2014; 36: 570-8.

Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 313-53.

Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 113-22.

Nixon RA, Yang DS. Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis* 2011; 43: 38-45.

Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* 2013; 19:

983-97.

Noda M, Nakanishi H, Akaike N. Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience* 1999; 92: 1465-74.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984; 307: 462-5.

Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 1998; 21: 545-59.

Nyitrai G, Kekesi KA, Juhasz G. Extracellular level of GABA and Glu: in vivo microdialysis-HPLC measurements. *Curr Top Med Chem* 2006; 6: 935-40.

O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 185-204.

Oh ES, Savonenko AV, King JF, Fangmark Tucker SM, Rudow GL, Xu G, Borchelt DR, Troncoso JC. Amyloid precursor protein increases cortical neuron size in transgenic mice. *Neurobiol Aging* 2009; 30: 1238-44.

Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282: 24131-45.

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 383-400.

Papa M, Bundman M, Greenberger V, Segal M. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *The Journal of*

Neuroscience 1995; 15: 1-11.

Parnavelas JG, Lynch G, Brecha N, Cotman CW, Globus A. Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. *Nature* 1974; 248: 71-3.

Parsons CG, Stoffler A, Danysz W. 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* 2007; 53: 699-723.

Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I. Memantine and Cholinesterase Inhibitors: Complementary Mechanisms in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurotox Res* 2013; 24: 358-69.

Penazzi L, Tackenberg C, Ghorri A, Golovyashkina N, Niewidok B, Selle K, Ballatore C, Smith AB, 3rd, Bakota L, Brandt R. Aβ-mediated spine changes in the hippocampus are microtubule-dependent and can be reversed by a subnanomolar concentration of the microtubule-stabilizing agent epothilone D. *Neuropharmacology* 2016; 105: 84-95.

Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2011; 14: 285-93.

Perez-Garmendia R, Gevorkian G. Pyroglutamate-Modified Amyloid Beta Peptides: Emerging Targets for Alzheimer's Disease Immunotherapy. *Current Neuropharmacology* 2013; 11: 491-8.

Perl DP. *Neuropathology of Alzheimer's Disease*. The Mount Sinai Journal of Medicine, New York 2010; 77: 32-42.

Phillis JW, O'Regan MH. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex. *Neurochem Int* 2003; 43: 461-7.

Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 2190-9.

Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 2003; 23: 5531-5.

Pohl C, Jentsch S. Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 65-70.

Preston Alison R, Eichenbaum H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. *Current Biology* 23: R764-R73.

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fa M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci* 2008; 28: 14537-45.

Quirion R, Aubert I, Lapchak PA, Schaum RP, Teolis S, Gauthier S, Araujo DM. Muscarinic receptor subtypes in human neurodegenerative disorders: focus on Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences* 1989; Suppl: 80-4.

Rammes G, Hasenjager A, Sroka-Saidi K, Deussing JM, Parsons CG. Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of beta-amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology* 2011; 60: 982-90.

Rammes G, Gravius A, Ruitenbergh M, Wegener N, Chambon C, Sroka-Saidi K, Jeggo R, Staniaszek L, Spanswick D, O'Hare E, Palmer P, Kim EM, Bywalez W, Egger V, Parsons CG. MRZ-99030 - A novel modulator of Abeta aggregation: II - Reversal of Abeta oligomer-induced deficits in long-term potentiation (LTP) and cognitive performance in rats and mice. *Neuropharmacology* 2015; 92: 170-82.

Rammes G, Mattusch C, Wulff M, Seeser F, Kreuzer M, Zhu K, Deussing JM, Herms J, Parsons CG. Involvement of GluN2B subunit containing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in mediating the acute and chronic synaptotoxic effects of oligomeric amyloid-beta (A β) in murine models of Alzheimer's disease (AD). *Neuropharmacology* 2017; 123: 100-15.

Rangaraju S, Verrier JD, Madorsky I, Nicks J, Dunn WA, Notterpek L. Rapamycin Activates Autophagy and Improves Myelination in Explant Cultures from Neuropathic Mice. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30: 11388-97.

Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology* 2014; 88: 640-51.

Religa D, Laudon H, Styczynska M, Winblad B, Naslund J, Haroutunian V. Amyloid beta pathology in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 867-72.

Rönicke R, Mikhaylova M, Rönicke S, Meinhardt J, Schröder UH, Fändrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG. Early neuronal dysfunction by amyloid β oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiology of Aging* 2011; 32: 2219-28.

Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 2006; 443: 780-6.

Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, Klionsky DJ. In search of an "autophagometer". *Autophagy* 2009; 5: 585-9.

Ruddy RM, Chen Y, Milenkovic M, Ramsey AJ. Differential effects of NMDA receptor antagonism on spine density. *Synapse* 2015; 69: 52-6.

Ruppa KB, King D, Olson RE. Chapter Seven - NMDA Antagonists of GluN2B Subtype and Modulators of GluN2A, GluN2C, and GluN2D Subtypes—Recent

Results and Developments. In: Annual Reports in Medicinal Chemistry. Manoj CD, ed.: Academic Press 2012: 89-103.

Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang Y-Y, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan K-L. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 741-50.

Saido TC, Yamao-Harigaya W, Iwatsubo T, Kawashima S. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neuroscience letters* 1996; 215: 173-6.

Schaffer BA, Bertram L, Miller BL, Mullin K, Weintraub S, Johnson N, Bigio EH, Mesulam M, Wiedau-Pazos M, Jackson GR, Cummings JL, Cantor RM, Levey AI, Tanzi RE, Geschwind DH. Association of GSK3B with Alzheimer disease and frontotemporal dementia. *Arch Neurol* 2008; 65: 1368-74.

Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 2007; 68: 1501-8.

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173-7.

Schilling S, Hoffmann T, Manhart S, Hoffmann M, Demuth H-U. Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS letters* 2004; 563: 191-6.

Schilling S, Zeitschel U, Hoffmann T, Heiser U, Francke M, Kehlen A, Holzer M, Hutter-Paier B, Prokesch M, Windisch M, Jagla W, Schlenzig D, Lindner C, Rudolph T, Reuter G, Cynis H, Montag D, Demuth HU, Rossner S. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like

pathology. *Nat Med* 2008; 14: 1106-11.

Schoenfeld TA, Obar RA. Diverse Distribution and Function of Fibrous Microtubule-Associated Proteins in the Nervous System. In: *International Review of Cytology*. Kwang WJ, Jonathan J, eds.: Academic Press 1994: 67-137.

Selenica ML, Jensen HS, Larsen AK, Pedersen ML, Helboe L, Leist M, Lotharius J. Efficacy of small-molecule glycogen synthase kinase-3 inhibitors in the postnatal rat model of tau hyperphosphorylation. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 959-79.

Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 2008; 192

Seshadri S, Wolf PA. Lifetime risk of stroke and dementia: current concepts, and estimates from the Framingham Study. *The Lancet Neurology* 2007; 6: 1106-14.

Shah RS, Lee H-G, Xiongwei Z, Perry G, Smith MA, Castellani RJ. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2008; 62: 199-207.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 2007; 27: 2866-75.

Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA, Levesque G, Rogaev EI, Lin C, Liang Y, Ikeda M, Mar L, Brice A, Agid Y, Percy ME, Clerget-Darpoux F, Piacentini S, Marcon G, Nacmias B, Amaducci L, Frebourg T, Lannfelt L, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 985-8.

Shors TJ, Matzel LD. Long-term potentiation: what's learning got to do with it?

Behav Brain Sci 1997; 20: 597-614; discussion -55.

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

Spilman P, Podlitskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R, Galvan V. Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid- β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS One* 2010; 5: e9979.

Sun X, Jin L, Ling P. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discov Ther* 2012; 6: 285-90.

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 2001; 20: 5971-81.

Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* 2007; 12: 209-18.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 1999; 401: 63-9.

Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 2005; 1: 84-91.

Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005; 120: 545-55.

Tekirian TL, Yang AY, Glabe C, Geddes JW. Toxicity of pyroglutaminated

amyloid beta-peptides 3(pE)-40 and -42 is similar to that of A beta1-40 and -42. *J Neurochem* 1999; 73: 1584-9.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991; 30: 572-80.

Texidó L, Martín-Satué M, Alberdi E, Solsona C, Matute C. Amyloid β peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium* 2011; 49: 184-90.

Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 2008; 283: 29615-9.

Tolino M, Kohrmann M, Kiebler MA. RNA-binding proteins involved in RNA localization and their implications in neuronal diseases. *Eur J Neurosci* 2012; 35: 1818-36.

Tong L, Prieto GA, Kramar EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G, Cotman CW. Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1beta via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 2012; 32: 17714-24.

Tooze SA, Schiavo G. Liaisons dangereuses: autophagy, neuronal survival and neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18: 504-15.

Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 405-96.

Trojanowski JQ, Lee V. Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *The FASEB journal* 1995; 9: 1570-6.

Tsuno N. Donepezil in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother* 2009; 9: 591-8.

Ulamiek-Koziol M, Furmaga-Jablonska W, Januszewski S, Brzozowska J, Scislewska M, Jablonski M, Pluta R. Neuronal autophagy: self-eating or self-cannibalism in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2013; 38: 1769-73.

Ulbrich MH, Isacoff EY. Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14163-8.

Valverde F. Apical dendritic spines of the visual cortex and light deprivation in the mouse. *Exp Brain Res* 1967; 3: 337-52.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286: 735-41.

Vassar R, Kandalepas PC. The beta-secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 2011; 3: 20.

Villamil-Ortiz JG, Cardona-Gomez GP. Comparative analysis of autophagy and tauopathy related markers in cerebral ischemia and Alzheimer's disease animal models. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2015; 7

Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, Weidner J, Mumford R, Webber R, Nathan C, Roberts AB, Lippa CF, Sporn MB. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* 1996; 184: 1425-33.

von Engelhardt J, Doganci B, Jensen V, Hvalby O, Gongrich C, Taylor A, Barkus C, Sanderson DJ, Rawlins JN, Seeburg PH, Bannerman DM, Monyer H.

Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron* 2008; 60: 846-60.

Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res* 2014; 63 Suppl 1: S191-203.

Wada H, Nakajoh K, Satoh-Nakagawa T, Suzuki T, Ohru T, Arai H, Sasaki H. Risk factors of aspiration pneumonia in Alzheimer's disease patients. *Gerontology* 2001; 47: 271-6.

Walker LC, LeVine H. The cerebral proteopathies: neurodegenerative disorders of protein conformation and assembly. *Mol Neurobiol* 2000; 21: 83-95.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416: 535-9.

Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 2004; 44: 181-93.

Wang QJ, Ding Y, Kohtz DS, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, Chait BT, Zhong Y, Heintz N, Yue Z. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* 2006; 26: 8057-68.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 1858-62.

Wenk GL, Parsons CG, Danysz W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behavioural pharmacology* 2006; 17: 411-24.

White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 401-10.

Wimo A, Jonsson L, Bond J, Prince M, Winblad B. The worldwide economic impact of dementia 2010. *Alzheimers Dement* 2013; 9: 1-11.e3.

Wolfe MS. gamma-Secretase as a target for Alzheimer's disease. *Adv Pharmacol* 2012a; 64: 127-53.

Wolfe MS. The role of tau in neurodegenerative diseases and its potential as a therapeutic target. *Scientifica* 2012b; 2012

Wong CW, Quaranta V, Glenner GG. Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 8729-32.

Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. beta-Amyloid selectively augments NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *Neuroreport* 1995; 6: 2409-13.

Wu TY, Chen CP, Jinn TR. Alzheimer's disease: aging, insomnia and epigenetics. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2010; 49: 468-72.

Xia W, Yang T, Smith IM, Shen Y, Walsh DM, Selkoe DJ. A Specific ELISA for Measuring Amyloid β -Protein Oligomers in Human Plasma and the Brains of Alzheimer Patients. *Archives of Neurology* 2009; 66: 190-9.

Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 3290-8.

Xing XN, Zhang WG, Sha S, Li Y, Guo R, Wang C, Cao YP. Amyloid beta 3-10 DNA vaccination suggests a potential new treatment for Alzheimer's disease in BALB/c mice. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124: 2636-41.

Yan R, Vassar R. Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol* 2014; 13: 319-29.

Yang Z, Klionsky DJ. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Current topics in microbiology and immunology* 2009; 335: 1-32.

Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 2008; 55: 1081-94.

Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 2013; 6: 19-33.

Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ. A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* 2007; 27: 14459-69.

Zhao M-G, Toyoda H, Lee Y-S, Wu L-J, Ko SW, Zhang X-H, Jia Y, Shum F, Xu H, Li B-M, Kaang B-K, Zhuo M. Roles of NMDA NR2B Subtype Receptor in Prefrontal Long-Term Potentiation and Contextual Fear Memory. *Neuron* 47: 859-72.

IX. ANHANG

1. Chemikalien und fertige Lösungen

Produkt	Hersteller
$A\beta_{1-40}$	American Peptide Sunnyvale, CA, USA
$A\beta_{1-42}$	American Peptide Sunnyvale, CA, USA
$A\beta_{pE3-42}$	Bachem AG Bubendorf, Schweiz
${}^3N_{Tyr10}A\beta$	bereitgestellt vom Department der Neurologie Universitätsklinikum Bonn
<i>Scrambled</i> $A\beta_{1-42}$	Covance Inc. Princeton, NJ, USA
Aceton	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Calciumchlorid ($CaCl_2$)- Dihydrat	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
50 x Complete	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
D-(+)-Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA

Clarity™ Western ECL substrate	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Ethanol	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
GFP rabbit IgG Antibody fraction-Alexa fluor 488 Conjugate	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Glycin	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Guanidine Hydrochlorid (Guanidine HCl)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Hexafluorisopropanol (HFIP)	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
Histoacryl Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG Tuttlingen, Deutschland
Human/rat β Amyloid (42) ELISA Kit	Wako Chemicals GmbH Neuss, Deutschland
Immersol™ 518 F	Carl Zeiss Oberkochen, Deutschland
Isofluran	CP-Pharma Burgdorf, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Memantin	Merz Pharma Frankfurt am Main, Deutschland
Methanol	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
Methoxy-X04	Tocris Bioscience Avonmouth, Bristol, UK
Magnesiumchlorid (MgCl₂)-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA

Monopropylenglykol	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
Mounting Medium Hard Set	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH Eching, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄)- Monohydrat	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
Normal Goat Serum (NGS)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen AG Carlsbad, CA, USA
NuPage Sample Reducing Agent	Invitrogen AG Carlsbad, CA, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Pepstatin	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonyl- fluorid (PMSF)	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate- buffered-saline</i> = PBS)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Radiprodil	Merz Pharma Frankfurt am Main, Deutschland
Rapamycin	Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, MA, USA
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Roti ® -Block	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Elektrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
TGX Stain Free Fast Cast Acrylamide Kit 10 %	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Tris	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
TritonX-100	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA

2. Hergestellte Puffer und Lösungen

Produkt	Substanz
Blocklösung spine density	1-fach-PBS
	+ 0,5 % Triton X-100
	+ 10% NGS

Blottingpuffer 10fach	247,93 mM Tris
	920 mM Glycin
Elektrophoresepuffer	24,8 mM Tris
	192 mM Glycin
	3,5 mM SDS
Methoxy-X04 Stammlösung	10 mg Methoxy-X04
	+ 100 µl DMSO
	+ 450 µl Monopropylenglykol
	+ 450 µl 1-fach-PBS
	+ 50 µl NaOH
TBS/T, pH 7,7	24,8 mM Tris
	190 mM NaCl
	0,1 % Tween 20
Trenngel (12Gele)	28,4 ml Substanz A
	+ 28,4 ml Substanz B
	+ 284 µl APS
	+ 28,4 µl TEMED
Sammelgel (12 Gele)	8 ml Substanz A
	+ 8 ml Substanz B
	+ 80 µl APS
	+ 16 µl TEMED

RIPA-Puffer	20 µl/ml 50x Complete
	+ 1mM PMSF
	+ 1 µl/ml Pepstatin
	Ad 1000 ml RIPA Puffer
Reaktionspuffer	100 ml 1-fach-PBS
	+ 1x Protease Inhibitor Cocktail
	+ 5% BSA
	+ 0,03 % Tween 20

3. Geräte

Produkt	Hersteller
Axiomager.M2	Carl Zeiss Oberkochen, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus Hanau, Deutschland
Blotting Kammer	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Chemi Doc™ XRS Kamera	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Leica VT 1000S	Leica Biosystems Buffalo Grove, IL, USA
LSM780 Mikroskop	Carl Zeiss Oberkochen, Deutschland
Sunrise™ Reader	Tecan Trading AG Männedorf, Schweiz

Thermo Scientific Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Tischguillotine	World Precision Instruments, Inc. Sarasota, FL, USA
Wärmeblock	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Köttermann GmbH und Co. KG Uetze, Deutschland

4. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Amersham Sample Grinding Kit	GE Healthcare Europe GmbH Freiburg, Deutschland
Amersham Hybond Low Fluorescence 0,2 µm PVDF	GE Healthcare Europe GmbH Freiburg, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Falkon	TPP Techno Plastic Products AG Trasadingen, Deutschland
Filterpapier	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland
Glasplatten für Gele	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
Mikrotiterplatte	Brand GmbH und Co. KG Wertheim, Deutschland
Pasteurpipette	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitze	Sarstedt AG und Co Nümbrecht, Deutschland

Rasierklinge	Wilkinson Sword High Wycombe, UK
Serologiepipette	Greiner Bio-one International GmbH Kremsmünster, Österreich

5. Software

Produkt	Hersteller
Excel 2013	Microsoft Redmond, WA, USA
Graph Pad Prism	GraphPad Software, Inc. La Jolla, USA
Image J	Launacher Symmetry Software NIH, Bethesda, USA
Image Lab 5.2.1.	Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA
LSM Image Browser	Carl Zeiss Oberkochen, Deutschland
Magellan	Tecan Trading AG Männedorf, Schweiz
Zen blue	Carl Zeiss Oberkochen, Deutschland
Zen black	Carl Zeiss Oberkochen, Deutschland

6. Graphiken

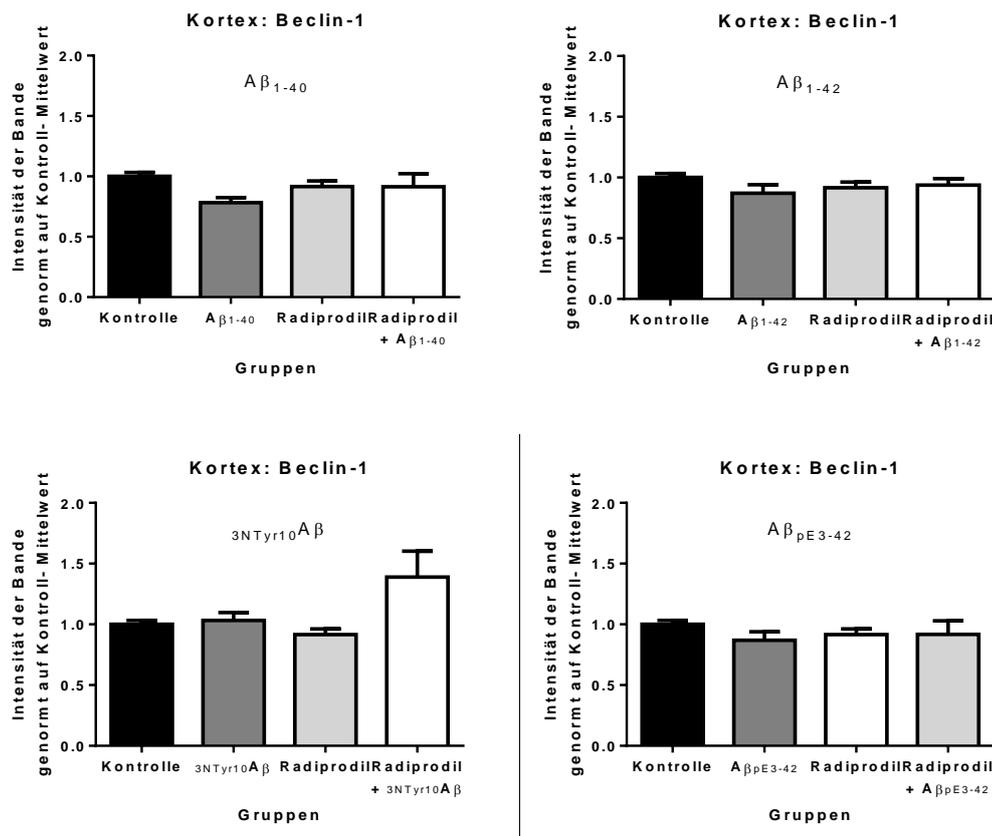


Abbildung Anh. 1: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Beclin-1 im Kortex. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.03 für die Kontroll-Gruppe (n=12) und 0.92 ± 0.05 für die Radiprodil-Gruppe (n=12).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.78 ± 0.04 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe (n=4) und 0.91 ± 0.11 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe (n=4) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.87 ± 0.07 (n=4) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 0.94 ± 0.05 (n=4) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der $3NTyr_{10}A\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($p > 0.9999$) und zur Radiprodil+ $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe ($p = 0.3324$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.03 ± 0.07 (n=4) für die $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe und 1.39 ± 0.21 für die Radiprodil+ $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe (n=4) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{pE3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.87 ± 0.07 für die $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe (n=4) und 0.94 ± 0.05 für die Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe (n=4) (mean \pm SEM).

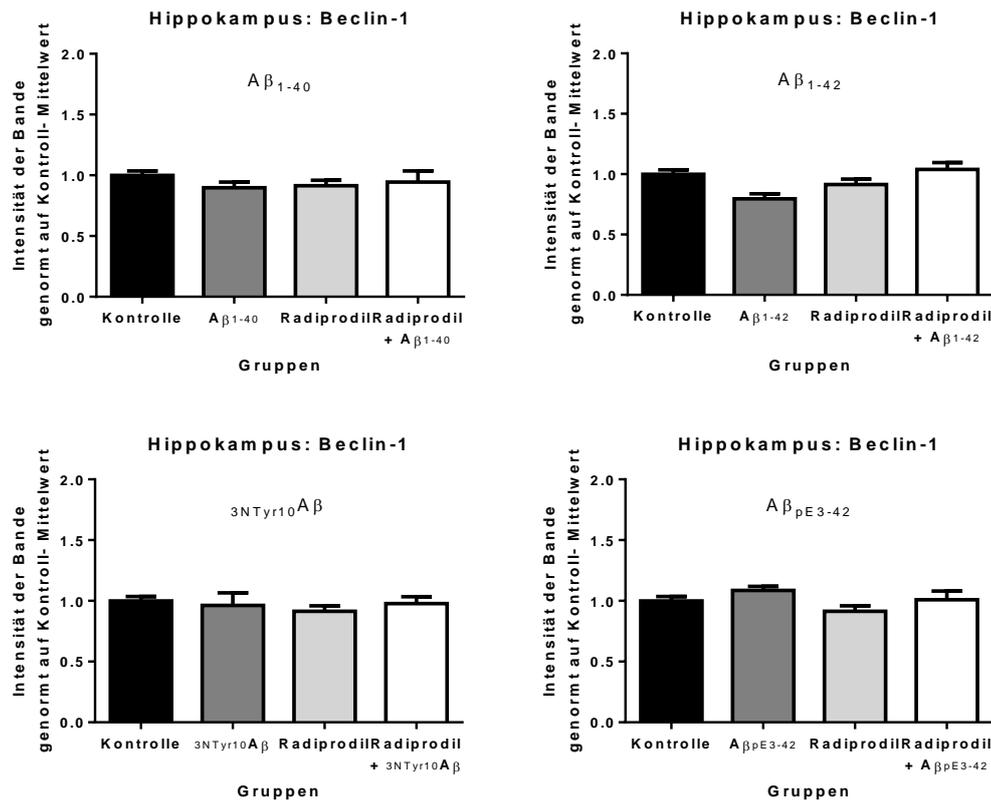


Abbildung Anh. 2: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Beclin-1 im Hippokampus. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.04 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 0.92 ± 0.04 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.9 ± 0.05 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) und 0.95 ± 0.09 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($p=0.5984$) und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p=0.7233$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.8 ± 0.04 ($n=4$) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 1.04 ± 0.06 ($n=4$) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der ${}^3N_{Tyr10}A\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ ${}^3N_{Tyr10}A\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.96 ± 0.1 ($n=4$) für die ${}^3N_{Tyr10}A\beta$ -Gruppe und 0.98 ± 0.06 für die Radiprodil+ ${}^3N_{Tyr10}A\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{pE3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.09 ± 0.03 für die $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.01 ± 0.07 für die Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

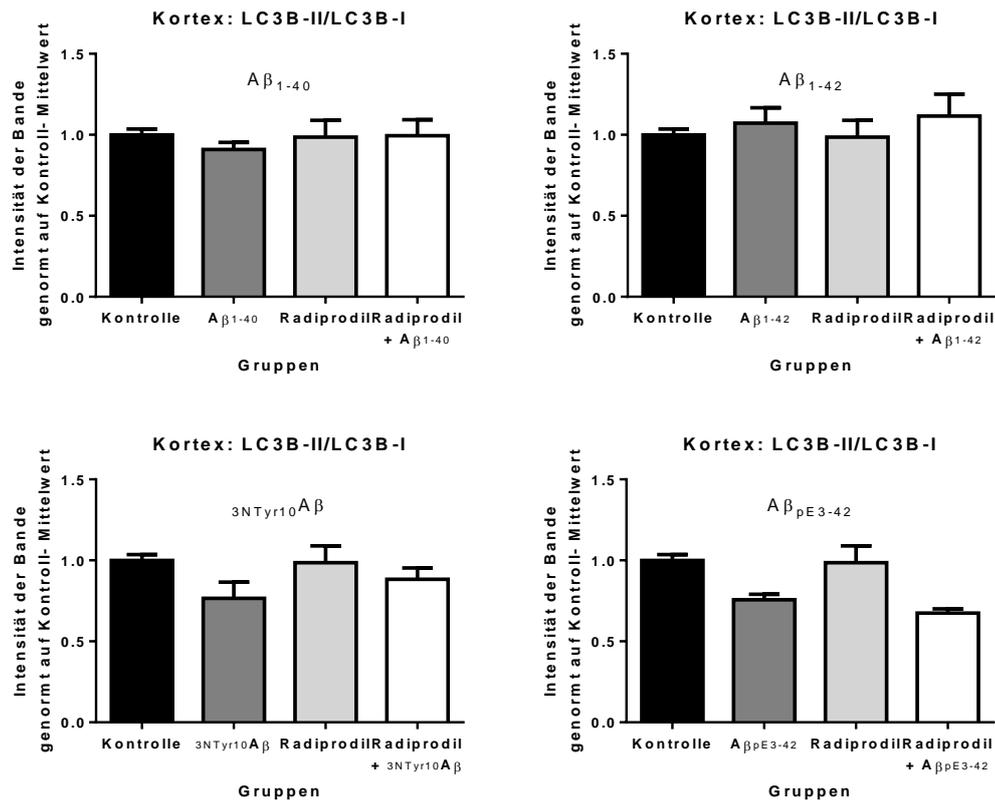


Abbildung Anh. 3: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II/LC3B-I im Kortex. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.04 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 0.99 ± 0.1 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.91 ± 0.04 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.0 ± 0.1 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.07 ± 0.1 ($n=4$) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 1.12 ± 0.14 ($n=4$) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der ${}_{3N}Tyr10A\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ ${}_{3N}Tyr10A\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.77 ± 0.1 ($n=4$) für die ${}_{3N}Tyr10A\beta$ -Gruppe und 0.88 ± 0.07 für die Radiprodil+ ${}_{3N}Tyr10A\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{pE3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.76 ± 0.03 für die $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 0.68 ± 0.03 für die Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

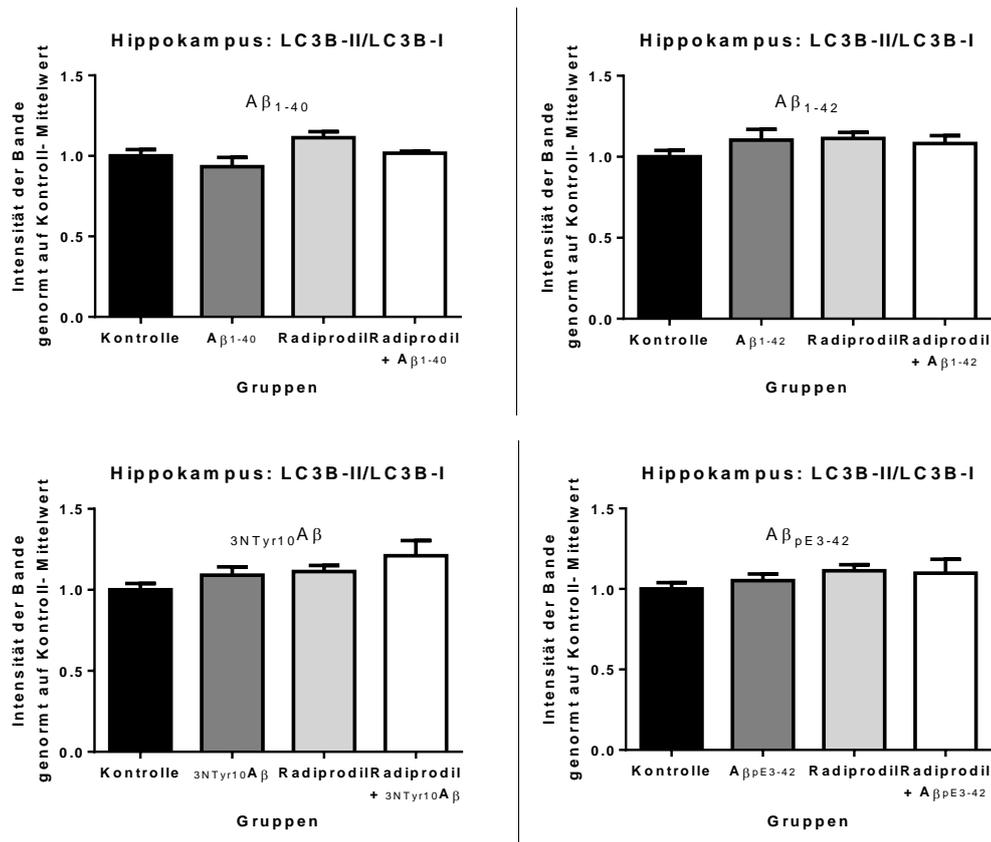


Abbildung Anh. 4: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II/LC3B-I im Hippokampus. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.04 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 1.11 ± 0.4 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.93 ± 0.06 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.02 ± 0.1 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.1 ± 0.07 ($n=4$) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 1.08 ± 0.05 ($n=4$) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der ${}^3\text{NTyr}_{10}\text{A}\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ ${}^3\text{NTyr}_{10}\text{A}\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.09 ± 0.05 ($n=4$) für die ${}^3\text{NTyr}_{10}\text{A}\beta$ -Gruppe und 1.21 ± 0.09 für die Radiprodil+ ${}^3\text{NTyr}_{10}\text{A}\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{\text{pE}3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{\text{pE}3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.05 ± 0.04 für die $A\beta_{\text{pE}3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.1 ± 0.09 für die Radiprodil+ $A\beta_{\text{pE}3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

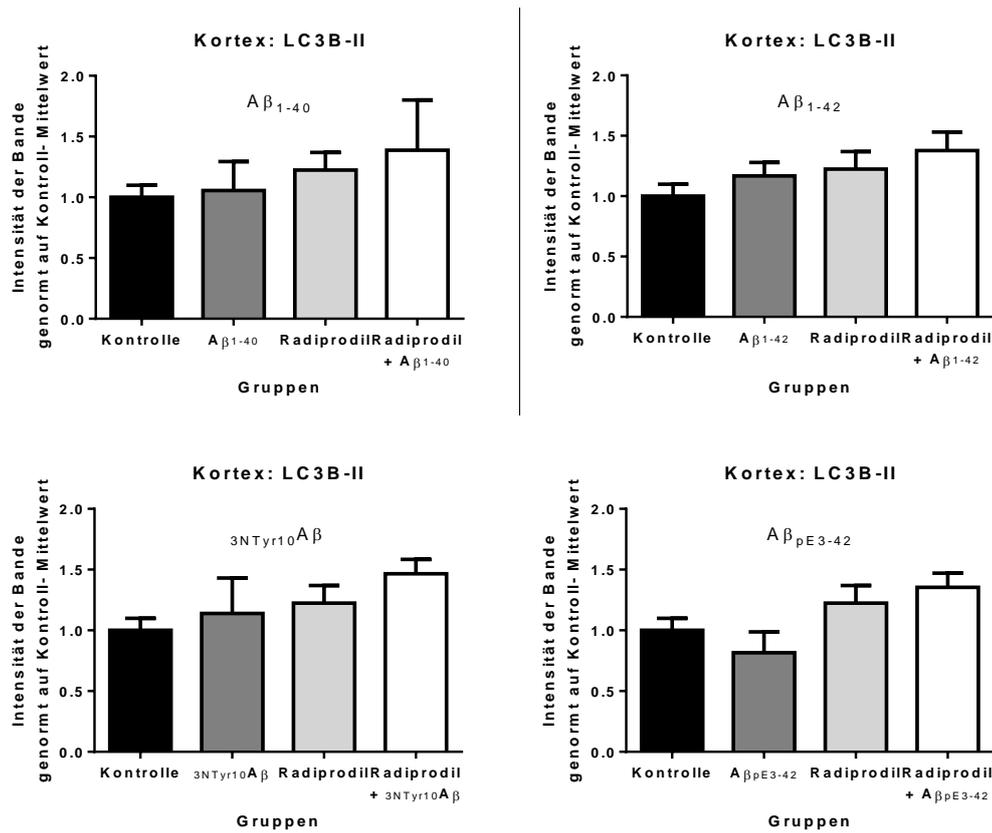


Abbildung Anh. 5: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II im Kortex. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.1 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 1.22 ± 0.15 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.06 ± 0.24 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.39 ± 0.41 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.17 ± 0.11 ($n=4$) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 1.38 ± 0.15 ($n=4$) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der $3NTyr_{10}A\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.14 ± 0.29 ($n=4$) für die $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe und 1.47 ± 0.12 für die Radiprodil+ $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{pE3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.82 ± 0.17 für die $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.35 ± 0.12 für die Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

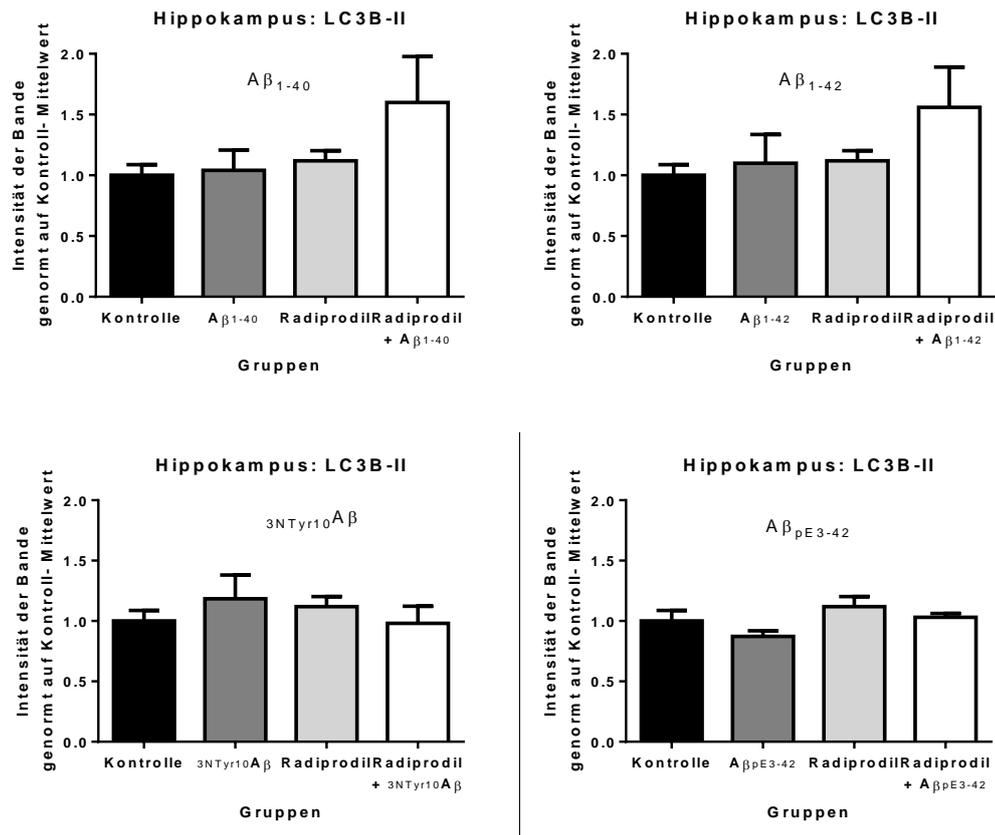


Abbildung Anh. 6: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers LC3B-II im Hippokampus. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.09 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 1.12 ± 0.08 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der A β_{1-40} -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+A β_{1-40} -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.04 ± 0.17 für die A β_{1-40} -Gruppe ($n=4$) und 1.6 ± 0.34 für die Radiprodil+A β_{1-40} -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der A β_{1-42} -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+A β_{1-42} -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.1 ± 0.24 ($n=4$) für die A β_{1-42} -Gruppe und 1.56 ± 0.33 ($n=4$) für die Radiprodil+A β_{1-42} -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der $3\text{NTyr}_{10}\text{A}\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $3\text{NTyr}_{10}\text{A}\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.19 ± 0.2 ($n=4$) für die $3\text{NTyr}_{10}\text{A}\beta$ -Gruppe und 0.98 ± 0.14 für die Radiprodil+ $3\text{NTyr}_{10}\text{A}\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der A $\beta_{\text{pE}3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+A $\beta_{\text{pE}3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.87 ± 0.05 für die A $\beta_{\text{pE}3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.03 ± 0.03 für die Radiprodil+A $\beta_{\text{pE}3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

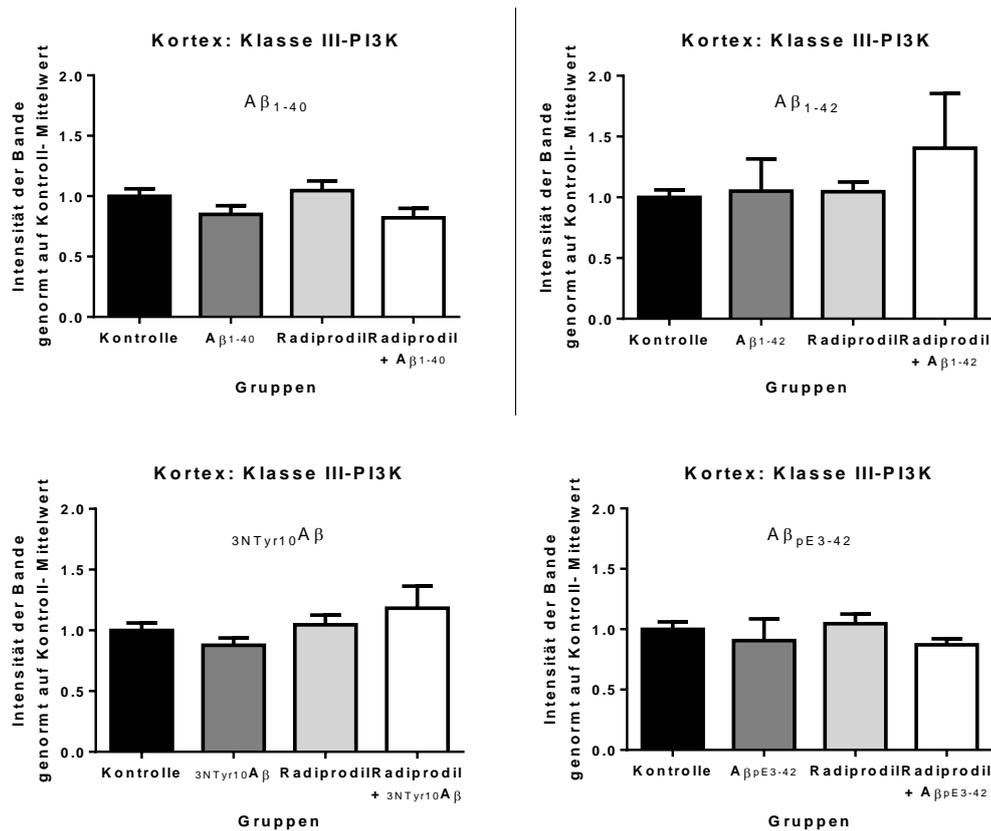


Abbildung Anh. 7: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Klasse III-PI3K im Kortex. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.06 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 1.05 ± 0.08 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.85 ± 0.07 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) und 0.82 ± 0.08 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.05 ± 0.27 ($n=4$) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 1.41 ± 0.45 ($n=4$) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der ${}_{3NTyr10}A\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ ${}_{3NTyr10}A\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.88 ± 0.06 ($n=4$) für die ${}_{3NTyr10}A\beta$ -Gruppe und 1.18 ± 0.18 für die Radiprodil+ ${}_{3NTyr10}A\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{pE3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.91 ± 0.18 für die $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 0.87 ± 0.05 für die Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

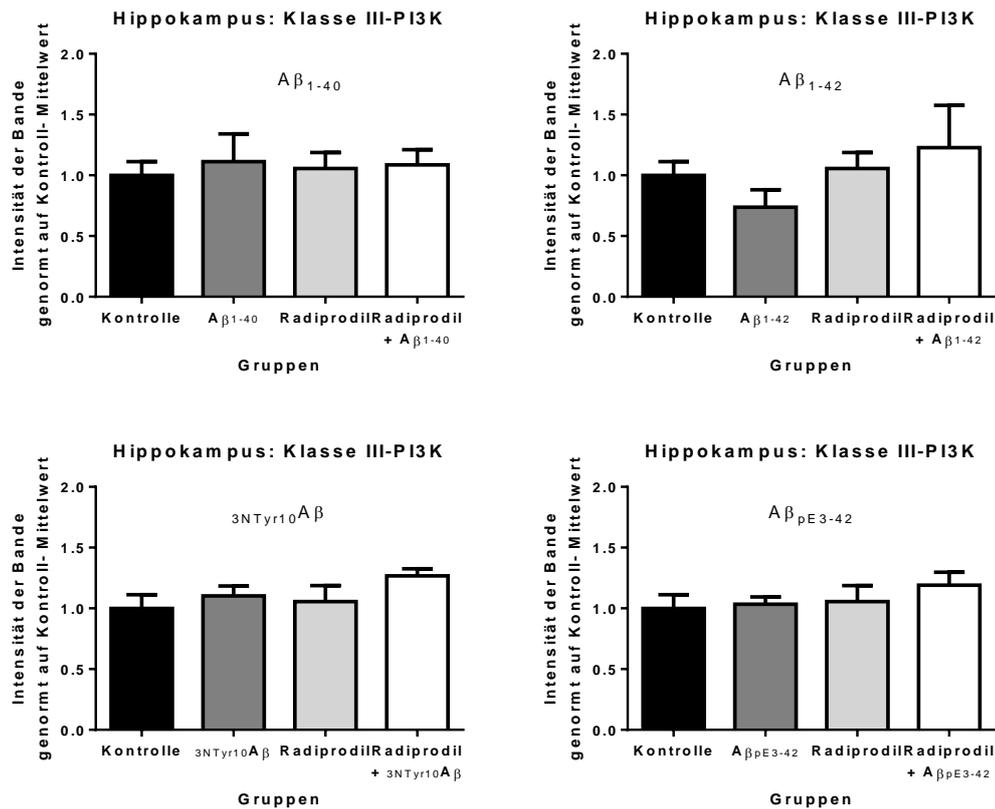


Abbildung Anh. 8: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Klasse III-PI3K im Hippokampus. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.11 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 1.06 ± 0.13 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.11 ± 0.23 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.09 ± 0.12 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.74 ± 0.14 ($n=4$) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 1.23 ± 0.35 ($n=4$) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der ${}_{3NTyr10}A\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ ${}_{3NTyr10}A\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.10 ± 0.08 ($n=4$) für die ${}_{3NTyr10}A\beta$ -Gruppe und 1.27 ± 0.06 für die Radiprodil+ ${}_{3NTyr10}A\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{pE3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.03 ± 0.06 für die $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.19 ± 0.11 für die Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

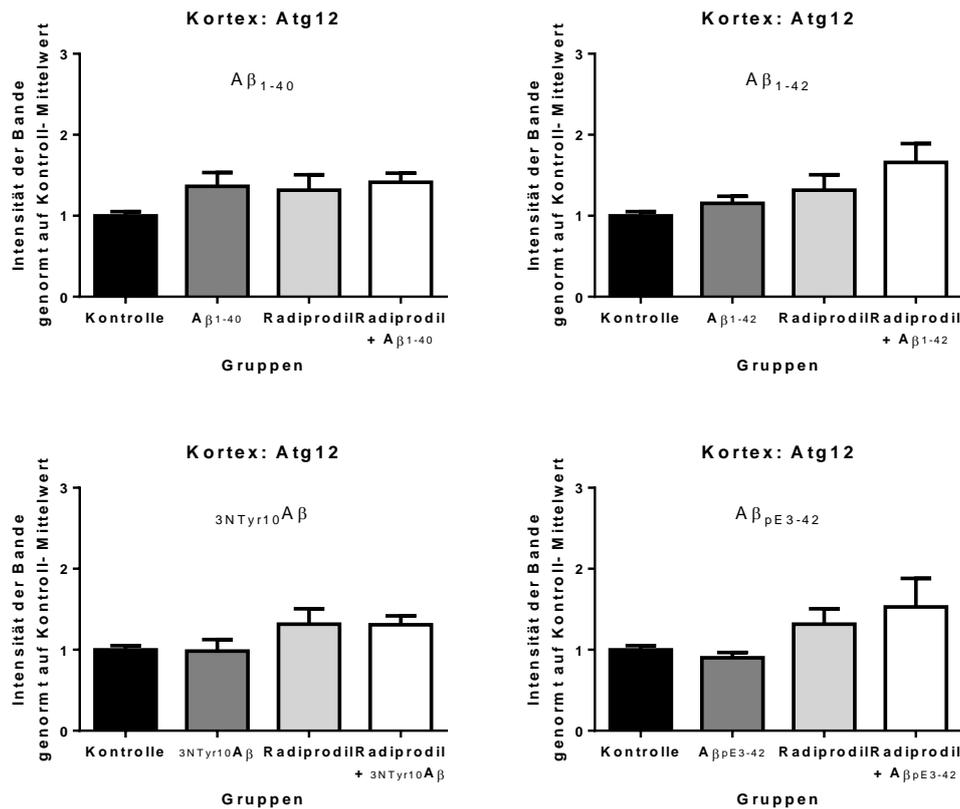


Abbildung Anh. 9: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Atg12 im Kortex. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.05 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 1.32 ± 0.19 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der Aβ₁₋₄₀-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+Aβ₁₋₄₀-Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.36 ± 0.17 für die Aβ₁₋₄₀-Gruppe ($n=4$) und 1.41 ± 0.12 für die Radiprodil+Aβ₁₋₄₀-Gruppe ($n=4$) (mean ± SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der Aβ₁₋₄₂-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+Aβ₁₋₄₂-Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.15 ± 0.09 ($n=4$) für die Aβ₁₋₄₂-Gruppe und 1.66 ± 0.23 ($n=4$) für die Radiprodil+Aβ₁₋₄₂-Gruppe (mean ± SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der 3^{NTyr10}Aβ-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+3^{NTyr10}Aβ-Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.98 ± 0.14 ($n=4$) für die 3^{NTyr10}Aβ-Gruppe und 1.31 ± 0.11 für die Radiprodil+3^{NTyr10}Aβ-Gruppe ($n=4$) (mean ± SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der Aβ_{pE3-42}-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+Aβ_{pE3-42}-Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.91 ± 0.07 für die Aβ_{pE3-42}-Gruppe ($n=4$) und 1.53 ± 0.35 für die Radiprodil+Aβ_{pE3-42}-Gruppe ($n=4$) (mean ± SEM).

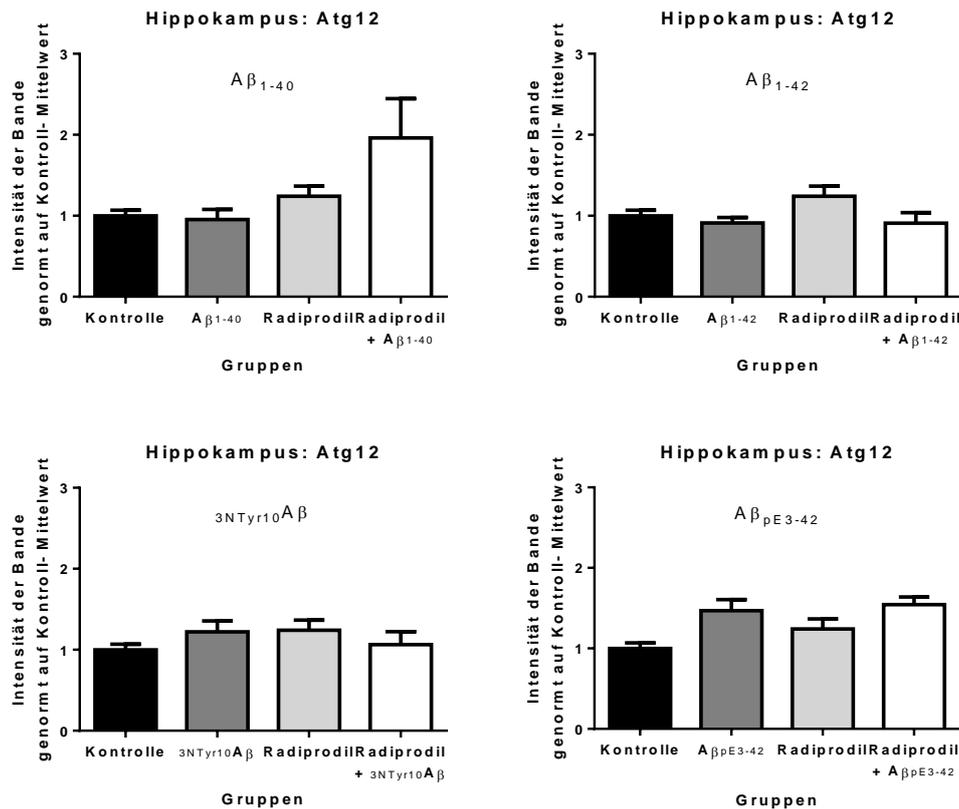


Abbildung Anh. 10: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers Atg12 im Hippokampus. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.07 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 1.24 ± 0.13 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.95 ± 0.13 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.96 ± 0.49 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.92 ± 0.07 ($n=4$) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 0.91 ± 0.13 ($n=4$) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der $3NTyr_{10}A\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.22 ± 0.14 ($n=4$) für die $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe und 1.06 ± 0.16 für die Radiprodil+ $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{pE3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.47 ± 0.14 für die $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.54 ± 0.1 für die Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

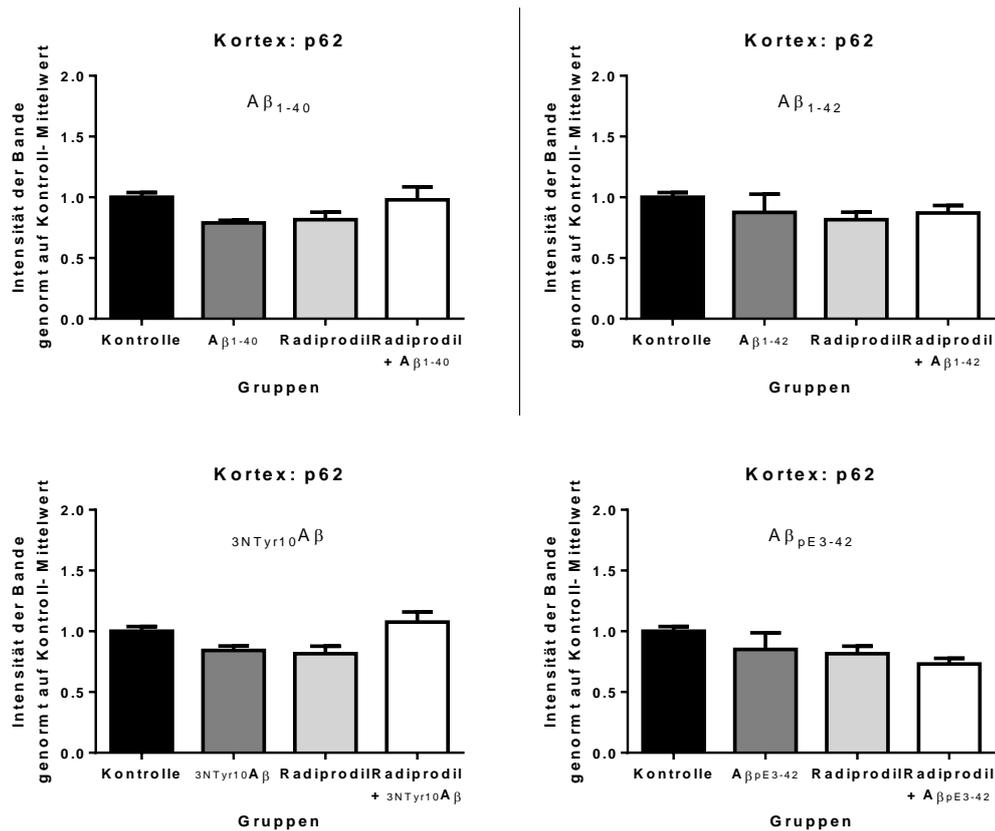


Abbildung Anh. 11: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers p62 im Kortex. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.00 ± 0.04 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 0.82 ± 0.06 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der Aβ₁₋₄₀-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+Aβ₁₋₄₀-Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.79 ± 0.02 für die Aβ₁₋₄₀-Gruppe ($n=4$) und 0.98 ± 0.11 für die Radiprodil+Aβ₁₋₄₀-Gruppe ($n=4$) (mean ± SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der Aβ₁₋₄₂-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+Aβ₁₋₄₂-Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.88 ± 0.15 ($n=4$) für die Aβ₁₋₄₂-Gruppe und 0.87 ± 0.06 ($n=4$) für die Radiprodil+Aβ₁₋₄₂-Gruppe (mean ± SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der 3NTyr₁₀Aβ-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+3NTyr₁₀Aβ-Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.84 ± 0.04 ($n=4$) für die 3NTyr₁₀Aβ-Gruppe und 1.08 ± 0.08 für die Radiprodil+3NTyr₁₀Aβ-Gruppe ($n=4$) (mean ± SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der Aβ_{pE3-42}-Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+Aβ_{pE3-42}-Gruppe ($p > 0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.85 ± 0.14 für die Aβ_{pE3-42}-Gruppe ($n=4$) und 0.73 ± 0.05 für die Radiprodil+Aβ_{pE3-42}-Gruppe ($n=4$) (mean ± SEM).

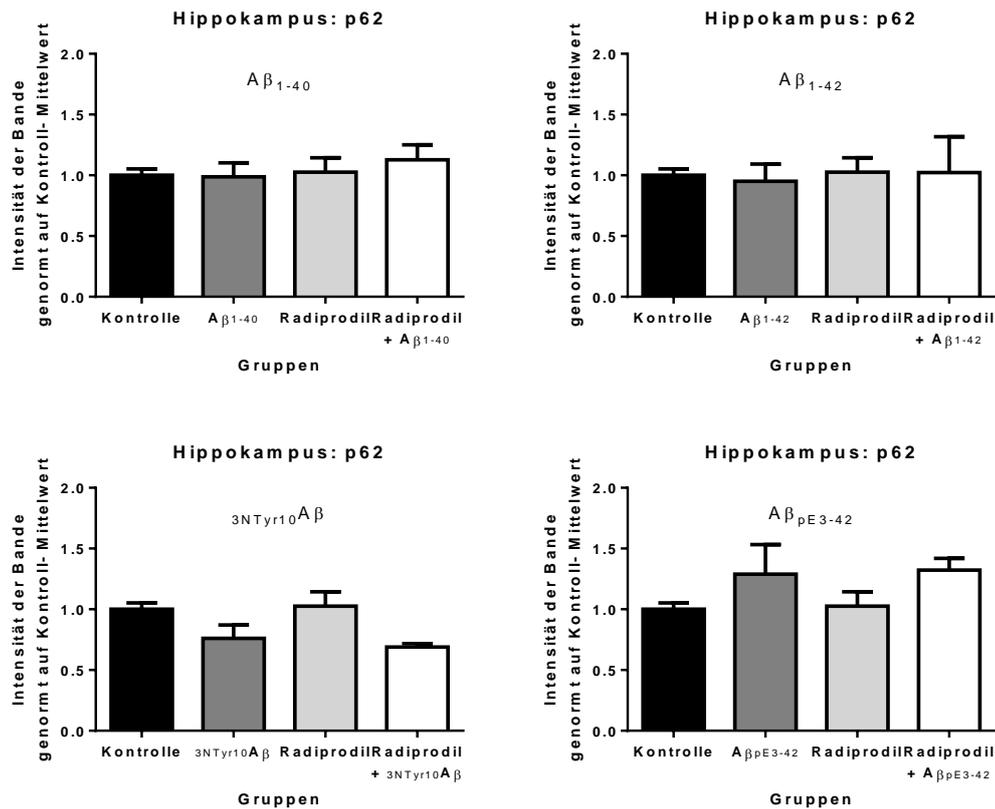


Abbildung Anh. 12: kein signifikanter Unterschied der Intensität des Autophagiemarkers p62 im Hippokampus. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.0 ± 0.05 für die Kontroll-Gruppe ($n=12$) und 1.03 ± 0.12 für die Radiprodil-Gruppe ($n=12$).

A Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-40}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.99 ± 0.12 für die $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.13 ± 0.13 für die Radiprodil+ $A\beta_{1-40}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

B Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{1-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.95 ± 0.14 ($n=4$) für die $A\beta_{1-42}$ -Gruppe und 1.02 ± 0.3 ($n=4$) für die Radiprodil+ $A\beta_{1-42}$ -Gruppe (mean \pm SEM).

C Die Western Blot Ergebnisse der $3NTyr_{10}A\beta$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 0.76 ± 0.11 ($n=4$) für die $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe und 0.69 ± 0.03 für die Radiprodil+ $3NTyr_{10}A\beta$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

D Die Western Blot Ergebnisse der $A\beta_{pE3-42}$ -Tiere zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe und zur Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($p>0.9999$) keinen signifikanten Unterschied. Die Werte für die Intensität der WB-Bande betragen 1.29 ± 0.24 für die $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) und 1.32 ± 0.1 für die Radiprodil+ $A\beta_{pE3-42}$ -Gruppe ($n=4$) (mean \pm SEM).

X. DANKSAGUNG

Mein erster Dank geht an Frau Univ.-Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka für die Einreichung der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München, für die wissenschaftliche Betreuung und die hilfreiche Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Herrn Prof. Gerhard Rammes, der mir das Thema und die dafür notwendigen Räumlichkeiten und Materialien am Klinikum Rechts der Isar in der Abteilung der experimentellen Anästhesiologie zur Verfügung gestellt hat. Mit seinem fundierten Fachwissen, den hilfreichen Anregungen und der konstruktiven Kritik hat er mir das wissenschaftliche Arbeiten näher gebracht und so dazu beigetragen, dass diese Doktorarbeit erfolgreich fertiggestellt werden konnte.

Herrn Prof. Jochen Herms danke ich dafür, dass ich die Räumlichkeiten und Materialien des deutschen Zentrums für neurodegenerative Forschung benutzen durfte. Herrn Kaichuan Zhu danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die professionelle Betreuung am DZNE. Ohne ihn wären die *spine density*- und *Plaque load*-Versuche nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. Nils Gassen vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie danke ich für seine fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Autophagie-Versuche.

Ein herzlicher Dank geht an Herrn Andreas Blaschke für die Einführung in die Arbeitstechniken und die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Durch seine vielen Tipps wurde mein Arbeitsalltag erheblich erleichtert.

Nina Bayer und Claudia Kopp danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts danke ich für die tolle Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern und meinen Bruder, die immer für mich da sind und mir das Tiermedizinstudium und die Promotion ermöglicht haben. Ohne eure Unterstützung wäre das alles nicht möglich gewesen. Zuletzt möchte ich mich bei Philipp bedanken, dafür dass du immer für mich da bist, mir Mut machst und mir die Fertigstellung der Arbeit ermöglicht hast. Und dir Kathi danke ich dafür, dass du mir durch dein Strahlen seit ein paar Monaten jeden Tag versüßt.