

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
Klinikum rechts der Isar – Technische Universität München



**Einfluss des A $\beta$ -Aggregations-Modulators GAL-201 auf  
neurotoxische Effekte unterschiedlicher Amyloid- $\beta$ -Subspezies –  
elektrophysiologische und molekularbiologische Betrachtung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Karin Riemann

aus  
München

Jahr  
2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Gerhard Rammes

Zweites Gutachten: PD Dr. Thomas Köglsperger

Drittes Gutachten: PD Dr. Sven Lammich

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2024

## **Influence of the A $\beta$ -Aggregation-Modulator GAL-201 on neurotoxic effects of different Amyloid- $\beta$ -subspecies – electrophysiological and molecular impact**

**Abstract:** It has become increasingly accepted that small, soluble oligomeric forms of Amyloid- $\beta$  are the major toxic species leading to the symptoms of Alzheimer's disease. Therefore, targeting these oligomers might be promising. The A $\beta$ -Aggregation-Modulator GAL-201 represents such a molecule. The dipeptide modulates A $\beta$  aggregation by binding the misfolded A $\beta$  monomers with high selectivity and affinity leading them to aggregation. Thereby non-toxic, amorphous clusters are formed, and the number of toxic oligomers is reduced. As this is the case even after serial dilution of GAL-201, a detoxification through a prion-like mechanism is suggested. Here we show that serial dilution is still efficient after one week of preincubation and that it is effective against different A $\beta$  subtypes. This protection comes along with a prevention of A $\beta$ -induced spine loss and beneficial effects on spine remodeling. Furthermore, GAL-201 seems to protect against an upregulation of proinflammatory microglia and reactive astrocytes - at least for an A $\beta$ <sub>1-42</sub>-derived toxicity. As this thesis extent previously collected preclinical data, it hopefully supports the transition of this molecule into IND-enabling studies. GAL-201 represents a promising, orally available and highly efficient drug candidate against A $\beta$ -derived pathophysiology (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

## **Einfluss des A $\beta$ -Aggregations-Modulators GAL-201 auf neurotoxische Effekte unterschiedlicher Amyloid- $\beta$ -Subspezies – elektrophysiologische und molekularbiologische Betrachtung**

**Abstract:** Die These, dass lösliche Amyloid- $\beta$ -Oligomere die toxischere Komponente in der Pathogenese von Morbus Alzheimer darstellen, gewinnt zunehmend an Evidenz. Medikamente, die in den Aggregationsprozess von A $\beta$  eingreifen, sind daher höchst vielversprechend. Der A $\beta$ -Aggregations-Modulator GAL-201 stellt ein solches Molekül dar. Das Dipeptid bindet fehlgefaltete A $\beta$ -Monomere mit hoher Selektivität und Affinität und führt diese zusammen. Nicht-toxische, amorphe Cluster entstehen und die Zahl der toxischen Oligomere sinkt. Da dies selbst nach serieller Verdünnung der Fall ist, ist von einer selbst-replizierenden Detoxifikation auszugehen die, ähnlich wie bei einem Prion, auf andere fehlgefaltete Monomere übertragen wird. Hier wird gezeigt, dass die serielle Verdünnung nicht nur nach einer Woche noch eine protektive Wirkung aufweist, sondern auch gegenüber verschiedenen A $\beta$ -Subtypen effektiv ist. Diese protektive Wirkung geht mit einer Protektion gegenüber einem A $\beta$ -induzierten Verlust von Spines und vorteilhaften Effekten im Remodeling von Spines einher. Außerdem scheint GAL-201 gegenüber einem Anstieg proinflammatorischer Mikroglia und reaktiver Astrozyten zu schützen - zumindest gegenüber einer A<sub>1-42</sub>-induzierten Toxizität. Diese Arbeit bietet eine umfassende Erweiterung bereits existierender präklinischer Daten und hilft hoffentlich dabei, die IND-Enabling Studies zu initiieren. GAL-201 stellt einen oral verfügbaren, höchst effizienten und daher sehr vielversprechenden Wirkstoffkandidaten gegen eine A $\beta$ -induzierte Pathologie dar (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Morbus Alzheimer .....	1
1.2 Ätiologie .....	2
1.3 Pathophysiologie .....	5
1.3.1 Amyloid- $\beta$ (A $\beta$ ).....	5
1.3.2 Tau-Protein .....	12
1.4 Therapie und aktueller Forschungsstand .....	14
1.5 A $\beta$ -Subtypen .....	19
1.6 Lösliche A $\beta$ -Oligomere.....	21
1.7 GAL-201 und sein Vorgänger GAL-101 .....	22
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>25</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1 Elektrophysiologie .....	26
3.1.1 Theoretische Grundlagen .....	26
3.1.2 Versuchsdurchführung .....	28
3.2 Analyse der Spines (Golgi-Färbung).....	33
3.2.1 Theoretische Grundlagen .....	33
3.2.2 Versuchsdurchführung .....	35
3.3 FACS.....	37
3.3.1 Theoretische Grundlagen .....	37
3.3.2 Versuchsdurchführung .....	38
3.3.3 Auswahl der Antikörper und Gatingstrategie.....	41
3.4 Statistik.....	47
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
4.1 Elektrophysiologie .....	48
4.2 Veränderungen der Spinedynamik .....	54
4.2.1 Spinedichte .....	54
4.2.2 Dichte der Filopodia Spines .....	60
4.2.3 Dichte der Long-Thin Spines .....	61
4.2.4 Dichte der Thin Spines.....	63
4.2.5 Dichte der Stubby Spines.....	64
4.2.6 Dichte der Mushroom Spines .....	65
4.3 FACS.....	66
4.3.1 Mikroglia Count .....	67
4.3.2 TREM-2 .....	68
4.3.3 CD163 .....	69
4.3.4 CD80 .....	71
4.3.5 CX3CR1 .....	72
4.3.6 IL-1 $\beta$ .....	73
4.3.7 Astrozyten Count.....	75

4.3.8 ALDH1L1 .....	76
4.3.9 S100B .....	77
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>78</b>
5.1 Elektrophysiologie .....	79
5.2 Veränderungen der Spinedynamik .....	82
5.3 FACS.....	85
5.3.1 Mikroglia.....	85
5.3.2 Astrozyten.....	88
5.4 Stärken und Schwächen der Ergebnisse .....	91
5.5 Klinisches Potential von GAL-201 .....	93
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>116</b>
<b>9 Anhang.....</b>	<b>XIII</b>
9.1 Verwendete Chemikalien.....	XIII
9.2 Herstellung von 3NTyr10A $\beta$ .....	XVII
9.3 Vorveröffentlichungen.....	XVIII
9.4 Eidesstattliche Erklärung .....	XIX

## Abkürzungsverzeichnis

3NTyr10A $\beta$	an Tyrosin 10 nitriertes A $\beta$
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
A $\beta$ pE3	A $\beta$ mit Pyroglutamat an Glutamat 3
ACh	Acetylcholin
aCSF	Artificial Cerebrospinal Fluid (= künstliche Zerebrospinalflüssigkeit)
AICD	Amyloid-Precursor-Protein-Intracellular-Domain
ALDH1L1	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1
AMD	Age-Related Macular Degeneration (= altersabhängige Makuladegeneration)
AMPA-Rezeptor	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic-acid-receptor
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AFM	Atomic Force Microscopy
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the receiver operating characteristic
AUCCi	95%iges Konfidenzintervall der AUC
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
C1q	Komplementfaktor C1q
C3	Komplementfaktor C3
CA1-CA4	<i>Cornu ammonis</i> 1-4
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CD45	Cluster of Differentiation 45
CD11b	Cluster of Differentiation 11b
CD163	Cluster of Differentiation 163
CD80	Cluster of Differentiation 80
Cdk5	Cyclin-abhängige Kinase 5
CD-Spectroscopy	Circular Dichroism Spectroscopy
CREB	cAMP response element-binding protein
CX3CR1	CX3C-Motiv Chemokin Rezeptor 1 (Fraktalin Rezeptor)
DAM	disease-associated microglia
DLS	Dynamic Light Scattering

DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	European Medicine Agency
EPSP	Exzitatorisches Postsynaptisches Potential
ERK1/2	extracellular signal regulated kinases 1/2
F4/80	auch EMR1(EGF-like module-containing-mucin-like hormone receptor-like 1)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3)
GWAS	genome-wide association studies
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HFS	High Frequency Stimulation
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
KLVFF	$\beta$ -Amyloid Peptide (16-20)
mGLUR5	Metabotropic Glutamate Receptor 5
nACh-Rezeptor	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NFTs	Neurofibrillary Tangles
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
P2RY12	Purinerges Rezeptor P2Y12
P3	P3 Peptid
PFA	Paraformaldehyd
PHF	Paired Helical Filament
PrP <sup>c</sup>	Cellular Prion Protein
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
ROS	Reactive Oxygen Species (= reaktive Sauerstoffspezies)
S100B	S100 Calcium-bindendes Protein B
SORL1	Sortilin-related receptor
TMEM119	Transmembranprotein 119

TNF- $\alpha$

TREM-2

TR-FRET

ZNS

Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2

time-resolved fluorescence resonance energy transfer

zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Proteolyse von APP.....	8
Abbildung 2: Aggregation von Amyloid- $\beta$ ( $A\beta$ ).....	8
Abbildung 3: Formen des Tau-Proteins.....	14
Abbildung 4: Strukturformeln von GAL-101 und GAL-201.....	24
Abbildung 5: Gezeichneter Hippocampus von Santiago Ramón y Cajal (1911).....	27
Abbildung 6: Sagittales Schneiden der beiden Gehirnhälften im Mikrotom.....	29
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Experimentes.....	31
Abbildung 8: Platzierung der Elektroden.....	31
Abbildung 9: Schema der seriellen Verdünnung.....	33
Abbildung 10: Klassifizierung der Spines nach Risher et al. (2014).....	37
Abbildung 11: Gatingstrategie Mikroglia und Astrozyten.....	46
Abbildung 12: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch $A\beta_{1-42}$ - induzierten synaptotoxischen Effekte – Zeitverlauf normalisierter fEPSP's nach einer HFS.....	49
Abbildung 13: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch $A\beta_{1-42}$ - induzierten synaptotoxischen Effekte.....	50
Abbildung 14: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch $A\beta_{1-40}$ - induzierten synaptotoxischen Effekte.....	51
Abbildung 15: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch $A\beta_{pE3}$ - induzierten synaptotoxischen Effekte.....	52
Abbildung 16: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch 3NTyr10 $A\beta$ - induzierten synaptotoxischen Effekte.....	53
Abbildung 17: Auch 10nM GAL-201 als initiale Startkonzentration in der seriellen Verdünnung schützt vor den $A\beta_{1-42}$ -induzierten synaptotoxischen Effekten.....	54
Abbildung 18: GAL-201 in serieller Verdünnung verhindert einen durch $A\beta_{1-42}$ - induzierten Abbau der Spines.....	55
Abbildung 19: GAL-201 in serieller Verdünnung verhindert einen durch $A\beta_{1-40}$ - induzierten Abbau der Spines.....	56
Abbildung 20: GAL-201 in serieller Verdünnung verhindert einen durch $A\beta_{pE3}$ - induzierten Abbau der Spines.....	57
Abbildung 21: GAL-201 in serieller Verdünnung verhindert einen durch 3NTyr10 $A\beta$ - induzierten Abbau der Spines.....	58
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der veränderten Spinedichte.....	59
Abbildung 23: Dichte der Filopodia Spines.....	60
Abbildung 24: Dichte der Long-Thin Spines.....	61
Abbildung 25: Dichte der Thin Spines.....	63
Abbildung 26: Dichte der Stubby Spines.....	64
Abbildung 27: Dichte der Mushroom Spines.....	65
Abbildung 28: Anteil der Mikroglia an der Gesamtzahl der Zellen (Gating nach $CD11b^+/CD45^{int}/F4/80^+/TMEM119^+/P2RY12^+$ ).....	67
Abbildung 29: TREM-2 Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach $CD11b^+/CD45^{int}/F4/80^+/TMEM119^+/P2RY12^+$ ).....	68
Abbildung 30: CD163 Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach $CD11b^+/CD45^{int}/F4/80^+/TMEM119^+/P2RY12^+$ ).....	69
Abbildung 31: CD80 Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach $CD11b^+/CD45^{int}/F4/80^+/TMEM119^+/P2RY12^+$ ).....	71
Abbildung 32: CX3CR1 Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach $CD11b^+/CD45^{int}/F4/80^+/TMEM119^+/P2RY12^+$ ).....	72

<b>Abbildung 33: IL-1<math>\beta</math> Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>/TMEM119<sup>+</sup>/P2RY12<sup>+</sup>).....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 34: Zahl der reaktiven Astrozyten an der Gesamtzahl der Zellen (Gating nach CD11b<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup>) .....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 35: ALDH1L1 Expression unter den reaktiven Astrozyten gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup>).....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildung 36: S100B Expression unter den reaktiven Astrozyten gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup>).....</b>	<b>77</b>

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1: FACS-Antikörperpanel .....</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 2: Zusammensetzung Präparations-Ringer und aCSF .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Tabelle 3: Verwendete A<math>\beta</math>-Peptide und bei der A<math>\beta</math>-Aufbereitung genutzte Chemikalien .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Tabelle 4: Informationen über GAL-201, inklusive der verwendeten Charge .....</b>	<b>XIV</b>
<b>Tabelle 5: Übersicht über die im sliceGolgi Kit von Bioenno Tech LLC enthaltenen Lösungen .....</b>	<b>XIV</b>
<b>Tabelle 6: Für die Golgi-Färbung selbst herzustellende Lösungen.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Tabelle 7: Für die FACS-Analyse verwendete Lösungen und Antikörper.....</b>	<b>XV</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Alzheimer

2020 lebten laut Alzheimer's Disease International weltweit mehr als 55 Millionen Menschen mit Demenz. Alle 3,2 Sekunden kommt ein Fall dazu, das bedeutet mehr als 10 Millionen neue Fälle jährlich. Es wird geschätzt, dass es 2030 ca. 78 Millionen und 2050 ca. 139 Millionen Patienten weltweit sein werden (Alzheimer's Disease International (1), n.d.). Dieser rasante Anstieg ist vor allem auf den demographischen Wandel zurückzuführen. Die Mehrheit der Patienten, die dabei Morbus Alzheimer entwickeln, ist bei der Diagnose 65 Jahre oder älter. Das Risiko steigt, je älter die Menschen werden (Alzheimer's Association, 2023). Gemessen an der durchschnittlichen US-Bevölkerung liegt das Risiko eine Alzheimererkrankung zu entwickeln bei Patienten über 65 Jahre bei 5,3% - bei Patienten über 85 Jahre steigt dieses Risiko jedoch weiter auf 34,6% (Rajan et al., 2021).

Dies ist mit erheblichen Kosten verbunden. 2015 lagen die geschätzten, weltweiten Kosten im Bereich Demenz bei US\$ 818 Billionen, 2021 waren es US\$ 1,3 Trillionen und 2030 werden Kosten in Höhe von US\$ 2,8 Trillionen erwartet. Diese Summen beziehen sich nicht nur auf die Behandlungskosten, sondern auch auf die Kosten der sozialen Betreuung durch Pflegeeinrichtungen, Familien und soziale Gruppen (Alzheimer's Disease International (1), n.d.). Die Entwicklung und Zulassung kausaler Therapien werden also immer notwendiger, um auch zukünftig eine Versorgung und Betreuung der Patienten gewährleisten zu können.

Morbus Alzheimer ist mit 50-75% aller Fälle die häufigste Form der Demenz (Alzheimer's Disease International (2), n.d. ). Die Krankheit wurde erstmals 1906 von Alois Alzheimer beschrieben. Er berichtete über seine Patientin Auguste Deter, die im Alter von 56 Jahren verstarb und die er nach ihrem Tod obduzierte (Alzheimer Forschung Initiative e. V., n.d. ). Der Titel seiner Arbeit lautete „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer et al., 1995). Die Patientin litt unter raschem Gedächtnisverlust, war zeitlich und räumlich desorientiert und vergaß den Gebrauch verschiedenster Gegenstände des Alltags. Er bemerkte schon damals Aggregate der Neurofibrillen und eine gleichzeitige Ablagerung „pathologischer Metabolite“ (Alzheimer et al., 1995). Allerdings wurde erst 1984 das heute als Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) bekannte Protein daraus isoliert (Glennner & Wong, 1984b). Der Einfluss der Phosphorylierung von Tau-Protein auf die Dynamik der Mikrotubuli wurde ebenfalls 1984 beschrieben (Lindwall & Cole, 1984) und 1986 in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer gebracht (Grundke-Iqbal et al., 1986).

Morbus Alzheimer ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung (Alzheimer's Association, 2023), die im Wesentlichen kognitive Funktionen beeinflusst. Im Frühstadium ist vor allem das Kurzzeitgedächtnis betroffen, die Patienten haben Schwierigkeiten, sich an kürzlich erlernte und erlebte Dinge zu erinnern oder alltägliche Aufgaben umzusetzen. Hinzu kommen im Verlauf sprachliche Probleme, Desorientierung und Verwirrung. Die Patienten erinnern sich nicht mehr an früher bekannte Gegenstände, Orte oder Personen. In späteren Stadien kommen dann neuropsychiatrische Symptome hinzu. Die Patienten sind nicht mehr in der Lage bestimmte Situationen zu verstehen, was in Ängsten, Depressionen, sozialem Rückzug, oder auch Agitiertheit resultieren kann. Psychosen und Halluzinationen können ebenfalls auftreten. Im Spätstadium werden die Patienten meist inkontinent und vollkommen abhängig von fremder Hilfe (Alzheimer et al., 1995; Alzheimer's Association, 2023; Lewis, 2022).

## **1.2 Ätiologie**

Die Mehrheit der Patienten, welche im Laufe ihres Lebens Morbus Alzheimer entwickeln, ist bei der Diagnose älter als 65 Jahre. Man spricht hier von einem „late-onset“. Der „early-onset“ dagegen (< 65 Jahre) tritt nur in 1-6% aller Fälle auf und ist zumeist mit der familiären Form assoziiert. Diese autosomal-dominant vererbte Form ist auf Mutationen in den Genen für Amyloid-Precursor-Protein (APP), Presenilin 1 (PSEN1) und Presenilin 2 (PSEN2) zurückzuführen und ist in weniger als 1% der Fälle verantwortlich (Bekris et al., 2010; Piaceri et al., 2013). Das Gen, welches für APP codiert, befindet sich auf Chromosom 21. Dies erklärt, warum Menschen mit Trisomie 21 ein erhöhtes Risiko tragen, ebenfalls in jungen Jahren Morbus Alzheimer zu entwickeln (Salehi et al., 2016). Schon Glenner and Wong (1984a) fanden heraus, dass zerebrovaskuläres Amyloid-Protein von Menschen mit Down-Syndrom eine homologe Aminosäuresequenz zu dem  $\beta$ -Protein von Alzheimer Patienten aufweist und vermuteten schon damals einen genetischen Defekt auf Chromosom 21 (Glenner & Wong, 1984a). Bei ca. 95% der Patienten tritt Morbus Alzheimer jedoch sporadisch auf und ist eher mit einem „late-onset“ assoziiert (Piaceri et al., 2013). Dabei spielt nicht nur das steigende Lebensalter eine Rolle. Auch hier beeinflussen genetische Faktoren und Umweltfaktoren das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken (Piaceri et al., 2013). Zudem scheint eine Vererbung mütterlicherseits das Risiko stärker zu erhöhen als eine Vererbung väterlicherseits (Honea, 2012). Ob Frauen jedoch allgemein ein erhöhtes Risiko tragen, bleibt derzeit ungeklärt. Etwa zwei Drittel der amerikanischen Alzheimerpatienten sind zwar weiblich, jedoch ist dies auch der höheren Lebenserwartung von Frauen zuzuschreiben (Alzheimer's Association, 2023).

Der wohl bekannteste und am besten erforschte, genetische Risikofaktor, der mit der sporadischen Form assoziiert wird, ist das APOE4-Gen (Piaceri et al., 2013). Apolipoprotein E ist ein Lipidtransportprotein. Während das Allel  $\epsilon 3$  sich vermutlich neutral gegenüber dem Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken verhält, scheint das Allel  $\epsilon 4$  die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen und das Allel  $\epsilon 2$  die Wahrscheinlichkeit, an Morbus Alzheimer zu erkranken, zu verringern. Vererben beide Elternteile das Allel  $\epsilon 4$ , führt das Tragen von zwei  $\epsilon 4$  Allelen ( $\epsilon 4/\epsilon 4$ ) dabei zu einem deutlich erhöhten Risiko eine Alzheimererkrankung zu entwickeln (Alzheimer's Association, 2023). In einer Studie unter Kaukasiern wurde gezeigt, dass im Vergleich zu  $\epsilon 3/\epsilon 3$ -Trägern, heterozygote  $\epsilon 4$ -Träger ein dreifach erhöhtes, homozygote dagegen ein fünfzehnfach erhöhtes Risiko haben (Farrer et al., 1997). Dies verhält sich für unterschiedliche ethnische Gruppen verschieden und es bleibt weiter zu erforschen, inwieweit APOE4 innerhalb der einzelnen ethnischen Gruppen Einfluss nimmt (Alzheimer's Association, 2023). Der Grund dieser Beeinflussung ist multifaktoriell und wurde übersichtlich dargestellt in der Arbeit von Holtzman et al. (2012). Neben verschiedenen untersuchten Mechanismen, ist wohl vor allem die Fähigkeit von APOE die Aggregation und Clearance von A $\beta$  zu beeinflussen von Bedeutung, da diese sich zwischen den einzelnen Isoformen unterscheidet und für die Variante E4 am geringsten ausgeprägt ist (Holtzman et al., 2012). Allerdings können weniger als 40% aller sporadisch auftretenden Fälle mit APOE in Verbindung gebracht werden, was darauf schließen lässt, dass andere genetische Faktoren sowie Umweltfaktoren ebenfalls von großer Bedeutung sind (Piaceri et al., 2013).

Mit Hilfe von GWAS (genome-wide association studies) wurden im Laufe der Jahre zahlreiche weitere genetische Risikofaktoren identifiziert. Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle der „Sortilin-related receptor“ (SORL1). Hierbei handelt es sich um einen Transmembranrezeptor, der maßgeblich am Recycling von APP beteiligt ist. Ein Mangel an SORL1 geht dagegen mit einer erhöhten A $\beta$ -Produktion einher (Andersen et al., 2005; Lee et al., 2008; Pottier et al., 2012). Interessanterweise zeigten Patienten, welche einen early-onset aufwiesen, der jedoch nicht auf die bekannten Mutationen in APP, PSEN1 und PSEN2 zurückzuführen war, Mutationen in SORL1 (Pottier et al., 2012). Dies würde dafürsprechen, dass es sich hierbei ebenfalls um eine genetische Ursache der familiären Form handelt, jedoch ist dies nicht abschließend geklärt (Schramm et al., 2022). Dass es sich in jedem Fall um einen stark penetrierenden genetischen Risikofaktor handelt, zeigt eine Studie mit homozygoten APOE4-Trägern. Diese weisen zu 100% auch einen Funktionsverlust von SORL1 auf, während dies bei Non-Carriern nur in 37% der Fälle zutrifft (Schramm et al., 2022). Neben SORL1

wurden jedoch zahlreiche weitere genetische Risikofaktoren identifiziert, einige davon in Mikroglia (Liang et al., 2021). So zum Beispiel der Mikroglia-Rezeptor TREM-2 (Triggering Receptor expressed on Myeloid Cells 2). Im Tierversuch wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor bei zunehmender Inflammation in einem normal alternden Gehirn, verstärkt exprimiert wird, was möglicherweise zu einer Aktivierung antiinflammatorischer Mikroglia führt (Han et al., 2022). Dass TREM-2 aber nicht nur einen Einfluss auf die allgemeine Neuroinflammation hat, sondern auch maßgeblich an der Entwicklung der A $\beta$ -Pathologie beteiligt ist, zeigt ein weiterer Versuch im Mausmodell. Hierbei führt ein Mangel an TREM-2 zu einer verringerten Ansammlung von Mikroglia rund um die A $\beta$ -Plaques, was wiederum dazu führt, dass diese diffuser, weniger dicht und mit signifikanteren neuronalen Schäden assoziiert sind (Wang et al., 2016). Dass ein Mangel an TREM-2 die Chemotaxis und die Antwort der Mikroglia auf neuronale Verletzungen beeinflusst wurde auch in Mazaheri et al. (2017) gezeigt. Genetische Risikovarianten von TREM-2, welche mit einem Funktionsverlust dessen einhergehen, sind vor diesem Hintergrund also besonders bedeutsam. Diese Erkenntnis macht TREM-2 zu einem vielversprechenden Drug-Target. So zeigte zum Beispiel ein TREM-2 stabilisierender Antikörper eine erhöhte protektive Aktivität der Mikroglia, was mit einer reduzierten Amyloidose im AD-Mausmodell einherging (Schlepckow et al., 2020). Da die Rolle von TREM-2 und Mikroglia in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer jedoch nicht vollständig verstanden ist (z.B. die Kontinuität im Krankheitsverlauf) sind weitere Studien erforderlich um TREM-2 als Target zu etablieren (Li et al., 2023). Im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer wurden jedoch viele weitere genetische Risikofaktoren in Mikroglia identifiziert, welche übersichtlich in Liang et al. (2021) dargestellt wurden. Insbesondere für TREM-2, AIB3 und PLCG2 wurde ein gemeinsames Expressionsmuster in humanem Cortex gefunden, welches stark von Mikroglia exprimiert wird (Sims et al., 2017).

Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren zählen, wie in der Übersichtsarbeit von Leszek et al. (2021) dargestellt, ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, einschließlich Typ-2-Diabetes, Adipositas, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Rauchen und Alkoholkonsum, wobei sich eine gesunde Ernährung und körperliche Aktivität positiv auswirken. Andere Übersichtsarbeiten zeigen, nicht nur physische Aktivität, auch ein mentales Training senken das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken (Su et al., 2022). Traumatische Hirnverletzungen (Fann et al., 2018) sowie eine schlechte Schlafqualität, beziehungsweise Schlafmangel, erhöhen wiederum das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken (Gaur et al., 2022). Zudem stehen auch verschiedene Metalle in der Diskussion, das Risiko zu steigern, wobei insbesondere erhöhte, zerebrale Konzentrationen von Eisen, Kupfer, Zink und Aluminium diskutiert werden,

die vor allem über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder eine Förderung der A $\beta$ -/Tau-Aggregation das Risiko erhöhen sollen (Brylinski et al., 2023; Tamagno et al., 2021). Diese beeinflussbaren Risikofaktoren tragen oft ebenso dazu bei, dass Familienmitglieder nicht nur aufgrund eines ähnlichen Genpools ein erhöhtes Risiko tragen, wenn Verwandte ersten Grades erkrankt sind (Green et al., 2002).

### **1.3 Pathophysiologie**

Morbus Alzheimer ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung (Alzheimer's Association, 2023). Bezüglich der Pathogenese existieren eine Reihe von Hypothesen und sie ist bis heute nicht vollständig geklärt (Chen et al., 2017). Im Wesentlichen gibt es jedoch zwei Auffälligkeiten im Gehirn, die für Morbus Alzheimer charakteristisch sind: Ablagerungen von Amyloid- $\beta$  (Glennner & Wong, 1984b) und Aggregate von Tau-Protein (Grundke-Iqbal et al., 1986; Lindwall & Cole, 1984), deren Pathomechanismen nachfolgend näher betrachtet werden sollen.

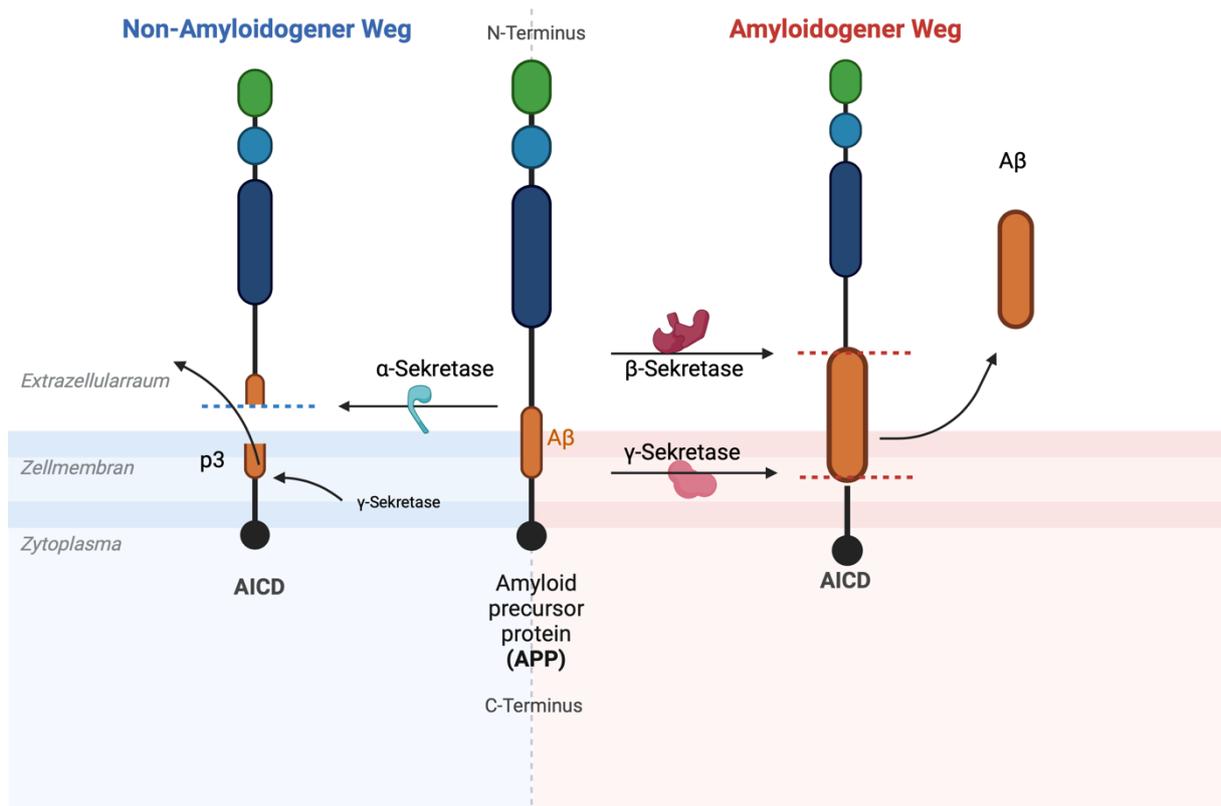
#### **1.3.1 Amyloid- $\beta$ (A $\beta$ )**

Die bekannteste und am kontroversesten diskutierte Hypothese ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Diese wurde erstmals von Hardy und Higgins 1992 beschrieben. Danach sind die A $\beta$ -Ablagerungen der initiale Grund der Pathogenese und die Bildung der NFTs (neurofibrillary tangles), der Neuronenverlust und damit verbundene kognitive Defizite nur das Ergebnis dieser Ablagerungen (Hardy & Higgins, 1992). Diese Hypothese wurde jedoch im Laufe der Jahre vielfach modifiziert und erweitert. Unterstützt wird sie von der Tatsache, dass autosomal-dominante Mutationen in den Genen für APP, PSEN1 und PSEN2, welche für die familiäre Form von Morbus Alzheimer verantwortlich sind, ebenso wie Trisomie 21 mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung von Morbus Alzheimer führen (Piaceri et al., 2013; Ricciarelli & Fedele, 2017). Auch Patienten mit einem APOE4-Gen, welche eine verschlechterte A $\beta$ -Clearance aufweisen, tragen ein erhöhtes Risiko (Piaceri et al., 2013). Zudem wurde gezeigt, dass eine Mutation an der  $\beta$ -Sekretase Spaltstelle von APP mit einer um 40% verringerten A $\beta$ -Produktion einhergeht (Jonsson et al., 2012) und dass dies bei steigendem Lebensalter vor einer frühen Verschlechterung der Kognition schützt (Haass & Selkoe, 2022) bezogen auf (Kero et al., 2013). Diese sogenannte „Icelandic Mutation“ befindet sich in der Nähe der  $\beta$ -Sekretasespaltstelle und stört somit möglicherweise eine Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase (Jonsson et al., 2012). Erhöhte Konzentrationen von pathologischem A $\beta$  scheinen folglich eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu spielen und sind ebenfalls in der Lage eine

Tau-Pathologie zu induzieren. Allerdings korreliert die Anwesenheit von A $\beta$ -Plaques nicht direkt mit dem Auftreten von NFT's, dem Neuronenverlust und dementiellen Symptomen, wohingegen eine Tau-Pathologie sehr wohl damit assoziiert ist (Karran et al., 2011). Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die mittlerweile vorherrschende These, dass es anders als ursprünglich angenommen nicht die A $\beta$ -Plaques, sondern lösliche oligomere Formen sind, welche die toxischere Spezies darstellen (Klein et al., 2001; Lue et al., 1999; Walsh et al., 2002). Dennoch befinden sich lösliche und unlösliche Formen in einem stetigen Fließgleichgewicht, wodurch die Anwesenheit von A $\beta$  Plaques nicht unerheblich bleibt. Schlussendlich bleibt allerdings zu klären, inwieweit die A $\beta$ -Pathologie zur Tau-Pathologie beiträgt oder inwieweit diese unabhängig davon auftritt (Karran et al., 2011). Eine Bestimmung der Konzentrationen von A $\beta$ - und Tau-Oligomeren in der Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten mit einer subjektiven kognitiven Verschlechterung (SCD) oder einer milden kognitiven Beeinträchtigung (MCI) zeigte jedoch für A $\beta$ -Oligomere eine deutlich höhere Konzentration, während für Tau-Oligomere keine Veränderung zu einem normalen Biomarkerprofil festgestellt wurde. Dies spricht für eine frühe Pathogenese durch A $\beta$ -Oligomere und unterstützt die Amyloid-Kaskaden-Theorie (Blömeke et al., 2024). Dass die Aggregation von A $\beta$  ein früher Prozess im Krankheitsverlauf ist, zeigt auch ein Blick auf die Mikrogliaaktivierung. Aktivierte Mikroglia sind nicht einfach nur, wie zu Beginn gedacht, eine Konsequenz der Amyloid-Kaskade; tatsächlich hat dieser Zelltyp bereits einen frühen Einfluss auf die A $\beta$ -Pathologie (Haass & Selkoe, 2022). Dies wurde übersichtlich dargestellt in Haass and Selkoe (2022). Insbesondere der Mikroglia-rezeptor TREM-2 spielt hier eine wichtige Rolle. Es wurde gezeigt, dass bereits frühe Aggregate von A $\beta$ , welche als Bildungskeim für weitere Aggregationen fungieren, eine TREM-2-abhängige Protektion induzieren. Diese frühe Reaktion der Mikroglia, deutet ebenfalls auf einen möglichen Benefit einer frühen A $\beta$ -Reduktion hin, was die Amyloid-Kaskaden-Hypothese weiter unterstützt (Haass & Selkoe, 2022). Gründe, warum mit Ausnahme von Lecanemab bisherige Anti-Amyloid Therapien dennoch nicht die gewünschten Erfolge verzeichneten, werden ebenfalls übersichtlich und plausibel in Haass and Selkoe (2022) dargestellt. Demnach könnten neben ungeeigneten Präparaten auch die Auswahl der Patienten, ein zu später Behandlungsbeginn oder eine nicht ideale Versuchsdurchführung dazu beigetragen haben (Haass & Selkoe, 2022).

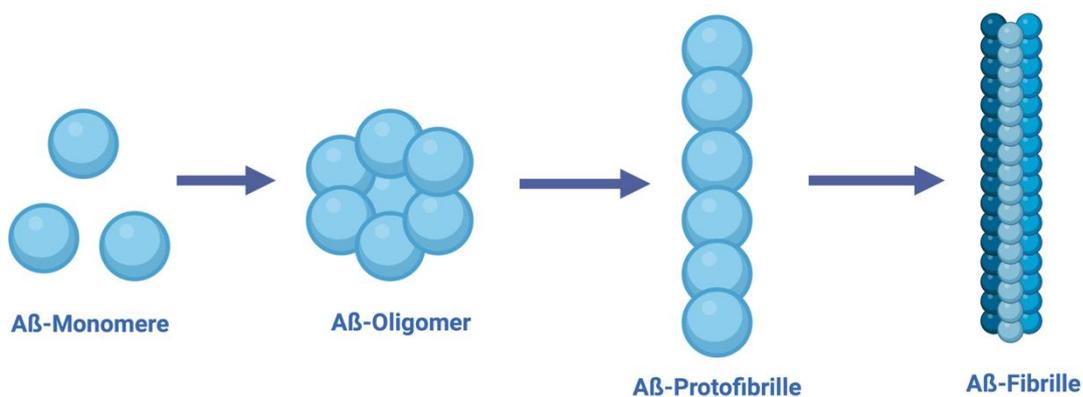
Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) entsteht, wie in Abbildung 1 zu sehen ist, durch Proteolyse des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), ein Transmembranprotein mit einem hohen extrazellulären Anteil. APP selbst ist nicht neurotoxisch, durch proteolytische Spaltung kann hieraus aber das

neurotoxische A $\beta$  entstehen. Prinzipiell kann die Spaltung an drei verschiedenen Stellen erfolgen. Inmitten der A $\beta$ -Domäne durch die  $\alpha$ -Sekretase, an der N-terminalen Seite der A $\beta$ -Domäne durch die  $\beta$ -Sekretase oder an der C-terminalen Seite der A $\beta$ -Domäne durch die  $\gamma$ -Sekretase (MacLeod et al., 2015). Beim nicht-amyloidogenen Weg, wird zunächst durch die  $\alpha$ -Sekretase gespalten. Im nächsten Schritt kann nun durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten werden, AICD (amyloid-precursor-protein-intracellular-domain), verbleibt auf der intrazellulären Seite und Peptid 3 (p3) entsteht (Arbor et al., 2016; Zheng & Koo, 2006). P3 ist nicht stabil in Oligomeren, da der hydrophobe Teil, an dem diese aggregieren, nicht von dem fehlenden, hydrophilen N-Terminus (A $\beta$ 1-16) geschützt werden kann. Es wird vermutet, dass dies der Grund für die fehlende Neurotoxizität ist und stärkt die These der toxischen Oligomere, welche im Verlauf der Arbeit noch näher erläutert wird (Dulin et al., 2008). Beim amyloidogenen Weg hingegen, wird erst durch die  $\beta$ -Sekretase und dann durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten, das neurotoxische A $\beta$  verbleibt auf der extrazellulären Seite, AICD im Intrazellulärraum (Arbor et al., 2016; Zheng & Koo, 2006). Je nachdem, wo die  $\gamma$ -Sekretase schneidet, entstehen unterschiedlich lange Formen von A $\beta$ . Die bekanntesten Isoformen sind A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 (Younkin, 1998). Während A $\beta$ 1-40 häufiger vorkommt (circa 90% A $\beta$ 1-40 versus 5-10% A $\beta$ 1-42 und andere Spezies (Younkin, 1998)), aggregiert A $\beta$ 1-42 leichter, bildet daher schneller Oligomere (El-Agnaf et al., 2000) und ist eher mit einem Krankheitsbeginn assoziiert (Karran et al., 2011). Die Plaques entstehen, wie Abbildung 2 zeigt, durch Aggregation verschiedener A $\beta$ -Strukturen. A $\beta$ -Monomere aggregieren zunächst zu Oligomeren, welche weiter zu Protofibrillen und Fibrillen aggregieren, die bei weiterer Aggregation Plaques bilden. Während die Fibrillen und die Plaques sich in der Zerebrospinalflüssigkeit nicht lösen, sind die Oligomere löslich und können sich so leichter im Gehirn verbreiten (Chen et al., 2017). Entgegen der ursprünglichen Amyloid-Kaskaden Hypothese, nach der die Plaques die Ursache für die Neurotoxizität und Demenz sind (Hardy & Higgins, 1992), stellte sich im Verlauf der Jahre heraus, dass es die löslichen Oligomere sind, welche die neurotoxischere Form bilden und die Pathogenese vorantreiben (Klein et al., 2001; Lue et al., 1999; Walsh et al., 2002). Studien zeigten, dass kognitive Defizite nicht mit dem Vorhandensein von Plaques korrelieren (Terry et al., 1991; Westerman et al., 2002) und synaptotoxische Effekte auch auftreten können, wenn noch keine Plaques vorhanden sind (Mucke et al., 2000). Im Gegensatz dazu werden Oligomere verstärkt bei Patienten nachgewiesen, die auch Symptome zeigen. Dies trifft nicht zu bei Patienten, die zwar A $\beta$ -Plaques und NFTs aufweisen, jedoch nicht symptomatisch sind (Bjorklund et al., 2012).



**Abbildung 1: Proteolyse von APP**

Created with BioRender.com - basierend auf Figur 1 (Arbor et al., 2016) und Figur 2 (Zheng & Koo, 2006). A $\beta$  entsteht durch Proteolyse von APP. Dabei unterscheidet man zwischen dem non-amyloidogenen Weg und dem amyloidogenen Weg. Bei Ersterem wird zunächst durch die  $\alpha$ -Sekretase inmitten der A $\beta$ -Domäne gespalten und dann durch die  $\gamma$ -Sekretase, sodass AICD auf der intrazellularen Seite verbleibt und das nicht-toxische Peptid P3 abgespalten wird. Beim amyloidogenen Weg wird dagegen erst durch die  $\beta$ -Sekretase und dann durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten, sodass neben AICD das toxische A $\beta$  entsteht.



**Abbildung 2: Aggregation von Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ )**

Created with BioRender.com - basierend auf Figur 2A (Bernabeu-Zornoza et al., 2019) und Figur 3E (Chen et al., 2017). A $\beta$ -Monomere aggregieren zunächst zu Oligomeren. Mehrere Oligomere lagern sich zu Protofibrillen zusammen und mehrere Protofibrillen aggregieren zu Fibrillen, welche bereits unlöslich sind.

Da es in dieser Arbeit zu großen Teilen um die Langzeitpotenzierung (LTP) geht, soll zunächst der direkte Einfluss der löslichen Oligomere auf diese erläutert werden. Lösliche A $\beta$  Oligomere induzieren eine Hemmung der LTP (Walsh et al., 2002), wobei hier vor allem NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor) und AMPA-Rezeptoren ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazoleprop-ionic acid receptor) eine wichtige Rolle spielen. NMDA-Rezeptoren sind spannungsabhängig und werden im inaktivierten Zustand durch Magnesiumionen blockiert. Bei der Langzeitpotenzierung kommt es durch eine anhaltende Glutamatausschüttung an der Präsynapse primär zu einer Aktivierung von AMPA-Rezeptoren. Durch die folgende Depolarisation dissoziiert Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> strömt über die NMDA-Rezeptoren ein. Es kommt zu einer Aktivierung der CaMKII (Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II), welche einerseits AMPA-Rezeptoren phosphoryliert und so direkt zu einer vermehrten Insertion dieser führt. Andererseits aktiviert CaMKII über ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinases) den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element-binding protein), welcher die Bildung von, für die synaptische Plastizität wichtigen, Proteinen induziert. Bei einer LTD (Langzeitdepression) kommt es hingegen infolge einer geringen Depolarisation über die AMPA-Rezeptoren zu einer Aktivierung verschiedener Phosphatasen, welche AMPA-Rezeptoren dephosphorylieren und damit deren Internalisierung induzieren, die Genexpression nimmt ab (Benarroch, 2021a; Mutschler E., 2007). Indem A $\beta$  die basalen Ca<sup>2+</sup>-Level erhöht, kommt es zu einer leichten, aber ständigen Aktivierung der NMDA-Rezeptoren (Rammes et al., 2015). Dies führt zu einer Abnahme der NMDA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Neurotransmission (Rammes et al., 2018). Eine Downregulation der Genexpression, welche für die synaptische Plastizität essenziell ist, ist die Folge (Huffels et al., 2023). Des Weiteren sind extrasynaptische NMDA-Rezeptoren von Bedeutung (Rammes et al., 2018). Im Gegensatz zu synaptischen NMDA-Rezeptoren, führt eine Aktivierung dieser zu einer verminderten Aktivität des Transkriptionsfaktors CREB und damit auch zu einer verringerten Bildung des neuronalen Wachstumsfaktors BDNF (brain derived neurotrophic factor). Neuronale Schäden und Zelltod sind die Folge (Hardingham et al., 2002). Das dies für die Pathogenese von Morbus Alzheimer von Bedeutung ist, zeigt auch eine weiterentwickelte Form des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Memantin. Nitromemantin, welches vor allem an die extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren bindet, wirkte sich bei *in vitro* Versuchen nicht nur protektiv auf A $\beta$ -induzierte Schäden an den Synapsen aus, sondern war auch in Verhaltenstests mit Mäusen einer Behandlung mit Memantin überlegen (Talentova et al., 2013). Eine Aktivierung dieser extrasynaptischen Rezeptoren kommt dann zustande, wenn so viel Glutamat im synaptischen Spalt verweilt, dass es aus diesem austritt (Bading, 2021). A $\beta$  hat hier einen direkten Einfluss, indem die Oligomere

mit hoher Affinität an nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nACh-R) von Astrozyten binden und so die Freisetzung von Glutamat fördern. Gleichzeitig hemmen sie die Wiederaufnahme von Glutamat durch Astrozyten. Zudem binden A $\beta$ -Oligomere an PrP<sup>c</sup> und aktivieren als Komplex mGluR5 (metabotroper Glutamat-Rezeptor 5). Eine Internalisierung von AMPA-Rezeptoren und Aktivierung der Fyn-Tyrosin-Kinase, welche NMDA-Rezeptoren phosphoryliert und damit weiter aktiviert, sind die Folge. Daneben wird durch die Aktivierung von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren und mGluR5 aber auch die Tau-Pathologie gefördert, da dadurch Kinasen wie Cdk5 und GSK-3 $\beta$  aktiviert werden (Benarroch, 2021b).

Neben diesen direkten Einflüssen von A $\beta$  auf die Langzeitpotenzierung, werden aber auch andere Pathomechanismen durch A $\beta$  beeinflusst. Oxidativer Stress, Neuroinflammation, Acetylcholin (ACh)-Mangel und die Hyperphosphorylierung von Tau-Protein tragen ebenso zur Pathogenese bei (Ricciarelli & Fedele, 2017). Während diese Mechanismen nach der ursprünglichen Amyloid-Kaskaden-Hypothese nur als Folge pathologischer A $\beta$ -Level betrachtet werden (Hardy & Higgins, 1992), sehen andere wissenschaftliche Gruppen hingegen in ihnen einen ursächlichen Mechanismus (Ramos-Rodriguez et al., 2013; Rapoport et al., 2002). Da sie aber unabhängig davon, welche Theorie man verfolgt, wichtige Mechanismen in der Pathogenese darstellen, sollen sie im Folgenden näher betrachtet werden:

Oxidativer Stress kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden und trägt bei Morbus Alzheimer ebenfalls zur Neurodegeneration bei. Ein Beispiel für einen Auslöser, ist die mitochondriale Dysfunktion. A $\beta$  stört mitochondriale Vorgänge und führt zu einer Verringerung des ATP-Levels. Es wird vermutet, dass es infolgedessen an den Synapsen, welche viel Energie benötigen, zu einer gestörten Neurotransmission und zu oxidativem Stress kommt (Reddy & Beal, 2008). Ein weiteres Beispiel ist der, im Gehirn von Alzheimer Patienten häufig erhöhte, Gehalt an Eisen, Kupfer und Zink, welcher ebenfalls die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies fördert (Tamagno et al., 2021). Die Folgen sind sehr gut in der Übersichtsarbeit von Tamagno et al. (2021) dargestellt: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden freigesetzt und können nicht mehr ausreichend durch Antioxidantien abgebaut werden. In der Folge kommt es zu zellulären Schäden, aber auch zu einer erhöhten A $\beta$ -Produktion. Dies fördert wiederum weiter die Bildung von ROS und es kommt langfristig zur Neurodegeneration (Tamagno et al., 2021).

Unter der chronischen Neuroinflammation versteht man eine Inflammation des zentralen Nervensystems (ZNS), die durch Schäden, beziehungsweise Verletzungen, im Gehirn ausgelöst wird. Mikroglia und Astrozyten werden aktiviert und sorgen zunächst für eine

Wiederherstellung beschädigter Areale. Bleibt der Stimulus allerdings bestehen, gehen die Gliazellen in den proinflammatorischen Zustand über. Weitere Schäden und eine chronische Inflammation sind die Folge (Streit et al., 2004). Bei Morbus Alzheimer werden proinflammatorische Botenstoffe vor allem in der Nähe von Plaques und NFTs gefunden. Es ist also davon auszugehen, dass diese eine Inflammation triggern und somit die Neurodegeneration fördern (Akiyama et al., 2000). Dass die Inflammation eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Morbus Alzheimer spielt, zeigt auch eine Studie, in der ein chronischer Gebrauch von NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken senkt (Vlad et al., 2008). Dabei spielen Mikroglia und Astrozyten eine wichtige Rolle im Inflammationsprozess. Mikroglia sind Phagozyten im ZNS, welche ihre Umgebung scannen und Zellschrott sowie Pathogene beseitigen (Kettenmann et al., 2011). Daneben regulieren nicht-aktivierte Mikroglia über die Zahl aktiver Synapsen die synaptische Plastizität. Es wurde gezeigt, dass eine reduzierte Zahl an Mikroglia mit einer höheren Spinedichte und einer stärkeren LTP-Induzierbarkeit einhergeht (Ji et al., 2013). Werden Mikroglia hingegen aktiviert, wandern sie in das beschädigte Gewebe ein und initiieren eine Immunantwort (Kettenmann et al., 2011). Dies ist auch der Fall bei Morbus Alzheimer. Mikroglia können über bestimmte Rezeptoren, wie zum Beispiel den TREM-2 Rezeptor, an A $\beta$  binden und dadurch aktiviert werden (Garcia-Revilla et al., 2019; Hsieh et al., 2009). Dabei findet ein sogenanntes Priming der Mikroglia statt. Dies meint, dass bei vermehrter Stimulation, wie es in einem alternden Gehirn oder bei neurodegenerativen Erkrankungen der Fall ist, eine erhöhte Sensitivität auf immunologische Trigger entwickelt wird (Perry & Teeling, 2013). Aber nicht nur Mikroglia spielen eine wichtige Rolle bei der Alzheimer induzierten Neuroinflammation, auch die Astrozytenanzahl ist in der Nähe von A $\beta$ -Plaques erhöht (Medeiros & LaFerla, 2013). Reaktive Astrozyten erkennt man durch einen hohen Anteil an „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP), welches den Astrozyten Struktur gibt und wichtig für deren uneingeschränkte Funktion ist. Eine Überproduktion hingegen führt zu einer Beeinträchtigung der Neurotransmission und infolgedessen der Kognition (Middeldorp & Hol, 2011; Olabarria et al., 2010). Zudem nimmt auch eine systemische Inflammation Einfluss auf die Vorgänge im ZNS, was in der Übersichtsarbeit von Czirr and Wyss-Coray (2012) dargestellt ist und insbesondere bei steigendem Lebensalter von Bedeutung ist (Chen et al., 2008). Immunologische Zellen oder primäre und sekundäre Botenstoffe können entweder direkt über die Blut-Hirn-Schranke gelangen oder aber mit Molekülen aus dem ZNS kommunizieren. Einer dieser Kommunikationswege läuft über den Vagusnerv. Eine Stimulation bewirkt hier eine Acetylcholinausschüttung in der Peripherie, was die Inflammation dort unterdrückt (Czirr &

Wyss-Coray, 2012). Bei Morbus Alzheimer kann diese Regulation aufgrund des ACh-Mangels im Gehirn jedoch beeinträchtigt sein, die systemische Inflammation nimmt zu und kann sich, wie beschrieben, auch auf die Neuroinflammation auswirken (Eikelenboom et al., 2012).

Ein Mangel an Acetylcholin beeinflusst die Pathogenese jedoch durch weitere Mechanismen, was in der Übersichtsarbeit von Ferreira-Vieira et al. (2016) dargestellt ist. Acetylcholin ist unter anderem ein wichtiger Neurotransmitter im Bereich Kognition und es wird vermutet, dass eine Degeneration cholinergischer Neurone, zusammen mit einer gestörten Transmission anderer Neurotransmitter, wie zum Beispiel Dopamin, im Wesentlichen zu den psychiatrischen Symptomen beitragen. Im ZNS befinden sich nACh-Rezeptoren vor allem auf der Präsynapse und dienen der Kontrolle über die Freisetzung von Neurotransmittern, wozu Dopamin, Glutamat und auch Acetylcholin selbst zählen. Eine Stimulation bewirkt einen Calciumeinstrom, was die Freisetzung von Neurotransmittern begünstigt. Ein Mangel hingegen stört die Neurotransmission (Ferreira-Vieira et al., 2016). Acetylcholin erwies sich zudem neuroprotektiv in Bezug auf die glutamaterge Übererregung. Es wurde gezeigt, dass es durch die Stimulation nACh-Rezeptoren, über einen Calcium-abhängigen Mechanismus zu einer „Downregulation“ der NMDA-Rezeptor-Aktivierung kommt. Nikotin scheint hier über Kompensationsmechanismen vor einem Calciumüberschuss, wie es bei der alleinigen Glutamat Exposition der Fall ist, zu schützen (Dajas-Bailador et al., 2000). Vertreter der cholinergen Hypothese sind der Meinung, dass der Mangel an Acetylcholin erst die Ablagerungen von A $\beta$  und die Hyperphosphorylierung von Tau-Protein induziert (Ramos-Rodriguez et al., 2013).

Der Amyloid-Kaskaden-Hypothese zufolge, wird aber die Hyperphosphorylierung von Tau-Protein, welche unter 1.3.2 näher erläutert wird, initial durch A $\beta$  induziert (Hardy & Higgins, 1992), wobei bis heute nicht geklärt ist, inwieweit diese tatsächlich zur Initiierung oder Beschleunigung der Pathogenese beiträgt (Karran et al., 2011). Unabhängig davon gibt es jedoch Hinweise, dass hyperphosphoryliertes Tau-Protein wiederum die A $\beta$ -Toxizität verstärkt und somit eine negative Feedbackschleife entsteht (Bloom, April 2014).

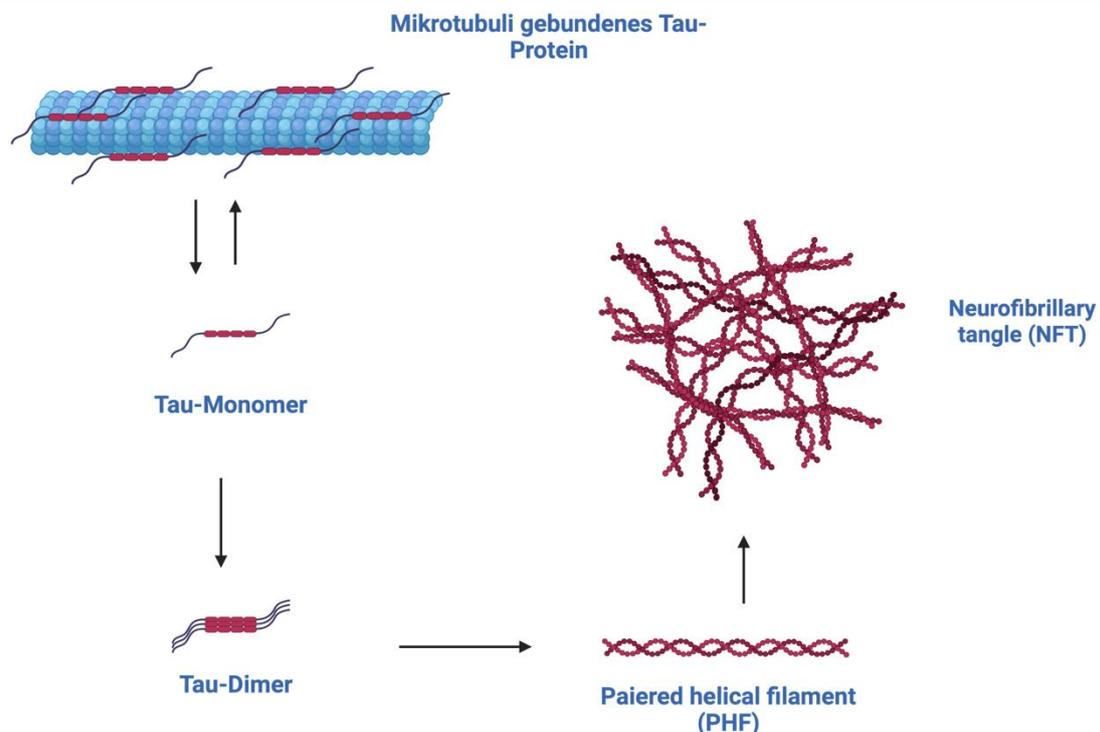
### **1.3.2 Tau-Protein**

Wie in den Übersichtsarbeiten von de Paula VJR (2009) und Fan et al. (2019) zusammengefasst, ist Tau-Protein ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches zu deren Stabilität beiträgt, indem es die Polymerisation fördert und die Depolymerisierung hemmt. Eine Hyperphosphorylierung von Tau-Protein führt zu einer Konformationsänderung innerhalb der Mikrotubuli, was in einer Ablösung von Tau-Protein und somit einer gestörten Polymerisation und Mikrotubulifunktion

resultiert. Die Mikrotubuli tragen zur neuronalen Struktur, zum axonalen Transport und zur synaptischen Plastizität bei. Eine uneingeschränkte Funktion ist also für die Neurotransmission essenziell (de Paula VJR, 2009; Fan et al., 2019). Wie Abbildung 3 zeigt, können die gelösten, monomeren Tau-Proteine aggregieren und sich über dimere und oligomere Formen zu den sogenannten „paired helical filaments“ (PHFs) zusammenlagern, welche bereits unlöslich sind und weiter zu den „neurofibrillary tangles“ kurz NFTs aggregieren (Fan et al., 2019; Sheppard & Coleman, 2020). Eine synaptische Dysfunktion und Neurodegeneration, mit Synapsenverlust und neuronalem Zelltod sind die Folge (Di et al., 2016). Während man früher dachte, dass es die NFTs sind, welche die toxischere Komponente darstellen, zeigte sich auch hier, dass dies doch die löslichen Oligomere von Tau-Protein sind (Kopeikina et al., 2012; Lasagna-Reeves et al., 2011). Diese werden sowohl in der Prä- als auch graduell abnehmend in der Postsynapse gefunden, was sogar der Fall ist, wenn nur wenige, beziehungsweise keine NFTs vorhanden sind (Colom-Cadena et al., 2023) und werden mit einer Verschlechterung der Kognition assoziiert (Singh et al., 2020). Oligomeres Tau tritt schon in frühen Stadien auf und scheint sich über die Synapsen auszubreiten (Colom-Cadena et al., 2023). Es wird vermutet, dass die NFTs dagegen inert und gewissermaßen protektiv sind, da sie lösliches Tau binden. Allerdings ist hier die Kapazität ab einem gewissen Level überschritten und die Toxizität der Oligomere überwiegt (Kopeikina et al., 2012). Vertreter der Tau-Hypothese sind der Meinung, dass die A $\beta$ -Pathologie erst durch die Tau-Pathologie induziert wird (Arnsten et al., 2021; Kametani & Hasegawa, 2018). Gestützt wird dies von der These, dass die Tau-Pathologie circa eine Dekade vor dem Auftreten von A $\beta$ -Plaques beginnt (Arnsten et al. (2021) aus Braak and Del Tredici (2015)) und dass das Auftreten von A $\beta$ -Plaques nicht immer mit einer Beeinträchtigung der Kognition assoziiert wird (Arboleda-Velasquez et al., 2019; Bjorklund et al., 2012). NFTs hingegen scheinen in hohen Konzentrationen mit verstärkten kognitiven Defiziten zu korrelieren (Giannakopoulos et al., 2003), wobei diese Korrelation nicht unbedingt Kausalität bedeutet (Nelson et al., 2009). In ihrer Übersichtsarbeit beschreibt de Paula VJR (2009) zudem eine weitere Hypothese, nach der beide Pathologien einem parallelen, aber unabhängigen Mechanismus folgen, die GSK3 $\beta$ -Hypothese. Nach dieser ist GSK3 $\beta$  nicht nur für die Phosphorylierung von Tau-Protein verantwortlich, sondern auch an der Regulation des APP-Metabolismus beteiligt (de Paula VJR, 2009). Demnach wäre GSK3 $\beta$  ein optimales Target in der Behandlung von Morbus Alzheimer, Inhibitoren, wie zum Beispiel Tideglusib, brachten aber bisher keinen Erfolg (Lovestone S, 2015).

Zusammenfassend lässt sich über die Pathologie von Morbus Alzheimer also sagen, dass es sich um eine multifaktorielle Krankheit handelt. Daher wird auch eine multifaktorielle Therapie

benötigt, um diese Krankheit effektiv zu therapieren (Arnsten et al., 2021; de Paula VJR, 2009; Selkoe & Hardy, 2016). Trotz aller Diskussionen bleibt jedoch die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die validierteste und im Drug-Targeting am meisten verfolgte Theorie. Es werden stets Evidenzen dafür gewonnen, dass die A $\beta$ -Pathologie ein früher, initiiender Faktor von Morbus Alzheimer ist. Einmal initiiert, werden eine Reihe von pathologischen Prozessen induziert und Therapien, welche hier angreifen, werden ebenso benötigt. Ein Beweis für die Richtigkeit der A $\beta$ -Theorie ist jedoch nur durch eine erfolgreiche, A $\beta$ -selektive Therapie bei symptomatischen Patienten (Selkoe & Hardy, 2016) oder eine, noch vor den A $\beta$ -Ablagerungen beginnende, erfolgreiche Therapie bei Risikopatienten zu erreichen (Karran et al., 2011).



**Abbildung 3: Formen des Tau-Proteins**

Created with BioRender.com - basierend auf (Sheppard & Coleman, 2020). Lösen sich Tau-Monomere von den Mikrotubuli, können sie zu Dimeren aggregieren. Aggregate dieser Dimere bilden die PHFs, welche weiter zu den NFTs aggregieren.

## 1.4 Therapie und aktueller Forschungsstand

Zurzeit stehen in der Behandlung von Morbus Alzheimer, mit Ausnahme des derzeit nur in den USA zugelassenen Antikörpers Lecanemab, nur symptomatische Therapien zur Verfügung. Als sogenannte „Antidementiva“ sind in Deutschland vier Wirkstoffe zugelassen (Alzheimer

Forschung Initiative e. V., 2023, January). Galantamin, Rivastigmin und Donepezil sind Acetylcholinesterase-Hemmstoffe. Sie sorgen dafür, dass weniger Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase abgebaut wird und somit mehr Acetylcholin im synaptischen Spalt verbleibt. Dies soll den bei Morbus Alzheimer vorliegenden Acetylcholinmangel im Gehirn ausgleichen und somit die cholinerge Neurotransmission und die Kognition fördern (Alzheimer Forschung Initiative e. V., 2023, January). Sie werden bei milden bis moderaten Formen der Erkrankung eingesetzt (Alzheimer Forschung Initiative e. V., 2023, January) und eine Behandlung sollte so früh wie möglich begonnen werden. Patienten, die erst sechs Monate nach der Diagnose mit der Therapie starteten, zeigten einen schnelleren kognitiven Verfall verglichen zu solchen, die direkt nach der Diagnose starteten (Farlow et al., 2000). Allerdings kommt es bei Acetylcholinesterase-Hemmstoffen oft zu leichten Nebenwirkungen, die sich vor allem in gastrointestinalen Erscheinungen wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall äußern (Alzheimer Forschung Initiative e. V., 2023, January). Dies führt häufig zu einer verschlechterten Compliance und reduziert somit die Wirkung (Campbell et al., 2017). Der vierte zugelassene Wirkstoff ist der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin. Dieser soll die Nervenzellen vor einer glutamatergen Übererregung schützen und somit eine dadurch induzierte Degeneration der Neurone und eine Abnahme der Lern- und Gedächtnisleistung verhindern (Alzheimer Forschung Initiative e. V., 2023, January). Memantin ist zugelassen bei moderaten bis schweren Formen der Erkrankung und eine Kombinationstherapie mit Acetylcholinesterase-Hemmstoffen ist einer Monotherapie mit diesen überlegen (Rountree et al., 2013). Auch *Ginkgo biloba* zeigt infolge einer verbesserten Durchblutung bei leichten bis moderaten Erkrankungsformen teilweise eine Verbesserung der Hirnleistung. Weitere Medikamente werden eingesetzt um Begleiterscheinungen wie zum Beispiel Depressionen oder Agitiertheit zu behandeln. Hier werden Antidepressiva und Neuroleptika verschrieben (Alzheimer Forschung Initiative e. V., 2023, January).

Da dies aber nur die Symptome lindern kann, jedoch nicht die Progression des Krankheitsverlaufes stoppt, wird eine kausale Therapie dringend benötigt. In der Vergangenheit entwickelte, kausal angreifende Wirkstoffe, zeigten jedoch keine Erfolge. Hierfür bieten die Übersichtsarbeiten von Vaz and Silvestre (2020) und Yiannopoulou and Papageorgiou (2020) einen Überblick. Eine Möglichkeit einer kausal angreifenden Therapie, ist die Beeinflussung der A $\beta$ -Bildung.  $\beta$ -Sekretase-Inhibitoren, wie Lanabecestat, Verubecestat oder Atabecestat, zeigten zwar eine reduzierte A $\beta$ -Konzentration im Liquor, konnten jedoch nicht mit einem klinischen Benefit assoziiert werden (Vaz & Silvestre, 2020). Im Gegenteil, teilweise kam es sogar zu einer Verschlechterung der Kognition und erheblichen Nebenwirkungen (Vaz &

Silvestre, 2020), was vermutlich daran liegt, dass  $A\beta_{1-42}$  in pikomolaren Konzentrationen die LTP sogar fördert (Puzzo et al., 2008). Auch die  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren Semagacestat und Avagacestat zeigten keinen klinischen Benefit und auch sie führten eher zu einer Verschlechterung der Kognition und waren mit erheblichen Nebenwirkungen, wie Hautkrebs und zusätzlich vermehrten Infektionen bei Semagacestat verbunden, was zu einem frühen Abbruch der Entwicklung führte (Vaz & Silvestre, 2020; Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020). Das Problem hier ist, dass die  $\gamma$ -Sekretase nicht spezifisch für APP ist, sondern auch andere Transmembranproteine wie zum Beispiel den Notch 1-Rezeptor, der für die normale Zelldifferenzierung wichtig ist, spaltet (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020). Der  $\gamma$ -Sekretase-Modulator Tarenflurbil zeigte hingegen ein besseres Nebenwirkungsprofil, brachte jedoch ebenfalls keinen klinischen Benefit (Vaz & Silvestre, 2020). Während also im Bereich der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase aktuell keine Studien laufen (Vaz & Silvestre, 2020; Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020), gibt es zwei  $\alpha$ -Sekretase-Modulatoren, die den nicht-amyloiden Weg fördern sollen und sich derzeit in der klinischen Phase II befinden (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2020).

Ein weiterer Ansatzpunkt, ist die Hemmung der  $A\beta$ -Aggregation. Hier werden verschiedene Wirkstoffe untersucht, welche oral appliziert werden können (Vaz & Silvestre, 2020). Der Zuckeralkohol Scyllo-Inositol inhibiert die Aggregation von  $A\beta$ -Peptiden hin zu höher molekularen Oligomeren (McLaurin et al., 2006). Er zeigte in einer Phase II Studie bei hohen Dosierungen allerdings schwere Nebenwirkungen. Dies besserte sich zwar mit niedrigeren Dosierungen, jedoch muss der klinische Benefit hierfür erst noch gezeigt werden (Salloway et al., 2011). Ein weiteres Molekül, welches die  $A\beta$ -Aggregation verhindert, ist Tramiprosat (Homotaurin). Tramiprosat verhindert eine Konformationsänderung innerhalb der  $A\beta$ -Monomere und beugt somit einer Fehlfaltung und einer daraus resultierenden Aggregation in Oligomere vor. Da homozygote APOE4-Träger dafür anfälliger sind, zeigte Tramiprosat vor allem hier einen klinischen Benefit (Hey, Kocis, et al., 2018; Tolar et al., 2024). Tramiprosat besitzt allerdings eine sehr individuelle Pharmakokinetik und es kommt oft zu gastrointestinalen Nebenwirkungen. Daher wurde das Prodrug ALZ-801 (Valitramiprosat; ein Prodrug ist ein inaktiver Wirkstoff, der erst durch eine Metabolisierung im Körper aktiviert wird), welches diesbezüglich verbesserte Eigenschaften aufweist, entwickelt (Hey, Yu, et al., 2018). Aktuell befindet sich ALZ-801 in der klinischen Phase III mit homozygoten APOE4-Trägern (Alzheon, 2021, June 04).  $A\beta$ -Aggregations-Inhibitoren wie ALZ-801 bieten den Vorteil, dass sie bereits zu Beginn des Aggregationsprozesses eingreifen und daher nicht

spezifisch für bestimmte aggregierte Formen sind. Für eine synthetische Herstellung dieser Aggregationsinhibitoren eignen sich Peptide besonders gut, da sie leicht modifiziert werden können. Dabei unterscheidet man solche, die dem hydrophoben, innenliegenden Teil der A $\beta$ -Sequenz (A $\beta$ 16-20 oder auch KLVFF-Region) ähneln von solchen, die auf der N- oder C-terminalen Sequenz basieren. Neben den vielfältigen Gestaltungsmöglichkeiten bieten Peptide aber auch den Vorteil, dass sie zumeist gut verträglich und oral bioverfügbar sind (Goyal et al., 2017). Ein Beispiel für ein Peptid, welches 2022 die klinische Phase I Studie erfolgreich beendete (ClinicalTrials.gov, 2022, August 23) und nun in die Phase II übergeht (Forschungszentrum Jülich, 2023, November 21), ist PRI-002 (Contraloid). Es stabilisiert ebenfalls die Monomere in ihrer nicht-aggregierenden Konformation und reduziert somit die Bildung der Oligomere, was langfristig das Gleichgewicht auf die Seite der Monomere verschiebt (Schartmann et al., 2018). Dabei scheint es zu einer Anreicherung bei wiederholter Gabe zu kommen und ein Steady-State (Fließgleichgewicht, durch das eine konstante, therapeutisch wirksame Wirkstoffkonzentration erreicht wird) wird nach ein bis zwei Wochen erreicht (Kutzsche et al., 2020).

Aufgrund aktueller Zulassungen steht jedoch die Erhöhung der A $\beta$ -Clearance momentan im Fokus. Hier schafften es in der Vergangenheit Wirkstoffe, die der aktiven Immunisierung dienen, in die frühe klinische Phase. Durch Injizierung von A $\beta$  oder Fragmenten davon, soll hier die Antikörperbildung angeregt werden (Vaz & Silvestre, 2020). Während Novartis (Amilomotide) (Novartis, 2019) und Pfizer/Janssen (Vanutide) (Adis International Ltd. Part of Springer Science+Business Media, 2023, November 05) die Entwicklung, aufgrund mangelnder Effektivität bereits stoppten, ist bei ABvac40 und UB-311 (Wirkstoffe, die ebenfalls der aktiven Immunisierung dienen) noch offen, ob es zu einer Einstellung der Entwicklung kommt. Während man bei ABvac40 noch auf die Ergebnisse der Phase II Studie wartet (Molina, 2022), wurde UB-311 in einer Phase II Studie gut vertagen und zeigte bei 96% der teilnehmenden Patienten eine Antikörperbildung (Cision, 2019, January 16). Zu einer Phase III Studie kam es jedoch bisher nicht (vaxxinity, 2023, January ). Dementgegen steht die passive Immunisierung. Während Bapineuzumab, Solanezumab, Crenezumab, und Gantenerumab keine Erfolge erzielten und Studien daher zum Teil frühzeitig beendet wurden (Vaz & Silvestre, 2020), sind drei Antikörper aktuell besonders von Interesse. Biogens Antikörper Aducanumab (Aduhelm®) ist selektiv für aggregierte Formen von A $\beta$  (Oligomere, Fibrillen, Plaques) (Budd Haerberlein et al., 2017; Gunawardena et al., 2021) und erhielt im Juni 2021 von der FDA eine beschleunigte Zulassung (FDA, 2021), obwohl die beiden Phase III Studien aufgrund von mangelnder Wirksamkeit früher beendet wurden (Dyer, 2022). Die Daten, die nach Beendigung

der Studien noch gesammelt wurden, zeigten jedoch für eine der beiden Studien einen klinischen Benefit, wodurch es zu der beschleunigten Zulassung durch die FDA kam (Dyer, 2022). Biogen hatte nun bis 2030 Zeit, den klinischen Benefit mit einer neuen Studie zu verifizieren (FDA, 2021). Man ging allerdings nicht davon aus, hier positive Ergebnisse zu erhalten, denn der klinische Benefit, den EMERGE zeigte, basierte laut Statistikern der FDA wohl eher auf einer Verschlechterung der Kognition innerhalb der Placebogruppe als auf einer Verlangsamung des Kognitionsverlusts innerhalb der Behandlungsgruppe. Auch Medicare wollte die Kosten nur für Patienten übernehmen, die sich in einer Langzeitstudie befinden (Dyer, 2022). Ein Zulassungsantrag bei der EMA (European Medicine Agency) wurde im April 2022 von Biogen zurückgezogen (EMA, 2022). Im Januar 2024 verkündete der Hersteller dann die Entwicklung aufgrund einer geänderten Priorisierung zu stoppen (Biogen, 2024, January 31). Anders hingegen der Antikörper Lecanemab (Lequemb® von Biogen & Eisai). Er erhielt im Januar 2023 die beschleunigte Zulassung und am 06. Juli 2023 die traditionelle Zulassung der FDA (FDA, 2023). Auch ein Antrag bei der EMA ist Anfang 2023 eingegangen (Biogen, 2023). Lecanemab ist hochspezifisch für lösliche A $\beta$  Protofibrillen (van Dyck et al., 2023). Die beschleunigte Zulassung erfolgte zunächst auf Basis positiver Ergebnisse einer klinischen Phase II Studie (FDA, 2023). Zur Verifizierung wurden für die traditionelle Zulassung die Ergebnisse der Phase III Studie 301 (CLARITY AD) herangezogen. Hier konnte bei Patienten mit milder Demenz/kognitiver Beeinträchtigung nach 18 Monaten ein klinischer Benefit im primären Endpunkt (CDR-SB) und auch in den sekundären Endpunkten bestätigt werden. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählten infusionsbedingte Reaktionen, Kopfschmerzen und die, bei den A $\beta$ -Antikörpern häufig vorkommenden, ARIA („amyloid-related imaging abnormalities“). Diese äußern sich in zerebralen, temporären Schwellungen und punktuellen Blutungen. Häufig bilden sie sich spontan zurück und der Patient zeigt keine Symptome. Es können allerdings auch Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit oder Sehstörungen auftreten. Nehmen die Schwellungen/Blutungen zu, können sie zudem zu schweren neurologischen Symptomen und letztendlich auch zum Tod führen. Da das Risiko für ARIA bei homozygoten APOE4-Trägern und das Blutungsrisiko bei Patienten mit Antikoagulantien erhöht ist, sollten diese Patientengruppen besonders aufgeklärt und überwacht werden (FDA, 2023; van Dyck et al., 2023). Es wird vermutet, dass ARIA dadurch entstehen, dass A $\beta$ , welches sich in den Blutgefäßen abgelagert hat, durch den Antikörper gelöst wird und somit initial zu einem verstärkten Blutfluss führt, da das gestaute Blut zunächst abfließt. Für diese These spricht, dass bei andauernder Therapie das Risiko für ARIA sinkt (Barakos et al., 2022). Um die Effizienz und insbesondere die Sicherheit von Lecanemab auch über die 18 Monate hinaus zu beurteilen,

werden nun offene Erweiterungsstudien durchgeführt. CLARITY AD soll insgesamt noch bis 2027 laufen (ClinicalTrials.gov, 2023b). Der dritte Antikörper dessen Zulassung momentan zur Diskussion steht ist Donanemab (Lilly). Dieser richtet sich, anders als Lecanemab, gegen bereits bestehende A $\beta$ -Plaques und bindet spezifisch an A $\beta$ (p3-42) (Demattos et al., 2012). Hier lehnte die FDA im Januar 2023 eine beschleunigte Zulassung, aufgrund nicht ausreichender Sicherheitsdaten in der Phase II, ab (Lilly, 2023, January 19). Im Mai 2023 berichtete der Hersteller jedoch über positive Ergebnisse der Phase III Studie, mit denen ein Zulassungsantrag bei der FDA gestellt werden soll (Lilly, 2023, May 03).

Aber nicht nur im Bereich A $\beta$ , auch hinsichtlich Tau-Protein wurde in den letzten Jahren einiges entwickelt und geforscht. Da jedoch A $\beta$  im Fokus dieser Arbeit steht, soll dies an dieser Stelle nur kurz erläutert werden. Eine Möglichkeit im Bereich Tau anzusetzen, ist die Hemmung der Hyperphosphorylierung. Der GSK3 $\beta$ -Inhibitor Tideglusib, brachte allerdings keinen klinischen Benefit (Lovestone S, 2015). Zudem befinden sich Tau-Aggregationsinhibitoren und Mikrotubuli Stabilisatoren in klinischen Phasen der Forschung (Vaz & Silvestre, 2020). Hinsichtlich der Immunisierung zeigte AADvac 1 als aktiv immunisierender Wirkstoff in einer Phase II Studie zwar eine gute Immunisierung, brachte jedoch keinen kognitiven Benefit (Novak et al., 2021). Außerdem schafften es vier Antikörper der passiven Immunisierung in eine Phase II Studie: Gosuranemab, Tilavonemab, Semorinemab und Zagotenemab (Vaz & Silvestre, 2020). Einen weiteren Ansatzpunkt stellt BIIB080 (Biogen/Ionis) dar. Dies ist ein Antisense-Oligonukleotid, welches die Tau-Expression beeinflusst. Durch das Binden an eine komplementäre Zielsequenz in der mRNA des Tau-Proteins, kann so dessen Bildung verhindert werden. Nach ersten Erfolgen im Tierversuch, welche sich neben einer guten Verträglichkeit auch in Phase I bestätigten, läuft nun die Phase II Studie (Mummery et al., 2023). Ergebnisse werden hier 2026 erwartet (ClinicalTrials.gov, 2023a).

Aber nicht nur in Bezug auf A $\beta$  und Tau, auch auf Grundlage anderer pathologischer Veränderungen wie beispielsweise Neuroinflammation, oxidativer Stress, Neuroprotektion und Neurotransmitterrezeptoren wird viel geforscht. Übersichtlich dargestellt ist dies in Cummings et al. (2023).

## 1.5 A $\beta$ -Subtypen

A $\beta$ -Peptide können sich, wie bereits erwähnt, in ihrer Länge unterscheiden, wobei A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ <sub>1-42</sub> die bekanntesten Subtypen darstellen. Während A $\beta$ <sub>1-40</sub> häufiger vorkommt (circa 90% A $\beta$ <sub>1-40</sub> versus 5-10% A $\beta$ <sub>1-42</sub> und andere Spezies (Younkin, 1998)) aggregiert A $\beta$ <sub>1-42</sub> leichter und

ist daher häufiger in den senilen Plaques zu finden (El-Agnaf et al., 2000). A $\beta$ <sub>1-42</sub> ist um zwei Aminosäuren länger als A $\beta$ <sub>1-40</sub> und dadurch hydrophober und schlechter löslich in der Zerebrospinalflüssigkeit. Es neigt also, durch die erhöhte C-terminale Länge, mehr zur Aggregation (Jarrett et al., 1993). Anders gesagt, eine erhöhte C-terminale Länge verstärkt die Toxizität (Jarrett et al., 1993) und ein Anstieg der extrazellulären A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-43</sub> Konzentration wird mit einem Krankheitsbeginn assoziiert (Borchelt et al., 1996; Karran et al., 2011).

A $\beta$ -Peptide unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihrer Länge, sondern sie können auch posttranslationale Modifikationen durchlaufen. Eine dieser ist die Bildung von Pyroglutamat-A $\beta$ . Das Enzym Glutaminyl-Cyclase ist in der Lage, bei N-Terminal gekürzten A $\beta$ -Peptiden, das endständige Glutamat in Pyroglutamat zu zyklisieren. Da Glutamat sich entweder in Position drei oder Position elf des A $\beta$ -Peptids befindet, kann dies jeweils an diesen Positionen geschehen (Schilling et al., 2004). A $\beta$ pE3 ist unter den N-Terminal gekürzten Peptiden die häufigste Form in den senilen Plaques (>50%) (Russo et al., 2002) und fungiert als Promotor für eine weitere Aggregation (Wittnam et al., 2012). Dies liegt zum einen daran, dass A $\beta$ pE3 durch die Kürzung und Zyklisierung hydrophober wird, zum anderen daran, dass endständige Lactame leichter aggregieren (Houston et al., 1996). Außerdem wird vermutet, dass A $\beta$ pE3 stabiler gegenüber einem Abbau durch Peptidasen ist, weil es im Vergleich zu ungekürzten A $\beta$ -Peptiden nicht durch jegliche Aminopeptidasen gespalten werden kann, sondern nur durch Pyroglutamat-spezifische (Saido et al., 1995). A $\beta$ pE3 aggregiert also leichter, als nicht posttranslational modifizierte A $\beta$ -Peptide (Pike et al., 1995) und ein Anstieg der Level wurde ebenfalls mit neurologischen Symptomen (im Mausmodell) assoziiert (Jawhar et al., 2011).

Eine weitere posttranslationale Modifikation ist die Bildung von nitriertem A $\beta$ . Infolge des oxidativen Stresses bei Morbus Alzheimer kommt es zu einer gesteigerten NO-Produktion. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen und führen zu einer Nitrierung an Tyrosin zehn (Radi, 2004). 3NTyr10A $\beta$  beschleunigt die Aggregation und fungiert ebenfalls als Promotor für eine weitere Aggregation, denn es wird verstärkt im Inneren der Plaques gefunden, während es von nicht-nitriertem A $\beta$  umgeben ist (Kummer et al., 2011). Des Weiteren zeigte Kummer et al. (2011), dass 3NTyr10A $\beta$ , verglichen zu nicht-nitriertem A $\beta$ <sub>1-42</sub>, die LTP-Induzierbarkeit stärker inhibiert. In Rammes et al. (2018) wies 3NTyr10A $\beta$  dagegen eine zu A $\beta$ <sub>1-42</sub> vergleichbare Toxizität auf, gefolgt von A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ pE3. A $\beta$ pE3 stellte hier also die am wenigsten toxischste Spezies dar (Rammes et al., 2018).

## 1.6 Lösliche A $\beta$ -Oligomere

A $\beta$ -Oligomere entstehen durch Aggregation von Monomeren und Dimeren, wobei die Aggregation durch eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur gefördert wird. Diese wurde verstärkt in Protobfibrillen gefunden, was darauf schließen lässt, dass es in den monomeren und dimeren A $\beta$ -Formen zu einem Strukturwandel kommt. Dabei scheint sich die Konformation von einer zufälligen, spulenartigen Struktur hin zu einer  $\beta$ -Faltblatt Struktur zu verändern, wobei als Zwischenzustand auch  $\alpha$ -Helices auftreten (Walsh et al., 1999). Während lösliche A $\beta$ -Oligomere sich negativ auf die Langzeitpotenzierung auswirken, trifft dies für A $\beta$ -Monomere nicht zu (Walsh et al., 2002).

Entgegen der ursprünglichen These, dass es die unlöslichen A $\beta$ -Plaques sind, welche eine A $\beta$ -Pathologie induzieren (Hardy & Higgins, 1992), gewinnt die These, dass die löslichen A $\beta$ -Oligomere die neurotoxischere Komponente darstellen, immer mehr an Zustimmung (Dahlgren et al., 2002; Lacor et al., 2007; Lesne et al., 2006; Lue et al., 1999; Walsh et al., 2002). Dafür spricht auch die Tatsache, dass lösliche A $\beta$ -Oligomere bei symptomatischen Alzheimer Patienten gehäuft auftreten, während dies bei nicht symptomatischen Patienten mit Plaques und NFTs nicht der Fall ist (Bjorklund et al., 2012). Zudem konnte an Mäusen gezeigt werden, dass A $\beta$ -Oligomere mit einer geringeren Spinedichte korrelieren, währenddessen kein Zusammenhang für Plaques festgestellt wurde (Mucke et al., 2000). Auch wurde im Tierversuch gezeigt, dass kognitive Defizite ebenso wie Mikrogliaaktivierung und Hyperphosphorylierung von Tau-Protein schon auftreten, wenn noch gar keine A $\beta$ -Plaques vorhanden sind. Die A $\beta$ -Oligomere scheinen also nicht nur direkt synaptotoxisch zu sein, sondern auch andere Pathologien zu induzieren (Tomiya et al., 2010). Auch der ausgebliebene Erfolg früherer Antikörper, die sich gegen den N-Terminus von A $\beta$  richteten, und zwar effektiv in der Beseitigung der Plaques waren, jedoch nicht mit einem kognitiven Benefit assoziiert wurden (zum Beispiel Bapineuzumab), könnte durch diese Hypothese zu erklären sein. Diese Antikörper lösen effektiv Fibrillen aus den Plaques und führen so wahrscheinlich auch zu einer vermehrten Freisetzung von A $\beta$ -Oligomeren, was die Neurotoxizität verstärkt und ein weiteres Indiz dafür ist, dass die löslichen A $\beta$ -Oligomere neurotoxischer sind als die Plaques (Liu et al., 2015). Dementgegen haben lösliche A $\beta$ -Monomere und -Oligomere aber auch positive Effekte. In pikomolaren Konzentration, wie sie bei nicht erkrankten Patienten vorkommen, sind sie in der Lage die LTP und damit die synaptische Plastizität zu verstärken. Dieser Effekt tritt durch eine Interaktion mit präsynaptischen  $\alpha 7$ -nACh-Rezeptoren in Erscheinung und ist möglicherweise der Grund,

warum  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren bisher keine Erfolge erzielten (Puzzo et al., 2008). Für  $A\beta$ -Monomere konnten weiterhin Neuronen-protective Effekte nachgewiesen werden (Giuffrida et al., 2009).

Es lässt sich also festhalten, dass sowohl eine Therapie welche die Bildung von  $A\beta$  gänzlich verhindert als auch eine Therapie welche nur an den  $A\beta$ -Plaques angreift, womöglich keinen klinischen Benefit erzielen wird. Ein gezieltes Angreifen der löslichen  $A\beta$ -Oligomere scheint demnach dringend erforderlich (Rammes et al., 2015).

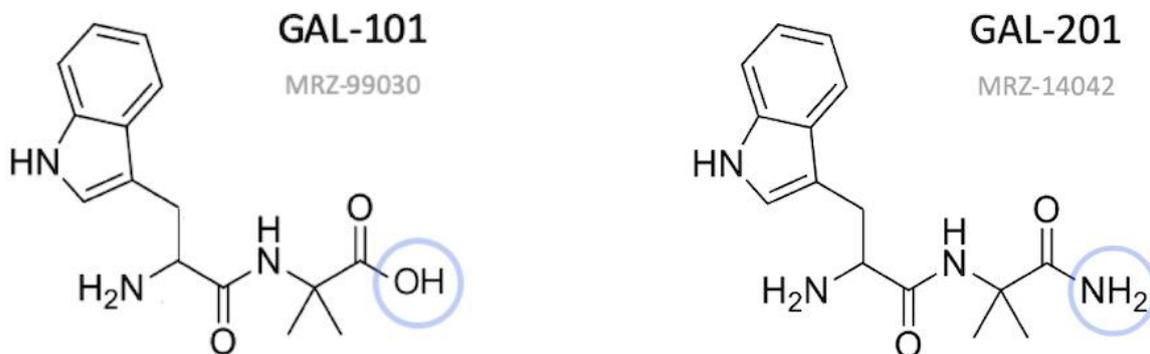
## **1.7 GAL-201 und sein Vorgänger GAL-101**

Bei GAL-201 und seinem Vorgänger GAL-101 handelt es sich um auf einem Dipeptid basierende „small molecules“, welche als  $A\beta$ -Aggregations-Modulatoren fungieren (Parsons et al., 2015; Rammes et al., 2015; Russ et al., 2022). GAL-101 (auch bekannt als MRZ-99030) absolvierte als topisch angewendeter Wirkstoff erfolgreich die klinische Phase I für die Indikationen Glaukom und trockene AMD (Age-Related Macular Degeneration) und steht als Topikum in der Indikation AMD kurz vor der Phase II. Eine orale Applikation bei diesen beiden Indikationen ist ebenfalls geplant (Galimedix Therapeutics, n.d.). Gerade die löslichen Oligomere haben sich als besonders toxisch für retinale Ganglienzellen erwiesen (Guo et al., 2007) und eine hier ansetzende Therapie, insbesondere bei Patienten mit einem Normaldruckglaukom, wird dringend benötigt (Russ, 2016). GAL-101 zeigte in Form von Augentropfen in tierexperimentellen Studien eine deutliche Protektion in Bezug auf die Degeneration retinaler Ganglienzellen (Glaukom-Modell mit oder ohne Therapie) und führte zu einer reduzierten Ablagerung von  $A\beta$  (AMD-Modell Therapie verglichen zu Placebo). Dabei scheint eine Intervallapplikation mit kurzzeitigen Peak-Konzentrationen ausreichend, um einen Detoxifikationsprozess zu induzieren und aufrecht zu erhalten (H.Russ; C.G. Parsons; et al., 2019). GAL-201 hingegen befindet sich in der präklinischen Phase für eine orale Applikation bei Morbus Alzheimer (Galimedix Therapeutics, n.d.). Beide Moleküle binden mit hoher Affinität an die fehlgefalteten  $A\beta$ -Monomere und fördern so deren Aggregation. Sie verfolgen also einen alternativen, nicht-amyloiden Weg bei dem große, amorphe, nicht-toxische  $A\beta$ -Aggregate gebildet werden. Auf diese Weise reduzieren sie die Anzahl der toxischen Oligomere (Parsons et al., 2015). Da sie also nicht direkt die Aggregation der Monomere inhibieren, werden sie als Modulatoren, nicht als Inhibitoren bezeichnet (Rammes et al., 2015; Russ et al., 2022). Schon 2015 zeigte GAL-101, dass es sowohl in Verhaltenstests als auch in Bezug auf CA1-LTP (Langzeitpotenzierung im *Cornu ammonis* 1) in der Lage war, die durch  $A\beta_{1-42}$  hervorgerufenen, synaptotoxischen Effekte zu verhindern. Hierfür zeigte sich eine 10-20-fache

Dosierung von GAL-101 über A $\beta$ <sub>1-42</sub> von Vorteil (Rammes et al., 2015). 2020 zeigte GAL-101 auch nach serieller Verdünnung (s. 3.1.2.3) bei einer Endkonzentration von 0,1 nM eine Prävention und eine Reversibilität in Bezug auf die toxischen Effekte, welche durch 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> ausgelöst wurden (Rammes & Parsons, 2020). Die Idee der seriellen Verdünnung ist, am Anfang eine aktive Konzentration hinzuzugeben und den Wirkstoff dann graduell auszudünnen, sodass am Ende eine Konzentration vorliegt, die weit unter jeglicher pharmakologischen Aktivität liegt. Da die Wirkung der seriellen Verdünnung nicht auf der geringen Wirkstoffkonzentration beruhen kann (eine Inkubation mit 0,1 nM GAL-101 ohne serielle Verdünnung erwies sich nicht als protektiv in Bezug auf CA1-LTP (Rammes & Parsons, 2020)), wird vermutet, dass hier ein Detoxifikationsprozess induziert wurde. Es werden initial hohe Konzentrationen benötigt, um eine erste Aggregation der fehlgefalteten A $\beta$ -Monomere zu bewirken. Diese Aggregate dienen dann als Trigger für weitere Aggregationen, sodass hier ähnlich wie bei einem Prion die Wirksamkeit auf benachbarte Moleküle weitergegeben wird, welche dann zu einer Aggregation verleitet werden. Das heißt, es werden keine konstanten Wirkstoff-Level benötigt und gelegentliche Peak-Konzentrationen sind möglicherweise ausreichend (Rammes & Parsons, 2020). Der vorteilhafte detoxifizierende Effekt blieb auch über eine Stunde, einen Tag und eine Woche aufrechterhalten. Die Verdünnung wurde hier erst nach Ablauf dieser Zeit für den Versuch verwendet (Rammes & Parsons, 2020). Die genaue Struktur der amorphen Cluster ist dabei noch nicht ganz geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass unter Einfluss von GAL-101 die zur Aggregation neigende  $\beta$ -Faltblatt Struktur aufgelöst wird und die zufällige, spulenartige Struktur überwiegt (Parsons et al., 2015). Das Problem von GAL-101 ist jedoch, dass der Wirkstoff schlechter über die Blut-Hirn-Schranke gelangt und daher für die systemische Anwendung bei Morbus Alzheimer weniger gut geeignet ist (Rammes et al., 2015).

Der Wirkstoff GAL-201 (früher MRZ-14042), welcher für die orale Anwendung bei Morbus Alzheimer entwickelt wird, weist demgegenüber eine verbesserte Pharmakokinetik auf. Hier ist die endständige Carboxylgruppe durch eine endständige Amidgruppe ausgetauscht. Dies resultiert bei GAL-201 in einer verbesserten systemischen Bioverfügbarkeit und einer höheren Bindungsaffinität zu A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Russ et al., 2022). Für GAL-201 wurden ebenfalls bereits erste Daten, welche den Einfluss von GAL-201 auf CA1-LTP zeigen, veröffentlicht. Diese werden im Verlauf der Arbeit noch näher betrachtet. Da es für den weiteren Verlauf jedoch wichtig ist, soll hier nur vorweggenommen werden, dass eine Konzentration von nur 10 nM GAL-201 (entsprechend einem Verhältnis von 1:5 GAL-201 über A $\beta$ <sub>1-42</sub>) wirksam ist, was es von bisherigen Wirkstoffkandidaten und auch von GAL-101 unterscheidet. Außerdem wurde

gezeigt, dass die frische serielle Verdünnung nicht nur gegenüber  $A\beta_{1-42}$ , sondern auch gegenüber  $A\beta_{pE3}$  wirksam ist (Russ et al., 2022). Da  $A\beta_{pE3}$  prinzipiell die toxischere Form darstellt und unter den N-Terminal gekürzten Peptiden am häufigsten in den Plaques zu finden ist (Russo et al., 2002), ist dies besonders wichtig. Auch der Antikörper Donanemab (Lilly), der sich gegen  $A\beta_{pE3}$  richtet, erzielte in einer klinischen Phase II Studie erste Erfolge, was die mögliche Relevanz von  $A\beta_{pE3}$  in der Pathogenese unterstreicht (Mintun et al., 2021).



**Abbildung 4: Strukturformeln von GAL-101 und GAL-201**

GAL-201 (früher MRZ-14042) unterscheidet sich von seinem Vorgängermolekül GAL-101 (früher MRZ-99030) durch den Tausch der endständigen Carboxylgruppe in eine Amidgruppe. Dadurch besitzt GAL-201 eine erhöhte orale Bioverfügbarkeit und weist zudem eine erhöhte Bindungsaffinität zu fehlgefaltetem  $A\beta_{1-42}$ -Monomer auf.

## 2 Zielsetzung

Diese Arbeit vertieft und erweitert die bisher gesammelten Daten über das Peptidmolekül GAL-201, welches eine pharmakokinetisch verbesserte Variante von GAL-101 darstellt. Nachdem in Russ et al. (2022) sich bereits 10 nM GAL-201 als pharmakologisch wirksam gegenüber 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> erwiesen haben und auch die serielle Verdünnung sowohl für A $\beta$ <sub>1-42</sub> als auch für A $\beta$ pE3 positive Effekte erzielte, sollen diese Daten nun um A $\beta$ <sub>1-40</sub> und 3NTyr10A $\beta$  erweitert werden, denn auch andere Subtypen rücken zunehmend in den Fokus (siehe Donanemab). Dabei soll ebenso wie zuvor schon für GAL-101 in Rammes and Parsons (2020) beschrieben, auch der Zeitverlauf des vermuteten protektiven Effektes für alle vier Subtypen untersucht werden. Dazu wird die verdünnte Lösung für eine Stunde, einen Tag und eine Woche inkubiert und erst nach Ablauf dieser Zeit appliziert (Rammes & Parsons, 2020). Außerdem sollen auch erstmals molekularbiologische Untersuchungen hinzugezogen werden, um den Mechanismus des protektiven Effektes erweitert zu untersuchen und die Daten der Elektrophysiologie zu ergänzen. Dabei soll zum einen der Einfluss auf die Spinedynamik zum anderen mögliche Effekte auf die Neuroinflammation analysiert werden.

Die gesammelten Daten sollen zu einem umfassenden Gesamtbild über die Wirkung von GAL-201 in der Pathogenese von Morbus Alzheimer beitragen und so einen Übergang zu den „IND-Enabling Studies“ und damit einer klinischen Phase I Studie weiter rechtfertigen. Angesichts der Tatsache, dass die Zahl der Erkrankungen immer weiter steigt und eine kausale Therapie, die zugleich für ein breites Patientenspektrum geeignet, leicht zu applizieren und kostengünstig bereitzustellen ist, dringend benötigt wird, wäre dies äußerst erstrebenswert (Russ et al., 2022).

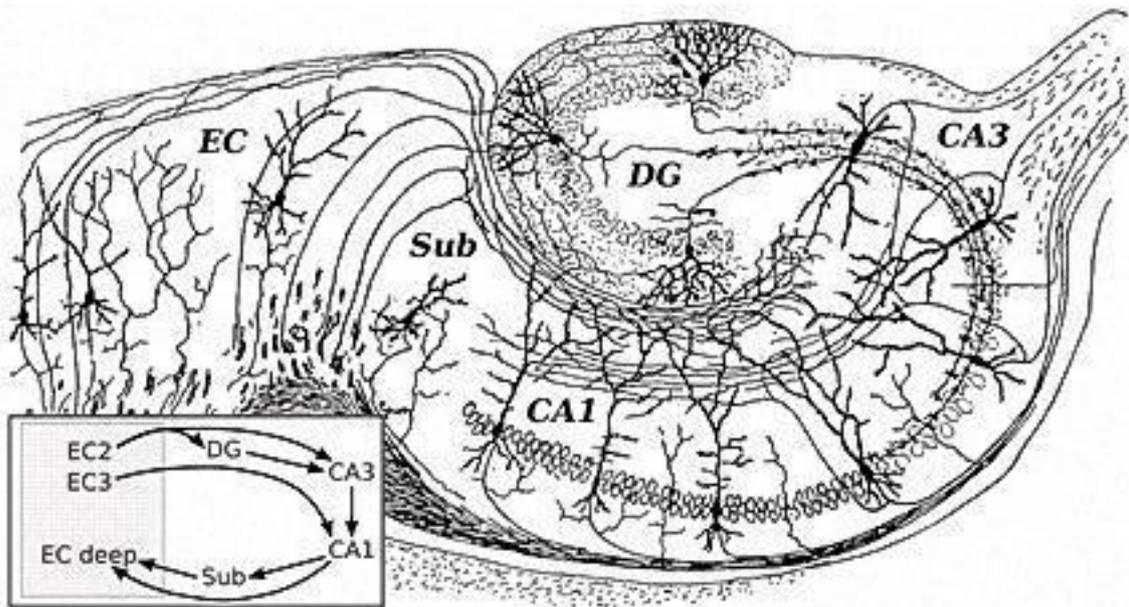
## 3 Material und Methoden

### 3.1 Elektrophysiologie

#### 3.1.1 Theoretische Grundlagen

Der Hippocampus liegt im medialen Teil des Temporallappens (Fogwe LA. Reddy V. Mesfin FB., [Updated 2022 Jul 18]) und ist Teil des limbischen Systems. Er ist verantwortlich für Gedächtnis und Lernen und besteht aus dem *Gyrus dentatus* und dem Ammonshorn (Trepel, 2022a), welche auf beiden Hemisphären eine C-förmige Struktur bilden (Fogwe LA. Reddy V. Mesfin FB., [Updated 2022 Jul 18]). Im weiteren Sinne zählen auch das *Subiculum* und die *Area entorhinalis* zum Hippocampus. Aus der *Area entorhinalis* treten über den *Tractus perforans* Afferenzen zum Hippocampus ein, während Efferenzen über den *Fornix* wieder austreten und über den Papez-Neuronenkreis (*Corpus mamillare* -> *Nucleus anterior* -> *Gyrus cinguli* -> *Area entorhinalis*) wieder zurück zum Hippocampus gelangen. Dieser Schaltkreis des limbischen Systems ist besonders wichtig für die Gedächtnisbildung (Trepel, 2022a).

Innerhalb des Hippocampus erfolgt die Gedächtnisbildung über die Langzeitpotenzierung. Hierbei kommt es über den folgenden Kreislauf zu einer funktionellen Veränderung der Pyramidalzellen im Hippocampus (Trepel, 2022b). Über den entorhinalen Cortex (*Area entorhinalis*) treten Afferenzen ein. Hier vorhandene Pyramidalzellen projizieren diese über den *Tractus perforans* auf die Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, welche sie an die Pyramidalzellen der CA3-Region des Ammonshornes weiterleiten. Von hier werden sie über die Schaffer-Kollaterale auf die Pyramidalzellen der CA1-Region projiziert, von wo aus sie schließlich über das *Subiculum* wieder zum entorhinalen Cortex gelangen (Trepel, 2022b). Dadurch zirkulieren die afferenten Signale und induzieren dabei funktionelle Veränderungen an den Pyramidalzellen, welche zu einer langanhaltenden Erregung führen. Man spricht von Langzeitpotenzierung (Trepel, 2022b). Abbildung 5 zeigt nicht nur die Langzeitpotenzierung, sondern auch die einzelnen Schichten des Hippocampus. Von *extra* nach *intra* verlaufen die Korbzellschicht (*Stratum oriens*), die Pyramidalzellschicht (*Stratum pyramidale*) und die Molekularschicht (*Stratum moleculare*), welche nochmal in *Stratum radiatum* und *Stratum lacunosum* unterteilt werden kann (Trepel, 2022b). Das *Stratum radiatum* dient dabei vor allem der Verknüpfung zwischen den Pyramidalzellen von CA3 und CA1 (Purves D. Augustine GJ. Fitzpatrick D. et al. editors, 2001b).



**Abbildung 5: Gezeichneter Hippocampus von Santiago Ramón y Cajal (1911)**

Entnommen von: Figur 3 (Ortega-Martínez, 2017). In dieser Zeichnung des Hippocampus sind nicht nur die wichtigsten hippocampalen Strukturen, sondern auch die Weiterleitung afferenter Signale bei einer Langzeitpotenzierung dargestellt. Details sind dem Fließtext zu entnehmen.

Die elektrische Stimulation der Schaffer-Kollaterale (stellen die Axone der CA3-Pyramidalzellen dar) führt an den postsynaptischen CA1-Pyramidalzellen zu einem exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP). Bei nur zwei bis drei Stimuli in der Minute bleibt dieses Potential konstant. Bei einem starken, hochfrequenten Stimulus hingegen (tetanische Stimulation) kommt es zu einem langanhaltenden Anstieg in der Amplitude des EPSPs (Purves D. Augustine GJ. Fitzpatrick D. et al. editors, 2001b). Diesen Prozess nennt man Langzeitpotenzierung (LTP), welche über den Kreislauf (entorhinaler Cortex -> *Gyrus Dentatus* -> CA3 -> CA1 -> entorhinaler Cortex) gefördert wird (Trepel, 2022b). Durch stärkere Stimuli werden neben den AMPA-Rezeptoren auch die NMDA-Rezeptoren aktiviert, was einen verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx bewirkt. Es kommt zu einer Aktivierung der CaMKII, welche wiederum AMPA-Rezeptoren phosphoryliert und somit zu einer verstärkten Insertion dieser führt und LTP fördert. Gleichzeitig wird auch die Genexpression von Proteinen, welche für die Langzeitpotenzierung essenziell sind, gefördert (Benarroch, 2021a). Dadurch wird die Spinedichte erhöht, was insgesamt zu einer Verstärkung der synaptischen Transmission führt (Moser, 1994). Das Gegenteil, die Langzeitdepression (LTD) wird durch inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) ausgelöst. Hierbei kommt es infolge einer geringen Glutamat-Freisetzung aus der Präsynapse zu einer Dephosphorylierung und Internalisierung von AMPA-Rezeptoren (Benarroch, 2021a). Dies führt zur Re-/Hyperpolarisation und das EPSP wird gehemmt (Purves D. Augustine GJ. Fitzpatrick D. et al. editors, 2001a). Diese

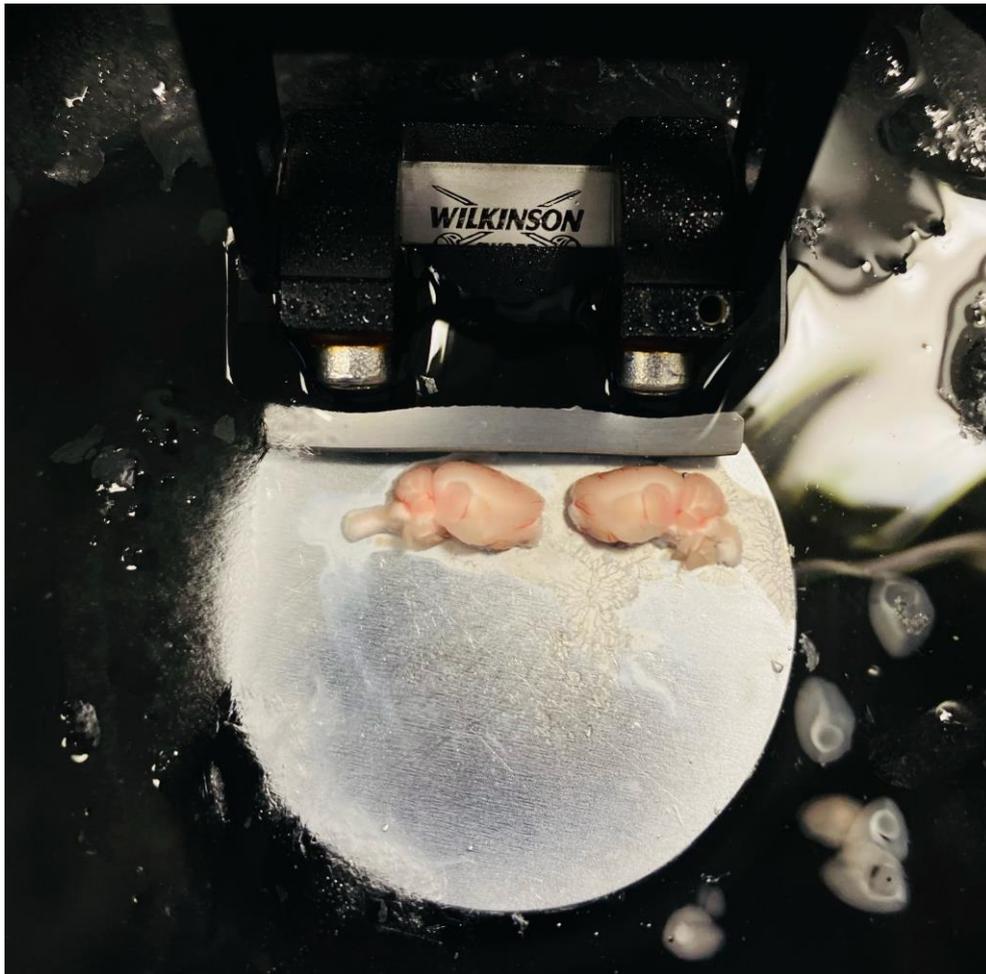
Anpassungsfähigkeit in der Effizienz der synaptischen Neurotransmission als Reaktion auf unterschiedlich starke Stimuli bezeichnet man als synaptische Plastizität (Benarroch, 2021a). Sie stellt die Grundlage für die Informationsverarbeitung im Gehirn dar (Trepel, 2022b). Dabei wird die Art der Informationsverarbeitung über die unterschiedlichen Eigenschaften der Langzeitpotenzierung reguliert. LTP ist statusabhängig, was bedeutet, dass ein einzelner Stimulus kein LTP auslöst. Trifft er aber auf eine stark depolarisierte Zelle, ist das EPSP verstärkt. Da dies nur funktioniert, wenn die postsynaptische Depolarisation direkt auf die präsynaptische Transmitterfreisetzung erfolgt, werden so nur aktivierte Signalwege gefördert (Purves D. Augustine GJ. Fitzpatrick D. et al. editors, 2001b). Außerdem ist es möglich, gezielt eine Synapse beziehungsweise ein Synapsen-Set zu aktivieren, während inaktive Synapsen derselben Zelle unberührt bleiben. Dies nennt man Input-Spezifität. Sie ist wichtig, um eine bestimmte Information zu vermitteln (Purves D. Augustine GJ. Fitzpatrick D. et al. editors, 2001b). Eine weitere Funktion ist die Assoziativität. Hierbei kann ein schwach stimulierter Signalweg ebenfalls der Langzeitpotenzierung unterliegen, wenn ein benachbarter Signalweg derselben Zelle stark stimuliert ist. Man vermutet, dass diese Funktion genutzt wird, um Informationen miteinander zu verknüpfen (Purves D. Augustine GJ. Fitzpatrick D. et al. editors, 2001b).

### **3.1.2 Versuchsdurchführung**

#### *3.1.2.1 Präparation der Gehirnschnitte*

Die Versuchsprotokolle wurden von der Ethikkommission für Tierpflege- und -nutzung der Regierung Oberbayern genehmigt. Für die Versuche wurden junge, männliche C57BL/6 Mäuse (Charles River) im Alter zwischen acht und zwölf Wochen verwendet. Die Tiere wurden in einem 12h hell/dunkel Zyklus bei *ad libitum* Futter und Wasser gehalten. Unter Isofluran Anästhesie wurden sie dekapitiert und das Gehirn anschließend in eiskalter Präparations-Ringer-Lösung (125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 25 mM D-Glukose; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 6 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.3 – für CAS-Nummern siehe Tabelle 2 unter 9.1), unter dauernder Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>) entnommen und in zwei Hemisphären geteilt. Diese wurden dann mit der Schnittseite nach unten mit Cyanoacrylat-Kleber auf einen metallenen Schneideblock geklebt. Der Metallblock wurde anschließend in ein Mikrotom (Microm HM 650V Thermo Fischer) eingesetzt, welches die beiden Gehirnhälften in sagittale, 350µm dicke Schnitte schnitt (Abbildung 6). Nach Isolierung des Hippocampus wurden die Schnitte zur Erholung in eine Carbogen-begaste Kammer mit künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF: 125 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 25 mM D-Glukose;

25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7.3 – für CAS-Nummern siehe Tabelle 2 unter 9.1) überführt. Dort blieben sie 30 Minuten bei 35°C und anschließend 60 Minuten bei Raumtemperatur, um sich von der Präparation zu erholen (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).



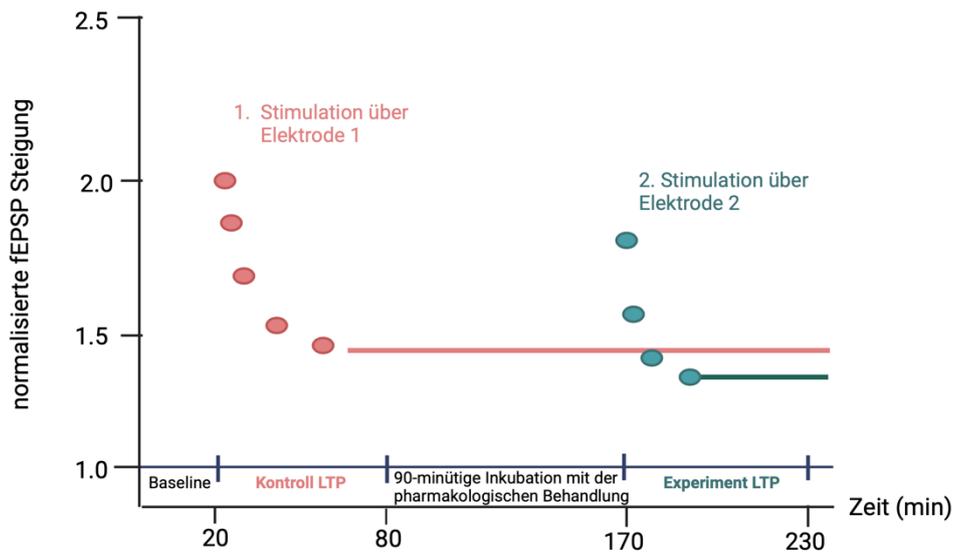
**Abbildung 6: Sagittales Schneiden der beiden Gehirnhälften im Mikrotom**

Die mit der Schnittkante nach unten aufgeklebten Gehirnhälften werden in eiskalter Präparations-Ringer-Lösung unter Carbogen-Begasung mittels eines Mikrotoms in 350 µm dicke, sagittale Schnitte geschnitten.

*3.1.2.2 Elektrophysiologische Messung*

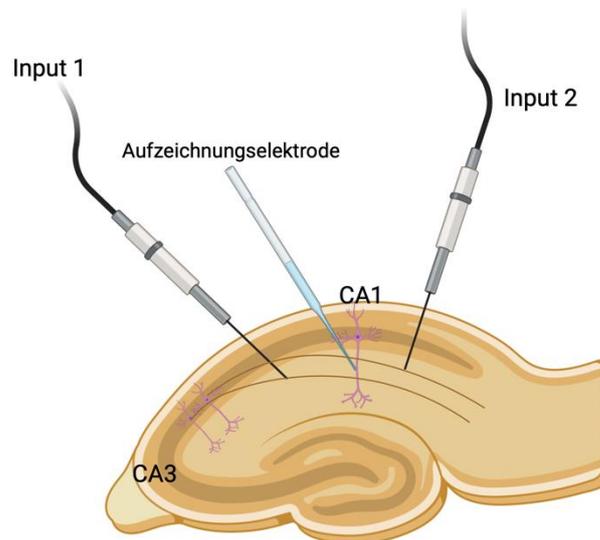
Nach Ablauf der 90-minütigen Ruhephase wird ein Schnitt für die Messung ausgewählt und ins LTP-Setup transferiert. Er wird mit Hilfe eines kleinen, Platin-gefassten Nylon-Gitters mittig in der Kammer platziert, wobei diese kontinuierlich mit carbogeniertem aCSF (4ml/min) gespült wird. Um die extrazellulären Feldpotentiale (fEPSPs) zweier nicht überlappender Populationen der Schaffer-Kollaterale zu messen, werden zunächst als Stimulationselektroden

zwei bipolare, gedrehte Wolfram-Elektroden (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatur; Durchmesser der Spitze: 50µm; isoliert) im *Stratum radiatum* im Bereich der CA1 Region platziert. Dazwischen wird dann, ebenfalls in der CA1 Region, die Aufzeichnungselektrode gesetzt. Hierzu dient eine mit aCSF gefüllte Mikropipette aus Borosilikat-Glas (Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatur, Germany) die an der geöffneten Spitze einen Widerstand von 1-2 MΩ aufweist. Die Stimulus-Intensität wird so gewählt, dass Potentiale mit 25-30% der maximalen Antwort erzeugt werden, wobei im alternierenden Rhythmus alle 15 Sekunden ein Stimulus abgegeben wird. Aus diesen beiden Werten wird dann jeweils ein Mittelwert für die Messung gebildet. Nach einer 60-minütigen Inkubation mit 0,1 nM GAL-201 erfolgt die erste HFS (High Frequency Stimulation mit (100 Hz)) zunächst mit einer beliebigen Elektrode und dient als interne Kontrolle für die Gesundheit des Schnittes. Hier wird 60 Minuten lang aufgezeichnet, dann folgt eine 90-minütige Inkubation der pharmakologischen Behandlung (50 nM Aβ oder serielle Verdünnung (vgl. Abbildung 9) von GAL-201 mit 50 nM Aβ). Danach wird durch die andere Elektrode die zweite HFS abgegeben und die Antwort wieder für 60 Minuten aufgezeichnet. Dabei wird die Steigung des fEPSP zwischen 20 und 80% der Peak Amplitude gemessen, welche anschließend auf die mittlere Steigung der Baseline normalisiert wird. Die fEPSPs werden verstärkt (BA-2S, npi electronic, Germany) und mittels einer laboratorischen Schnittstelle (ITC-16, Instrutech Corp., USA) und dem Programm WinLTP Version 2.4 (<http://www.winltp.com/Ltp24/indexLtp24.htm>) gefiltert (3kHz) und digitalisiert (9kHz). Die Normalisierung der Daten erfolgt mit Excel (Version 2016, Microsoft). Man spricht von einem induzierbaren LTP, wenn die Steigung des fEPSP 60 Minuten nach der HFS noch mehr als 120% beträgt (hierfür wird der Mittelwert der letzten 10 Minuten gebildet). Die anschließende grafische Auswertung erfolgt mit GraphPad Prism (Version 8, Dotmatics). Alle Versuche werden bei Raumtemperatur (22-24°C) durchgeführt (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Da die Versuche zeitintensiv sind, wurden Kontrollexperimente durchgeführt, die sicherstellten, dass über die maximale Dauer von fünf Stunden, der Einfluss auf die Langzeitpotenzierung nicht zeitabhängig ist (Rammes & Parsons, 2020). Abbildung 7 zeigt noch einmal den zeitlichen Verlauf des Experimentes, Abbildung 8 die Platzierung der Elektroden.



### Abbildung 7: Schematische Darstellung des Experimentes

Created with BioRender.com - Nach einer 60-minütigen Inkubation mit 0,1 nM GAL-201 erfolgt die erste HFS (100 Hz) zunächst mit einer beliebigen Elektrode und dient als interne Kontrolle für die Gesundheit des Schnittes. Hier wird 60 Minuten lang aufgezeichnet, dann folgt eine 90-minütige Inkubation der pharmakologischen Behandlung (50 nM A $\beta$  oder serielle Verdünnung von GAL-201 mit 50 nM A $\beta$ ). Danach wird durch die andere Elektrode die zweite HFS abgegeben und die Antwort wieder für 60 Minuten aufgezeichnet.



### Abbildung 8: Platzierung der Elektroden

Created with BioRender.com - basierend auf Figur 1A (Haley et al., 1996). Um die extrazellulären Feldpotentiale (fEPSPs) zweier nicht überlappender Populationen der Schaffer-Kollaterale zu messen, werden zunächst die beiden Stimulationselektroden im Stratum radiatum im Bereich der CA1 Region platziert. Dazwischen wird dann, ebenfalls in der CA1 Region, die Aufzeichnungselektrode gesetzt.

### *3.1.2.3 Aufbereitung von Amyloid- $\beta$ und GAL-201 sowie Herstellung der seriellen Verdünnung*

#### Aufbereitung von A $\beta$

1 mg A $\beta$ <sub>1-42</sub> wird in 400  $\mu$ l Hexafluoroisopropanol 100% (HFIP) gelöst und 90 Minuten bei Raumtemperatur (22-24°C) inkubiert. Anschließend werden 100  $\mu$ g aliquotiert und das HFIP entzogen, indem es, um die Proteine vor der Denaturierung zu schützen, so lange bei Raumtemperatur abgeraucht wird, bis alles verdampft ist (circa 30 Minuten). Die A $\beta$ -Aliquote werden bei -80°C gelagert und erst bei Gebrauch in DMSO (99,9%) gelöst (Endkonzentration 100  $\mu$ M) und mit aCSF zur experimentell benötigten Konzentration gebracht. Die Vorbereitung von A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ pE3 erfolgt analog dazu. Bei der Herstellung von 3NTyr10A $\beta$  wird A $\beta$ <sub>1-42</sub> gemäß des im Anhang vorzufindenden Protokolls zur Herstellung von 3NTyr10A $\beta$  (9.2) zunächst in NaOH gelöst und auf Trockeneis gelagert. Anschließend wird mit Pi-Puffer verdünnt und eine Minute mit Peroxynitrit inkubiert. Danach wird filtriert und dreimal mit Pi-Puffer gewaschen. Resuspendiert wird abermals mit Pi-Puffer und dann gleichermaßen bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Lösung hat ebenfalls eine Konzentration von 100  $\mu$ M und kann direkt mit aCSF weiter verdünnt werden (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Die hier verwendeten Chemikalien sind unter 9.1 Tabelle 3 aufgelistet.

#### Aufbereitung von GAL-201

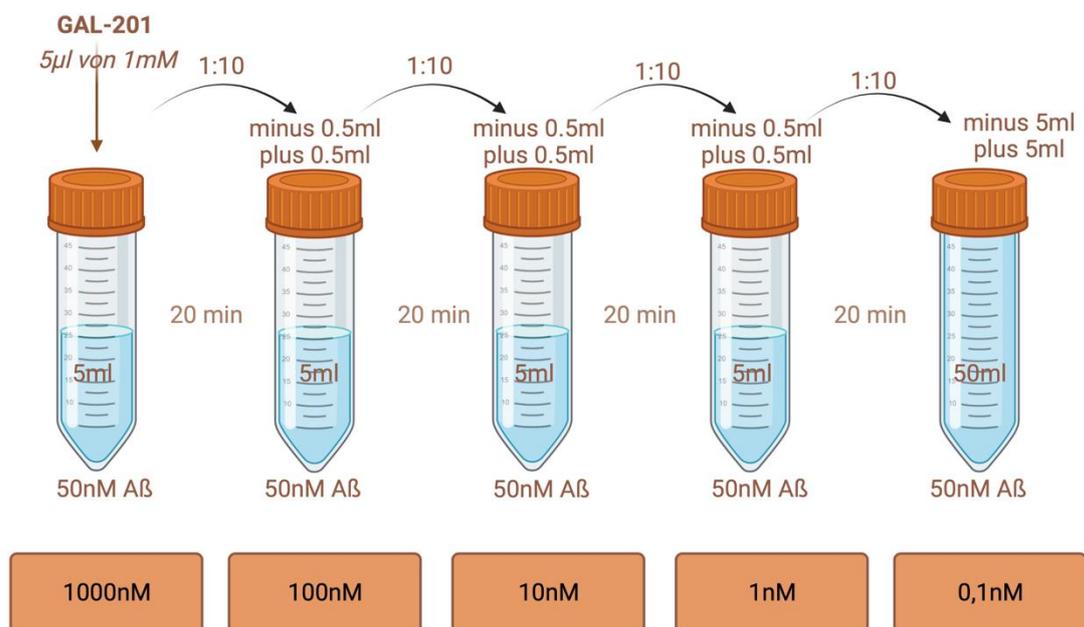
Das verwendete GAL-201 liegt als Fumarat-Salz vor. Unter Beachtung dessen, wird die Einwaage für 1,5 ml einer 10 mM Stammlösung berechnet und eventuelle Wäge-Fehler durch Volumen Anpassung ausgeglichen. Die Lösung der Substanz erfolgt mit MQ-H<sub>2</sub>O. Daraus werden 50  $\mu$ l Aliquote einer 1 mM Arbeitslösung durch Verdünnung mit aCSF hergestellt. Diese dient für alle weiteren Verdünnungen mit GAL-201 (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Alle Informationen über das verwendete GAL-201 finden sich unter 9.1 Tabelle 4.

#### Herstellung der seriellen Verdünnung (GAL-201/A $\beta$ SD5)

Die Herstellung der applizierten GAL-201/A $\beta$  Verdünnung (im Folgenden GAL-201/A $\beta$ SD5) erfolgt analog zu Rammes and Parsons (2020) und Russ et al. (2022) sowie analog zu Riemann & von Ahsen et al. in preparation in vier Verdünnungsschritten (Abbildung 9). Jedes der fünf vorbereiteten Reaktionsgefäße enthält aCSF und eine A $\beta$ -Konzentration von 50 nM. Im ersten Schritt wird eine Konzentration von 1000 nM GAL-201 hinzugegeben (entsprechend 20:1 GAL-201 über A $\beta$ ). Nach 20 Minuten wird 1:10 verdünnt, dieser Schritt wird dreimal wiederholt, sodass im letzten Reaktionsgefäß eine Endkonzentration von 0,1 nM GAL vorliegt. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:10.000 und einem stöchiometrischen A $\beta$  über GAL-

201 Verhältnis von 500:1. Diese Konzentration liegt weit unterhalb jeglicher pharmakologischen Aktivität. Die Idee ist hier, am Anfang eine aktive Konzentration hinzuzugeben und dann seriell zu verdünnen, sodass eine Detoxifikation induziert wird, die sich durch einen Prionen-ähnlichen Mechanismus auf andere A $\beta$ -Peptide überträgt (Rammes & Parsons, 2020; Riemann & von Ahsen et al. in preparation; Russ et al., 2022).

In dieser Arbeit soll es darum gehen, den zeitlichen Verlauf des protektiven Effektes von GAL-201 zu untersuchen. Die serielle Verdünnung der unterschiedlichen A $\beta$ -Subtypen wird dazu eine Stunde, einen Tag oder eine Woche bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im LTP-Experiment appliziert. Für jede Gruppe wird dabei ein biologisches n von acht generiert.



**Abbildung 9: Schema der seriellen Verdünnung**

Created with BioRender.com - basierend auf Figur 1 (Rammes & Parsons, 2020) und Figur 5 (Russ et al., 2022) sowie in Anlehnung an Riemann & von Ahsen et al. in preparation. Details sind dem Fließtext zu entnehmen.

## 3.2. Analyse der Spines (Golgi-Färbung)

### 3.2.1 Theoretische Grundlagen

Die Golgi-Färbung wurde 1873 von dem italienischen Arzt Camillo Golgi entdeckt (Golgi C., 1873). Im Gegensatz zu früheren Färbemethoden des 19. Jahrhunderts, brachte diese Methode den Vorteil mit sich, dass nur ein Teil der Zellen gefärbt wird und somit weniger Überlappungen einzelner Neurone stattfinden. Dies erleichtert die Unterscheidung von Axonen und Dendriten

und macht eine Analyse einzelner Dendriten möglich (Saceleanu et al., 2022). Die Methode beruht auf einer Färbung mit Silbernitrat, nach vorheriger Imprägnation und Härtung des Gewebes mit Kaliumchromat/Kaliumdichromat. Das dadurch entstehende Silberchromat sorgt für eine tief dunkle, fast schwarze Färbung der Neurone auf einem hellen Hintergrund (Baloyannis, 2015; Fregerslev et al., 1971). Die Methode wurde insbesondere durch die Arbeiten von Santiago Ramon y Cajal bekannt (Ramon y Cajal S., 1909, 1954) und wurde seitdem vielfach modifiziert und weiterentwickelt (Zhang et al., 2003). So existiert neben der ursprünglichen Silberfärbung beispielsweise noch die „Rapid Golgi“ Methode, bei der Osmium in der Fixation eingesetzt wird, die „Golgi-Kopsch“ Methode, bei der Osmium durch Aldehyde ausgetauscht ist und die „Golgi-Cox“ Methode, bei der das Silber durch Quecksilber ausgetauscht ist (Kang et al., 2017; Zhang et al., 2003). Manchmal kommt, für eine besonders detaillierte Darstellung der Neurone, auch eine Goldfärbung zum Einsatz (Fairen et al., 1977).

In dieser Arbeit geht es darum, mit Hilfe der Golgi-Färbung dendritische Spines zu analysieren, welche als kleine Dornfortsätze der Dendriten den wesentlichen Teil der exzitatorischen Postsynapsen beinhalten (Fiala et al., 2002). Dabei kann ein Spine auch mehr als eine Synapse beinhalten (Popov & Stewart, 2009). Wie in der Übersichtsarbeit von Dorostkar et al. (2015) dargestellt, gehen LTP und LTD mit morphologische Änderungen in Form und Zahl dieser Spines einher, was innerhalb von Minuten erfolgt und die Grundlage für synaptische Plastizität darstellt. Während die langen, schmalen Filopodia Spines sehr beweglich sind und möglicherweise den frühen, initialen Kontakt herstellen (Kater & Rehder, 1995), bieten die breiten Mushroom Spines mehr Platz für eine erhöhte Rezeptordichte und sind damit wichtig bei der Ausbildung einer Langzeitpotenzierung (Matsuzaki et al., 2001). Aber nicht nur die Art der Spines, auch die Anzahl der Spines moduliert synaptische Plastizität. So geht eine erhöhte Spinedichte mit einer erhöhten Neurotransmission einher, was für Lernprozesse essenziell ist (Fiala et al., 2002). Während nicht mehr benötigte Synapsenverbindungen gezielt gelöscht werden, entstehen neue Verbindungen, welche bei wiederholtem Gebrauch stabilisiert werden. So findet eine kontinuierliche Neuvernetzung statt (Xu et al., 2009). Dabei wird das Remodelling vor allem über BDNF vermittelt (Bliss & Cooke, 2011). In neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, wurde durch die Golgi-Färbung eine deutliche Reduktion der Spinedichte nachgewiesen (Baloyannis, 2015), was mit einer verstärkten synaptischen Dysfunktion und einer Einschränkung der Kognition einhergeht (Terry et al., 1991). Es wurde zudem gezeigt, dass es weniger die Plaques sind (Terry et al., 1991), welche mit dem Spineverlust assoziiert sind, sondern mehr die Oligomere (Koffie et al., 2012).

Um diesen Aspekt und damit einhergehend den Einfluss von GAL-201 auf die Spinedichte zu untersuchen, wird eine Golgi-Färbung mit Silbernitrat durchgeführt. Diese Methode bietet gegenüber neueren Methoden wie der Fluoreszenzfärbung den Vorteil, dass die Bilder schneller erstellt werden können als im Konfokalmikroskop und die Präparate länger haltbar sind (Risher et al., 2014). Aufgrund der hohen Probenanzahl wurde daher für die Golgi-Färbung entschieden. Zur Analyse der Spinedichte wird die „rapid Golgi spine analysis Methode“ nach Risher et al. (2014) verwendet. Diese stellt eine semi-automatische Methode zur Analyse von Spines dar, was heißt, dass die Spines händisch nachgezeichnet werden, eine Berechnung und Klassifizierung der Spines jedoch automatisch erfolgt (Risher et al., 2014).

### 3.2.2 Versuchsdurchführung

#### 3.2.2.1 Färbung und Mikroskopie der Schnitte

Für die Färbung wird das *sliceGolgi* Kit von der Firma Bioenno Tech LLC (Katalognummer: 003760) einschließlich des Protokolls verwendet (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Das Set eignet sich für eine frei-schwebende Imprägnation von Schnitten mit einer Schichtdicke zwischen 50 und 400µm. Es beinhaltet einige Lösungen, die der Fixation, Imprägnation und Färbung der Schnitte dienen und die unter 9.1 Tabelle 5 genauer aufgelistet sind. Zudem muss, gemäß des von Bioenno Tech LLC beigefügten Protokolls, noch ein 0,1 M PB-Puffer und ein 0,01 M PBS-T Puffer zum Waschen und Lagern der Schnitte selbst hergestellt werden. Die jeweiligen Einwaagen und verwendeten Chemikalien befinden sich im Anhang unter 9.1 Tabelle 6.

Am Tag der Probengewinnung (als Probe dient mit Ausnahme der naiven Kontrollschnitte immer der Schnitt aus dem LTP-Versuch) werden die Schnitte zunächst über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Dazu werden die Lösungen A1 bis A3 gemäß dem Protokoll gemischt und verdünnt. Am nächsten Tag wird die Fixationslösung durch 0,1 M PB-Puffer ersetzt. Die anschließende Imprägnation erfolgt mit einer 1:4 Verdünnung von Lösung B. Hierzu werden die Schnitte in einem geschlossenen Plastikgefäß für sieben Tage bei Raumtemperatur (22-24°C) im Dunklen aufbewahrt. Dabei wird nach dem ersten Tag die Imprägnationslösung noch einmal erneuert. Dann folgt für die gehärteten Schnitte eine Wasch- und Färbestraße nach den folgenden Schritten:

- |                             |             |
|-----------------------------|-------------|
| 1. Milli-Q H <sub>2</sub> O | 45 Sekunden |
| 2. PBS-T                    | 5 Minuten   |
| 3. PBS-T                    | 5 Minuten   |

4. PBS-T	5 Minuten
5. Färben mit Lösung C	8 Minuten
6. PBS-T	45 Sekunden
7. Nachbehandlung mit Lösung D	4 Minuten
8. PBS-T	5 Minuten
9. PBS-T	5 Minuten
10. PBS-T	5 Minuten
11. Ethanol 50%	5 Minuten
12. Ethanol 75%	5 Minuten
13. Ethanol 99%	5 Minuten

Nach Trocknung der Schnitte mit Ethanol (Otto-Fischer GmbH, Ch-B: 7121084) werden sie 15 Minuten lang in Xylene (Sigma Aldrich, CAS: 106-42-3) geklärt. Dann werden sie mit „DAKO Mounting Medium“ (Agilent, CS70330-2) auf zuvor mit Poly-L-Lysin (0,1%, Sigma Aldrich, CAS: 25988-63-0) überzogene Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas eingeschlossen. Die so erhaltenen Langzeitpräparate werden bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

#### Herstellen der Poly-L-Lysin überzogenen Objektträger

Die Objektträger werden zunächst 5 Minuten lang in Chloroform (Roth, CAS: 67-66-3) entfettet. Nachdem sie vollständig getrocknet sind, werden sie, für eine bessere Haftung der Schnitte, mit Poly-L-Lysin (0,1%, Sigma Aldrich, CAS: 25988-63-0) überzogen und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

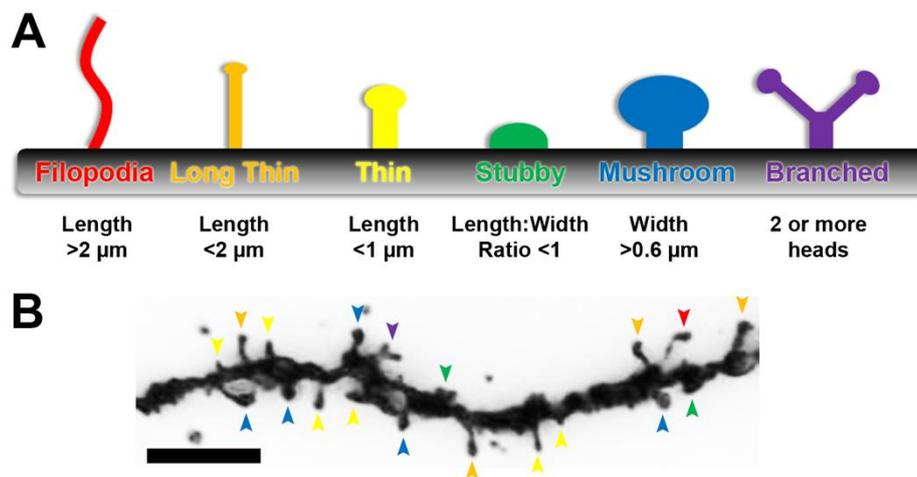
#### Mikroskopie

In jedem Schnitt werden fünf Dendriten der CA1 Region ausgewählt und mit einem 63er-Öl-Immersionsobjektiv (Apotom Zeiss – AxioCam 503 Mono) ein Z-Stapel der Region erstellt. Nach der Aufnahme kann mit Hilfe von Zen 3.0 (blue edition) ein spezifischer Bildausschnitt erstellt werden (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

#### *3.2.2.2 Auswertung der Bilder*

Die Auswertung der Bilder erfolgt analog zu Risher et al. (2014) nach der „rapid Golgi Analysis“-Methode. Hierzu werden die Aufnahmen zunächst in Fiji (<https://imagej.net/software/fiji/downloads>) optimiert (Eingrenzung der Bilderfolge und Kontrastanpassung). Die als JPEG separat gespeicherte Bilderfolge wird dann zur Analyse der

Spines mit dem frei erhältlichen Programm RECONSTRUCT geöffnet und bearbeitet (<https://synapseweb.clm.utexas.edu>) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Es wird jeweils ein Spine-Abschnitt von mindestens 10 microns ausgewählt und die Analyse wie im Paper von Risher et al. (2014) beschrieben durchgeführt. Dabei wird die exakte Länge des Dendriten, sowie Breite und Länge der Spines händisch nachgezeichnet und die Spines anhand ihrer Breite und Länge wie folgt (Abbildung 10) charakterisiert:



**Abbildung 10: Klassifizierung der Spines nach Risher et al. (2014)**

Abbildung übernommen aus: (Risher et al., 2014), Figur 1. Nach dieser Klassifizierung sind Filopodia Spines länger als 2  $\mu\text{m}$ . Beträgt die Länge zwischen 1 und 2  $\mu\text{m}$  werden sie als Long-Thin Spines bezeichnet. Bei einer Länge von unter 1  $\mu\text{m}$  spricht man von Thin Spines. Liegt das Verhältnis von Länge zu Breite bei einem Wert von unter 1, handelt es sich um Stubby Spines. Bei einer Breite von > 0,6  $\mu\text{m}$  sind sie dagegen den Mushroom Spines zuzuordnen. Von Branched Spines spricht man, wenn es zwei oder mehr Spineheads gibt.

Die Daten werden in Excel (Version 16, Microsoft) importiert und mit dem, von den Autoren zur Verfügung gestellten Template, ausgewertet. Aus fünf Dendriten eines Schnittes wird jeweils ein Mittelwert gebildet. Die anschließende grafische Auswertung erfolgt mit GraphPad Prism (Version 8, Dotmatics) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Hier wird ein biologisches n von sechs bis acht generiert.

### 3.3 FACS

#### 3.3.1 Theoretische Grundlagen

Das „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) oder zu Deutsch die Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode zur Bestimmung der Zellgröße und der Granularität, wobei über

Fluoreszenzmarkierung auch die Expression verschiedener Strukturen gemessen werden kann. Das Prinzip beruht auf einer Laser-induzierten Lichtemission, welche detektiert wird. Bei der Durchflusszytometrie wird die Probe in einen laminaren Probenstrom eingebracht und durch eine im 90° Winkel eintreffende Laserstrahlung angeregt. Das Laserlicht besitzt dabei abhängig von der Art des Lasers eine bestimmte Wellenlänge, ist also monochromatisch und wird über eine Fokussierungslinse gebündelt. Nach Auftreffen auf den laminaren Probestrom wird ein Teil der Strahlung nach vorne emittiert (FSC=Forwardscatter) und ein Teil seitlich im 90° Winkel (SSC = Sidescatter). Der FSC gibt dabei Auskunft über die Größe der Partikel, der SSC über die Granularität dieser. Bei einer Fluoreszenzmarkierung durch Farbstoffe oder Fluoreszenz-markierte Antikörper wird ein Teil der Lichtenergie absorbiert und energieärmeres Licht höherer Wellenlängen emittiert. Über Spiegel wird dieses Licht dann aufgeteilt und umgelenkt, sodass es auf verschiedene Filter trifft, welche jeweils nur eine, für jedes Fluorophor spezifische, Wellenlänge durchlassen. Somit ist es möglich, verschiedene Fluorophore nebeneinander in einer Probe zu betrachten. Nach Auftreffen auf den Filter wird das Signal detektiert, verstärkt und digitalisiert. Da die Fluorophore aber zumeist in einem größeren Bereich um ihr Absorptionsmaximum emittieren und sich diese Emissionswellenlängenbereiche bei einzelnen Fluorophoren trotz unterschiedlicher Absorptionsmaxima dennoch überschneiden können, ist eine Kompensation notwendig, um eine eindeutige Zuordnung zu ermöglichen. Dabei werden die Einstellungen so gewählt, dass die Überschneidungen wegfallen (Luttmann, 2014).

### **3.3.2 Versuchsdurchführung**

Vor diesem Hintergrund wurde für die FACS-Messungen das Antikörperpanel aus Tabelle 1 genutzt.

#### **Probengewinnung und -vorbereitung:**

Die Schnitte für die FACS-Analyse werden parallel zu den LTP-Versuchen in einer separaten Inkubationskammer inkubiert (n = 8). Da von den 50 ml GAL-201/A $\beta$ SD5 nur 40 ml für den LTP-Versuch benötigt werden, bleiben 10 ml der Verdünnung für die kleine Inkubationskammer übrig. Es wird 90 Minuten lang inkubiert und anschließend Hippocampus und Cortex in zwei verschiedene Eppendorfgefäße separiert. Der Verdau des Gewebes erfolgt wie folgt (Riemann & von Ahsen et al. in preparation):

1. 1 ml Aufschlusslösung (EDTA + L-Lysin + PBS-Puffer, siehe 9.1 Tabelle 7) und 10  $\mu$ l Papain (aus Carica Papaya, Sigma Aldrich, CAS: 9001-73-4) zum Gewebe hinzugeben

2. Inkubation für 15 Minuten im Wasserbad bei 37 °C
3. Mechanisches Auftrennen des Gewebes durch gründliches Mischen
4. Filtration der Zellsuspension durch 70 µm Filter (Avantar VWR® Cell Strainer, Katalognummer: 732-2758) um zu große Partikel, welche das FACS-Gerät verstopfen würden, zu entfernen
5. Mit 1 ml PBS-Puffer 1x (siehe 9.1 Tabelle 7) nachspülen
6. Alles in ein frisches Eppendorfggefäß überführen
7. Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 600 G) und Überstand verwerfen
8. In 500 µl Freezing-Medium (DMEM (1x) + GlutaMax™ – I mit 10 % DMSO, siehe 9.1 Tabelle 7) resuspendieren und bei -20 °C lagern

### **Vorbereitungen vor der Messung:**

1. Proben langsam auftauen (4 °C → Raumtemperatur)
2. Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 600 G) und Überstand verwerfen
3. Resuspendieren mit 1 ml PBS-Puffer 1x und vorsichtig mischen (*Waschen*)
4. Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 600 G) und Überstand verwerfen
5. Resuspendieren mit 1 ml PBS-Puffer 1x und vorsichtig mischen (*Waschen*)
6. *Zählen der Zellen in der Neubauer Zählkammer: Da eine Konzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/ml nach einigen Testläufen nie überschritten wurde, entfiel dieser Schritt für die restlichen Proben*
7. Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 600 G) und Überstand verwerfen
8. *Fixierung:* In 200 µl FixPerm (siehe 9.1 Tabelle 7) resuspendieren und 30 min bei 4 °C inkubieren (Fixierung soll Antigene über einen längeren Zeitraum stabil halten)
9. *Permeabilisierung:* Mit 50 µl PermWash (siehe 9.1 Tabelle 7) waschen, zentrifugieren (5 min, 4 °C, 600 G) und Überstand verwerfen, dann in 200 µl PermWash (siehe 9.1 Tabelle 7) resuspendieren, zentrifugieren (5 min, 4 °C, 600 G) und Überstand verwerfen (dient der Permeabilisierung der Zellmembran, um diese für die Antikörper durchlässig zu machen)
10. *Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen:* 50 µl Blockungs-Lösung (49 µl PermWash + 1 µl TrueStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) siehe 9.1 Tabelle 7) zum Zellpellet hinzufügen, gut mischen und 5 min bei 4°C im Dunkeln inkubieren
11. Antikörper-Mastermix vorbereiten
12. 13 µl Mastermix zu jeder Probe hinzufügen und gut mischen
13. Bei 4 °C über Nacht im Dunkeln inkubieren

14. *Waschen*: 100 µl PermWash (s. 9.1 Tabelle 7) hinzufügen, gut mischen, zentrifugieren (5 min, 4°C, 600 G) und Überstand verwerfen
15. *Fixierung der gebundenen Antikörper*: 150 µl FACS-Fixations-Puffer (Mischung aus FACS-Puffer und Paraformaldehyd (PFA) 4%, siehe 9.1 Tabelle 7) hinzufügen und gut mischen
16. Proben für die Messung in FACS-Probenröhrchen überführen und 200 µl FACS-Puffer (siehe 9.1 Tabelle 7) hinzufügen

**Tabelle 1: FACS-Antikörperpanel**

	<b>Antikörper</b>	<b>Farbe</b>	<b>µl pro Probe</b>	<b>Kanal</b>
1	CD45	Brilliant Violet 510	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-7
2	CD11b	Brilliant Violet 785	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-3
3	F4/80	PerCP-Cy5.5	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-15
4	TMEM119	PE-Cy7	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-14
5	P2RY12	APC	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-13
6	CD163	SuperBright 702	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-4
7	CD80	Brilliant Violet 605	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-6
8	CX3CR1	Brilliant Violet 421	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-8
9	GFAP	DyLight 594	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-16
10	TREM-2	FITC	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-2
11	S100B	PE	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-18
12	IL-1β	APC-Cy7	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-11
13	ALDH1L1	DyLight 680	0,1 µl = 1 µl Verdünnung	FL-12
			<b>Total: 13 µl Verdünnung</b>	

Tabelle 1 zeigt alle im FACS-Panel enthaltenen Antikörper (für Katalognummer siehe 9.1 Tabelle 7), inklusive ihrer Farbe und dem bei der Messung verwendeten Kanal. Die Antikörper werden 1:10 mit PermWash (s. 9.1 Tabelle 7) verdünnt und zu einem Mastermix gemischt. 1 µl Verdünnung entspricht einer Antikörpermenge von 0,1 µl. Da es 13 Antikörper sind, werden in jede Probe 13 µl Mastermix pipettiert. Um Pipettierfehler zu vermeiden wird der Mastermix für einen größeren Satz Proben hergestellt.

## **Messung:**

Gemessen wird mit BD LSRFortessa™, Software BD FACSDiva™ (Version 6.1.3) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Das BD LSRFortessa™ enthält fünf Laser (Rot: 640nm, Violett: 405nm, UV: 355nm, Blau: 488nm FSC, Grün: 532nm) und ermöglicht dadurch, laut Herstellerangaben, eine Detektion von 18 Farben gleichzeitig.

### **3.3.3 Auswahl der Antikörper und Gatingstrategie**

Mikroglia zählen zu den Gliazellen des ZNS und bilden die erste Immunabwehr im Gehirn (Huffels et al., 2023; Jurga et al., 2020). Sie überwachen ihre Umgebung und induzieren bei Gefahr eine Entzündung. Mikroglia detektieren ihre Umgebung über Oberflächenrezeptoren und kommunizieren über Zytokinausschüttung mit anderen Zellen. Der inflammatorische Zustand wird dabei strikt reguliert und fällt über Zeit ab. Bei sehr starker Inflammation kann diese Regulierung allerdings fehlschlagen. Die proinflammatorische Phase wird verlängert und es kommt auch bei gesunden Neuronen zu neuronalen Schäden (Jurga et al., 2020). Außerdem sind Mikroglia primär an der neuronalen Plastizität im Erwachsenenalter beteiligt. Sie eliminieren inaktive Synapsenverbindungen (synaptic pruning/synaptic stripping) und reagieren damit sehr dynamisch auf ihre Umgebung. Diese Synapsenelimination wird reguliert durch Aktivierung von CX3CR1 (CX3C-Motiv Chemokin Rezeptor 1) und des Komplementsystems, welches bei Morbus Alzheimer eine besondere Rolle spielt. Komplementfaktoren, wie C1q (Komplementfaktor C1q) und C3 (Komplementfaktor C3) treten hier verstärkt auf und A $\beta$  bindet an diese, was in einer Überaktivierung der entsprechenden Signalwege und damit exzessiver Synapsenelimination resultiert (Huffels et al., 2023). Des Weiteren sind Mikroglia für die Phagozytose von Zellschrott und neurotoxischen Proteinen verantwortlich (Jurga et al., 2020; Zhang et al., 2021). Auch die Angiogenese (Jurga et al., 2020; Zhang et al., 2021) und die eigene Proliferation zählen zu ihren Aufgaben (Zhang et al., 2021). Weitere Gliazellen im ZNS sind Astrozyten. Sie dienen unter anderem dem Neurotransmitterrecycling und der Regulation der synaptischen Transmission, indem durch inhibitorische Gliotransmitter die exzitatorische Toxizität neuronaler Netzwerke verhindert wird. Bei Morbus Alzheimer verlieren sie allerdings diese protektive Funktion und werden proinflammatorisch. Es kommt zu einer verstärkten Insertion von AMPA-Rezeptoren und infolgedessen zu einer erhöhten Glutamatsensitivität (Huffels et al., 2023). Zudem kommt es zu einer verringerten Glutamat-Wiederaufnahme und einer damit verbundenen Aktivierung extrasynaptischer NMDA-Rezeptoren, die synaptische Plastizität sinkt (Bading, 2021).

Mit dem FACS soll der Einfluss von A $\beta$  und GAL-201 auf die Neuroinflammation untersucht werden. Dabei wird anhand der Expression charakteristischer Marker die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten analysiert. Vorher müssen diese jedoch anhand spezifischer Marker zunächst definiert werden, man spricht von „gaten“.

### **Gatingstrategie Mikroglia**

**CD11b** (Cluster of Differentiation 11b), **CD45** (Cluster of Differentiation 45), **F4/80** (auch EMR1: EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1), **P2RY12** (Purinergischer Rezeptor P2Y12), **TMEM119** (Transmembranprotein 119):

Die Marker CD11b und CD45 können für eine erste Eingrenzung und Unterscheidung von Mikroglia herangezogen werden. Beide Marker werden zwar auch von Makrophagen exprimiert, jedoch lassen sich die Mikroglia eher der CD45<sup>low</sup>- bis intermediate-Gruppe zuordnen, während Makrophagen eher CD45<sup>high</sup> entsprechen (Galatro et al., 2017; Jurga et al., 2020). Ein weiteres Mittel für die Eingrenzung von Mikroglia und Makrophagen ist der von beiden exprimierte Marker F4/80 (Jurga et al., 2020). Dieser ist in Mikroglia des Hippocampus erhöht und eignet sich daher gut für die weitere Eingrenzung (de Haas et al., 2008). Um die Mikroglia noch besser von Makrophagen unterscheiden zu können, werden TMEM119 und P2RY12 herangezogen (Jurga et al., 2020). Insbesondere TMEM119 ermöglicht eine eindeutige Abgrenzung von eingewanderten Makrophagen da es im Gehirn ausschließlich von Mikroglia exprimiert wird (Bennett et al., 2016; Satoh et al., 2016). Nach diesen Markern werden die Mikroglia also wie folgt „gegated“: Zunächst wird ein Gate für die allgemeine Population der Zellen gesetzt. Das bedeutet, dass die gefärbten Zellen hier von jeglichen Resten, wie Zellschrott oder Zellklumpen, Antikörperresten oder ungefärbten Zellen getrennt werden. Zu sehen ist dies in Abbildung 11A. In diesem Forward- vs. Sidescatter-Plot, wird nach Größe und Granularität sortiert, nicht fluoreszierende Zellen oder Zellschrott befinden sich am unteren linken Rand. Die fluoreszierenden Zellen werden anschließend für eine erste grobe Einteilung, wie in Abbildung 11B zu sehen, nach CD11b und CD45 gegated. Dabei werden die Astrozyten analog zu Clark et al. (2023) als CD11b<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen definiert, während die Mikroglia die CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low bis intermediate</sup>-Gruppe darstellen (Galatro et al., 2017; Jurga et al., 2020). Im nächsten Schritt werden, wie in Abbildung 11C zu sehen, die CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low bis intermediate</sup>-Zellen in F4/80 positiv und negativ unterschieden, um weiter hinsichtlich Mikroglia zu differenzieren (de Haas et al., 2008; Jurga et al., 2020). Abbildung 11D zeigt, dass im folgenden Schritt, die F4/80-positiven Zellen zudem nach P2RY12 und TMEM119 gegated werden. Dieser Schritt dient ebenso der weiteren Identifikation der Mikroglia (Jurga et al., 2020).

Mikroglia werden demnach als CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low-int</sup>/F4/80<sup>+</sup>/P2RY12<sup>+</sup>/TMEM119<sup>+</sup>-Zellen definiert (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

### **CX3CR1** (CX3C-Motiv Chemokin Rezeptor 1)

Wie in der Übersichtsarbeit von Pawelec et al. (2020) zusammengefasst, stellt CX3CR1 einen Transmembranrezeptor dar, der exklusiv von Mikroglia exprimiert wird und der wichtig für die Kommunikation zwischen Neuron und Mikroglia ist. Ein Binden des Liganden CX3CL1 (Fraktalkin) ist dabei wichtig für die Zelladhäsion und induziert in Mikroglia einen Ruhezustand, bei dem vor allem die Regulation von Synapsen und synaptischer Plastizität sowie die Kontrolle der Immunantwort im Vordergrund stehen. Löst sich CX3CL1 dagegen durch Spaltung ab, kommt es zu einer Aktivierung der Mikroglia (Pawelec et al., 2020). Bei Morbus Alzheimer ist CX3CR1 erniedrigt, was unterschiedliche Auswirkungen haben kann (Cho et al., 2011). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an CX3CR1 mit einer reduzierten Ablagerung von A $\beta$  einherging. Es wird vermutet, dass infolge des CX3CR1-Mangels und des daraus resultierenden Signalverlusts, es zu einer verstärkten Aktivierung von Mikroglia kommt, was wiederum die Clearance von A $\beta$  erhöht (Lee et al., 2010). Auf der anderen Seite wurde ebenfalls im Tierversuch gezeigt, dass ein Mangel an CX3CR1 zu einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) und IL-6 (Interleukin-6)) und einer verstärkten Tau-Pathologie führt, was die synaptische Dysfunktion und die Verschlechterung der Kognition verschlechtert (Cho et al., 2011). Ein Mangel an CX3CR1 kann sich also sowohl protektiv als auch toxisch auf die Pathogenese von Morbus Alzheimer auswirken.

### **Unterscheidung in proinflammatorische und antiinflammatorische Mikroglia**

**TREM-2** (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2), **CD163** (Cluster of Differentiation 163), **IL-1 $\beta$**  (Interleukin-1 $\beta$ ) **und CD80** (Cluster of Differentiation 80):

Wie die Übersichtsarbeit von Bachiller et al. (2018) zeigt, ist die klassische Einteilung der Mikroglia in proinflammatorische M1 und antiinflammatorische M2 (Mikroglia) obsolet. Denn genau genommen existieren weit mehr Phänotypen und funktionelle sowie strukturelle Änderungen der Mikroglia sind meist auf veränderte Gegebenheiten zurückzuführen (Bachiller et al., 2018). Es macht also Sinn, anhand pathologischer Veränderungen verschiedene „disease-associated-microglia“ (DAM) zu unterscheiden (Garcia-Revilla et al., 2019). Es wird vermutet, dass der Rezeptor TREM-2 beim Übergang nicht-differenzierter Mikroglia in DAM eine essenzielle Rolle spielt (Garcia-Revilla et al., 2019; Ulland & Colonna, 2018). TREM-2 wird

im Gehirn exklusiv von Mikroglia exprimiert (Ulland & Colonna, 2018) und ist verstärkt in der Nähe von A $\beta$ -Plaques zu finden (Frank et al., 2008). Auch in einem alternden gesunden Gehirn wurde TREM-2 ebenso wie CD163 mit zunehmender Entzündung in einer Genanalyse verstärkt nachgewiesen. Dabei zeigten beide Marker antiinflammatorische Eigenschaften und wirkten sich positiv auf die Kognition aus (Han et al., 2022). TREM-2 scheint also auch in einem gesunden alternden Gehirn bei zunehmender Entzündung, die Bildung von DAM-1 zu induzieren. Diese verstärken die Phagozytose von A $\beta$  und inhibieren die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Takahashi et al., 2005). Bei Morbus Alzheimer konnte jedoch nachgewiesen werden, dass TREM-2 im Krankheitsverlauf immer weniger aktiviert wird und diese protektive Funktion verloren geht (Okuzono et al., 2021). A $\beta$  kann hier weniger schnell abgebaut werden und bindet neben weiteren endogenen Liganden (wie APOE und Galectin-3) an eigene Toll-Like-Rezeptoren über die es, in Folge einer Überstimulation, zu einer Differenzierung in proinflammatorische Mikroglia (DAM-2) kommt. Daneben kann es durch Stimulation von Toll-Like-Rezeptoren auf M1 Mikroglia zu einer Aktivierung dieser kommen. Diese wiederum setzen proinflammatorische Botenstoffe wie zum Beispiel IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  frei, was zu einer weiteren Förderung der DAM-2 beiträgt (Garcia-Revilla et al., 2019). Dennoch stellt TREM-2, ebenso wie CD163, initial einen antiinflammatorischen Marker dar (Han et al., 2022). IL-1 $\beta$  hingegen ist ein proinflammatorischer Marker und wird bei Morbus Alzheimer verstärkt von Mikroglia exprimiert (Akiyama et al., 2000). Initial kann dies noch eine verbesserte Plaque-Clearance bedeuten, im Verlauf kommt es allerdings zu einer Selbsterhaltung der Stimulation und somit letztendlich zu einer Verstärkung der A $\beta$ - und Tau-Pathologie (Shaftel et al., 2008). Auch CD80 wird vermehrt während einer ZNS-Inflammation exprimiert. Es ist ein Co-Stimulator bei der T-Zell-Aktivierung und wird ebenfalls von aktivierten Mikroglia exprimiert (Aloisi, 2001).

## **Gatingstrategie Astrozyten**

### **GFAP (glial fibrillar acidic protein)**

Wie bereits erwähnt, wurden zur Betrachtung der Astrozyten die CD11b<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen herangezogen (Clark et al., 2023). Um sicherzugehen, dass es sich bei diesen Zellen wirklich um Astrozyten handelt, wurden weiterhin nur die GFAP-positiven Zellen selektiert (Abbildung 11E). GFAP ist der Hauptbestandteil des intermediären Filaments der Astrozyten, also dem beweglichen Teil des Zytoskeletts (Hol & Pekny, 2015). Es reguliert die Morphologie und Funktion von Astrozyten und sorgt für die Stabilität der Zelle (Gorina et al., 2022). GFAP ist in reaktiven Astrozyten erhöht (Hol & Pekny, 2015) und wird verstärkt von „disease associated

astrocytes" exprimiert (Habib et al., 2020). Das heißt, im gesunden Gewebe wird auch GFAP gebildet, jedoch liegt dies meist unterhalb der detektierbaren Schwelle, sodass GFAP einen verlässlichen Marker für reaktive Astrozyten darstellt (Garcia et al., 2004; Gorina et al., 2022). Folglich bilden die CD11b<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/GFAP<sup>+</sup>-Zellen analog zu Riemann & von Ahsen et al. in preparation die Gruppe der reaktiven Astrozyten (Clark et al., 2023; Gorina et al., 2022; Serrano-Pozo et al., 2013).

### **ALDH1L1 (Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1)**

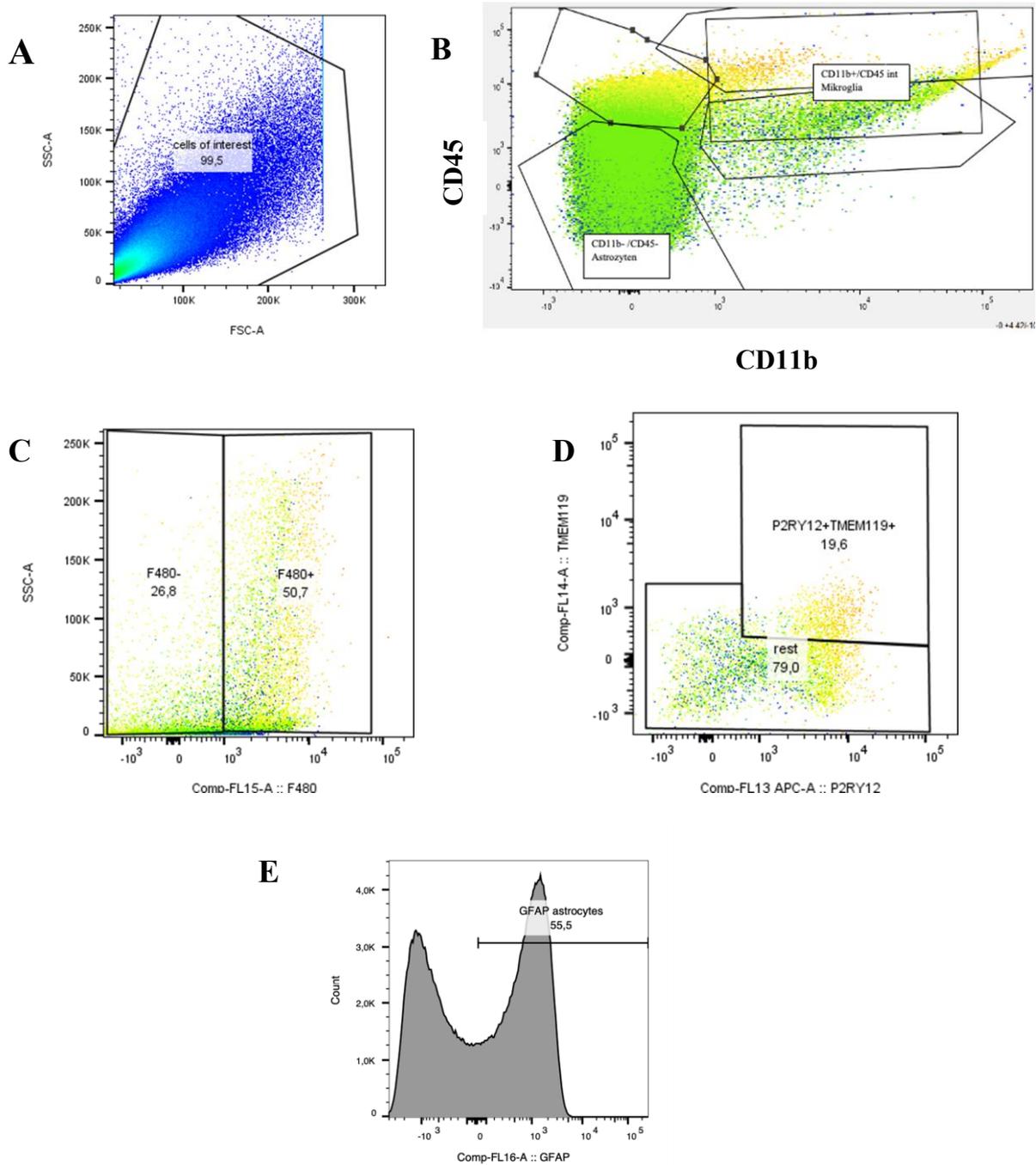
ALDH1L1 ist ein hochspezifischer Astrozytenmarker. Im Gegensatz zu GFAP werden hiermit zusätzlich ruhende Astrozyten erfasst (Cahoy et al., 2008; Serrano-Pozo et al., 2013). Da aber die Expression von ALDH1L1 sehr gering ausfiel und ohnehin vor allem die reaktiven Astrozyten von Interesse sind, wird nur nach GFAP-positiven Zellen selektiert und stattdessen die Expression von ALDH1L1 innerhalb dieser Gruppe verglichen (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Da bei Morbus Alzheimer nicht nur für GFAP, sondern auch für ALDH1L1 erhöhte Level gezeigt werden konnten (Garcia-Esparcia et al., 2018), ist eine erhöhte Expression von ALDH1L1 unter GFAP-positiven Zellen also vermutlich ebenfalls ein Zeichen einer erhöhten Anzahl reaktiver Astrozyten (Serrano-Pozo et al., 2013). Diese Vermehrung und Aktivierung von Astrozyten (Astrogliose) tritt schon in frühen Stadien auf (Scholl et al., 2015) und trägt ebenso wie die Aktivierung der Mikroglia zur Synapseneliminierung bei (Chung et al., 2013).

### **S100B (S100 Calcium-bindendes Protein B)**

S100B wird vor allem von Astrozyten exprimiert und wurde bei neurodegenerativen Erkrankungen verstärkt nachgewiesen (Brozzi et al., 2009). Es ist am Remodeling des astrozytären, intermediären Filaments beteiligt und stellt einen Biomarker für Apoptose dar (Gorina et al., 2022). Insbesondere bei Morbus Alzheimer wurden stark erhöhte S100B Level bei aktivierten Astrozyten rund um die A $\beta$ -Plaques gefunden (Mrak & Griffin, 2001).

### **Für die Auswertung genutzte Programme:**

Das Gating erfolgt mit Hilfe von FlowJo (Version 9.0, BD Biosciences) und die daraus erhaltenen Daten werden als Excel Datei (Version 16, Microsoft) exportiert. Die graphische Auswertung erfolgt mit GraphPad Prism (Version 8, Dotmatics) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Es wird ein biologisches n von acht generiert.



### Abbildung 11: Gatingstrategie Mikroglia und Astrozyten

(A) Allgemeines Gate für die Population der Zellen (B) Erste grobe Einteilung nach CD45 und CD11b: Astrozyten werden als CD11b<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen (Clark et al., 2023), Mikroglia als CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low bis intermediate</sup> definiert (Galatro et al., 2017; Jurga et al., 2020) (C) Unterscheidung der CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low bis intermediate</sup>-Zellen in F4/80 positiv und negativ, um weiter hinsichtlich Mikroglia zu differenzieren (de Haas et al., 2008; Jurga et al., 2020) (D) Gaten der F4/80-positiven Zellen nach P2RY12 und TMEM119, um Mikroglia noch besser zu selektieren (Jurga et al., 2020) (E) Selektion der GFAP-positiven Zellen unter den CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen, um reaktive Astrozyten zu selektieren (Clark et al., 2023; Gorina et al., 2022)

### 3.4 Statistik

Für die statistische Analyse wie in Riemann & von Ahsen et al. in preparation erfolgt zunächst ein nicht-parametrischer Test in Form des Kruskal- Wallis-Tests. Im nächsten Schritt wird dann eine Dunn's Multiple Comparison durchgeführt, da vor allem der Vergleich zu 50 nM A $\beta$  von Interesse ist. In Anlehnung an Rothman (1990) wird keine Korrektur der Multiple Comparison vorgenommen. Die unkorrigierten p-Werte werden mit \* gekennzeichnet. Aufgrund der niedrigen Probenanzahl wird zusätzlich die Effektgröße als "area under the receiver operating characteristic" (AUC) bestimmt. Sie gibt Auskunft über den Unterschied zwischen zwei Gruppen. Dazu wird die, für MATLAB geschriebene, MES-Toolbox (= measures of effect size) genutzt. Diese berechnet die AUC zusammen mit dem 95%igen Konfidenzintervall (AUCCi), welches durch ein 10k-faches Bootstrapping ermittelt wird (Hentschke & Stuttgart, 2011). Eine AUC von 0,5 bedeutet dabei, dass kein relevanter Unterschied zwischen zwei Gruppen besteht. Bei einer AUC < 0,3 und > 0,7 besteht hingegen ein relevanter Unterschied (Mandrekar, 2010). Signifikant ist das Ergebnis, wenn das Konfidenzintervall sich entweder auf Bereiche < 0,5 oder auf Bereiche größer > 0,5 beschränkt (Hentschke & Stuttgart, 2011). Durch die Effektgröße können die Ergebnisse zuverlässig analysiert werden und es wird verhindert, dass relevante Ergebnisse keine Beachtung finden, nur weil sie keine Signifikanz in der Dunn's Multiple Comparison zeigen (Hentschke & Stuttgart, 2011).

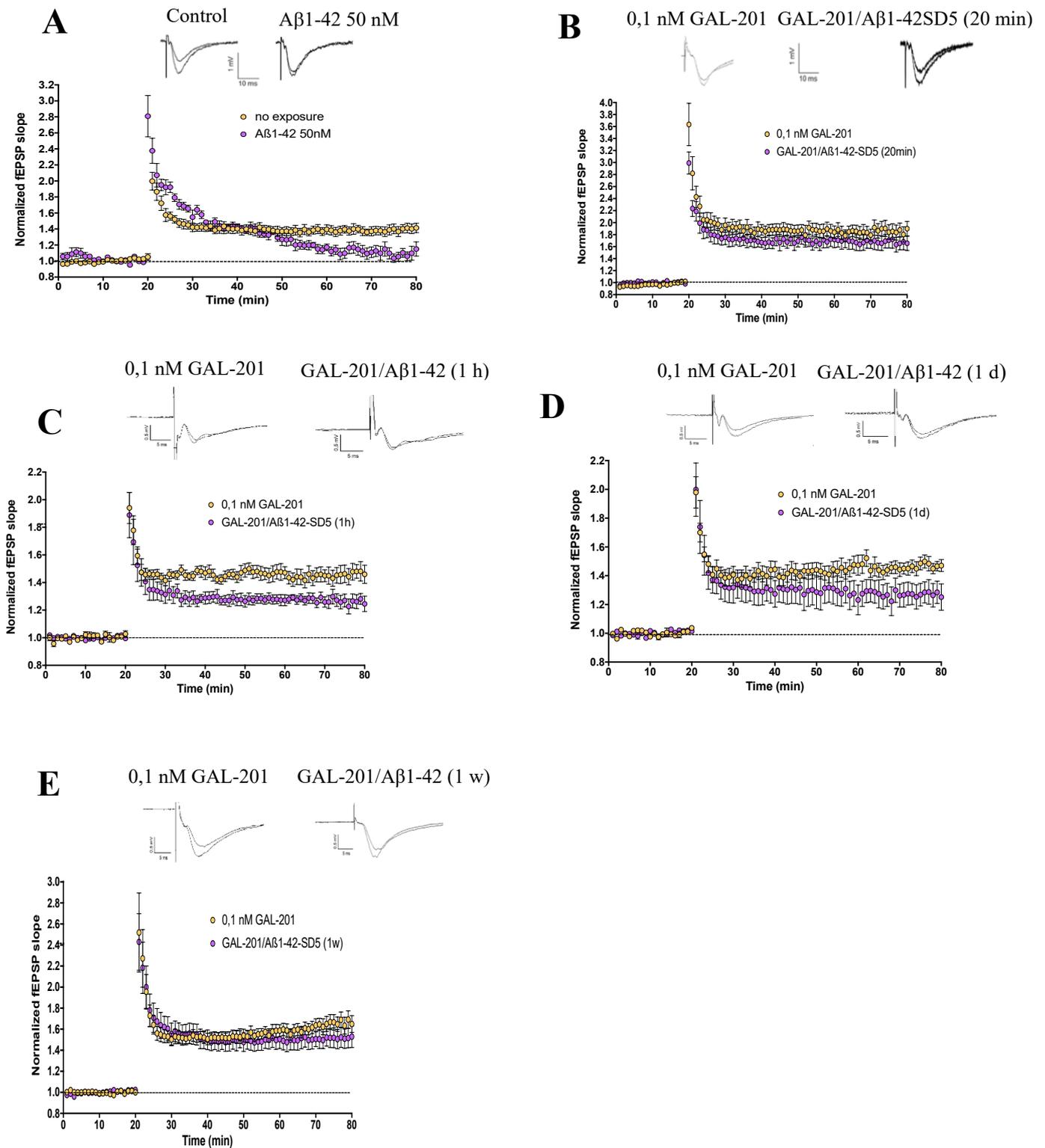
## 4 Ergebnisse

Im Folgenden werden ergänzende Ergebnisse zu denen in Russ et al. (2022) bereits publizierten Daten präsentiert. Analog zu Rammes and Parsons (2020) wird die serielle Verdünnung auch bei GAL-201 mit einem zeitlichen Versatz von einer Stunde, einem Tag und einer Woche appliziert, wobei dies nicht nur für A $\beta$ <sub>1-42</sub> und A $\beta$ pE3, sondern auch für A $\beta$ <sub>1-40</sub> und 3NTyr10A $\beta$  getestet wird. Alle seriellen Verdünnungen werden mit 50 nM A $\beta$  des jeweiligen Subtyps verglichen und in einem Boxplot gegenübergestellt. Neben den erweiterten elektrophysiologischen Experimenten wird außerdem auch erstmals der molekularbiologische Einfluss näher betrachtet. Es wird die Dichte und Morphologie der Spines analysiert, indem diese zuvor durch ein Golgi-Staining visualisiert wurden. Daneben wird mit Hilfe des FACS die Aktivierung der Mikroglia und Astrozyten analysiert. Dadurch werden Einblicke in Bezug auf die Neuroinflammation gewonnen. Da sich die Daten der LTP und die der Spineanalyse auf Veränderungen im Hippocampus beziehen, werden auch bezüglich der FACS-Analyse die entsprechenden Hippocampi ausgewertet. Die Erstellung der Statistik erfolgt wie unter 3.4 beschrieben. Eine Signifikanz nach der Dunn's Multiple Comparison ist mit „\*“, eine Signifikanz durch die Effektgröße durch ein „s“ und eine Relevanz durch die Effektgröße durch ein „r“ in den jeweiligen Abbildungen gekennzeichnet. Verglichen werden alle Gruppen zu 50 nM A $\beta$  des jeweiligen Subtyps (orange eingefärbter Boxplot).

### 4.1 Elektrophysiologie

Im Folgenden soll zunächst exemplarisch für A $\beta$ <sub>1-42</sub>, der zeitliche Verlauf der LTP aufgezeigt werden (Abbildung 12). Die interne Kontrolle (keine Exposition im Versuch mit 50 nM A $\beta$  sowie 0,1 nM GAL-201 bei den seriellen Verdünnungen) wird dabei in Gelb dargestellt, die pharmakologische Behandlung nach 90 Minuten Inkubation in Violett. Es gilt zu beachten, dass bei den LTP-Daten Ergebnisse bereits in Russ et al. (2022) veröffentlicht wurden und drei Versuche schon im Vorhinein von anderen Personen durchgeführt wurden. Dies wird entsprechend gekennzeichnet.

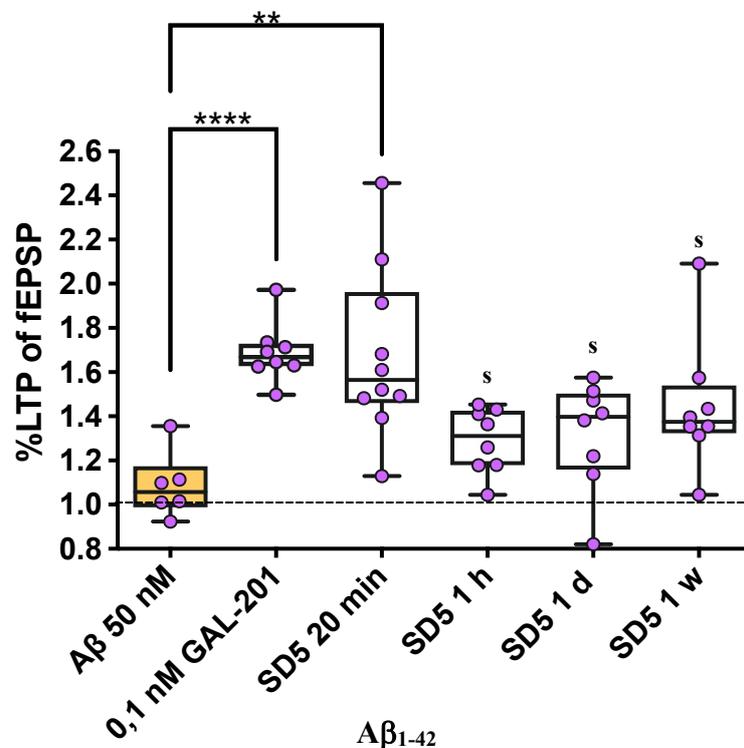
Wie in Abbildung 12 zu sehen, ist bei der internen Kontrolle aller Versuchsgruppen die LTP induzierbar. Das heißt, der Schnitt ist durch die Präparation nicht beeinträchtigt und 0,1 nM GAL-201 ohne serielle Verdünnung beeinflussen die Induzierbarkeit der LTP nicht. Eine Inkubation mit 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> führt dagegen, wie in Abbildung 12A zu erkennen, zu einer deutlichen Blockade der LTP.



**Abbildung 12: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch Aβ<sub>1-42</sub>-induzierten synaptotoxischen Effekte – Zeitverlauf normalisierter fEPSP's nach einer HFS**

Zeitverlauf des normalisierten fEPSP nach einer HFS (A) in einem naiven Schnitt, sowie nach 90-minütiger Inkubation mit 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> (B) unter vorheriger 60-minütiger Inkubation mit 0,1 nM GAL-201 sowie nach 90-minütiger Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 (20 min) / (C) (1 h) / (D) (1 d) / (E) (1 w). Jeder Abbildung sind außerdem Traces des fEPSP der letzten 50 bis 60 Minuten nach einer HFS für Kontrolle und Versuch beigelegt. Die Ergebnisse aus (A) und (B) wurden bereits in Russ et al. (2022) publiziert und sind hier der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Die Antwort, gemessen an der normalisierten Steigung des fEPSP's, beträgt 60 Minuten nach der tetanischen Stimulation weniger als 120 % der Baseline und ist somit nicht mehr potenziert. Wie bereits unter 3.1.1 besprochen führt dies zu einer beeinträchtigten Informationsverarbeitung im Gehirn und beeinflusst somit Lernen und Gedächtnis (Trepel, 2022a, 2022b). Im Gegensatz dazu ist die LTP nicht mehr blockiert, wenn zusätzlich zu 50 nM  $A\beta_{1-42}$ , GAL-201 in serieller Verdünnung vorhanden ist. Dies trifft nicht nur für die frisch hergestellte serielle Verdünnung zu, sondern auch für alle zeitlichen Versätze (Abbildung 12B-E und Abbildung 13) sowie gegenüber einer  $A\beta_{1-40}$ -,  $A\beta_{pE3}$ - und 3NTyr10 $A\beta$ -vermittelten Toxizität (Abbildung 14-16) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

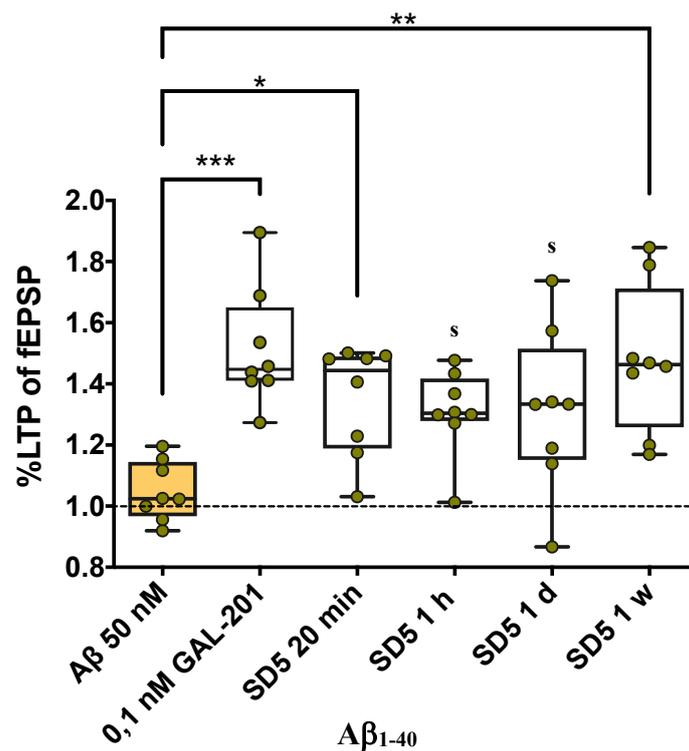


(s = signifikant anhand der Effektgröße) – aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

**Abbildung 13: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch  $A\beta_{1-42}$ -induzierten synaptotoxischen Effekte**

[Mittelwerte der letzten 50 bis 60 Minuten nach einer HFS präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM  $A\beta_{1-42}$  (orange) = Vergleichsgruppe (die  $A\beta_{1-42}$  50 nM Daten und die GAL-201/ $A\beta_{1-42}$ -SD5 (20 min) Daten wurden bereits in Russ et al. (2022) publiziert)]. Bei reiner Inkubation mit 50 nM  $A\beta_{1-42}$  sinkt die LTP-Induzierbarkeit im Vergleich zur 0,1 nM GAL-201 Kontrolle signifikant [ $p < 0,0001$  sowie  $AUC = 0$  ( $AUCC_i$  0 bis 0)]. Die LTP ist blockiert. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Die LTP ist weiterhin induzierbar und GAL-201/ $A\beta_{1-42}$ -SD5 (20 min) unterscheidet sich signifikant von 50 nM  $A\beta_{1-42}$  [ $p < 0,01$  sowie  $AUC = 0,02$  ( $AUCC_i$  0 bis 0,1)]. Dieser Effekt ist ebenso anhand der Effektgröße für die zeitlichen Versätze zu beobachten:  $AUC$  (1 h) = 0,13 ( $AUCC_i$  0 bis 0,35),  $AUC$  (1 d) = 0,17 ( $AUCC_i$  0 bis 0,44),  $AUC$  (1 w) = 0,13 ( $AUCC_i$  0 bis 0,38) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

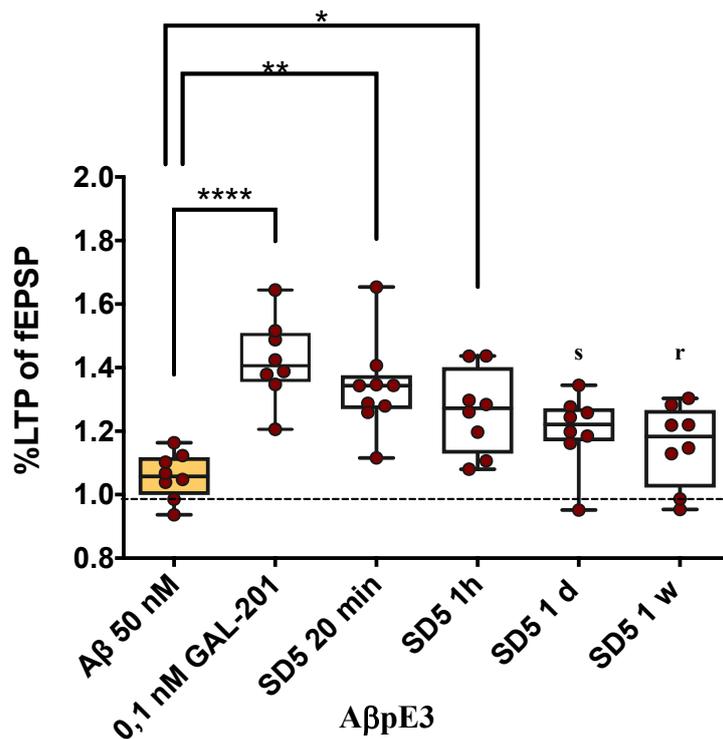
Abbildung 13 und 14 zeigen, bei alleiniger Inkubation mit 50 nM  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$  sinkt die LTP-Induzierbarkeit im Vergleich zur 0,1 nM GAL-201 Kontrolle signifikant. Die LTP ist blockiert. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Die LTP ist weiterhin induzierbar und GAL-201/ $A\beta_{1-42SD5}$ / GAL-201/ $A\beta_{1-40SD5}$  (20 min) unterscheiden sich signifikant von 50 nM  $A\beta$ . Dieser Effekt ist ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).



(s = signifikant anhand der Effektgröße) – aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

#### Abbildung 14: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch $A\beta_{1-40}$ -induzierten synaptotoxischen Effekte

[Mittelwerte der letzten 50 bis 60 Minuten nach einer HFS präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM  $A\beta_{1-40}$  (orange) = Vergleichsgruppe]. Bei reiner Inkubation mit 50 nM  $A\beta_{1-40}$  sinkt die LTP-Induzierbarkeit im Vergleich zur 0,1 nM GAL-201 Kontrolle signifikant [ $p < 0,001$  sowie  $AUC = 0$  (AUCCi 0 bis 0)]. Die LTP ist blockiert. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Die LTP ist weiterhin induzierbar und GAL-201/ $A\beta_{1-40SD5}$  (20 min) unterscheidet sich signifikant von 50 nM  $A\beta_{1-40}$  [ $p < 0,05$  sowie  $AUC = 0,06$  (AUCCi 0 bis 0,2)]. Dieser Effekt ist ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten:  $AUC$  (1 h) = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,28),  $AUC$  (1 d) = 0,17 (AUCCi 0 bis 0,44), (1 w)  $p < 0,01$  sowie  $AUC = 0,02$  (AUCCi 0 bis 0,09) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).



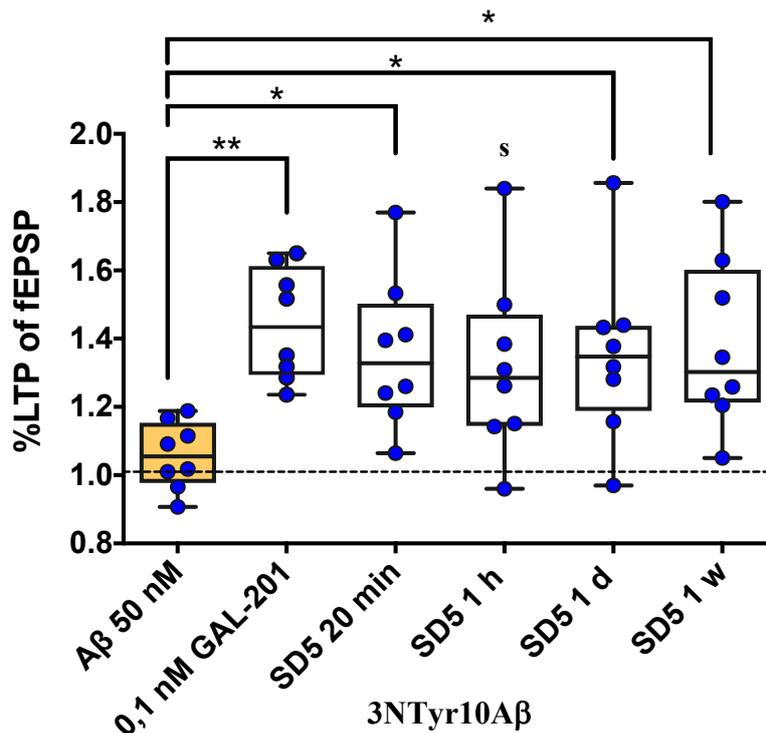
(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) – aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 15: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch AβpE3-induzierten synaptotoxischen Effekte

[Mittelwerte der letzten 50 bis 60 Minuten nach einer HFS präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM AβpE3 (orange) = Vergleichsgruppe (die Daten von GAL-201/AβpE3 (20 min) wurden bereits in Russ et al. (2022) publiziert)]. Bei reiner Inkubation mit 50 nM AβpE3 sinkt die LTP-Induzierbarkeit im Vergleich zur 0,1 nM GAL-201 Kontrolle signifikant [ $p < 0,0001$  sowie  $AUC = 0$  ( $AUCCi$  0 bis 0)]. Die LTP ist blockiert. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Die LTP ist weiterhin induzierbar und GAL-201/AβpE3SD5 (20 min) unterscheidet sich signifikant von 50 nM AβpE3 [ $p < 0,01$  sowie  $AUC = 0,03$  ( $AUCCi$  0 bis 0,13)]. Dieser Effekt ist ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten (relevanter Unterschied bei einer Woche): (1 h)  $p < 0,05$  sowie  $AUC = 0,08$  ( $AUCCi$  0 bis 0,25),  $AUC$  (1 d) = 0,13 ( $AUCCi$  0 bis 0,38),  $AUC$  (1 w) = 0,23 ( $AUCCi$  0 bis 0,53) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Abbildung 15 und 16 zeigen, bei alleiniger Inkubation mit 50 nM AβpE3/3NTyr10Aβ sinkt die LTP-Induzierbarkeit im Vergleich zur 0,1 nM GAL-201 Kontrolle signifikant. Die LTP ist blockiert. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Die LTP ist weiterhin induzierbar und GAL-201/AβpE3SD5/ GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min) unterscheiden sich signifikant von 50 nM Aβ. Dieser Effekt ist ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten (wenn auch bei GAL-201/AβpE3SD5 (1w) nur mit einem relevanten Unterschied) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

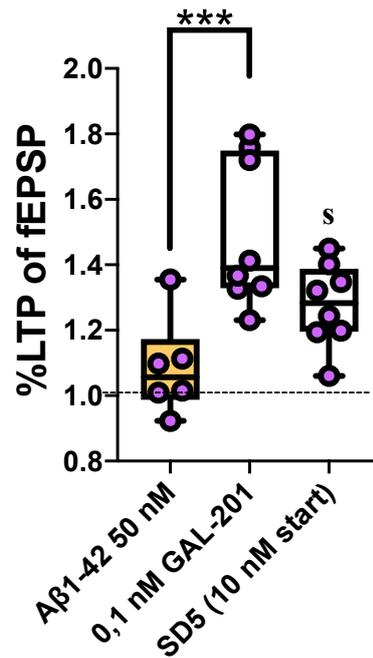


(s = signifikant anhand der Effektgröße) – aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

**Abbildung 16: GAL-201 verhindert nach serieller Verdünnung, die durch 3NTyr10Aβ-induzierten synaptotoxischen Effekte**

[Mittelwerte der letzten 50 bis 60 Minuten nach einer HFS präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM 3NTyr10Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Bei reiner Inkubation mit 50 nM 3NTyr10Aβ sinkt die LTP-Induzierbarkeit im Vergleich zur 0,1 nM GAL-201 Kontrolle signifikant [ $p < 0,01$  sowie  $AUC = 0$  (AUCCI 0 bis 0)]. Die LTP ist blockiert. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Die LTP ist weiterhin induzierbar und GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min) unterscheidet sich signifikant von 50 nM 3NTyr10Aβ [ $p < 0,05$  sowie  $AUC = 0,08$  (AUCCI 0 bis 0,25)]. Dieser Effekt ist ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten:  $AUC$  (1 h) = 0,17 (AUCCI 0 bis 0,43), (1 d)  $p < 0,05$  sowie  $AUC = 0,13$  (AUCCI 0 bis 0,34), (1 w)  $p < 0,05$  sowie  $AUC = 0,06$  (AUCCI 0 bis 0,23) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Langzeitpotenzierung bei allen vier untersuchten Aβ-Subtypen unter dem Einfluss von 50 nM Aβ blockiert ist und die Induzierbarkeit des LTP sich signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Dies ist dagegen nicht der Fall, wenn zusätzlich zu 50 nM Aβ GAL-201 in serieller Verdünnung vorliegt. Hier bleibt die LTP weiterhin induzierbar. Dieser Effekt ist auch nach einer Woche noch zu beobachten (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Da sich eine Konzentration von 10 nM GAL-201 in vergangenen Versuchen als pharmakologisch wirksam erwiesen hat (Russ et al., 2022), interessierte uns weiterhin, ob 10 nM GAL-201 ebenfalls als Startkonzentration für die serielle Verdünnung ausreichen. Abbildung 17 zeigt, dass mit einer Startkonzentration von 10 nM GAL-201 in der seriellen Verdünnung bei direkter Applikation (20 min) die LTP induzierbar ist und sich signifikant von 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> unterscheidet.



(s = signifikant anhand der Effektgröße)

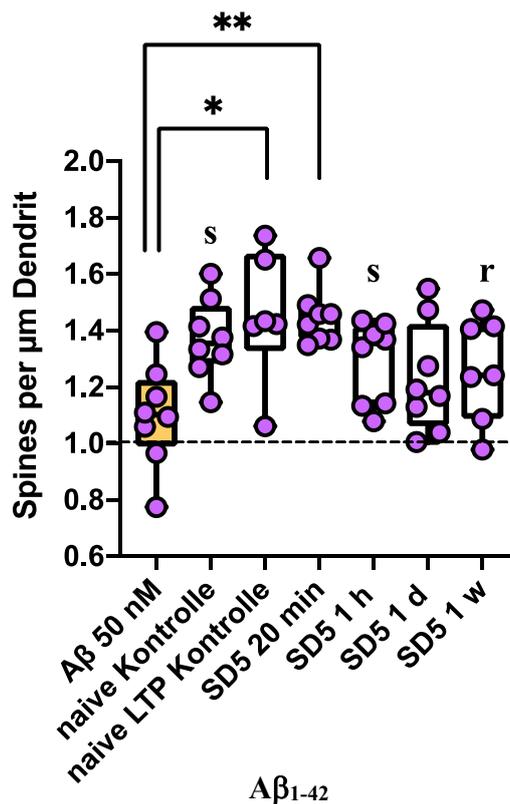
### Abbildung 17: Auch 10nM GAL-201 als initiale Startkonzentration in der seriellen Verdünnung schützt vor den Aβ<sub>1-42</sub>-induzierten synaptotoxischen Effekten

[Mittelwerte der letzten 50 bis 60 Minuten nach einer HFS präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> (orange) = Vergleichsgruppe]. Bei reiner Inkubation mit 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> sinkt die LTP-Induzierbarkeit im Vergleich zur 0,1 nM GAL-201 Kontrolle signifikant [ $p < 0,001$  sowie  $AUC = 0,06$  (AUCCi 0 bis 0,25)]. Die LTP ist blockiert. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) mit einer initialen Startkonzentration von 10 nM GAL-201 vorhanden ist. Die LTP ist weiterhin induzierbar und unterscheidet sich signifikant anhand der Effektgröße von 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> [ $AUC = 0,17$  (AUCCi 0 bis 0,46)].

## 4.2 Veränderungen der Spinedynamik

### 4.2.1 Spinedichte

Unter dem Einfluss von 50 nM Aβ (Aβ<sub>1-42</sub>, Aβ<sub>1-40</sub>, AβpE3 und 3NTyr10Aβ) ist die Spinedichte gegenüber einem unbehandelten Hirnschnittpräparat, welches weder einer Behandlung noch einer Stimulation ausgesetzt war (nachfolgend bezeichnet als naive Kontrolle) stets reduziert (Abbildung 18 bis 21). Auch gegenüber Präparaten, welche mit einer seriellen Verdünnung inkubiert wurden, ist dies zu beobachten. Hier werden im Vergleich zu 50 nM Aβ ebenso wie bei der naiven Kontrolle deutlich mehr Spines ausgebildet. Um den Effekt der HFS auf die Bildung der Spines zu untersuchen, wird ein unbehandelter Schnitt dieser ausgesetzt und die Antwort für eine Stunde aufgezeichnet (nachfolgend bezeichnet als naive LTP-Kontrolle). Es zeigt sich, auch hier ist die Spinedichte gegenüber 50 nM Aβ signifikant erhöht, was sich in einem größeren Unterschied als unter naiven Kontrollbedingungen äußert (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).



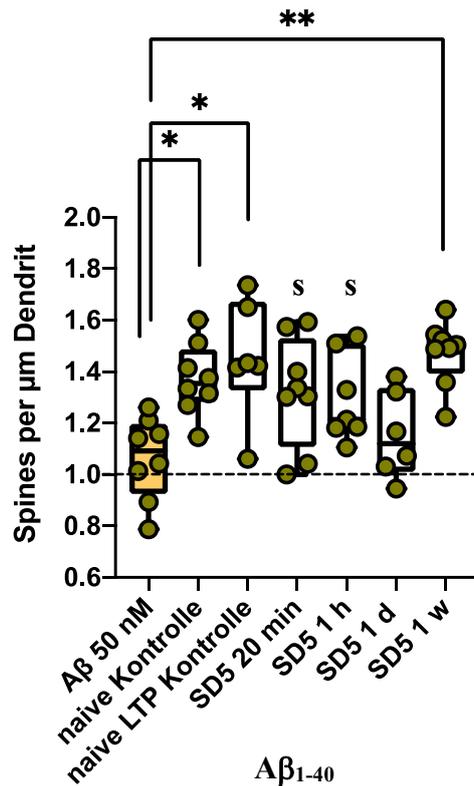
(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) – aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 18: GAL-201 in serieller Verdünnung verhindert einen durch Aβ<sub>1-42</sub>-induzierten Abbau der Spines

[Zahl der Spines pro μm Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> (orange) = Vergleichsgruppe]. Bei alleiniger Inkubation der Schnitte mit 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> sinkt die Zahl der Spines gegenüber Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) signifikant [AUC (naiv) = 0,11 (AUCCi 0 bis 0,31) und (naiv LTP) p < 0,05 sowie AUC = 0,1 (AUCCi 0 bis 0,33)]. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 (20 min) treten signifikant mehr Spines gegenüber 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> auf [p < 0,01 sowie AUC = 0,05 (AUCCi 0 bis 0,19)]. Dieser Effekt ist mit Ausnahme von GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 (1 d), ebenso in signifikanter oder relevanter Form für die zeitlichen Versätze zu beobachten: AUC (1 h) = 0,22 (AUCCi 0,03 bis 0,48), AUC (1 w) = 0,27 (AUCCi 0,04 bis 0,57) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Wie in Abbildung 18 und 19 zu sehen, ist die Spinedichte unter Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) signifikant im Vergleich zu 50 nM Aβ<sub>1-42</sub>/ Aβ<sub>1-40</sub> erhöht. Dies ist auch der Fall, wenn GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5/ GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (20 min) treten signifikant mehr Spines gegenüber 50 nM Aβ auf. Dieser Effekt ist, mit Ausnahme des jeweiligen 1-Tagesversatz ebenso für die zeitlichen Versätze mit einem signifikanten oder relevanten Unterschied zu beobachten. Im Gesamten wird die Spinedichte durch 50 nM Aβ<sub>1-42</sub>/ Aβ<sub>1-40</sub> in Gegenwart von seriell-verdünntem GAL-201 also nicht herabgesetzt (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

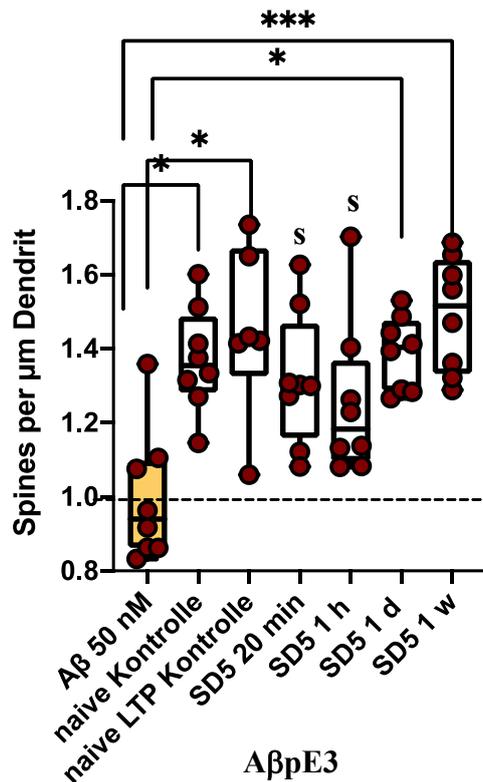


(s = signifikant anhand der Effektgröße) – aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 19: GAL-201 in serieller Verdünnung verhindert einen durch Aβ<sub>1-40</sub>-induzierten Abbau der Spines

[Zahl der Spines pro μm Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ<sub>1-40</sub> (orange) = Vergleichsgruppe]. Bei alleiniger Inkubation mit 50 nM Aβ<sub>1-40</sub> sinkt die Zahl der Spines gegenüber Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) signifikant [(naiv)  $p < 0,05$  sowie  $AUC = 0,05$  (AUCCi 0 bis 0,19) und  $AUC$  (naiv LTP) = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,31)]. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (20 min) treten signifikant mehr Spines gegenüber 50 nM Aβ<sub>1-40</sub> auf [ $AUC = 0,17$  (AUCCi 0 bis 0,44)]. Dieser Effekt ist, mit Ausnahme von GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (1 d), ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten:  $AUC$  (1 h) = 0,16 (AUCCi 0 bis 0,41), (1 w)  $p < 0,01$  sowie  $AUC = 0,02$  (AUCCi 0 bis 0,09) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Abbildung 20 und 21 zeigen, die Spinedichte unter Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) ist auch gegenüber 50 nM Aβ<sub>pE3/3NTyr10Aβ</sub> signifikant erhöht. Dies ist auch der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>pE3SD5</sub>/ GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min) treten signifikant mehr Spines gegenüber 50 nM Aβ auf. Dieser Effekt ist mit Ausnahme von GAL-201/3NTyr10AβSD5 (1 w) ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

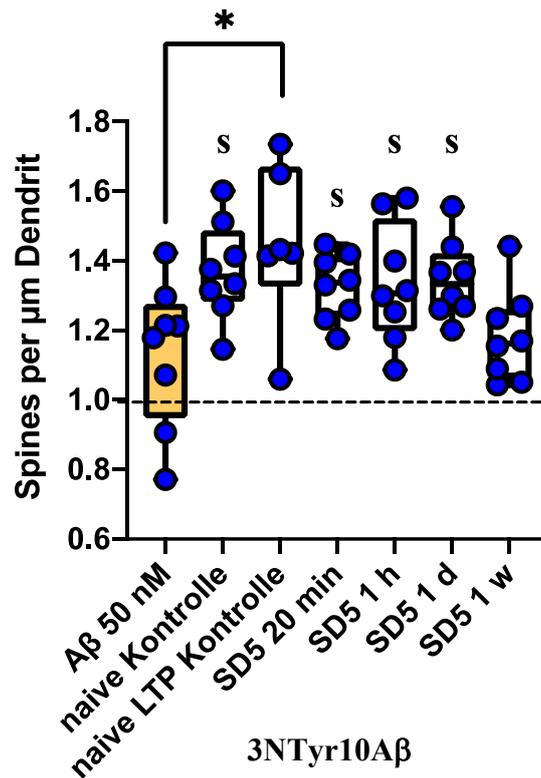


(s = signifikant anhand der Effektgröße) – aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 20: GAL-201 in serieller Verdünnung verhindert einen durch AβpE3-induzierten Abbau der Spines

[Zahl der Spines pro  $\mu\text{m}$  Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM AβpE3 (orange) = Vergleichsgruppe]. Bei alleiniger Inkubation mit 50 nM AβpE3 sinkt die Zahl der Spines gegenüber Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) signifikant [(naiv)  $p < 0,05$  sowie  $AUC = 0,06$  (AUCCi 0 bis 0,23) und  $AUC$  (naiv LTP) = 0,06 (AUCCi 0 bis 0,25)]. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung (20 min) vorhanden ist. Nach Inkubation mit GAL-201/AβpE3SD5 (20 min) treten signifikant mehr Spines gegenüber 50 nM AβpE3 auf [ $AUC = 0,11$  (AUCCi 0 bis 0,33)]. Dieser Effekt ist ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten:  $AUC$  (1 h) = 0,13 (AUCCi 0 bis 0,36), (1 d)  $p < 0,05$  sowie  $AUC = 0,05$  (AUCCi 0 bis 0,19), (1 w)  $p < 0,001$  sowie  $AUC = 0,03$  (AUCCi 0 bis 0,14) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Es lässt sich also zusammenfassend über die Spinedichte festhalten, dass eine Inkubation mit 50 nM Aβ (Aβ<sub>1-42</sub>, Aβ<sub>1-40</sub>, AβpE3 und 3NTyr10Aβ) zu einem Verlust von Spines führt. GAL-201 in serieller Verdünnung schützt hingegen bei allen vier untersuchten Aβ-Subtypen vor dieser Aβ-induzierten Elimination der Spines (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Dies ist auch in den folgenden Ausschnitten der Spineanalyse zu sehen (Abbildung 22). Es handelt sich um eine schwarz-weiß Durchlichtaufnahme mit einem 63er Öl-Immersionsobjektiv (63x/1,4oil DIC $\infty$ /0,17).

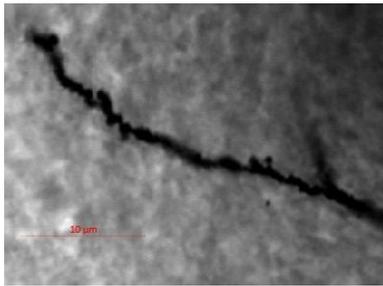


(s = signifikant anhand der Effektgröße) – aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 21: GAL-201 in serieller Verdünnung verhindert einen durch 3NTyr10Aβ-induzierten Abbau der Spines

[Zahl der Spines pro  $\mu\text{m}$  Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM 3NTyr10Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Bei alleiniger Inkubation mit 50 nM 3NTyr10Aβ sinkt die Zahl der Spines gegenüber Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) signifikant [AUC (naiv) = 0,17 (AUCCi 0 bis 0,42) und (naiv LTP)  $p < 0,05$  sowie AUC = 0,17 (AUCCi 0 bis 0,46)]. Dies ist nicht der Fall, wenn zusätzlich GAL-201 in serieller Verdünnung vorhanden ist. Nach Inkubation mit GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min) treten signifikant mehr Spines gegenüber 50 nM 3NTyr10Aβ auf [AUC = 0,2 (AUCCi 0 bis 0,47)]. Dieser Effekt ist, mit Ausnahme von GAL-201/3NTyr10AβSD5 (1 w) ebenso für die zeitlichen Versätze zu beobachten: AUC (1 h) = 0,22 (AUCCi 0,03 bis 0,47), AUC (1 d) = 0,17 (AUCCi 0 bis 0,41) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

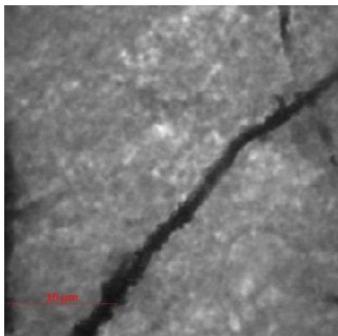
Im Hinblick auf die verschiedenen Spineklassen zeigt sich, dass Filopodia Spines am wenigsten vertreten ist. Es fällt auf, dass im Vergleich zu einer Inkubation mit 50 nM A $\beta_{1-42}$  (Riemann & von Ahsen et al. in preparation) und 3NTyr10Aβ unter Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) signifikant weniger Filopodia Spines auftreten. Nur nach einer Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-42}$ SD5 (20 min) treten ebenfalls relevant weniger Filopodia Spines im Vergleich 50 nM A $\beta_{1-42}$  auf (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Bei A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{pE3}$  ist dieser Effekt dagegen nicht zu beobachten. Hier treten nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-40}$ SD5 (1h) und GAL-201/A $\beta_{pE3}$ SD5 (1d) signifikant mehr Filopodia Spines gegenüber 50 nM A $\beta$  auf. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 23).



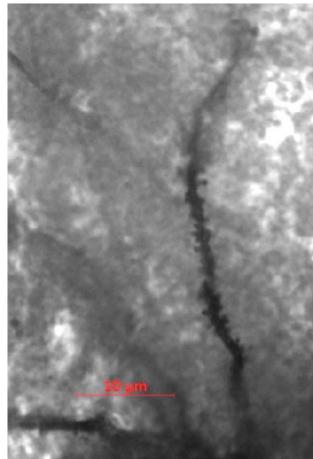
Aβ<sub>1-42</sub> 50 nM



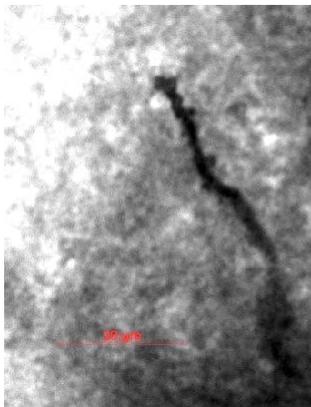
GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 (20 min)



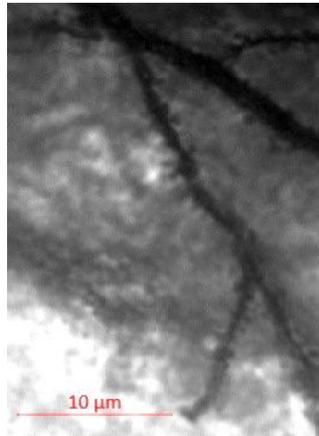
Aβ<sub>1-40</sub> 50 nM



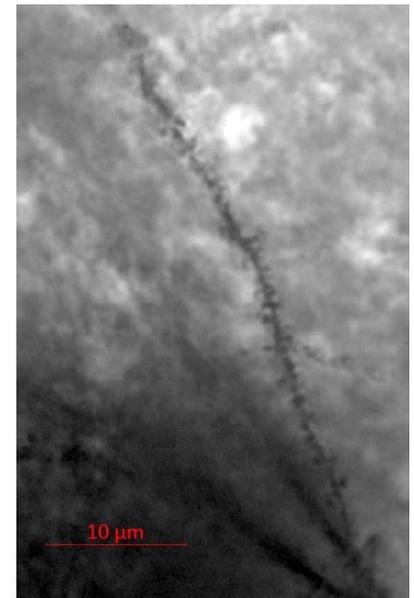
GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (20 min)



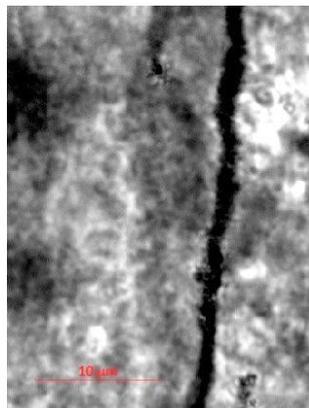
3NTyr10Aβ 50 nM



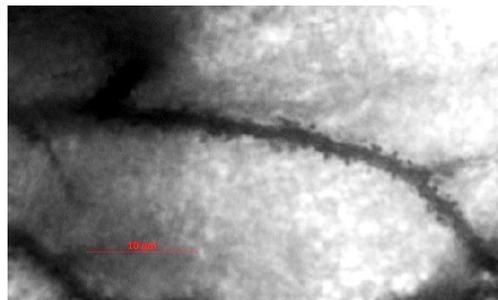
GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min)



naive Kontrolle



AβpE3 50 nM

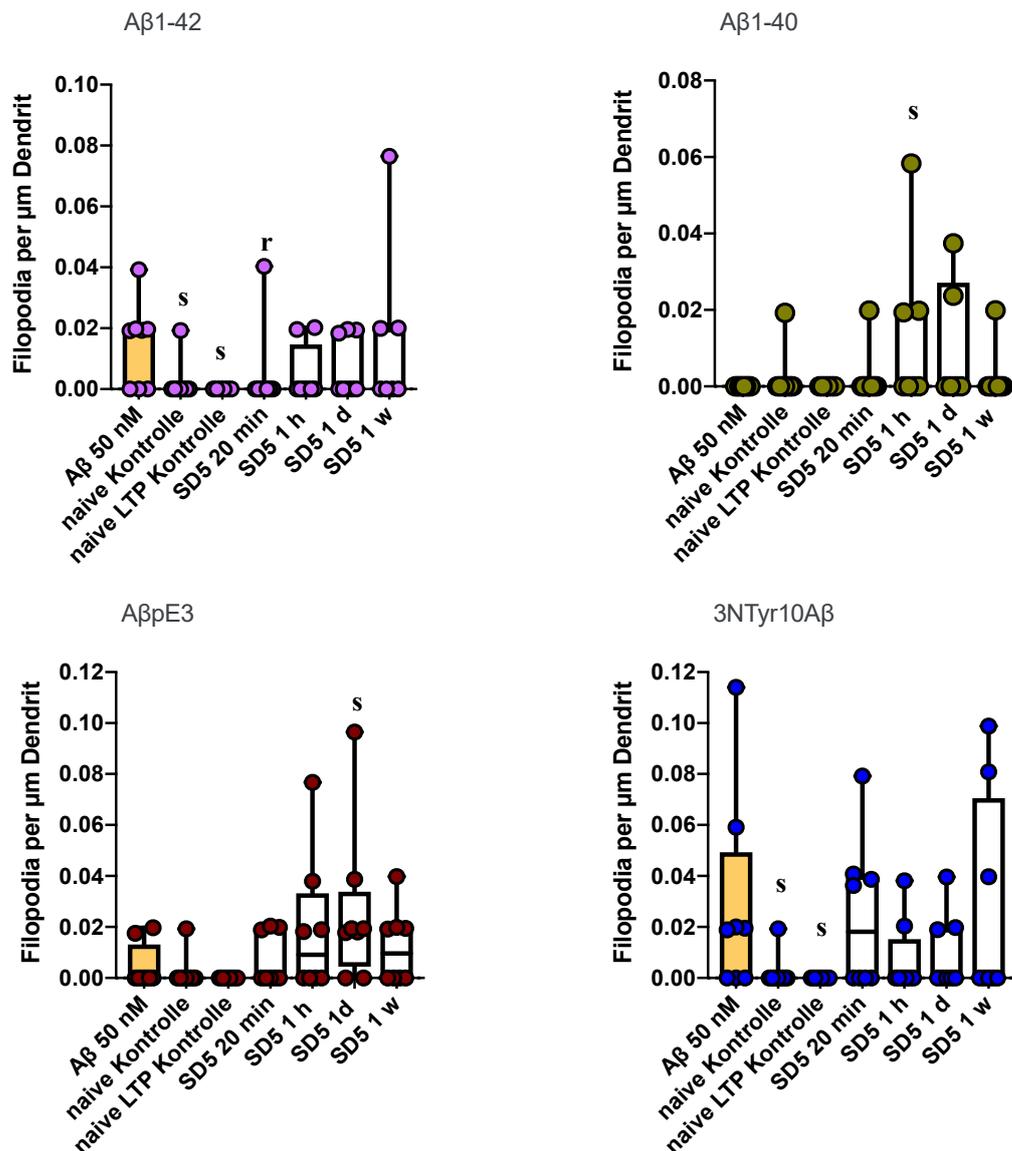


GAL-201/AβpE3SD5 (20 min)

## Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der veränderten Spinedichte

Einfluss von 50 nM Aβ<sub>1-42</sub>, Aβ<sub>1-40</sub>, 3NTyr10Aβ, und AβpE3 auf die Spinedichte - Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle und einem mit GAL-201 behandelten Schnitt. Aufgenommen wurde eine schwarz-weiß Durchlichtaufnahme eines Dendriten mit einem 63er Öl-Immersionsobjektiv (63x/1,4oil DIC<sub>∞</sub>/0,17). Als Maßstab wurden 10 μm gewählt.

## 4.2.2 Dichte der Filopodia Spines



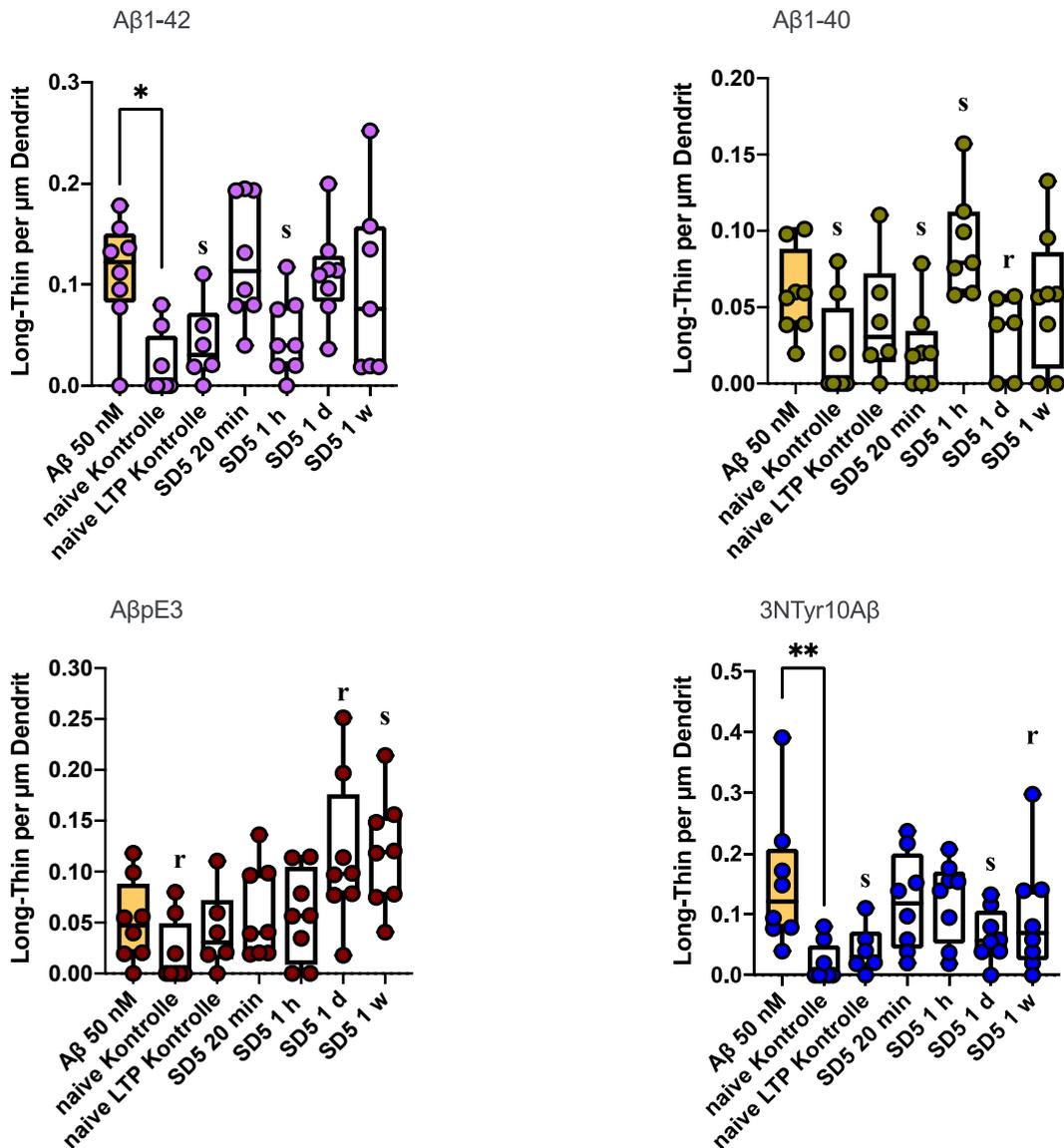
(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) - Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 23: Dichte der Filopodia Spines

[Zahl der Filopodia Spines pro μm Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Unter Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) treten verglichen zu einer Inkubation mit 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> und 3NTyr10Aβ signifikant weniger Filopodia Spines auf [Aβ<sub>1-42</sub>: AUC (naiv) = 0,77 (AUCCi 0,56 bis 0,94) und AUC (naiv LTP) = 0,81 (AUCCi 0,63 bis 0,94); 3NTyr10Aβ: AUC (naiv) = 0,77 (AUCCi 0,56 bis 0,94) und AUC (naiv LTP) = 0,81 (AUCCi 0,63 bis 0,94)]. Nur nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 (20 min) treten ebenfalls relevant weniger Filopodia Spines im Vergleich zu 50 nM Aβ auf [AUC = 0,71 (AUCCi 0,47 bis 0,94)]. Bei Aβ<sub>1-40</sub> und AβpE3 ist dieser Effekt dagegen nicht zu beobachten. Nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (1h) und GAL-201/AβpE3SD5 (1d) treten signifikant mehr Filopodia Spines gegenüber 50 nM Aβ auf [AUC GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (1h) = 0,29 (AUCCi 0,07 bis 0,43) und AUC GAL-201/AβpE3SD5 (1d) = 0,22 (AUCCi 0 bis 0,47)]. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM Aβ (Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

### 4.2.3 Dichte der Long-Thin Spines



(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) - Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 24: Dichte der Long-Thin Spines

[Zahl der Long-Thin Spines pro μm Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Unter naiven Kontrollbedingungen treten signifikant oder relevant weniger Long-Thin Spines gegenüber 50 nM Aβ auf [Aβ<sub>1-42</sub>: p < 0,05 sowie AUC = 0,9 (AUCCi 0,7 bis 1), Aβ<sub>1-40</sub>: AUC = 0,81 (AUCCi 0,54 bis 1), AβpE3: AUC = 0,74 (AUCCi 0,47 bis 0,96), 3NTyr10Aβ: p < 0,01 sowie AUC = 0,94 (AUCCi 0,8 bis 1)]. Auch nach LTP-Induktion der naiven Kontrolle ist die Dichte an Long-Thin Spines gegenüber 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> und 3NTyr10Aβ signifikant erniedrigt [AUC = 0,84 (AUCCi 0,58 bis 1) und AUC = 0,88 (AUCCi 0,65 bis 1)]. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich hingegen stark. Während nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 (1 h), GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (20 min und 1 d), sowie GAL-201/3NTyr10AβSD5 (1 d und 1 w) signifikant oder relevant weniger Long-Thin Spines gegenüber 50 nM Aβ auftreten [AUC GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 (1 h) = 0,82 (AUCCi 0,56 bis 1), AUC GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (20 min) = 0,83 (AUCCi 0,58 bis 1) und AUC (1 d) = 0,75 (AUCCi 0,46 bis 0,96), AUC GAL-201/3NTyr10AβSD5 (1 d) = 0,8 (AUCCi 0,55 bis 0,97) und AUC (1 w) = 0,7 (AUCCi 0,41 bis 0,94)], sind es nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (1 h) [AUC = 0,21 (AUCCi 0,02 bis 0,48)] und GAL-201/AβpE3SD5 (1 d und 1 w) signifikant oder relevant mehr [AUC = 0,25 (AUCCi 0 bis 0,53) und AUC = 0,13 (AUCCi 0 bis 0,33)]. Alle anderen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM Aβ (Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Long-Thin Spines treten unter naiven Kontrollbedingungen signifikant oder relevant weniger im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  auf (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Auch nach LTP-Induktion treten unter naiven Kontrollbedingungen signifikant weniger Long-Thin Spines gegenüber 50 nM A $\beta_{1-42}$  (Riemann & von Ahsen et al. in preparation) und 3NTyr10A $\beta$  auf. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich hingegen stark. Während nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-42}$ SD5 (1 h) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation), GAL-201/A $\beta_{1-40}$ SD5 (20 min und 1 d), sowie GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 d und 1 w) signifikant oder relevant weniger Long-Thin Spines gegenüber 50 nM A $\beta$  auftreten, sind es nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-40}$ SD5 (1 h) und GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (1 d und 1 w) signifikant oder relevant mehr. Alle anderen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 24).

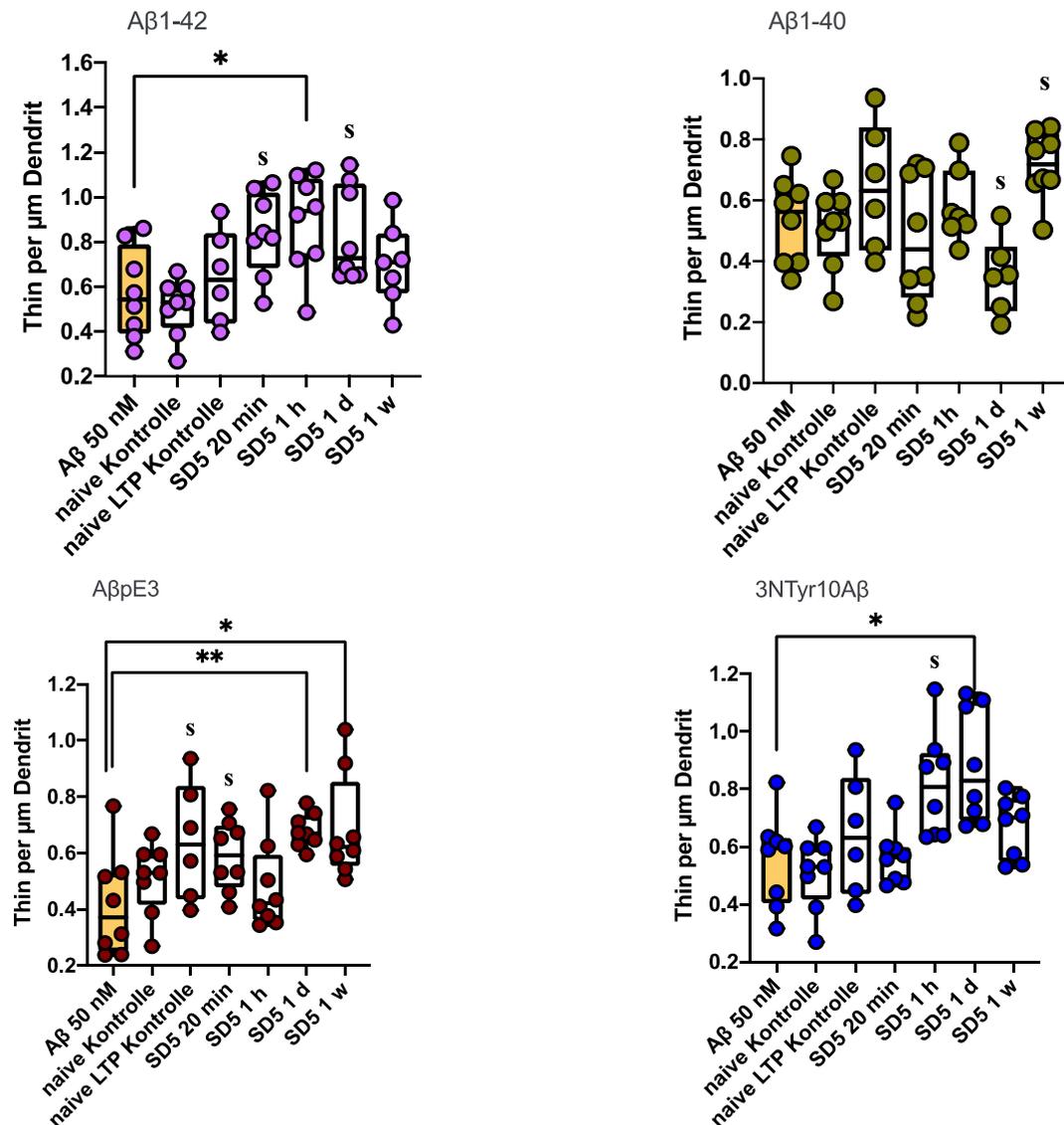
Thin Spines kommen auf die Gesamtheit der Gruppen gesehen verstärkt in den Gruppen der seriellen Verdünnung vor: Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-42}$ SD5 (20 min, 1 h, 1 d) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation), GAL-201/A $\beta_{1-40}$ SD5 (1 w), GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min, 1 d, 1 w) sowie GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 h, 1 d) treten signifikant mehr Thin Spines gegenüber 50 nM A $\beta$  auf. Auch nach LTP-Induktion der naiven Kontrolle ist die Dichte an Thin Spines im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ pE3 erhöht. Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-40}$ SD5 (1d) sind es dagegen signifikant weniger Thin Spines im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ . Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 25).

In Bezug auf die Stubby Spines fällt auf, dass unter Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) die Dichte an Stubby Spines signifikant oder relevant erhöht ist im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Auch signifikant oder relevant mehr Stubby Spines im Vergleich zum 50 nM A $\beta$  treten nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-42}$ SD5 (1 h) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation), GAL-201/A $\beta_{1-40}$ SD5 (20 min, 1 d, 1 w) und GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min, 1 w) auf. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 26).

Die Dichte an Mushroom Spines ist unter naiven Kontrollbedingungen gegenüber 50 nM A $\beta$  aller untersuchten Isoformen signifikant erhöht (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Auch signifikant mehr Mushroom Spines im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  treten nach einer Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-40}$ SD5 (20 min, 1 h, 1 d) sowie mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5

(20 min) auf. Signifikant weniger Mushroom Spines gegenüber 50 nM A $\beta$  kommen dagegen nach einer Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (1 h und 1 d) vor. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber dem 50 nM A $\beta$  Vergleich (Abbildung 27).

#### 4.2.4 Dichte der Thin Spines



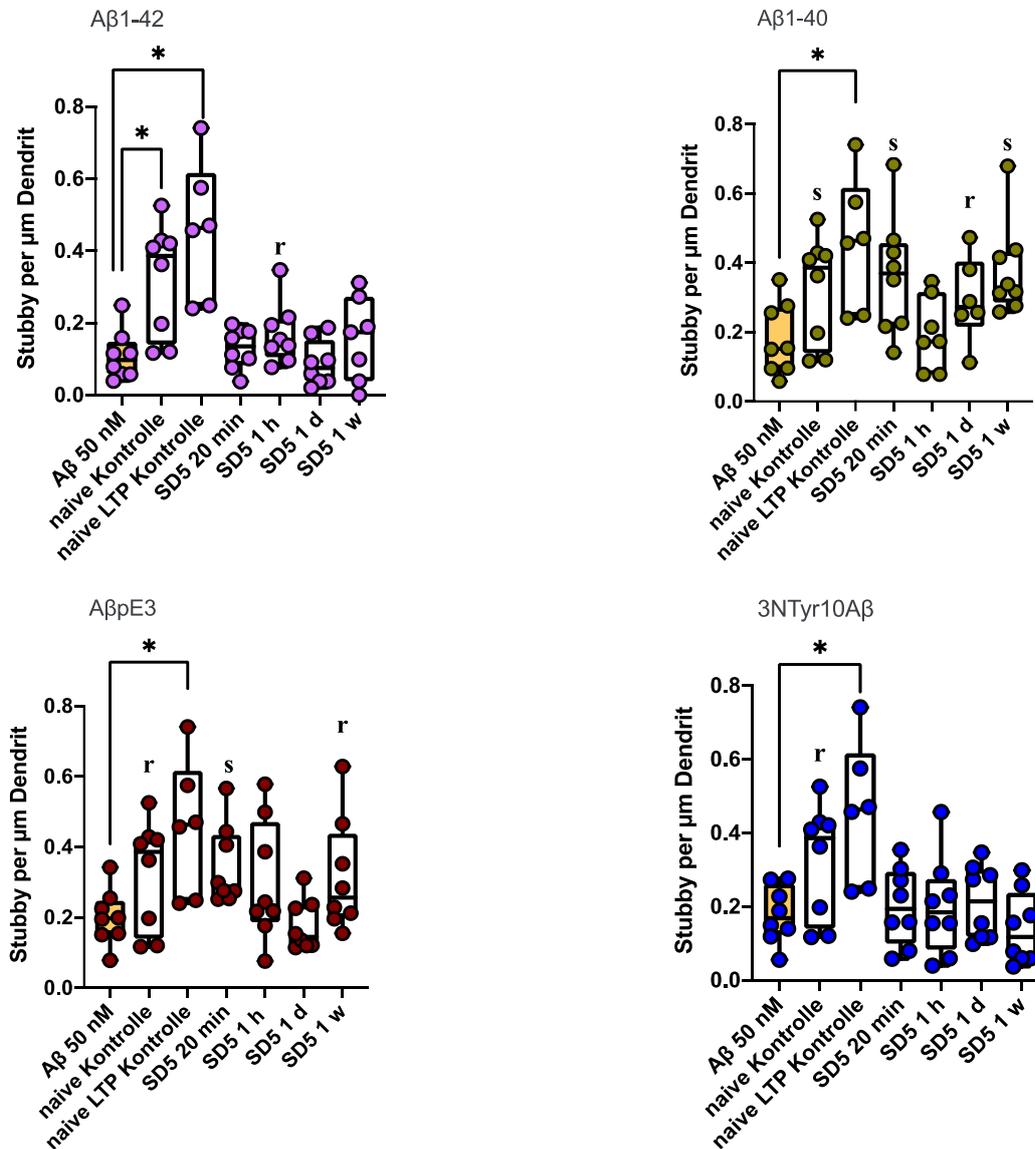
(s = signifikant anhand der Effektgröße) - A $\beta$ 1-42 aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

#### Abbildung 25: Dichte der Thin Spines

[Zahl der Thin Spines pro  $\mu$ m Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM A $\beta$  (orange) = Vergleichsgruppe]. Thin Spines kommen auf die Gesamtheit der Gruppen gesehen verstärkt in den Gruppen der seriellen Verdünnung vor: Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (20 min, 1 h, 1 d) [AUC (20 min) = 0,19 (AUCCi 0,02 bis 0,44), (1 h)  $p < 0,05$  sowie AUC = 0,14 (AUCCi 0 bis 0,36), AUC (1 d) = 0,2 (AUCCi 0,02 bis 0,47)], GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (1 w) [AUC = 0,13 (AUCCi 0 bis 0,34), GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min, 1 d, 1 w) [AUC (20 min) = 0,22 (AUCCi 0,02 bis 0,48), (1 d)  $p < 0,01$  sowie AUC = 0,11 (AUCCi 0 bis 0,38), (1 w)  $p < 0,05$  sowie AUC = 0,13 (AUCCi 0 bis 0,34)] und GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 h, 1 d) [AUC (1 h) = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,25), (1 d)  $p < 0,05$  sowie AUC = 0,06 (AUCCi 0 bis 0,23)] treten signifikant mehr Thin Spines gegenüber

50 nM A $\beta$  auf. Auch signifikant mehr Thin Spines treten auf nach LTP-Induktion der naiven Kontrolle im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ pE3 [AUC = 0,19 (AUCCi 0 bis 0,46)]. Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (1d) treten gegenüber 50 nM A $\beta$  dagegen signifikant weniger Thin Spines auf [AUC = 0,81 (AUCCi 0,54 bis 1)]. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

#### 4.2.5 Dichte der Stubby Spines



(s = signifikant anhand der Effektgröße)

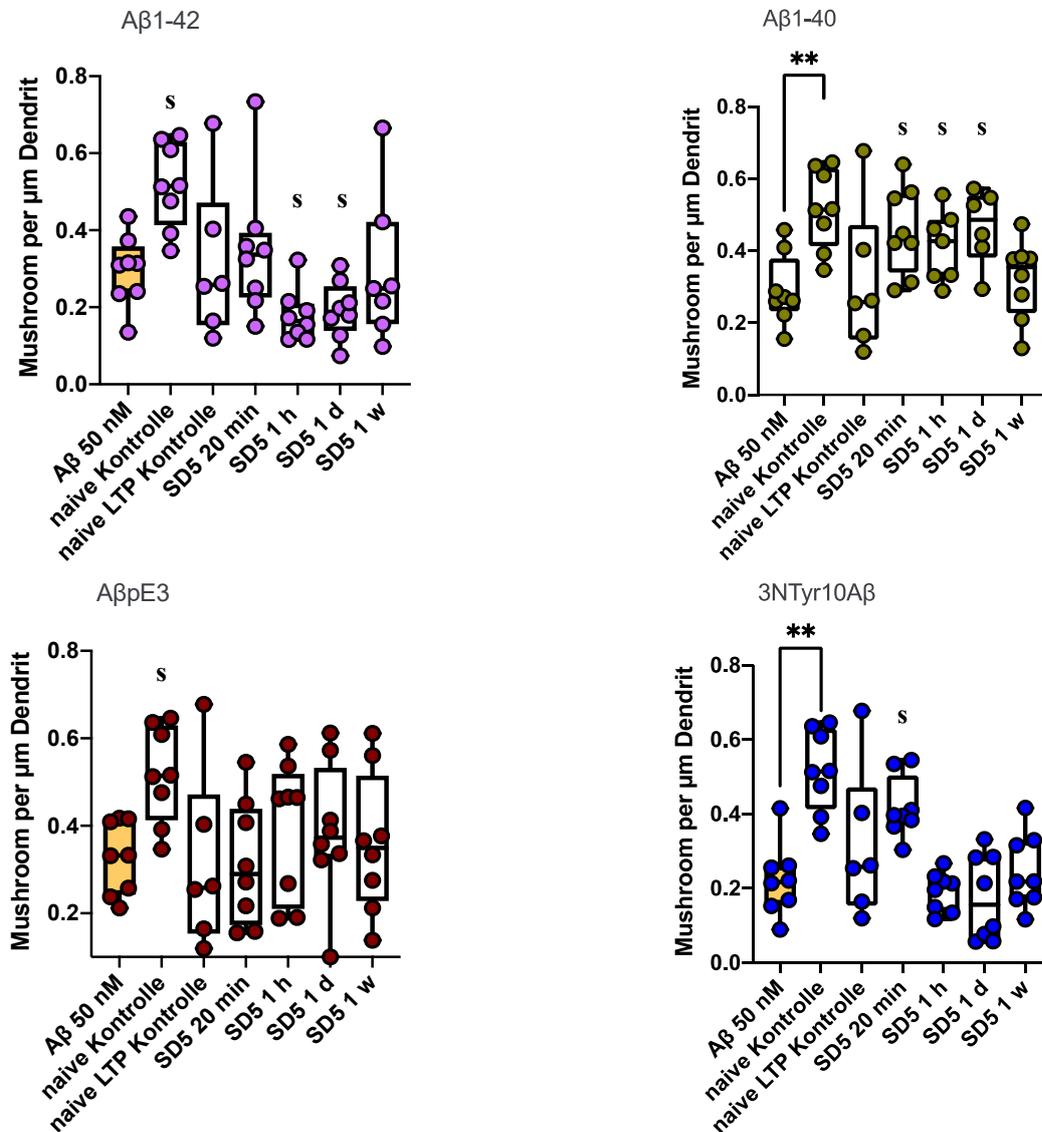
(r = relevant anhand der Effektgröße) - A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

#### Abbildung 26: Dichte der Stubby Spines

[Zahl der Stubby Spines pro μm Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM A $\beta$  (orange) = Vergleichsgruppe]. Unter Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) ist die Dichte an Stubby Spines gegenüber 50 nM A $\beta$  signifikant oder relevant erhöht [A $\beta$ <sub>1-42</sub>: beide p < 0,05 sowie AUC = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,23) und AUC = 0,04 (AUCCi 0 bis 0,17), A $\beta$ <sub>1-40</sub>: AUC = 0,2 (AUCCi 0 bis 0,47) und p < 0,05 sowie AUC = 0,13 (AUCCi 0 bis 0,38), A $\beta$ pE3: AUC = 0,28 (AUCCi 0,02 bis 0,59) und p < 0,05 sowie AUC = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,25), 3NTyr10A $\beta$ : AUC = 0,25 (AUCCi 0,02 bis 0,53) und p < 0,05 sowie AUC = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,25)]. Auch signifikant oder relevant mehr Stubby Spines im Vergleich zum 50 nM A $\beta$  treten nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (1 h) [AUC = 0,27 (AUCCi 0,05 bis 0,55), GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (20 min, 1 d, 1 w) [AUC (20

min) = 0,19 (AUCCi 0,02 bis 0,44), AUC (1 d) = 0,23 (AUCCi 0,02 bis 0,52), AUC (1 w) = 0,09 (AUCCi 0 bis 0,28)] und GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min, 1 w) [AUC (20 min) = 0,11 (AUCCi 0 bis 0,31), AUC (1 w) = 0,23 (AUCCi 0,05 bis 0,5)] auf. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

#### 4.2.6 Dichte der Mushroom Spines



(s = signifikant anhand der Effektgröße) - A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

#### Abbildung 27: Dichte der Mushroom Spines

[Zahl der Mushroom Spines pro  $\mu$ m Dendrit präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM A $\beta$  (orange) = Vergleichsgruppe]. Unter naiven Kontrollbedingungen treten im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  aller untersuchten Subtypen signifikant mehr Mushroom Spines auf [A $\beta$ <sub>1-42</sub>: AUC = 0,05 (AUCCi 0 bis 0,17), A $\beta$ <sub>1-40</sub>: p < 0,01 sowie AUC = 0,06 (AUCCi 0 bis 0,23), A $\beta$ pE3: AUC = 0,09 (AUCCi 0 bis 0,28), 3NTyr10A $\beta$ : p < 0,01 sowie AUC = 0,03 (AUCCi 0 bis 0,14)]. Auch signifikant mehr Mushroom Spines im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  treten nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (20 min, 1 h, 1 d) [AUC (20 min) = 0,11 (AUCCi 0 bis 0,31), AUC (1h) = 0,13 (AUCCi 0 bis 0,36), AUC (1d) = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,27)] und nach Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (20 min) [AUC = 0,09 (AUCCi 0 bis 0,31)] auf. Signifikant weniger Mushroom Spines gegenüber 50 nM A $\beta$  kommen dagegen nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (1 h und 1 d) [AUC = 0,84 (AUCCi 0,61 bis 1) und AUC = 0,84 (AUCCi 0,59 bis 1)] vor. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

### 4.3 FACS

Bei der FACS-Analyse wird nicht nur die relative Anzahl der Mikroglia und Astrozyten gemessen, sondern auch deren Aktivierung anhand der Expression verschiedener Markerproteine betrachtet. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den LTP-Daten und der Spineanalyse wurden für die Durchflusszytometrie ebenso Proben aus hippocampalen Gewebe verwendet.

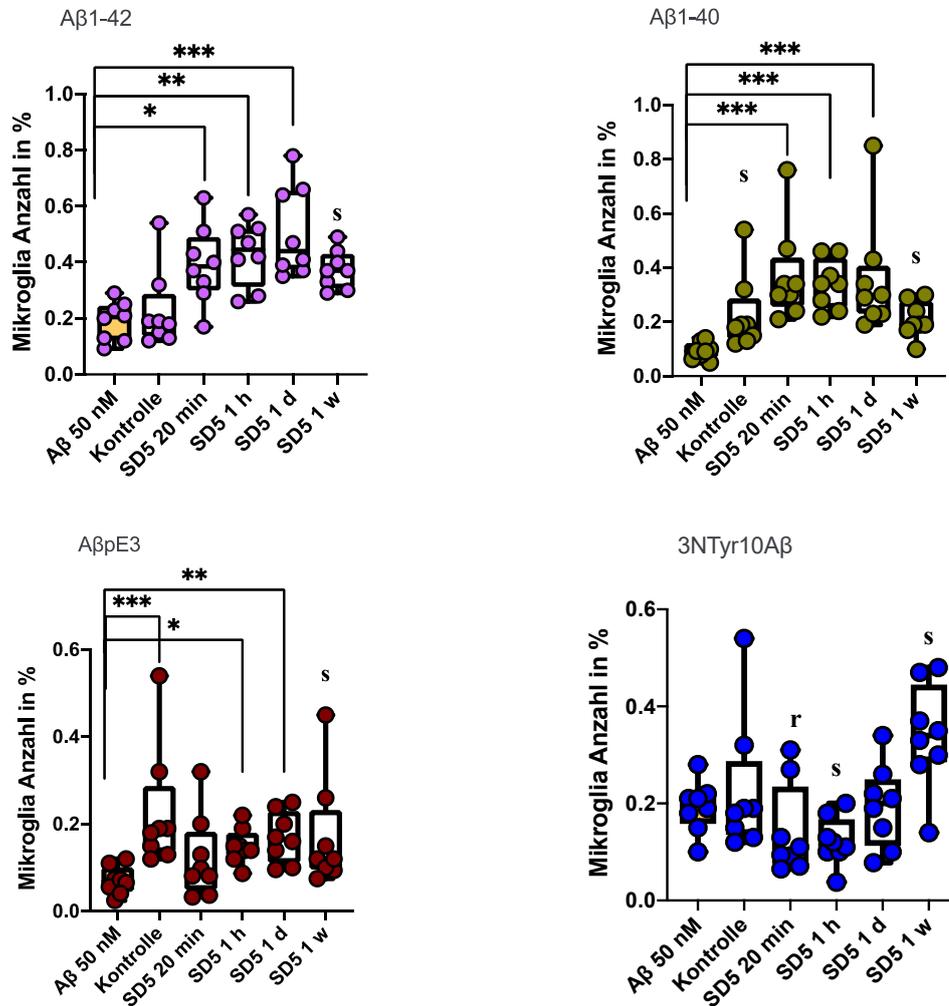
Bei Betrachtung der Zellen, die über die Gates  $CD11b^+/CD45^{int}/F4/80^+/TMEM119^+/P2RY12^+$  erfasst wurden (Gruppe der Mikroglia), fällt auf, dass nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (Riemann & von Ahsen et al. in preparation) und GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (je alle Zeitversätze) signifikant mehr Mikroglia auftreten als nach einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$ . Ebenso der Fall ist dies nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (1 h, 1 d, 1 w). Allerdings ist im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ pE3 die relative Mikrogliazahl unter Kontrollbedingungen ebenfalls signifikant erhöht. Außerdem erhöht ist der Anteil der Mikroglia nach der Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 w), erniedrigt dagegen nach der Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (20 min und 1 h). Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 28).

Die TREM-2 Expression unter den Mikroglia ist nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (alle Zeitversätze) ebenso wie unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ 1-42 signifikant erhöht (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). TREM-2 ist außerdem erhöht nach Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 d und 1 w) im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ . Relevant erniedrigt gegenüber 50 nM A $\beta$  ist TREM-2 nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (1 w). Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 29).

Die CD163 Expression unter den Mikroglia ist signifikant erhöht nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (Riemann & von Ahsen et al. in preparation) und GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (je alle Zeitversätze) sowie unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ 1-42 (Riemann & von Ahsen et al. in preparation) und A $\beta$ 1-40. Dies ist sonst nur der Fall nach Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (20 min). Bei A $\beta$ pE3 liegt dagegen der umgekehrte Fall vor, unter Kontrollbedingungen unterscheidet sich die CD163 Expression nicht relevant von 50 nM A $\beta$ pE3, jedoch wird nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ pE3 (20 min, 1h, 1d) signifikant oder

relevant weniger CD163 exprimiert. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 30).

### 4.3.1 Mikroglia Count



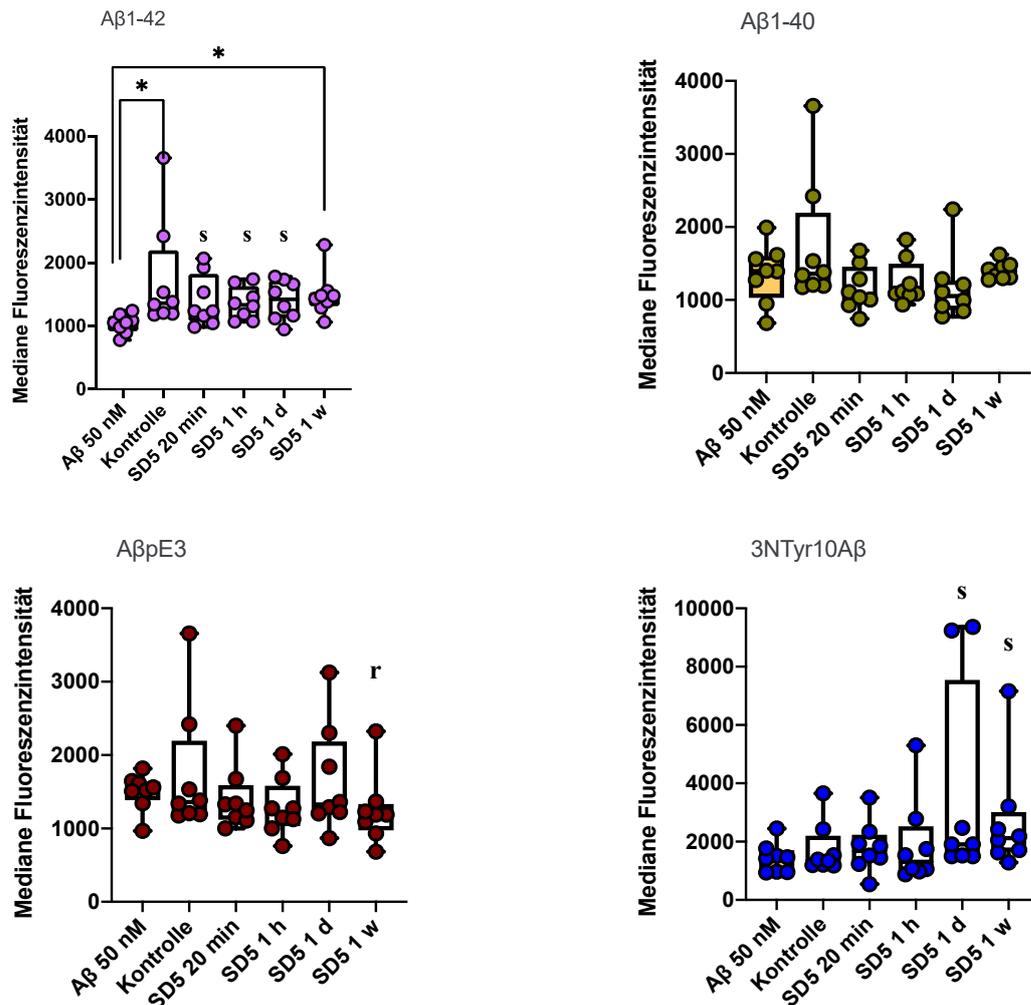
(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) - A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 28: Anteil der Mikroglia an der Gesamtzahl der Zellen (Gating nach CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>/TMEM119<sup>+</sup>/P2RY12<sup>+</sup>)

[Anzahl der Events präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM A $\beta$  (orange) = Vergleichsgruppe]. Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 und GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (je alle Zeitversätze) ist die Zahl der Mikroglia signifikant gegenüber 50 nM A $\beta$  erhöht [A $\beta$ 1-42SD5: (20 min)  $p < 0,05$  sowie AUC = 0,09 (AUCCi 0 bis 0,28), (1 h)  $p < 0,01$  sowie AUC = 0,03 (AUCCi 0 bis 0,14), (1 d)  $p < 0,001$  sowie AUC = 0 (AUCCi 0 bis 0), AUC (1w) = 0,01 (AUCCi 0 bis 0,05); A $\beta$ 1-40SD5: (20 min)  $p < 0,001$  sowie AUC = 0 (AUCCi 0 bis 0), (1 h)  $p < 0,001$  sowie AUC = 0 (AUCCi 0 bis 0), (1 d)  $p < 0,001$  sowie AUC = 0 (AUCCi 0 bis 0), AUC (1w) = 0,04 (AUCCi 0 bis 0,16)]. Ebenso der Fall ist dies für GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (Ausnahme 20 min) [(1 h)  $p < 0,05$  sowie AUC = 0,04 (AUCCi 0 bis 0,15), (1 d)  $p < 0,01$  sowie AUC = 0,06 (AUCCi 0 bis 0,23), AUC (1 w) = 0,01 (AUCCi 0 bis 0,05)]. Erhöht war der Anteil der Mikroglia auch nach der Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 w) [AUC = 0,12 (AUCCi 0 bis 0,38)], erniedrigt dagegen nach der Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (20 min und 1 h) [AUC (20 min) = 0,73 (AUCCi 0,42 bis 1), AUC (1 h) = 0,84 (AUCCi 0,6 bis 1)]. Außerdem erhöht waren die Mikroglia unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu der Inkubation mit 50 nM A $\beta$ 1-40 [AUC = 0,06 (AUCCi 0 bis 0,19)] und 50 nM A $\beta$ pE3 [ $p < 0,001$  sowie AUC = 0,01 (AUCCi 0 bis 0,05)] (A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

### 4.3.2 TREM-2



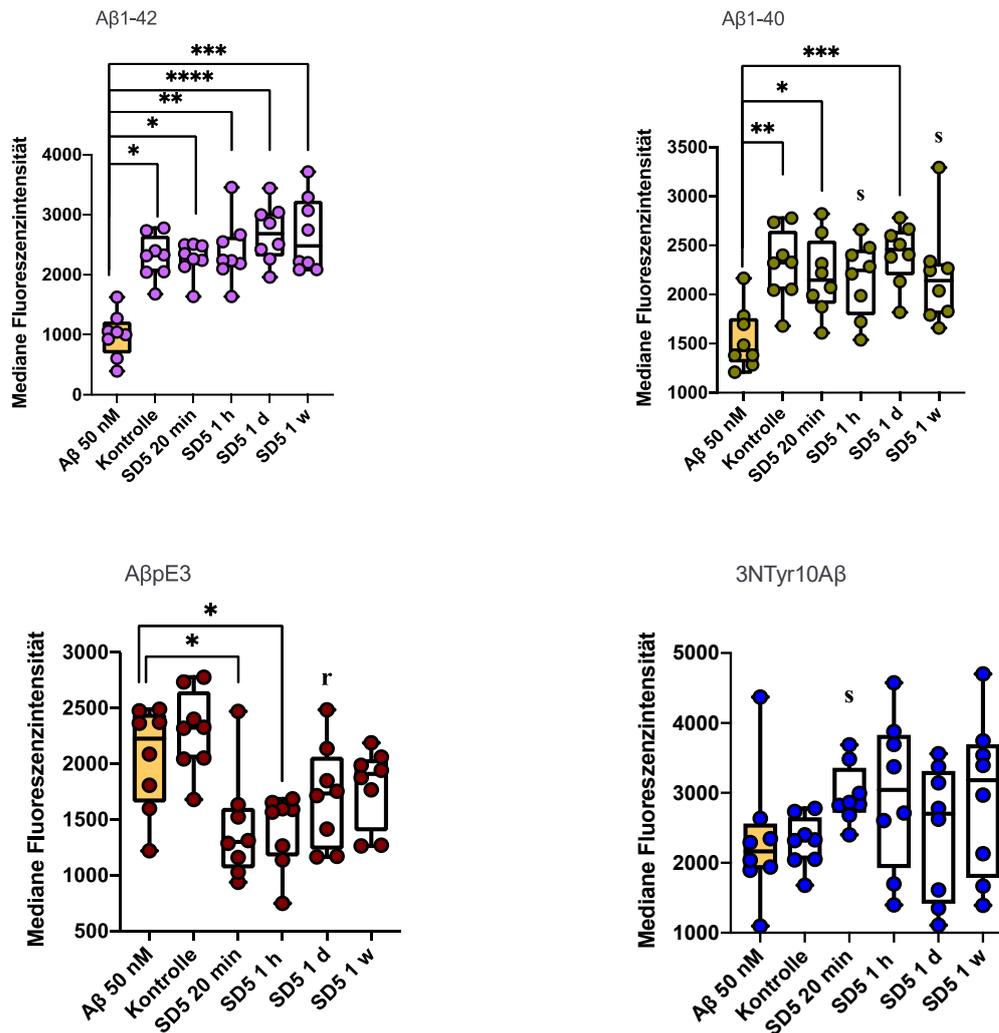
(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) - Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

#### Abbildung 29: TREM-2 Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>/TMEM119<sup>+</sup>/P2RY12<sup>+</sup>)

[Expressionslevel von TREM-2 präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Die TREM-2 Expression ist nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 ebenso wie unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> signifikant erhöht [Kontrolle p < 0,05 sowie AUC = 0,06 (AUCCi 0 bis 0,22), AUC (20 min) = 0,22 (AUCCi 0,03 bis 0,48), AUC (1 h) = 0,11 (AUCCi 0 bis 0,31), AUC (1 d) = 0,16 (AUCCi 0 bis 0,39), 1w p < 0,05 sowie AUC = 0,05 (AUCCi 0 bis 0,19)]. TREM-2 ist außerdem erhöht nach Inkubation mit GAL-201/3NTyr10AβSD5 (1 d und 1 w) im Vergleich zu 50 nM 3NTyr10Aβ [AUC = 0,16 (AUCCi 0 bis 0,39) und AUC = 0,19 (AUCCi 0 bis 0,44)]. Relevant erniedrigt gegenüber 50 nM AβpE3 ist TREM-2 nach Inkubation mit GAL-201/ AβpE3SD5 (1 w) [AUC = 0,78 (AUCCi 0,48 bis 1)]. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM Aβ (Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

### 4.3.3 CD163



(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) - Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 30: CD163 Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>/TMEM119<sup>+</sup>/P2RY12<sup>+</sup>)

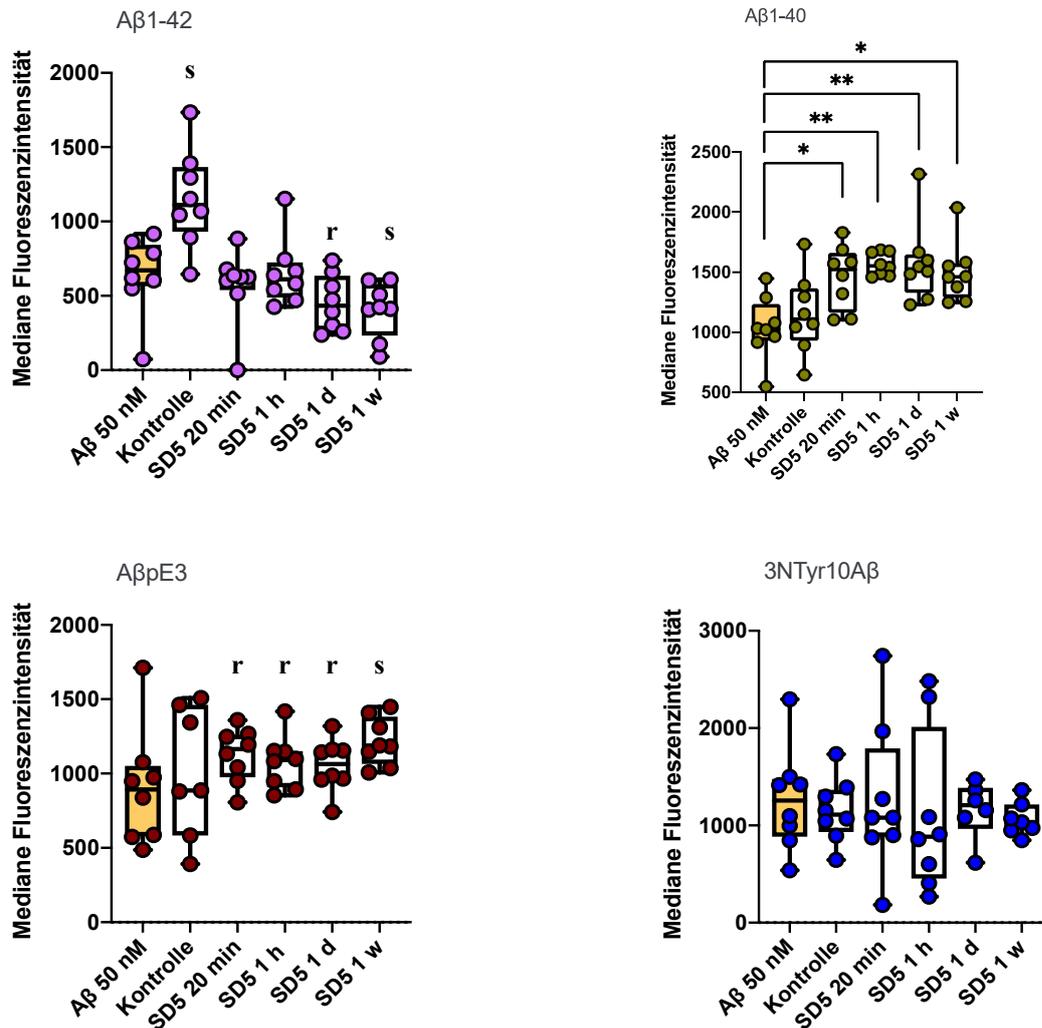
[Expressionslevel von CD163 präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Die CD163 Expression ist signifikant erhöht nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 und GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 sowie unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> und Aβ<sub>1-40</sub> [Aβ<sub>1-42</sub>: (Kontrolle) p < 0,05, (20 min) p < 0,05, (1 h) p < 0,01, (1 d) p < 0,0001, (1 w) p < 0,001 sowie bei allen Gruppen AUC = 0 (AUCCi 0 bis 0), Aβ<sub>1-40</sub>: (Kontrolle) p < 0,01 sowie AUC = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,25), (20 min) p < 0,05 sowie AUC = 0,09 (AUCCi 0 bis 0,28), AUC (1 h) = 0,09 (AUCCi 0 bis 0,27), (1 d) p < 0,001 sowie AUC = 0,03 (AUCCi 0 bis 0,14), AUC (1 w) = 0,09 (AUCCi 0 bis 0,28)]. Dies ist sonst nur der Fall nach Inkubation mit GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min) [AUC = 0,14 (AUCCi 0 bis 0,39)]. Bei AβpE3 liegt dagegen der umgekehrte Fall vor, unter Kontrollbedingungen unterscheidet sich die CD163 Expression nicht relevant von 50 nM AβpE3, jedoch wird nach Inkubation mit GAL-201/AβpE3 (20 min, 1h, 1d) signifikant oder relevant weniger CD163 exprimiert [(20 min) p < 0,05 sowie AUC = 0,83 (AUCCi 0,58 bis 1) und (1h) p < 0,05 sowie AUC 0,88 (AUCCi 0,66 bis 1), AUC (1d) = 0,7 (AUCCi 0,42 bis 0,94)]. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM Aβ (Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Die CD80 Expression unter den Mikroglia ist nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 und GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (je alle Zeitversätze) gegenüber 50 nM A $\beta$  signifikant oder relevant erhöht. Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (1 d und 1 w) wird dagegen relevant/signifikant weniger CD80 im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  exprimiert. Unter Kontrollbedingungen ist die Expression von CD80 im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ 1-42 jedoch signifikant erhöht. Bei den anderen Gruppen und insbesondere bei 3NTyr10A $\beta$  treten keine relevanten oder signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 31).

Bei der CX3CR1 Expression unter den Mikroglia fällt auf, dass die Expression unter Kontrollbedingungen gegenüber 50 nM A $\beta$  (alle untersuchten Subtypen) signifikant oder relevant niedriger ausfällt. Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (1 h), GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (20 min, 1 h, 1 d, 1 w) und GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min, 1 h, 1 d) wird im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  dagegen signifikant oder relevant mehr CX3CR1 exprimiert. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 32).

Die IL-1 $\beta$ -Expression unter den Mikroglia ist unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (alle Zeitversätze) gegenüber 50 nM A $\beta$ 1-42 signifikant erniedrigt (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Sonst ist dies nur der Fall nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ pE3 SD5 (1 h und 1 w). Allerdings wird gegenüber 50 nM A $\beta$ pE3 unter Kontrollbedingungen signifikant mehr IL-1 $\beta$  exprimiert. Dies ist auch der Fall gegenüber 50 nM A $\beta$ 1-40. Allerdings wird nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (alle Zeitversätze) ebenfalls relevant/signifikant mehr IL-1 $\beta$  gegenüber 50 nM A $\beta$  exprimiert. Dies ist auch der Fall unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM 3NTyr10A $\beta$  und einer Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 w). Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 33).

#### 4.3.4 CD80

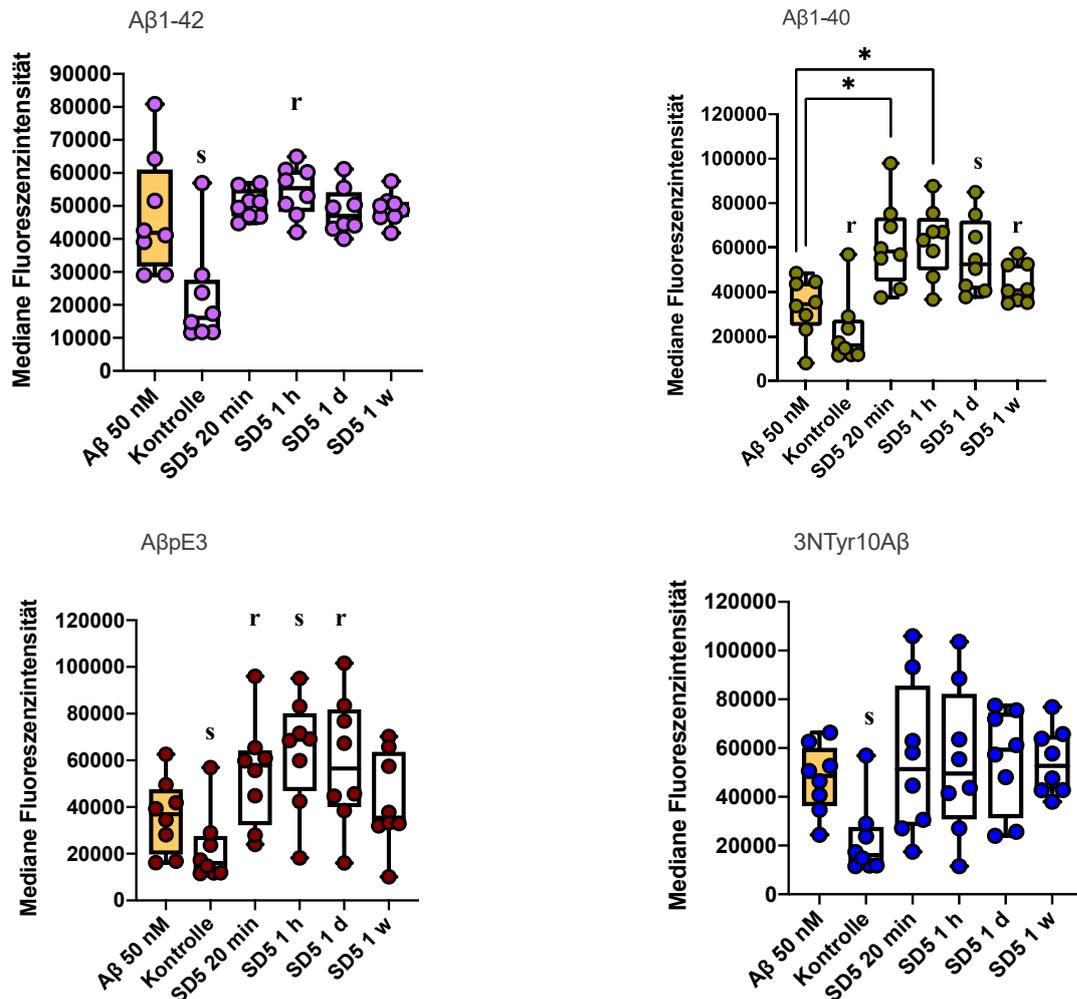


(s = signifikant anhand der Effektgröße)  
(r = relevant anhand der Effektgröße)

#### Abbildung 31: CD80 Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>/TMEM119<sup>+</sup>/P2RY12<sup>+</sup>)

[Expressionslevel von CD80 präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Die CD80 Expression unter den Mikroglia ist nach Inkubation mit GAL-201/Aβ1-40SD5 und GAL-201/AβpE3SD5 gegenüber 50 nM Aβ signifikant oder relevant erhöht [Aβ<sub>1-40</sub>: (20 min) p < 0,05 sowie AUC = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,23), (1 h) p < 0,01 sowie AUC = 0 (AUCCi 0 bis 0), (1 d) p < 0,01 sowie AUC = 0,06 (AUCCi 0 bis 0,23), (1 w) p < 0,05 sowie AUC = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,25) und AβpE3: AUC (20 min) = 0,23 (AUCCi 0,02 bis 0,5), AUC (1 h) = 0,26 (AUCCi 0,03 bis 0,55), AUC (1 d) = 0,27 (AUCCi 0,03 bis 0,55), AUC (1 w) = 0,16 (AUCCi 0 bis 0,41)]. Nach Inkubation mit GAL-201/Aβ1-42SD5 (1 d und 1 w) wird dagegen relevant/signifikant weniger CD80 im Vergleich zu 50 nM Aβ exprimiert [AUC = 0,75 (AUCCi 0,47 bis 0,97) und AUC = 0,82 (AUCCi 0,56 bis 1)]. Unter Kontrollbedingungen ist die Expression von CD80 im Vergleich zu 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> jedoch signifikant erhöht [AUC = 0,08 (AUCCi 0 bis 0,25)]. Bei den anderen Gruppen und insbesondere bei 3NTyr10Aβ treten keine relevanten oder signifikanten Unterschiede auf.

### 4.3.5 CX3CR1

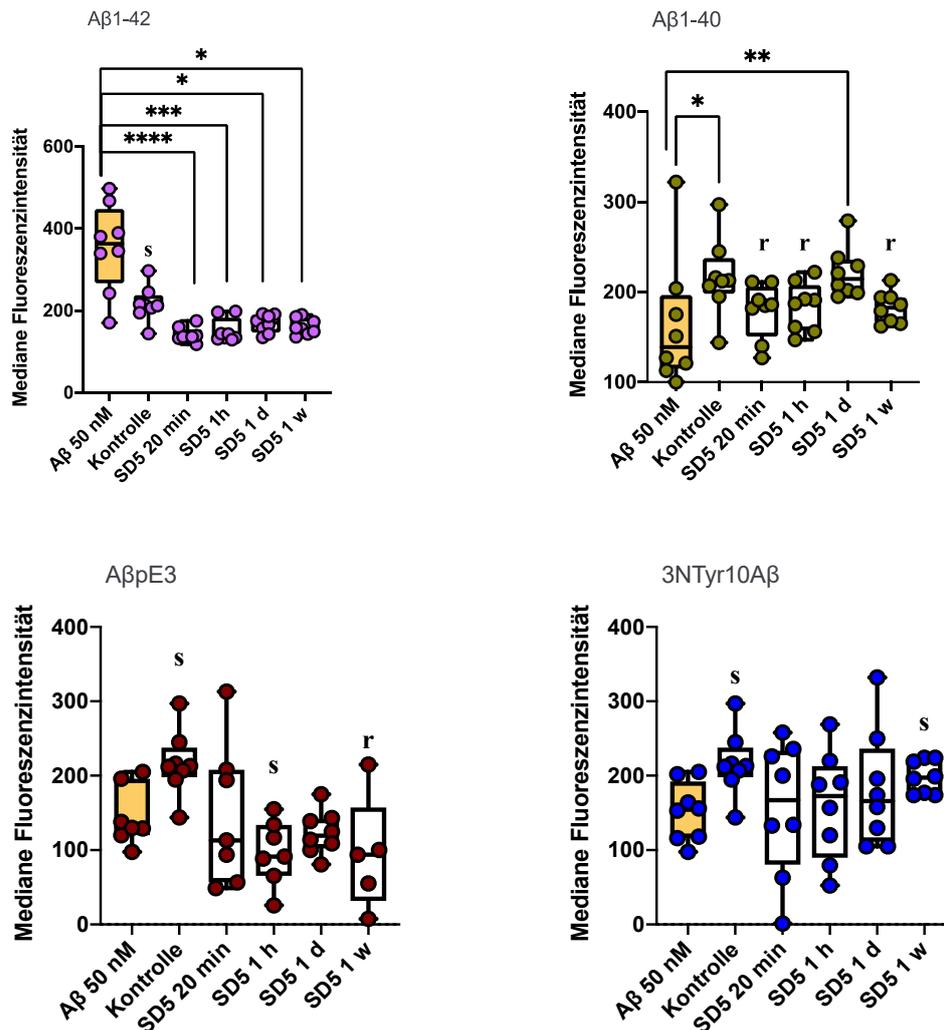


(s = signifikant anhand der Effektgröße)  
(r = relevant anhand der Effektgröße)

#### Abbildung 32: CX3CR1 Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach $CD11b^+/CD45^{int}/F4/80^+/TMEM119^+/P2RY12^+$ )

[Expressionslevel von CX3CR1 präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM A $\beta$  (orange) = Vergleichsgruppe]. Die Expression von CX3CR1 ist unter Kontrollbedingungen gegenüber 50 nM A $\beta$  (alle untersuchten Subtypen) signifikant oder relevant erniedrigt [A $\beta_{1-42}$ : AUC = 0,91 (AUCCi 0,67 bis 1), A $\beta_{1-40}$ : AUC = 0,73 (AUCCi 0,44 bis 1), A $\beta$ pE3: AUC = 0,78 (AUCCi 0,52 bis 0,98), 3NTyr10A $\beta$ : AUC = 0,89 (AUCCi 0,67 bis 1)]. Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta_{1-42}$ SD5 (1 h) [AUC = 0,3 (AUCCi 0,03 bis 0,59)], GAL-201/A $\beta_{1-40}$ SD5 (20 min, 1 h, 1 d, 1 w) [(20 min) p < 0,05 sowie AUC = 0,09 (AUCCi 0 bis 0,28), (1 h) p < 0,05 sowie AUC = 0,06 (AUCCi 0 bis 0,22), AUC (1 d) = 0,14 (AUCCi 0 bis 0,38), AUC (1 w) = 0,27 (AUCCi 0,06 bis 0,56)] sowie GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min, 1 h, 1 d) [AUC (20 min) = 0,27 (AUCCi 0,03 bis 0,55), AUC (1 h) = 0,14 (AUCCi 0 bis 0,38), AUC (1 d) = 0,25 (AUCCi 0,03 bis 0,53)] wird gegenüber 50 nM A $\beta$  dagegen signifikant oder relevant mehr CX3CR1 exprimiert. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$ .

### 4.3.6 IL-1 $\beta$



(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) - A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

#### Abbildung 33: IL-1 $\beta$ Expression unter den Mikroglia gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>/TMEM119<sup>+</sup>/P2RY12<sup>+</sup>)

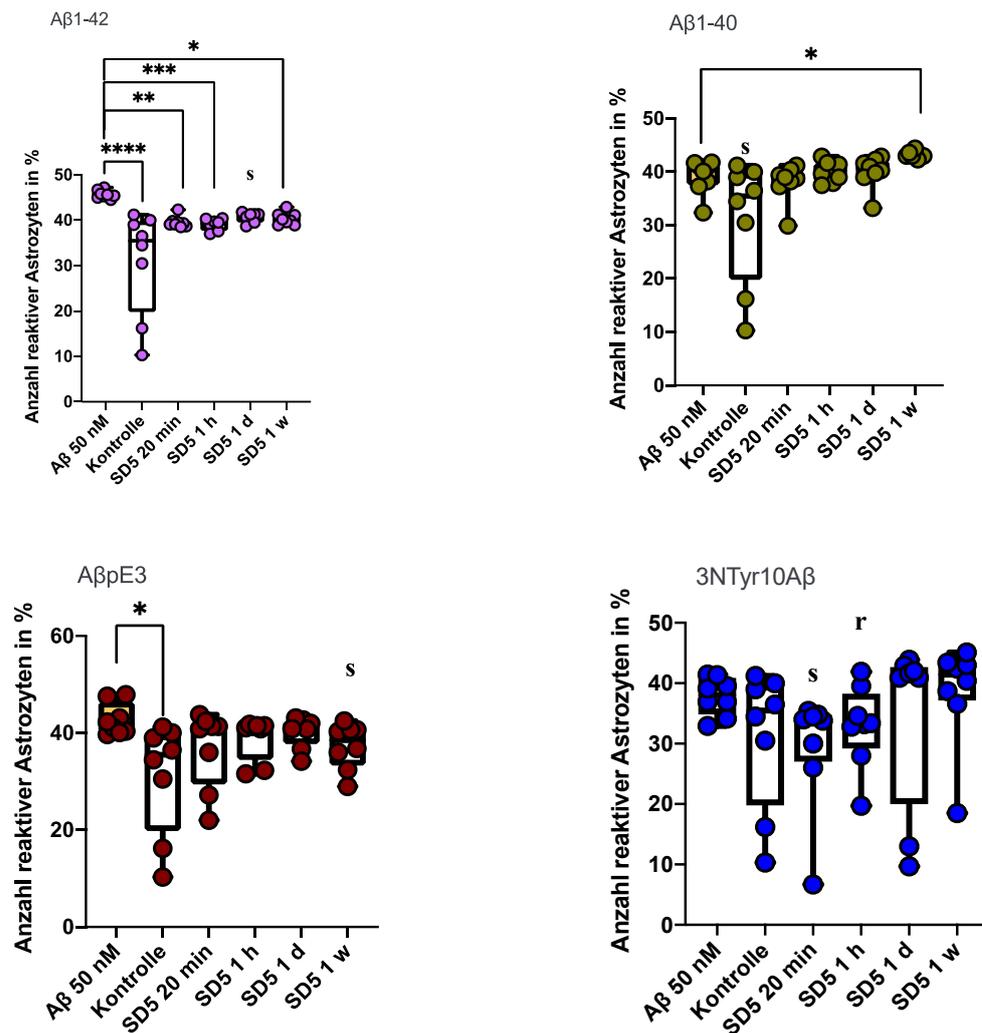
[Expressionslevel von IL-1 $\beta$  präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM A $\beta$  (orange) = Vergleichsgruppe]. Die IL-1 $\beta$ -Expression unter den Mikroglia ist unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 gegenüber 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> signifikant erniedrigt [(Kontrolle) AUC = 0,86 (AUCCi 0,63 bis 1), (20 min) p < 0,0001 sowie AUC 0,98 (AUCCi 0,91 bis 1), (1 h) p < 0,001 sowie AUC = 0,97 (AUCCi 0,86 bis 1), (1 d) p < 0,05 sowie AUC = 0,94 (AUCCi 0,77 bis 1), (1 w) p < 0,05 sowie AUC = 0,95 (AUCCi 0,81 bis 1)]. Sonst ist dies nur der Fall nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ pE3 SD5 (1 h und 1 w) [AUC = 0,8 (AUCCi 0,51 bis 1) und AUC = 0,77 (AUCCi 0,4 bis 1)]. Allerdings ist hier unter Kontrollbedingungen signifikant mehr IL-1 $\beta$  gegenüber 50 nM A $\beta$ pE3 exprimiert [AUC = 0,07 (AUCCi 0 bis 0,21)]. Dies ist auch der Fall gegenüber 50 nM A $\beta$ <sub>1-40</sub>. Allerdings wird nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-40</sub>SD5 ebenfalls relevant/signifikant mehr IL-1 $\beta$  gegenüber 50 nM A $\beta$  exprimiert [(Kontrolle) p < 0,05 sowie AUC = 0,19 (AUCCi 0 bis 0,47), AUC (20 min) = 0,29 (AUCCi 0,04 bis 0,6), AUC (1 h) = 0,28 (AUCCi 0,03 bis 0,58), (1 d) p < 0,01 sowie AUC = 0,17 (AUCCi 0 bis 0,44), AUC (1w) = 0,28 (AUCCi 0 bis 0,59)]. Dies ist auch der Fall unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM 3NTyr10A $\beta$  und einer Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 w) [AUC = 0,11 (AUCCi 0 bis 0,31) und AUC = 0,16 (AUCCi 0 bis 0,39)]. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Bei der Betrachtung des Anteils der reaktiven Astrozyten fällt auf, dass unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  (mit Ausnahme von 3NTyr10A $\beta$ ) signifikant weniger reaktive Astrozyten auftreten. Ebenso der Fall ist dies nach einer Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (alle Zeitversätze) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Weniger reaktive Astrozyten treten außerdem nach der Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (20 min und 1 h) auf. Signifikant mehr reaktive Astrozyten treten dagegen nach der Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (1 w) und GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (1 w) auf (Abbildung 34).

Im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ 1-42 ist die ALDH1L1 Expression unter den reaktiven Astrozyten unter Kontrollbedingungen sowie nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42 (alle Zeitversätze) signifikant erniedrigt (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Signifikant oder relevant mehr ALDH1L1 gegenüber 50 nM A $\beta$  wird hingegen nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (20 min, 1 h und 1 d), GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min und 1 h) und GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (20 min und 1 h) sowie unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM 3NTyr10A $\beta$  exprimiert. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 35).

Die S100B Expression unter den reaktiven Astrozyten variiert zwischen den einzelnen A $\beta$ -Subtypen stark. Signifikant oder relevant höhere S100B-Level gegenüber 50 nM A $\beta$  treten nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (20 min, 1 d und 1 w), GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min, 1 h) und GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (20 min, 1 h, 1 d, 1 w) auf. Ebenfalls signifikant erhöht ist die S100B-Expression unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ pE3. Signifikant/relevant weniger S100B wird dagegen nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ 1-40 (20 min, 1 h, 1 d, 1 w) exprimiert. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM A $\beta$  (Abbildung 36).

### 4.3.7 Astrozyten Count



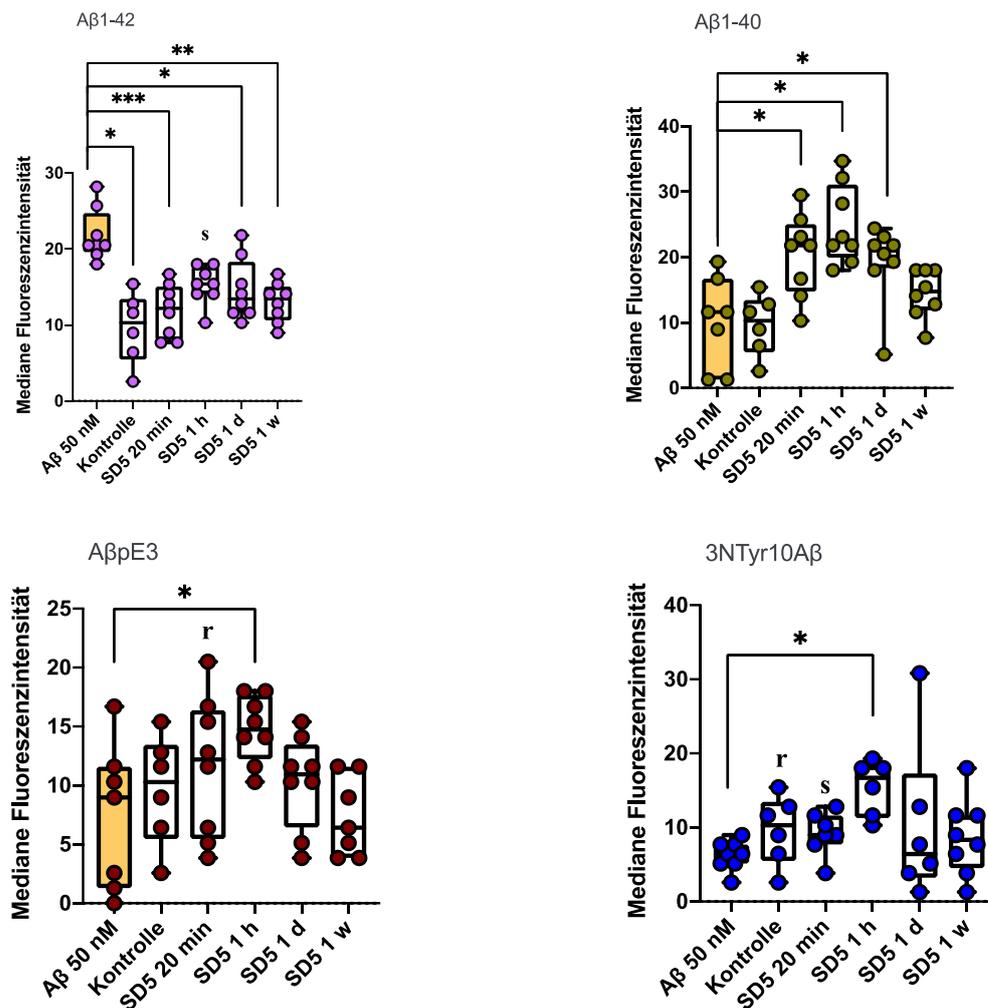
(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) - Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

### Abbildung 34: Zahl der reaktiven Astrozyten an der Gesamtzahl der Zellen (Gating nach CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>)

[Anzahl der Events präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Unter Kontrollbedingungen treten im Vergleich zu 50 nM Aβ (Ausnahme 3NTyr10Aβ) signifikant weniger reaktive Astrozyten auf [Aβ<sub>1-42</sub>: p < 0,0001 sowie AUC = 1 (AUCCi 1 bis 1), Aβ<sub>1-40</sub>: AUC = 0,78 (AUCCi 0,52 bis 0,97), AβpE3 p < 0,05 sowie AUC = 0,92 (AUCCi 0,75 bis 1)]. Ebenso der Fall ist dies nach einer Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub>SD5 (alle Zeitversätze) [(20 min) p < 0,01 sowie AUC = 1 (AUCCi 1 bis 1), (1 h) p < 0,001 sowie AUC = 1 (AUCCi 1 bis 1), AUC (1 d) = 1 (AUCCi 1 bis 1), (1 w) p < 0,05 sowie AUC = 1 (AUCCi 1 bis 1)]. Weniger reaktive Astrozyten treten außerdem nach der Inkubation mit GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min und 1 h) auf [AUC (20 min) = 0,88 (AUCCi 0,66 bis 1), AUC (1 h) = 0,73 (AUCCi 0,44 bis 0,97)]. Signifikant mehr treten dagegen nach der Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (1w) [p < 0,05 sowie AUC = 0 (AUCCi 0 bis 0)] und mit GAL-201/AβpE3SD5 (1 w) [AUC = 0,8 (AUCCi 0,53 bis 0,97)] auf (Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

### 4.3.8 ALDH1L1



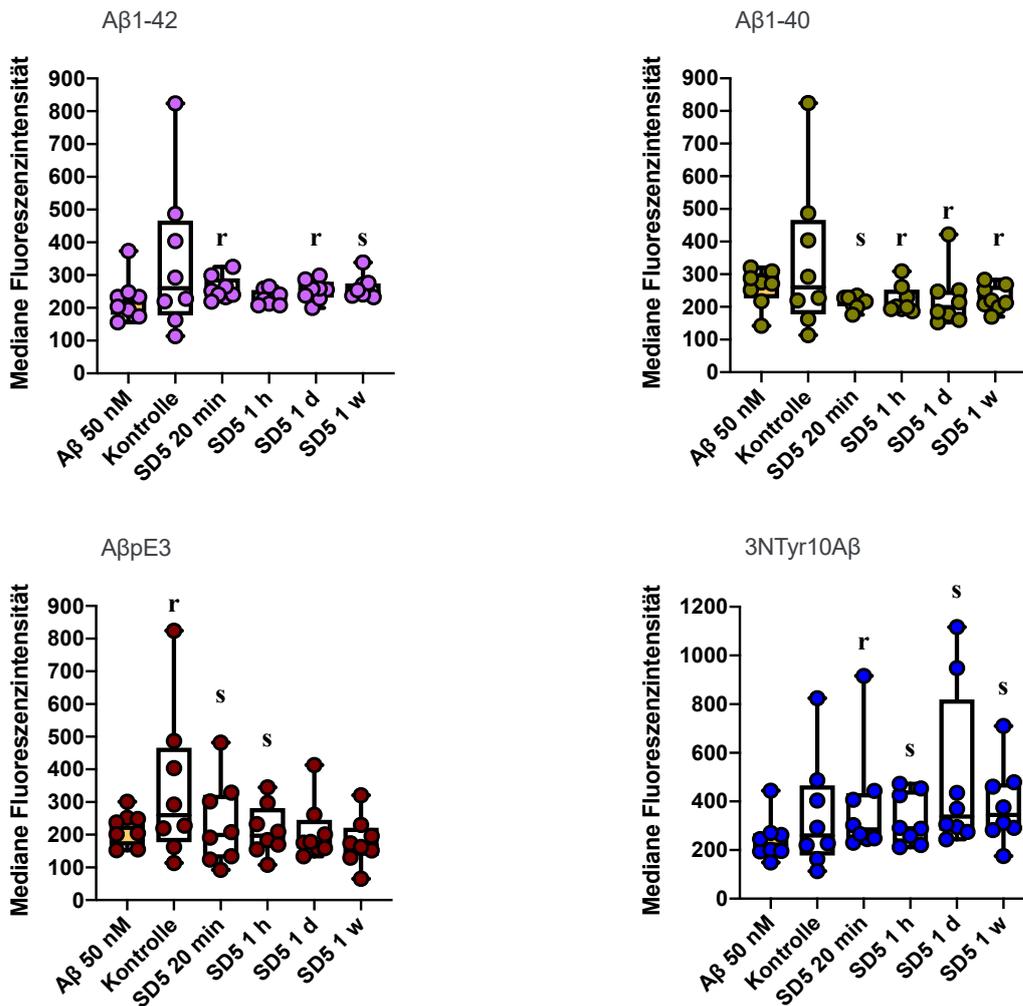
(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße) - Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation

#### Abbildung 35: ALDH1L1 Expression unter den reaktiven Astrozyten gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>)

[Expressionslevel von ALDH1L1 präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Im Vergleich zu 50 nM Aβ<sub>1-42</sub> ist die ALDH1L1 Expression unter Kontrollbedingungen sowie nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-42</sub> signifikant erniedrigt [(Kontrolle) p < 0,05 sowie AUC = 1 (AUCCi 1 bis 1), (20 min) p < 0,001 sowie AUC = 1 (AUCCi 1 bis 1), AUC (1 h) = 0,98 (AUCCi 0,93 bis 1), (1 d) p < 0,05 sowie AUC = 0,89 (AUCCi 0,67 bis 1), (1 w) p < 0,01 sowie AUC = 1 (AUCCi 1 bis 1)]. Signifikant oder relevant mehr ALDH1L1 gegenüber 50 nM Aβ wird hingegen nach Inkubation mit GAL-201/Aβ<sub>1-40</sub>SD5 (20 min, 1 h und 1 d) [(20 min) p < 0,05 sowie AUC = 0,13 (AUCCi 0 bis 0,36), (1 h) p < 0,05 sowie AUC = 0,03 (AUCCi 0 bis 0,13), (1 d) p < 0,05 sowie AUC = 0,12 (AUCCi 0 bis 0,33)], GAL-201/AβpE3SD5 (20 min und 1 h) [AUC (20 min) = 0,29 (AUCCi 0,05 bis 0,59) und (1 h) p < 0,05 sowie AUC = 0,13 (AUCCi 0 bis 0,38)] und GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min und 1 h) sowie unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM 3NTyr10Aβ [AUC (20min) = 0,18 (AUCCi 0 bis 0,46), (1 h) p < 0,05 sowie AUC = 0 (AUCCi 0 bis 0), AUC (Kontrolle) = 0,25 (AUCCi 0 bis 0,58)] exprimiert. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM Aβ (Aβ<sub>1-42</sub> aus Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

### 4.3.9 S100B



(s = signifikant anhand der Effektgröße)

(r = relevant anhand der Effektgröße)

### Abbildung 36: S100B Expression unter den reaktiven Astrozyten gemessen an der medianen Fluoreszenzintensität (Gating nach CD11b-/CD45-/GFAP<sup>+</sup>)

[Expressionslevel von S100B präsentiert als Boxplot mit Interquartilsabstand - 50 nM Aβ (orange) = Vergleichsgruppe]. Signifikant oder relevant erhöht ist die Expression von S100B gegenüber 50 nM Aβ nach Inkubation mit GAL-201/Aβ1-42SD5 (20 min, 1 d und 1 w) [AUC (20 min) = 0,23 (AUCCi 0,02 bis 0,52), AUC (1 d) = 0,25 (AUCCi 0,03 bis 0,53), AUC (1 w) = 0,2 (AUCCi 0 bis 0,48)], GAL-201/AβpE3SD5 (20 min, 1 h, sowie unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM AβpE3) [AUC (20 min) = 0,18 (AUCCi 0 bis 0,46), AUC (1 h) = 0 (AUCCi 0 bis 0), AUC (Kontrolle) = 0,25 (AUCCi 0 bis 0,58)] und GAL-201/3NTyr10AβSD5 (20 min, 1 h, 1 d, 1 w) [AUC (20 min) = 0,24 (AUCCi 0,03 bis 0,52), AUC (1 h) = 0,22 (AUCCi 0,03 bis 0,48), AUC (1d) = 0,14 (AUCCi 0 bis 0,38), AUC (1w) = 0,17 (AUCCi 0 bis 0,44)]. Signifikant/relevant weniger S100B wird dagegen nach Inkubation mit GAL-201/Aβ1-40 (20 min, 1 h, 1 d, 1 w) exprimiert [AUC (20 min) = 0,83 (AUCCi 0,56 bis 1), AUC (1 h) = 0,74 (AUCCi 0,45 bis 0,98), AUC (1 d) = 0,73 (AUCCi 0,44 bis 1), AUC (1 w) = 0,74 (AUCCi 0,45 bis 0,97)]. Die restlichen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant oder relevant gegenüber 50 nM Aβ.

## 5 Diskussion

Wie bereits eingangs erwähnt, besitzt GAL-201 durch den Tausch der endständigen Carboxylgruppe gegen eine Amidgruppe eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit gegenüber seinem Vorgänger GAL-101. Außerdem unterscheidet sich GAL-201 auch hinsichtlich seiner Bindungsaffinität zu fehlgefaltetem A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Monomer von GAL-101. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) für die Bindung von GAL-201 an A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Monomere beträgt  $2.5 \pm 0.6$  nM ( $n=4$ ) (Russ et al., 2022). Sie gibt die Wirkstoffkonzentration an, bei der die Hälfte der Monomere gebunden sind. Je kleiner also der  $K_D$ -Wert, desto größer ist die Bindungsaffinität. Studien zur Pharmakokinetik wurden in Ratten durchgeführt. Nach oraler Applikation wurden hier nicht nur im Plasma, sondern auch in der interstitiellen Flüssigkeit im Gehirn pharmakologisch aktive Konzentrationen nachgewiesen ( $505 \pm 124$  nM). Es zeigte sich, dass bereits nach einer einzigen oralen Gabe ungefähr 7% der systemisch verfügbaren Menge (gemessen an der maximalen Plasmakonzentration ( $C_{max} = 7,4 \pm 0,9$   $\mu$ M)) die Blut-Hirn-Schranke passierten. Für die orale Bioverfügbarkeit wurde ein Wert von 16-24 % berechnet und die Eliminations-Halbwertszeit in der interstitiellen Flüssigkeit im Gehirn betrug maximal zwei Stunden (Russ et al., 2022).

In Russ et al. (2022) wurde gezeigt, dass GAL-201 sowohl in einem stöchiometrischen Verhältnis von 10:1 (entsprechend 500 nM GAL-201) als auch in einem Verhältnis von 2:1 (entsprechend 100 nM GAL-201) in der Lage war die synaptotoxischen Effekte, welche durch 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> hervorgerufen werden, zu verhindern (40,2 % und 34,7 % relative Effektgröße). Interessanterweise zeigte auch ein umgekehrtes Verhältnis, bei dem A $\beta$ <sub>1-42</sub> in einer fünffach erhöhten Konzentration (1:5) vorlag (entsprechend 10 nM GAL-201), eine relative Effektgröße von 60 % und verhinderte damit signifikant die A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Toxizität (Russ et al., 2022). Ähnliche Ergebnisse wurden in *in vivo* LTP-Experimenten erzielt. Nach vorheriger subkutaner Verabreichung von 2 mg/kg oder 0,4 mg/kg GAL-201, konnte eine Verringerung der Langzeitpotenzierung durch A $\beta$ <sub>1-42</sub> verhindert werden. Dabei wurde nach der Verabreichung von 0,4 mg/kg GAL-201 eine Peakkonzentration von 10 nM in der interstitiellen Flüssigkeit im Gehirn gemessen (Russ et al., 2022). Zudem konnte auch nach serieller Verdünnung von GAL-201 ein durch 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ pE3-induzierter toxischer Effekt auf *in vitro* CA1-LTP signifikant verhindert werden (Russ et al., 2022). Da aber in den meisten klinischen Fällen die Alzheimer-Pathologie schon besteht, blieb die Frage, ob die serielle Verdünnung auch in der Lage ist einen schon bestehenden neurotoxischen Prozess wieder aufzuheben. Daher wurde in einem weiteren Versuch die erste HFS unter Inkubation mit A $\beta$ <sub>1-42</sub> durchgeführt, während die

zweite HFS nach Inkubation der GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 Lösung erfolgte. Die Langzeitpotenzierung erholte sich nach Inkubation mit der seriellen Verdünnung in diesem Versuch vollständig (Russ et al., 2022). Es fand also offensichtlich eine Detoxifikation in Anwesenheit der frischen seriellen Verdünnung von GAL-201 statt (Russ et al., 2022). Auf der Grundlage dieser bereits im Vorhinein gewonnenen Ergebnisse, sollen im Folgenden die Ergebnisse dieser Arbeit interpretiert werden.

## 5.1 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Ergebnisse zeigten für alle hier untersuchten A $\beta$ -Subtypen, eine deutliche Toxizität im Hinblick auf die Langzeitpotenzierung, wenn diese in einer Konzentration von 50 nM vorlagen. Die LTP war hier stets blockiert und im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,1 nM GAL-201) signifikant reduziert. Das heißt zugleich, eine ausschließliche Inkubation mit 0,1 nM GAL-201 beeinträchtigte die LTP nicht. Für seriell-verdünntes GAL-201 konnte hingegen in allen Fällen ein protektiver Effekt gegenüber 50 nM A $\beta$  der hier untersuchten Isoformen nachgewiesen werden. Die LTP war abgeschwächt im Vergleich zu der Kontrollgruppe (0,1 nM GAL-201), jedoch nicht gänzlich blockiert. Im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation mit 50 nM A $\beta$ , konnte bei den seriellen Verdünnungen mit allen hier untersuchten A $\beta$ -Subtypen über alle zeitlichen Versätze hinweg eine signifikante Protektion erkannt werden (außer bei GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (1 w) - hier war der Effekt nicht signifikant, jedoch relevant; Abbildung 13-16) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Die direkte Applikation von 0,1 nM GAL-201 war dagegen nicht protektiv gegenüber 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub>, was darauf schließen lässt, dass eine initial hohe Konzentration essenziell für die Wirkung ist (Russ et al., 2022). Das heißt der „Trigger-Effekt“, wie er erstmals für GAL-101 beschrieben wurde (Rammes & Parsons, 2020) und sich in den bereits 2022 publizierten Daten von Russ et al. (2022) ebenfalls für GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub> SD5 (20 min) und GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min) bestätigte, bestand auch gegenüber A $\beta$ <sub>1-40</sub> und 3NTyr10A $\beta$  und blieb über den Zeitraum von bis zu einer Woche aufrechterhalten (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Wie bereits 2022 publiziert, ist die serielle Verdünnung von GAL-201 ebenso in der Lage einen bereits vorhandenen toxischen Effekt ausgelöst durch 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> zu reversieren (Russ et al., 2022). Das heißt, durch das spezifische Binden mit hoher Selektivität und Affinität, vorzugsweise an fehlgefaltete A $\beta$ -Monomere ( $K_D$  2.5  $\pm$  0.6 nM (n = 4) (Russ et al., 2022)), wird nicht nur die Bildung löslicher A $\beta$ -Oligomere verhindert, sondern auch in bereits bestehenden Oligomeren eine detoxifizierende Konformationsänderung induziert, wodurch die Bildung nicht toxischer Aggregate gefördert wird. Dabei werden initial pharmakologisch wirksame

Konzentrationen benötigt, um die Bindung von GAL-201 an A $\beta$ -Monomere und eine damit verbundene Konformationsänderung und Aggregation dieser zu initiieren. Dieser Effekt der Konformationsänderung wird, ähnlich wie bei einem Prion, auf benachbarte Moleküle übertragen, sodass mit der Zeit große, amorphe, nicht toxische Cluster entstehen. Dieser Mechanismus wurde ausführlich in Parsons et al. (2015) für GAL-101 gezeigt und diskutiert. Sind diese Cluster einmal gebildet, scheinen sie weitere fehlgefaltete A $\beta$ -Monomere zu detoxifizieren und die Clusterbildung zu fördern. Es handelt sich also um einen „selbst-propagierenden Effekt“, der nur initial ausreichende „Trigger-Konzentrationen“ benötigt (Rammes & Parsons, 2020; Riemann & von Ahsen et al. in preparation; Russ et al., 2022). Die serielle Verdünnung ist also folglich eine notwendige Bedingung, um diesen Effekt näher zu untersuchen. Mit initial pharmakologisch wirksamen Konzentrationen wurde hier eine Detoxifikation induziert. Nachdem GAL-201 final durch die Anfertigung der seriellen Verdünnung 1000-fach verdünnt vorlag und selbst nach einer Woche noch wirksam war, ist zu vermuten, dass hier bereits diese nicht-toxischen Aggregate gebildet worden sind, welche weitere fehlgefaltete A $\beta$ -Monomere detoxifizieren (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Ein direkter Nachweis dieser nicht-toxischen Aggregate/Cluster innerhalb der Lösung ist allerdings nicht möglich, da eine A $\beta$  Konzentration von 50 nM unterhalb der detektierbaren Grenze in der Massenspektroskopie liegt. Jedoch konnte Parsons et al. (2015) über CD-Spektroskopie (Circular Dichroism Spectroscopy), AFM (Atomic Force Microscopy), DLS (Dynamic Light Scattering) und TR-FRET (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) für GAL-101 zeigen, dass die Bildung von Aggregaten mit einer  $\beta$ -Faltblattstruktur verhindert wurde und stattdessen amorphe Cluster entstanden. Die Aggregation von A $\beta$ -Monomeren wurde also nicht inhibiert, sondern moduliert (Parsons et al., 2015).

GAL-201 besitzt, wie die Daten der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zeigten, eine sehr hohe Bindungsaffinität zu fehlgefaltetem A $\beta_{1-42}$ -Monomer, was von anderen A $\beta$ -Aggregations-Modulatoren bisher nicht erreicht wurde (Russ et al., 2022). Dies ermöglicht den Einsatz sehr niedriger Konzentrationen. Die ersten *in vitro* LTP-Experimente wurden zunächst mit GAL-101, in einem stöchiometrischen Verhältnis von 10:1 (500 nM GAL-101/50 nM A $\beta_{1-42}$ ) erfolgreich durchgeführt (Rammes et al., 2015). Die Applikation des gleichen stöchiometrischen Verhältnisses mit GAL-201/A $\beta_{1-42}$  zeigte dagegen in Russ et al. (2022) ein etwas anderes Ergebnis. GAL-201 war hier zwar in der Lage eine vollständige Blockierung der LTP durch 50 nM A $\beta_{1-42}$  zu verhindern, jedoch erschien diese Konzentration, gemessen an der Potenz von GAL-201, zu hoch und hatte eher einen suppressiven Effekt, sodass hier nur eine

moderate Wirkung erzielt wurde (40,2 % relative Effektgröße). Auch eine Konzentration von 100 nM GAL-201 (entspricht einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 GAL-201/50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub>) wies gegenüber einer A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induzierten Toxizität nur eine moderate Prävention auf (34,7 % relative Effektgröße). Eine Konzentration von 10 nM GAL-201 (entsprechend einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:5 GAL-201/50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub>) zeigte hingegen eine signifikante Prävention gegenüber den toxischen Effekten von 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub>, was sich in einer relativen Effektgröße von 60% widerspiegelte (Russ et al., 2022). Auch *in vivo* LTP-Experimente in Ratten zeigten für eine Spitzenkonzentration von 10 nM GAL-201 in der zerebralen Interstitialflüssigkeit einen protektiven Effekt gegenüber 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Russ et al., 2022). Dies lässt darauf schließen, dass eine Konzentration von 10 nM GAL-201 pharmakologisch aktiv ist und aufgrund der hohen Potenz von GAL-201 bereits ausreicht, um einen Detoxifikationsprozess zu induzieren. Selbst in der seriellen Verdünnung war, wie Abbildung 17 zeigt, eine Startkonzentration von 10 nM GAL-201 ausreichend, denn auch hier konnte ein protektiver Effekt gegenüber 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> nachgewiesen werden. GAL-201 ist folglich selbst bei einer Unterrepräsentation von 1:5 gegenüber A $\beta$ <sub>1-42</sub> in der Lage eine Detoxifikation vorzunehmen, was im Umkehrschluss bedeutet, dass ein Molekül GAL-201 in der Lage ist fünf Moleküle A $\beta$  zu modulieren. Bei anderen A $\beta$ -Aggregations-Modulatoren, wie ALZ-801 und PRI-002 werden dagegen deutlich höhere Konzentrationen benötigt (Kocis et al., 2017; van Groen et al., 2017). Für ALZ-801 erwiesen sich beispielsweise 1000 Wirkstoffmoleküle gegenüber einem A $\beta$ -Monomer als effektiv (Kocis et al., 2017). Selbst für GAL-101 zeigte sich bisher (ohne serielle Verdünnung) nur ein stöchiometrisches von 10:1 (GAL-101 über A $\beta$ <sub>1-42</sub>) als effektiv (Rammes et al., 2015). Gegenüber anderen A $\beta$ -Aggregationsinhibitoren/-modulatoren bietet GAL-201 durch seine hohe Affinität zu fehlgefaltetem A $\beta$ -Monomer also den Vorteil, dass nur geringe Wirkstoffmengen eingesetzt werden müssen. Zusammen mit dem Prionen-ähnlichen Effekt ist dies insbesondere bei einer Non-Compliance von Vorteil (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Wie durch die LTP-Experimente mit einer Woche Zeitversatz gezeigt, bleibt die detoxifizierende Wirkung über einen gewissen Zeitraum aufrechterhalten. Somit werden keine konstanten Wirkstofflevel, wie es beispielsweise bei ALZ-801 der Fall ist, benötigt (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Zudem bleibt aufgrund der hohen Selektivität für fehlgefaltetes A $\beta$  die physiologische Wirkung von normalgefaltetem A $\beta$  aufrechterhalten (Puzzo et al., 2008). Verglichen zu A $\beta$ -Antikörpern bietet GAL-201 einen effizienteren Mechanismus, da toxische A $\beta$ -Oligomere nicht nur beseitigt werden, sondern auch deren Bildung verhindert wird. Indem GAL-201 gleich zu Beginn des Aggregationsprozesses eingreift, ist es zudem nicht spezifisch

für bestimmte aggregierte Formen von A $\beta$  (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Es ist außerdem oral bioverfügbar, kostengünstig und Hirnschwellungen/Hirnblutungen (ARIA), wie sie typischerweise mit den Antikörpern auftreten, sind aufgrund unterschiedlicher Wirkmechanismen unwahrscheinlich (Riemann & von Ahsen et al. in preparation; Russ et al., 2022).

## 5.2 Veränderungen der Spinedynamik

Da Veränderungen in Zahl und Form der Spines die Grundlage der synaptischen Plastizität darstellen, sie zur Ausbildung einer LTP essenziell sind (Dorostkar et al., 2015) und insbesondere eine erhöhte Spinedichte mit einer verstärkten Neurotransmission einhergeht (Fiala et al., 2002), interessierte uns weiterhin, welchen Einfluss GAL-201 und A $\beta$  (alle untersuchten Subtypen) auf Spines haben. Da es sich in der Spineanalyse um dieselben Hirnschnittpräparate handelte, welche zuvor schon in der LTP untersucht wurden, bestand hier eine direkte Korrelation. Ähnlich wie zuvor schon Yang et al. (2008), konnten wir in der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine induzierte LTP mit einer deutlich erhöhten Spinedichte korrelierte. Dendriten hippocampaler Hirnschnitte, welche ausschließlich mit 50 nM A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ pE3, 3NTyr10A $\beta$ ) inkubiert wurden, wiesen gegenüber Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) stets eine signifikant erniedrigte Anzahl an Spines auf. Nach Inkubation mit einer seriellen Verdünnung von GAL-201, bildeten Dendriten dagegen mit wenigen Ausnahmen (GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 (1d), GAL-201/A $\beta$ <sub>1-40</sub>SD5 (1d) und GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1w)) gegenüber einer alleinigen Inkubation mit 50 nM A $\beta$  signifikant mehr Spines aus. GAL-201 schützte hier also vor einer A $\beta$ -induzierten Elimination der Spines. Dieser protektive Effekt wurde also mit einer initialen Peakkonzentration induziert und blieb über den Zeitraum von bis zu einer Woche auch ohne eine weitere Wirkstoffapplikation aufrechterhalten (Abbildung 18-21) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Hippocampale Hirnschnittpräparate in denen ein CA1-LTP ausgelöst wurde, wurden als zusätzliche Referenz ausgewertet, da die tetanische Stimulation selbst zu einer Induktion von Spines führt (Lang et al., 2004; Wosiski-Kuhn & Stranahan, 2012; Yang et al., 2008).

Aber nicht nur die Spinedichte, auch die Spineklassen unterschieden sich zwischen den einzelnen Gruppen. So bildeten beispielsweise Dendriten unter naiven Kontrollbedingungen gegenüber einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) signifikant mehr Mushroom Spines aus (Abbildung 27) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Diese bieten aufgrund ihrer Breite eine erhöhte Stabilität und genügend Platz, um die Expression an AMPA-Rezeptoren dynamisch anzupassen, was im Falle einer Langzeitpotenzierung essenziell ist und die

Neurotransmission verstärkt (Bourne & Harris, 2007; Matsuzaki et al., 2001). In Bourne and Harris (2007) werden sie deshalb auch als „Memory Spines“ bezeichnet, während die Thin Spines hier den „Learning Spines“ zugeordnet werden. Thin Spines, welche im adulten Hippocampus am häufigsten vorkommen, weisen eine hohe Flexibilität auf, da sie sich sowohl in breitere stabilere Spines als auch in unreife Spines wie Filopodia und Stubby Spines differenzieren können. Welcher Weg eingeschlagen wird, ist dabei abhängig vom Input den der Spine erhält. Starke Signale (LTP) fördern die Bildung von Mushroom Spines, schwache Signale (LTD) dagegen die Rückbildung hin zu frühen Spineformen (Bourne & Harris, 2007). Dass in diesem Fall unter naiven Kontrollbedingungen signifikant mehr Mushroom Spines gegenüber einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) gebildet wurden, korreliert also damit, dass die LTP bei einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  nicht induzierbar war (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Außerdem fiel auf, dass Stubby Spines unter Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) signifikant oder relevant gegenüber einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) erhöht waren. Insbesondere nach einer LTP-Induktion unterschied sich die Kontrolle mit  $p < 0,05$  signifikant von 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) (Abbildung 26) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). In der frühen Entwicklung, sind Stubby Spines die am häufigsten vertretene Spineart, wobei zu dieser Phase auch die Long-Thin-Spines und Filopodia Spines gehören (Nimchinsky et al., 2002), welche wichtig für initiale Kontakte und neue Verknüpfungen sind (Kater & Rehder, 1995; Ziv & Smith, 1996). Im Verlauf der weiteren Entwicklung kommt es zu einer Zunahme der Spinedichte, bei gleichzeitiger Abnahme der Spinelänge (Nimchinsky et al., 2002). Bei einer nicht induzierbaren LTP, wie es nach Inkubation mit 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) der Fall war, schien folglich ein Remodeling hin zu Spinearten der frühen Entwicklungsphase stattzufinden. Diese Vermutung bestätigt sich mit Blick auf die längeren Spinearten. Diese kamen im Allgemeinen zwar seltener vor als Stubby oder Thin Spines, zeigten sich bei Dendriten der Präparate, die ausschließlich mit 50 nM A $\beta$  inkubiert wurden, aber zumeist gegenüber Kontrollbedingungen erhöht. So traten Long-Thin Spines nach Inkubation mit 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) im Vergleich zu naiven Kontrollbedingungen signifikant oder relevant häufiger auf (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Für A $\beta_{1-42}$  (Riemann & von Ahsen et al. in preparation) und 3NTyr10A $\beta$  bestätigte sich dies auch gegenüber Kontrollbedingungen nach LTP-Induktion (Abbildung 24). Nach Inkubation mit 50 nM A $\beta_{1-42}$  (Riemann & von Ahsen et al. in preparation) und 3NTyr10A $\beta$  traten zudem signifikant mehr Filopodia Spines im Vergleich zu Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) auf. Bei A $\beta_{1-40}$  und 3NTyr10A $\beta$  bestand dagegen kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Filopodia Spines (Abbildung 23). Nach Inkubation mit 50 nM A $\beta$  (alle

Isoformen) schien es folglich zu einem Remodeling zu kommen, bei dem besonders die frühen längeren Spineformen gefördert wurden (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Thin Spines traten dagegen vor allem nach Inkubation mit einer seriellen Verdünnung auf [vgl. GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (20 min, 1 h, 1 d) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation), GAL-201/A $\beta$ 1-40SD5 (1 w), GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min, 1 d, 1 w) und GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 h, 1 d)] (Abbildung 25). Diese können sich, wie bereits erwähnt, leicht differenzieren und sind somit wichtig für Lernprozesse (Bourne & Harris, 2007).

Es lässt sich also zusammenfassend festhalten, dass eine Inkubation mit 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) zu einer Reduktion der Spinedichte führte. Dabei waren längere Spines, wie Filopodia und Long-Thin, hier häufiger ausgebildet als unter Kontrollbedingungen (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Die Entwicklung der noch nicht eliminierten Spines, schien also eher rückläufig zu den frühen Entwicklungsstadien, wo die Motilität der Spines noch im Vordergrund steht, um die Umgebung zu erschließen und neue Verknüpfungen zu finden (Kater & Rehder, 1995; Ziv & Smith, 1996). Dagegen wurden nach Inkubation mit einer seriellen Verdünnung im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  zumeist signifikant mehr Thin Spines und allgemein eine höhere Spinedichte ausgebildet. In Gegenwart von seriell-verdünntem GAL-201 fand also kein Abbau der Spines statt. Jedoch wurde hier ein Remodeling induziert, bei dem vor allem Thin Spines gefördert wurden (Riemann & von Ahsen et al. in preparation), welche essenziell für Lernprozesse sind (Bourne & Harris, 2007). Unter Kontrollbedingungen (naiv und naiv LTP) wurde im Vergleich zu einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) eine signifikant erhöhte Dichte an Stubby Spines festgestellt. Die allgemein erhöhte Spinedichte resultierte hier also eher aus einer erhöhten Dichte an Stubby Spines, wohingegen Thin Spines und längere Spines seltener vorkamen. Das Dendriten unter naiven Kontrollbedingungen die höchste Dichte an Mushroom Spines aufwies, weist zudem darauf hin, dass hier am wenigsten Remodeling stattfand. Die tetanische Stimulation schien also die Neubildung von Spines anzuregen. Während dies unter Kontrollbedingungen vor allem Stubby Spines waren, kam es nach Inkubation mit GAL-201 dagegen zumeist zu einer vermehrten Ausbildung von Thin Spines (Riemann & von Ahsen et al. in preparation), welche mit Lernprozessen assoziiert werden (Bourne & Harris, 2007). War die LTP hingegen blockiert, wie es nach einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  der Fall war, kam es nicht nur zu einer Elimination der Spines, sondern es schien auch eine Rückbildung hin zu frühen Spineformen wie Filopodia oder Long-Thin Spines (Kater & Rehder, 1995; Ziv & Smith, 1996) stattzufinden (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

## 5.3 FACS

Mit dem “Fluorescence Activated Cell Sorting” wurden die Einflüsse von GAL-201 auf die Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten untersucht, um Rückschlüsse auf einen möglichen Einfluss in der Neuroinflammation zu ziehen. Der Übersicht halber wurde entschieden, die Diskussion der Ergebnisse auf die Wirkung der Isoform A $\beta$ <sub>1-42</sub> zu fokussieren. Hier wurden die eindeutigsten Ergebnisse erzielt, was die Diskussion übersichtlicher hält. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Ergebnisse mit den anderen Isoformen keine Beachtung finden, nur weil sie von geringerer Konsistenz waren. Auch hier werden eindeutige Veränderungen beobachtet und Gründe, warum diese Ergebnisse von denen mit A $\beta$ <sub>1-42</sub> abweichen, werden eingehend diskutiert.

### 5.3.1 Mikroglia

Da die Mikrogliaaktivierung nicht nur eine Folge von pathologischem A $\beta$  ist, sondern auch maßgeblich zu dessen Pathologie beiträgt und somit als integraler Bestandteil der Amyloid-Kaskaden-Hypothese angesehen werden kann (Haass & Selkoe, 2022), interessierte uns weiterhin, ob GAL-201 auch hier einen Einfluss zeigt.

Der Anteil der Mikroglia war nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 (alle Zeitversätze) signifikant erhöht gegenüber 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Abbildung 28). Um diese Beobachtung genauer zu analysieren, wurde weiterführend in inflammatorische und antiinflammatorische Mikroglia differenziert. Dazu diente in erster Linie die Betrachtung der Expressionslevel von CD163 und IL-1 $\beta$ . Während CD163 einen Marker für antiinflammatorische Mikroglia darstellt (Han et al., 2022), ist IL-1 $\beta$  ein Marker für Inflammation und in proinflammatorischen Mikroglia erhöht (Akiyama et al., 2000). In dem hier vorliegenden Versuch war die Expression von CD163 sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 (alle Zeitversätze) gegenüber 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> signifikant erhöht (Abbildung 30), die Expression von IL-1 $\beta$  dagegen signifikant erniedrigt (Abbildung 33). Dies führt zu der Vermutung, dass der nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 beobachtete Anstieg der Mikroglia, auf einer Zunahme antiinflammatorischer Mikroglia beruhte. Wie die Expressionslevel von IL-1 $\beta$  zeigten, schienen 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> dagegen eine verstärkte Aktivierung inflammatorischer Mikroglia zu bewirken, da hier signifikant mehr IL-1 $\beta$  exprimiert wurde als unter Kontrollbedingungen. In Gegenwart von GAL-201 war dies dagegen nicht zu beobachten. Hier waren die Expressionslevel von CD163 und IL-1 $\beta$  ähnlich wie unter Kontrollbedingungen. GAL-201 schien hier also vor einen Anstieg proinflammatorischer Mikroglia zu schützen (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Diese These wird unterstützt durch die Ergebnisse

mit dem Mikroglia-spezifischen Marker TREM-2. TREM-2 wird im Gehirn exklusiv von Mikroglia exprimiert (Ulland & Colonna, 2018) und ist verstärkt in der Nähe von A $\beta$ -Plaques zu finden, wo es die Differenzierung und Funktion der Mikroglia in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer beeinflusst (Frank et al., 2008). Es wird vermutet, dass die lokale Mikrogliaaktivierung infolge der Plaques, zu einer Differenzierung der homöostatischen Mikroglia hin zu antiinflammatorischen DAM-1 führt und dass TREM-2 dabei eine entscheidende Rolle spielt (Garcia-Revilla et al., 2019; Ulland & Colonna, 2018). Diese DAM-1 verstärken die Phagozytose von A $\beta$  und inhibieren die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Takahashi et al., 2005). In einem gesunden, alternden Gehirn wird TREM-2 daher mit zunehmendem Alter verstärkt exprimiert (Han et al., 2022). Bei Morbus Alzheimer konnte jedoch nachgewiesen werden, dass TREM-2 im Krankheitsverlauf immer weniger aktiviert wird und seine protektive Funktion verloren geht (Okuzono et al., 2021). A $\beta$  kann hier weniger schnell abgebaut werden und bindet neben weiteren endogenen Liganden an Mikroglia-eigene Toll-Like-Rezeptoren über die es, in Folge der verstärkten Stimulation, zu einer Differenzierung in proinflammatorische Mikroglia (DAM-2) kommt (Garcia-Revilla et al., 2019). Unter Beachtung dessen, erscheinen die Ergebnisse der FACS-Analyse nachvollziehbar. Die Expressionslevel von TREM-2 waren nach Inkubation mit 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> signifikant erniedrigt gegenüber Kontrollbedingungen, aber auch gegenüber einer Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 (alle Zeitversätze) (Abbildung 29). Vor dem Hintergrund, dass TREM-2 im Krankheitsverlauf von Morbus Alzheimer immer weniger aktiviert wird (Okuzono et al., 2021), würde man genau diesen Einfluss von 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> erwarten. GAL-201 hingegen schien sich protektiv auf diese Reduzierung der TREM-2-Level auszuwirken und somit die Aktivierung antiinflammatorischer Mikroglia zu fördern (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Die Inkubation mit den anderen A $\beta$ -Subtypen zeigte dagegen ein weniger konsistentes Ergebnis. Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-40</sub>SD5 (alle Zeitversätze) (Abbildung 28) war der Anteil der Mikroglia ebenfalls signifikant erhöht, was auch hier vermutlich auf einem Anstieg antiinflammatorischer Mikroglia beruhte. Die seriellen Verdünnungen wiesen, ebenso wie die Kontrolle, ein signifikant erhöhtes Expressionslevel von CD163 im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ <sub>1-40</sub> auf (Abbildung 30). Allerdings war hier auch das Expressionslevel von IL-1 $\beta$  im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ <sub>1-40</sub> erhöht (Abbildung 33). Da dies jedoch unter Kontrollbedingungen ebenso der Fall war, ist zu vermuten, dass A $\beta$ <sub>1-40</sub> welches im Vergleich zu A $\beta$ <sub>1-42</sub> als weniger toxisch gilt (Jarrett et al., 1993), hier eine geringere Aktivierung proinflammatorischer Mikroglia bewirkte. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass auch im Vergleich zu

Kontrollbedingungen nach der Inkubation mit 50 nM A $\beta$ <sub>1-40</sub> signifikant weniger Mikroglia auftraten. Dies war ebenso der Fall nach einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$ pE3 (Abbildung 28). Auch nach einer Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ pE3-SD5 (Ausnahme 20 min) war der Anteil der Mikroglia im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ pE3 erhöht. Betrachtet man die Expressionslevel von CD163 und IL-1 $\beta$ , lässt dies vermuten, dass durch den Einfluss von A $\beta$ pE3 allgemein eine geringere Aktivierung der Mikroglia erfolgte. Während sich das Expressionslevel von CD163 zwischen 50 nM A $\beta$ pE3 und Kontrollbedingungen nicht relevant unterschied (Abbildung 30), wurde unter Kontrollbedingungen signifikant mehr IL-1 $\beta$  gegenüber 50 nM A $\beta$ pE3 exprimiert (Abbildung 33). A $\beta$ pE3 schien hier also eine geringere Inflammation zu bewirken, wodurch sich der Einfluss von GAL-201 nur schwer beurteilen lässt. Gleiches gilt für 3NTyr10A $\beta$ . Auch hier wurde unter Kontrollbedingungen signifikant mehr IL-1 $\beta$  gegenüber 50 nM 3NTyr10A $\beta$  exprimiert (Abbildung 33), währenddessen kein relevanter Unterschied in der Expression von CD163 zwischen diesen beiden Gruppen festzustellen war (Abbildung 30). Einen relevanten Unterschied im Anteil der Mikroglia gab es hier zwar nicht (Abbildung 28), jedoch lassen die niedrigen IL-1 $\beta$  Level nach Inkubation mit 50 nM 3NTyr10A $\beta$  darauf schließen, dass auch 3NTyr10A $\beta$  hier eine geringere Inflammation bewirkte, wodurch der Einfluss von GAL-201 sich hier nicht beurteilen lässt.

Auch die Expressionslevel der Marker TREM-2, CD80 und CX3CR1 führten bezüglich der Mikrogliaaktivierung nicht zu eindeutigeren Ergebnissen. Signifikante oder relevante Unterschiede in der TREM-2 Expression traten im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ pE3 und 3NTyr10A $\beta$  kaum auf und waren insbesondere im Vergleich zu Kontrollbedingungen nicht vorhanden (Abbildung 29). CD80, ein weiterer proinflammatorischer Marker, welcher einen wichtigen Co-Stimulator bei der T-Zell-Aktivierung darstellt und bei einer Inflammation des ZNS verstärkt von aktivierten Mikroglia exprimiert wird (Aloisi, 2001), konnte eine Inflammation durch A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ pE3 und 3NTyr10A $\beta$ , ebenso wie bereits IL-1 $\beta$ , nicht bestätigen. Nach Inkubation mit 50 nM A $\beta$  wurde hier kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrollbedingungen beobachtet. Im Vergleich zu 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> wurde unter Kontrollbedingungen hingegen mehr CD80 exprimiert (Abbildung 31), obwohl hier schon zuvor über IL-1 $\beta$ , CD163 und TREM-2 eindeutig eine durch 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> induzierte Inflammation beobachtet wurde. CD80 eignete sich somit hier weniger, um den Einfluss der Neuroinflammation zu untersuchen. Schwieriger gestaltete sich dagegen die Beurteilung der CX3CR1-Expressionslevel. CX3CR1 ist ein weiterer Mikroglia-rezeptor, jedoch wird die Rolle seiner Aktivierung in Bezug auf Morbus Alzheimer kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite

zeigte sich, dass ein Mangel an CX3CR1 mit einer verstärkten Freisetzung von Zytokinen sowie einer verstärkten Tau-Pathologie einherging, auf der anderen Seite wurde dieser Mangel aber auch mit einer verstärkten Mikrogliaaktivierung und einer daraus resultierenden erhöhten A $\beta$ -Clearance assoziiert (Cho et al., 2011). Letzteres wurde auch in Lee et al. (2010) beobachtet. Die Übersichtsarbeit von Chen et al. (2016) beschreibt hingegen wieder positive Einflüsse eines CX3CR1-CX3CL1-Signalings in Bezug auf die Zytokinfreisetzung und auch in Bezug auf die synaptische Plastizität. In dieser Arbeit fiel auf, dass unter Kontrollbedingungen im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  aller getesteter Isoformen die Expressionslevel von CX3CR1 signifikant oder relevant erniedrigt waren (Abbildung 32). Dieses Ergebnis bestätigt die in Gonzalez-Prieto et al. (2021) gemachte Beobachtung. Auch hier wurde in einem Alzheimer Mausmodell mehr CX3CR1 produziert (Gonzalez-Prieto et al., 2021). Als mögliche Erklärung wurde geäußert, dass dies einen kompensatorischen Effekt auf die bei Alzheimer Patienten beobachteten reduzierten CX3CL1-Level im CSF (Perea et al., 2018) darstellen könnte (Gonzalez-Prieto et al., 2021). In unserem Versuch fiel zudem auf, dass CX3CR1 verstärkt nach der Inkubation mit einer seriellen Verdünnung exprimiert wurde, was insbesondere bei A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{PE3}$  durch signifikante/relevante Unterschiede zu 50 nM A $\beta$  gezeigt wurde. Über die Bedeutung dessen lässt sich nur mutmaßen, jedoch ist es vorstellbar, dass hierdurch das CX3CR1-CX3CL1-Signaling verstärkt wird und der neuroprotektive Effekt, wie er in Chen et al. (2016) beschrieben wird, überwiegt.

### 5.3.2 Astrozyten

Da die Astroglieose schon in frühen Stadien auftritt (Scholl et al., 2015) und Astrozyten neben Mikroglia maßgeblich an der Synapseneliminierung beteiligt sind (Chung et al., 2013), interessierte uns weiterhin der Einfluss von GAL-201 auf die Astrozytenaktivierung. Für die Erfassung dieser wurden GFAP und ALDH1L1 herangezogen. GFAP, ein wesentlicher Bestandteil des beweglichen Zytoskeletts von Astrozyten, ist in reaktiven Astrozyten erhöht und wird bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer verstärkt exprimiert (Habib et al., 2020; Hol & Pekny, 2015). Dies bedeutet nicht, dass GFAP im gesunden Gewebe nicht exprimiert wird, jedoch liegt die Expression meist unterhalb der detektierbaren Schwelle, sodass erhöhte GFAP-Level einen verlässlichen Marker für reaktive Astrozyten darstellen (Garcia et al., 2004; Gorina et al., 2022). Auch ALDH1L1 ist bei Morbus Alzheimer ebenso wie GFAP erhöht (Garcia-Esparcia et al., 2018). Allerdings erfasst ALDH1L1 ein breiteres Spektrum an Astrozyten und auch solche, die nicht aktiviert sind (Cahoy et al., 2008). Das heißt, würde man erst die ALDH1L1<sup>+</sup>-Zellen auswählen und diese dann weiter in GFAP<sup>+</sup> und GFAP<sup>-</sup>

sortieren, würden auch Astrozyten detektiert werden, welche durch GFAP allein nicht erfasst werden. Somit könnte man zwischen reaktiven und ruhenden Astrozyten unterscheiden, welche man als ALDH1L1<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> und ALDH1L1<sup>+</sup>/GFAP<sup>-</sup> klassifizieren würde (Serrano-Pozo et al., 2013). Da bei unseren Proben die Expression von ALDH1L1 allerdings sehr gering ausfiel und ohnehin vor allem die reaktiven Astrozyten von Interesse waren, wurde in unserem Falle nur nach den GFAP<sup>+</sup>-Zellen selektiert (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Das heißt, die hier detektierte Menge an Astrozyten gibt keine Auskunft über die Menge aller Astrozyten und daher keinen Aufschluss darüber, wie sich die Astrozyten in ihrer Gesamtzahl verändert haben, sondern nur, ob es zu einem Anstieg reaktiver Astrozyten gekommen ist oder nicht. Da die Expression von ALDH1L1 aber bei Morbus Alzheimer ebenfalls erhöht ist (Garcia-Esparcia et al., 2018), deutet auch ein erhöhtes Expressionslevel unter den GFAP<sup>+</sup>-Zellen (reaktive Astrozyten) auf eine erhöhte Aktivierung dieser hin (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Betrachtet man vor diesem Hintergrund die Ergebnisse des FACS, so konnten auch in Bezug auf die Astrozytenaktivierung für A $\beta$ <sub>1-42</sub> eindeutige Ergebnisse festgestellt werden. Gegenüber Kontrollbedingungen war die Zahl der reaktiven Astrozyten durch die Inkubation mit 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> signifikant erhöht. Dies war nicht der Fall bei einer Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 (alle Zeitversätze), der Anteil der reaktiven Astrozyten verhielt sich hier ähnlich wie unter Kontrollbedingungen (Abbildung 34). GAL-201 schien hier also vor einem A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induzierten Anstieg reaktiver Astrozyten zu schützen (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die Betrachtung der Expressionslevel von ALDH1L1. Nach Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-42</sub>SD5 (alle Zeitversätze) waren sie ebenso wie unter Kontrollbedingungen, signifikant erniedrigt (Abbildung 35) (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Da es sich hierbei um die Gruppe der reaktiven Astrozyten handelt und die Expression von ALDH1L1 bei Morbus Alzheimer erhöht ist (Garcia-Esparcia et al., 2018) unterstützen diese Ergebnisse die These, dass GAL-201 vor einem A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induzierten Anstieg reaktiver Astrozyten schützte (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Die Ergebnisse der anderen Isoformen zeigten dagegen ein weniger konsistentes Ergebnis (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Eine Inkubation mit 50 nM A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ pE3 (nicht jedoch 3NTyr10A $\beta$ ) führte ebenso wie bei A $\beta$ <sub>1-42</sub> zu einem signifikanten Anstieg reaktiver Astrozyten im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Abbildung 34). Jedoch zeigten sich hier nach der Inkubation mit den seriellen Verdünnungen kaum Einflüsse. Reaktive Astrozyten waren im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  signifikant erhöht nach einer Inkubation mit GAL-201/A $\beta$ <sub>1-</sub>

40SD5 (1 w) und signifikant erniedrigt nach einer Inkubation mit GAL-201/3NTyr10A $\beta$ SD5 (1 w). Die anderen zeitlichen Versätze wiesen keinen relevanten Unterschied im Vergleich zu 50 nM A $\beta$  auf. Eindeutige Einflüsse von GAL-201 auf eine A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ pE3- induzierte Astrozytenaktivierung konnten hier also nicht beobachtet werden. Auch die Betrachtung der Expressionslevel von ALDH1L1 konnte dies nicht zeigen, da bereits kein relevanter Unterschied zwischen einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  und Kontrollbedingungen bestand. Im Vergleich zu einer Inkubation mit 50 nM 3NTyr10A $\beta$  wurde unter Kontrollbedingungen jedoch relevant mehr ALDH1L1 exprimiert (Abbildung 35). Da zwischen diesen beiden Gruppen allerdings auch kein relevanter Unterschied in der Zahl reaktiver Astrozyten bestand, lässt dies vermuten, dass es durch 3NTyr10A $\beta$  zu einer geringen Aktivierung der Astrozyten kam. Der Einfluss von GAL-201 auf eine 3NTyr10A $\beta$ -induzierte Astrozytenaktivierung lässt sich somit nicht beurteilen.

Ursprünglich sollte S100B als weiterer Marker der Astrozytenaktivierung dienen, denn S100B wird ebenfalls von reaktiven Astrozyten verstärkt exprimiert und mit Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht (Mrak & Griffinbc, 2001). Auch hier würde man also nach einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  die höchste Expression erwarten. Dies konnte durch die Ergebnisse des FACS jedoch nicht bestätigt werden. Nach einer Inkubation mit 50 nM A $\beta$  wurde im Vergleich zu Kontrollbedingungen nicht mehr S100B exprimiert (Abbildung 36). Daher ließen sich auch keine Rückschlüsse auf die Wirkung von GAL-201 ziehen und die S100B-Level wurden für die weitere Beurteilung der Astrozytenaktivierung nicht beachtet.

Zusammenfassend lässt sich über die Ergebnisse des FACS also sagen, dass GAL-201 durchaus einen Einfluss auf die Neuroinflammation zeigte. Auch wenn ein positiver Effekt gegenüber A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ pE3 und 3NTyr10A $\beta$  nicht eindeutig gezeigt werden konnte, so wurde er doch für A $\beta$ <sub>1-42</sub> bestätigt. Nach Inkubation mit der seriellen Verdünnung (alle Zeitversätze) traten hier, ähnlich wie unter Kontrollbedingungen, signifikant weniger inflammatorische (IL-1 $\beta$ ) und signifikant mehr antiinflammatorische (CD163, TREM-2) Mikroglia auf. GAL-201 schien hier also vor der Ausbildung proinflammatorischer Mikroglia zu schützen und förderte gleichzeitig einen Anstieg antiinflammatorischer Mikroglia. Auch gegenüber einer A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induzierten Astrozytenaktivierung zeigte sich GAL-201 als protektiv (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Bei den anderen Isoformen kam es dagegen bereits durch die Inkubation mit 50 nM A $\beta$  zu einer geringen Inflammation, was eine Aussage über eine mögliche Wirkung von GAL-201 in Gegenwart dieser Isoformen verhinderte. Lediglich in Bezug auf die

Astrozytenaktivierung in Gegenwart von A $\beta$ <sub>1-40</sub> und A $\beta$ pE3 wäre dies vielleicht möglich gewesen, jedoch zeigte GAL-201 hier kaum relevante Unterschiede, was eine Aussage ebenfalls erschwerte. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die Inkubation der Schnitte nur 90 Minuten lang erfolgte und möglicherweise bei längerer Inkubation eindeutiger Ergebnisse erzielt worden wären. Auch ist vielleicht eine Konzentration von 50 nM nicht bei jeder Isoform ausreichend, um eine Aktivierung der Mikroglia und Astrozyten zu induzieren (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Dass nach dieser kurzen Zeit in Gegenwart von 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> dennoch so klare Ergebnisse erzielt worden sind, ist nicht durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten von GAL-201 zu den einzelnen Isoformen zu erklären. Da die Bindungsstelle innerhalb der hydrophoben KLVFF-Region liegt (Frydman-Marom et al., 2009) und diese von den hier vorliegenden posttranslationalen Modifikationen und Kürzungen nicht betroffen ist, muss der Grund eher in der Toxizität der einzelnen Isoformen liegen. In Rammes et al. (2018) wurde gezeigt, dass A $\beta$ <sub>1-42</sub> den stärksten suppressiven Effekt auf eine NMDA-Rezeptor-vermittelte CA1-LTP hat, was vermuten lässt, dass es sich hierbei um die am stärksten zur Aggregation neigende Isoform handelt. Da GAL-201 genau hier eingreift, indem die Bildung toxischer A $\beta$ -Oligomere verhindert wird, ist dies die wahrscheinlichste Erklärung dafür, dass in Gegenwart von 50 nM A $\beta$ <sub>1-42</sub> auch nach 90 Minuten Inkubation ein signifikanter Effekt beobachtet wurde. Es ist zudem möglich, dass sich die Toxizität der anderen Isoformen weniger deutlich in einer Aktivierung der Mikroglia und Astrozyten widerspiegelt (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

#### **5.4 Stärken und Schwächen der Ergebnisse**

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit stellen eine Weiterführung zu den bisher über GAL-201 publizierten Daten dar. Es wurde gezeigt, dass GAL-201 nicht nur vor synaptotoxischen Effekten welche durch A $\beta$ <sub>1-42</sub> und A $\beta$ pE3 induziert werden schützt (Russ et al., 2022), sondern dass dies ebenso für eine durch A $\beta$ <sub>1-40</sub>- und 3NTyr10A $\beta$ -induzierte Toxizität zutrifft (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Eine zuvor schon für GAL-101 beobachtete Modulation der Aggregation, bei der es zu der Bildung nicht toxischer Aggregate kommt (Parsons et al., 2015), wurde durch die hier gewonnenen Ergebnisse unterstützt. Indem GAL-201 graduell aus der Lösung ausgedünnt wurde, lässt sich vermuten, dass die Wirkung auf diesen nicht toxischen Aggregaten, welche eine detoxifizierende Konformationsänderung über einen Prionen-ähnlichen Mechanismus auf andere fehlgefaltete Proteine übertragen, beruht. Dabei scheinen initial hohe Konzentrationen ausreichend zu sein, um die Detoxifikation zu induzieren (Rammes & Parsons, 2020; Riemann & von Ahsen et al. in preparation; Russ et al., 2022). Es

wurde zudem gezeigt, dass die Wirkung über den Zeitraum von einer Woche aufrecht erhalten blieb, was die Theorie des „selbst-propagierenden Mechanismus“ weiter unterstützt und insbesondere bei einer Non-Compliance von Vorteil ist (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Hier wäre weiterhin interessant, wie lange der Effekt nachgewiesen werden kann, also beispielsweise, ob selbst nach einem Monat noch eine Wirkung besteht. Hierzu sind *in vivo* Experimente geplant, welche weiteren Aufschluss geben sollen. Verhaltenstests mit Mäusen der Linie tgArcSwe lieferten bisher nach akuter, subkutaner Injektion von GAL-201 (Einzeldosis) positive Ergebnisse im Water-Cross-Maze (Kleinknecht et al., 2012). Behandelte Tiere zeigten hier einen kognitiven Benefit gegenüber unbehandelten Tieren (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Weitere Tests zur Aufklärung und Nachweis des Trigger-Effekts *in vivo* sind geplant. Bei einer Behandlung erhalten die Mäuse über vier Monate jeweils die ersten drei Tage des Monats eine subkutane Injektion. Ein weiteres Behandlungsdesign ist so ausgelegt, dass den Tieren über drei Monate jeden Tag eine subkutane Injektion verabreicht wird, gefolgt von einem „Wash-Out“ über einen Monat.

Die Ergebnisse der CA1-LTP werden durch die Analyse der Spinedynamik unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass eine durch 50 nM A $\beta$  (alle Isoformen) blockierte LTP mit einer reduzierten Spinedichte einherging und dass GAL-201 vor dieser Elimination der Spines schützte. Da die Durchführung beider Methoden am selben Hirnschnitt angewandt wurde, wird die Bedeutung der hier gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkung von GAL-201 und A $\beta$  verstärkt. Aber nicht nur in Bezug auf die Bildung und Elimination von Spines, auch in Bezug auf die Spineklassen konnten Unterschiede beobachtet werden. Sowohl die HFS selbst als auch die pharmakologische Behandlung induzieren morphologische Veränderungen der Spines, wobei GAL-201 hier tendenziell vorteilhafte Effekte bewirkte (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Da kleinere A $\beta$ -Aggregate über TREM-2 eine frühe, protektive Immunantwort der Mikroglia induzieren (Haass & Selkoe, 2022), interessierte uns, ob sich der protektive Effekt von GAL-201 auf die Bildung dieser toxischen Aggregate bereits schon hier widerspiegelt. Es zeigte sich, dass in der Tat ein signifikanter Unterschied in Gegenwart von A $\beta_{1-42}$  bestand. Der Anteil proinflammatorischer Mikroglia und reaktiver Astrozyten konnte durch GAL-201 signifikant reduziert werden. Die Ergebnisse bezüglich der anderen Isoformen waren dagegen weniger konsistent. Eine Konzentration von 50 nM A $\beta$  schien hier allerdings auch eine geringere Inflammation zu bewirken, wodurch für diese Isoformen keine Aussage über eine mögliche Wirkung von GAL-201 getroffen werden konnte. Es sollte jedoch bedacht werden, dass es sich

hierbei um *in vitro* Versuche mit nur 90 Minuten Inkubationszeit handelte. Längere Inkubationszeiten hätten womöglich andere Ergebnisse geliefert, allerdings können diese ohnehin nicht auf ein *in vivo* Modell extrapoliert werden. Es ist möglich, dass sich die Toxizität der anderen Isoformen weniger in einer Aktivierung der Mikroglia und Astrozyten äußert und/oder eventuell höhere Konzentration für eine Induktion der Toxizität nötig gewesen wären (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

Generell gilt für alle Versuche, es wurde ein „biologisches n“ von acht generiert. Daher sollte vielleicht weniger von Signifikanz, sondern mehr von einem Effekt gesprochen werden. Es bleibt abzuwarten, ob sich die beobachteten Effekte auch in Humanstudien, welche im Verlauf der Zulassung immer größer angelegt werden, bestätigen. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit stellen jedoch eine umfassende Ergänzung über die Wirkung von GAL-201 dar, um die IND-Enabling Studies, welche der Vorbereitung einer klinischen Phase I Studie dienen, weiter zu rechtfertigen und zu initiieren (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Zusätzliche präklinische Daten, die auch einen *in vivo* Langzeiteffekt von GAL-201 bestätigen, wären hier wünschenswert.

## **5.5 Klinisches Potential von GAL-201**

GAL-201 stellt als A $\beta$ -Aggregationsmodulator einen Vertreter einer sehr jungen Wirkstoffklasse dar und besitzt einen höchst vielversprechenden Wirkmechanismus. Indem es gezielt fehlgefaltete A $\beta$ -Monomere bindet und deren Aggregation moduliert, greift GAL-201 gleich zu Beginn des Aggregationsprozesses ein, was es von den bisher untersuchten A $\beta$ -Antikörpern unterscheidet. A $\beta$ -Oligomere, welche sich als besonders toxisch erwiesen haben (Klein et al., 2001; Lue et al., 1999; Walsh et al., 2002), werden somit nicht gebildet. Wie durch die Zulassung von Lequemi® bereits gezeigt, stellen diese jedoch ein von der FDA zugelassenes Target dar (Biogen, 2023). Dadurch, dass GAL-201 allerdings schon vor der Bildung von toxischen Oligomeren eingreift ist es, entgegen der A $\beta$ -Antikörper, nicht spezifisch für bestimmte aggregierte Formen von A $\beta$  und ermöglicht somit eine effizientere Clearance (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Auch ARIA, wie sie bei den Antikörpern verstärkt auftreten, sind hier weniger wahrscheinlich. Durch die Bildung der nicht-toxischen amorphen Cluster (Parsons et al., 2015) werden aggregierte Formen nicht einfach aufgelöst, sondern nur moduliert, wodurch der Effekt der kurzfristigen, starken Gefäßerweiterung (Barakos et al., 2022) vermutlich abgeschwächt wird. Für ein genaues Nebenwirkungsprofil bleiben die toxikologischen Studien abzuwarten, jedoch ist aufgrund der

Struktur (Dipeptid) nicht von einer Toxizität auszugehen. Daraus ergibt sich auch ein weiterer Vorteil der GAL-201 von den A $\beta$ -Antikörpern unterscheidet: Als Dipeptid kann GAL-201 oral appliziert werden. Dies erleichtert die Compliance deutlich. Auch ist es deutlich günstiger in der Herstellung, was die Therapie für ein breiteres Patientenspektrum zugänglich macht. All diese Aspekte unterstreichen die Relevanz der Entwicklung alternativer Wirkstoffklassen (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Dass Inhibitoren/Modulatoren der A $\beta$ -Aggregation eine vielversprechende Alternative darstellen, zeigt auch die klinische Entwicklung von ALZ-801 und Pri-002. GAL-201 unterscheidet sich von diesen Molekülen jedoch durch seine hohe Bindungsaffinität an A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Monomere. Während sich bei GAL-201 bereits eine Konzentration von 10 nM als pharmakologisch wirksam erwiesen hat (entsprechend einer Unterrepräsentation von 1:5) (Russ et al., 2022), werden bei Pri-002 und ALZ-801 weit mehr Wirkstoffmoleküle zur Neutralisierung eines A $\beta$ -Moleküls benötigt (Kocis et al., 2017; van Groen et al., 2017). Dies ermöglicht den Einsatz sehr geringer Konzentrationen, was das Risiko möglicher Nebenwirkungen senkt und die Compliance erleichtert (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Insbesondere im Vergleich zu ALZ-801 unterscheidet sich GAL-201 zudem durch seinen Prionen-ähnlichen Effekt. Durch diesen werden keine konstanten Wirkstofflevel benötigt, ein Vorteil, der insbesondere bei einer Non-Compliance bedeutsam ist (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Des Weiteren zeigte Tramiprosat bisher nur unter homozygoten APOE4-Trägern eine signifikante Verbesserung der Kognition (Abushakra et al., 2016).

## **6 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GAL-201 selbst nachdem es graduell aus der Lösung ausgedünnt wurde, noch in der Lage war eine A $\beta$ -induzierte Hemmung der LTP zu verhindern - selbst nach einer Woche (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Dies spricht für die Bildung der, zuvor schon für GAL-101 nachgewiesenen, nicht toxischen Aggregate, welche selbst in Abwesenheit zusätzlicher Wirkstoffmoleküle in der Lage sind, weitere fehlgefaltete A $\beta$ -Monomere zu detoxifizieren (Parsons et al., 2015; Rammes & Parsons, 2020). Dabei scheinen schon initiale Peakkonzentrationen für die Induktion des detoxifizierenden Effektes ausreichend zu sein (Rammes & Parsons, 2020). Unterstützt wird dieser protektive Effekt in Bezug auf die synaptische Plastizität durch Veränderungen der Spinedichte. Durch die Inkubation mit 50 nM A $\beta$  sank die Spinedichte signifikant, was durch eine Inkubation mit

GAL-201 verhindert werden konnte. Da diese Beobachtung direkt mit der Fähigkeit zur Ausbildung einer LTP korrelierte, erhielten wir hier ein äußerst stringentes Ergebnis in Bezug auf eine verbesserte synaptische Plastizität durch GAL-201 (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Zudem konnte in Bezug auf eine A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induzierte Mikroglia- und Astrozytenaktivierung ein protektiver Effekt durch GAL-201 bestätigt werden (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Aber nicht nur gegenüber A $\beta$ <sub>1-42</sub> auch gegenüber A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ pE3 und 3NTyr10A $\beta$  erwies sich GAL-201 in Bezug auf CA1-LTP und die Elimination der Spines als protektiv (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). In Anbetracht ihres Vorkommens im Gehirn und ihrer Toxizität ist dies von besonderer Bedeutung (Kummer et al., 2011; Russo et al., 2002; Wittnam et al., 2012). Insbesondere A $\beta$ pE3 ist durch den Zulassungsantrag von Donanemab in den Fokus gerückt, da dieser Antikörper selektiv für A $\beta$ pE3 in Plaques ist (Demattos et al., 2012). A $\beta$ pE3 zeigte sich in Rammes et al. (2018) zwar nicht so potent wie A $\beta$ <sub>1-42</sub> und 3NTyr10A $\beta$  in der Inhibition der CA1-LTP, aggregiert aber ebenso wie 3NTyr10A $\beta$  aufgrund einer gesteigerten Hydrophobie leichter und fungiert somit als Bildungskeim für weitere Aggregationen (Kummer et al., 2011; Wittnam et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich über das kleine Molekül GAL-201 also festhalten, dass es sich hierbei um eine kausal ansetzende, die A $\beta$ -Pathologie betreffende, Therapie von Morbus Alzheimer handelt, welche nicht nur gegenüber verschiedenen A $\beta$ -Subtypen Wirkung zeigt, sondern neben einer direkten Beeinflussung der synaptischen Plastizität auch eine Langzeitwirkung besitzt, indem eine A $\beta$ -induzierte Neurodegeneration verhindert wird (Riemann & von Ahsen et al. in preparation; Russ et al., 2022). Ein Zusammenhang in Bezug auf die Tau-Pathologie wurde nicht untersucht, jedoch ist Morbus Alzheimer multifaktoriell und es wird ohnehin verschiedener Therapieansätze bedürfen. Es ist davon auszugehen, dass je nach Krankheitsstadium vermutlich, wie bei anderen Krankheiten auch, mehrere Targets durch unterschiedliche Wirkstoffklassen verfolgt werden müssen, um die Krankheit ausreichend zu therapieren. GAL-201 stellt jedoch einen Wirkstoff dar, der bereits früh in der Pathogenese eingreift, äußert effizient, oral applizierbar und kostengünstig bereitzustellen ist. Aufgrund seines besonderen Wirkmechanismus werden keine konstanten Wirkstofflevel benötigt, was insbesondere bei einer Non-Compliance von Alzheimer Patienten von Vorteil ist (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Durch sein Target innerhalb der KLVFF-Region (Frydman-Marom et al., 2009), weist GAL-201 eine hohe Selektivität für fehlgefaltetes A $\beta$ -Monomer auf und ist zudem auch gegenüber anderen A $\beta$ -Subtypen, welche gekürzt oder posttranslational modifiziert sind, wirksam (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). GAL-201 weist also

einige Vorteile auch gegenüber sich bereits in klinischen Studien befindenden Vertretern der eigenen Wirkstoffklasse (ALZ-801 und PRI-002) auf (Riemann & von Ahsen et al. in preparation). Dieses positive pharmakokinetische und pharmakodynamische Wirkprofil von GAL-201 rechtfertigt eine Weiterentwicklung dieses Moleküls. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen zusammen mit den parallel dazu gewonnenen, positiven Ergebnissen der *in vivo* Versuche mit einer akuten Behandlungsgruppe, eine umfassende Erweiterung über die Wirkung von GAL-201 dar und ergänzen damit die Daten aus Russ et al. (2022). Wir hoffen, dass diese Ergebnisse die Initiierung der IND-Enabling Studies, welche den Übergang in eine klinische Phase I Studie ermöglichen, weiter unterstützen und rechtfertigen (Riemann & von Ahsen et al. in preparation).

## 7 Literaturverzeichnis

- Abushakra, S., Porsteinsson, A., Vellas, B., Cummings, J., Gauthier, S., Hey, J. A., Power, A., Hendrix, S., Wang, P., Shen, L., Sampalis, J., & Tolar, M. (2016). Clinical Benefits of Tramiprosate in Alzheimer's Disease Are Associated with Higher Number of APOE4 Alleles: The "APOE4 Gene-Dose Effect". *J Prev Alzheimers Dis*, 3(4), 219-228. <https://doi.org/10.14283/jpad.2016.115>
- Adis International Ltd. Part of Springer Science+Business Media. (2023, November 05). *Vanutide cridificar*. <https://adisinsight.springer.com/drugs/800021285>
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., . . . Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21(3), 383-421. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00124-x](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00124-x)
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia*, 36(2), 165-179. <https://doi.org/10.1002/glia.1106>
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, 8(6), 429-431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Alzheimer Forschung Initiative e. V. (2023, January). *Medikamente zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit*. Retrieved June 12, 2023, from [https://www.alzheimer-forschung.de/fileadmin/user\\_upload/0\\_Broschüren/Liste\\_Medikamente.pdf](https://www.alzheimer-forschung.de/fileadmin/user_upload/0_Broschüren/Liste_Medikamente.pdf)
- Alzheimer Forschung Initiative e. V. (n.d. ). *Die Geschichte der Alzheimer-Krankheit*. Retrieved May 30, 2023, from <https://www.alzheimer-forschung.de/alzheimer/wasistalzheimer/geschichte-der-alzheimer-krankheit/>
- Alzheimer's Association. (2023). Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 2023;19(4). <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- Alzheimer's Disease International (1). (n.d.). *Dementia facts & figures: Dementia Statistics*. Retrieved May 30, 2023, from <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>
- Alzheimer's Disease International (2). (n.d. ). *Dementia facts & figures: Types of dementia: Alzheimer's Disease*. Retrieved May 30, 2023, from <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/types-of-dementia/alzheimers-disease/>
- Alzheon. (2021, June 04). *Alzheon Announces First Patient Dosed in APOLLOE4 Phase 3 Trial of Oral ALZ 801 in Patients with Early Alzheimer's Disease*. <https://alzheon.com/alzheon-announces-first-patient-dosed-in-apolloe4-phase-3-trial-of-oral-alz-801-in-patients-with-early-alzheimers-disease/>
- Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C. A., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., Bales, K. R., Cappai, R., Masters, C. L., Gliemann, J., Mufson, E. J., Hyman, B. T., Paul, S. M., Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(38), 13461-13466. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503689102>
- Arboleda-Velasquez, J. F., Lopera, F., O'Hare, M., Delgado-Tirado, S., Marino, C., Chmielewska, N., Saez-Torres, K. L., Amarnani, D., Schultz, A. P., Sperling, R. A., Leyton-Cifuentes, D., Chen, K., Baena, A., Aguillon, D., Rios-Romenets, S., Giraldo, M., Guzman-Velez, E., Norton, D. J., Pardilla-Delgado, E., . . . Quiroz, Y. T. (2019).

- Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report. *Nat Med*, 25(11), 1680-1683.  
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0611-3>
- Arbor, S. C., LaFontaine, M., & Cumbay, M. (2016). Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J Biol Med*, 89(1), 5-21.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27505013>
- Arnsten, A. F. T., Datta, D., Del Tredici, K., & Braak, H. (2021). Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 17(1), 115-124.  
<https://doi.org/10.1002/alz.12192>
- Bachiller, S., Jimenez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci*, 12, 488.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
- Bading, H. (2021). Hoffnung auf Trennung - Eine unheilvolle Verbindung *Neurowissenschaft*.
- Baloyannis, S. J. (2015). Staining neurons with Golgi techniques in degenerative diseases of the brain. *Neural Regen Res*, 10(5), 693-695. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.156950>
- Barakos, J., Purcell, D., Suhy, J., Chalkias, S., Burkett, P., Marsica Grassi, C., Castrillo-Viguera, C., Rubino, I., & Vijverberg, E. (2022). Detection and Management of Amyloid-Related Imaging Abnormalities in Patients with Alzheimer's Disease Treated with Anti-Amyloid Beta Therapy. *J Prev Alzheimers Dis*, 9(2), 211-220.  
<https://doi.org/10.14283/jpad.2022.21>
- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 23(4), 213-227.  
<https://doi.org/10.1177/0891988710383571>
- Benarroch, E. E. (2021a). *Neuroscience for Clinicians*, S. 306+307+278
- Benarroch, E. E. (2021b). *Neuroscience for Clinicians*, S. 310
- Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelow, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., Mulinyawe, S. B., Bohlen, C. J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I. L., Chang, E. F., Li, G., Grant, G. A., Hayden Gephart, M. G., & Barres, B. A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(12), E1738-1746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Bernabeu-Zornoza, A., Coronel, R., Palmer, C., Monteagudo, M., Zambrano, A., & Liste, I. (2019). Physiological and pathological effects of amyloid-beta species in neural stem cell biology. *Neural Regen Res*, 14(12), 2035-2042. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.262571>
- Biogen. (2023). EISAI SUBMITS MARKETING AUTHORIZATION APPLICATION FOR LECANEMAB AS TREATMENT FOR EARLY ALZHEIMER'S DISEASE IN EUROPE.  
<https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/eisai-submits-marketing-authorization-application-lecanemab> [13.06.23]
- Biogen. (2024, January 31). *Biogen to Realign Resources for Alzheimer's Disease Franchise*. Retrieved April 6, 2024, from <https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-realign-resources-alzheimers-disease-franchise>
- Bjorklund, N. L., Reese, L. C., Sadagoparamanujam, V. M., Ghirardi, V., Woltjer, R. L., & Tagliatela, G. (2012). Absence of amyloid beta oligomers at the postsynapse and regulated synaptic Zn<sup>2+</sup> in cognitively intact aged individuals with Alzheimer's disease neuropathology. *Mol Neurodegener*, 7, 23. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-23>

- Bliss, T. V., & Cooke, S. F. (2011). Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo)*, *66 Suppl 1*(Suppl 1), 3-17.  
<https://doi.org/10.1590/s1807-59322011001300002>
- Blömeke, L., Rehn, F., Kraemer-Schulien, V., Kutzsche, J., Pils, M., Bujnicki, T., Lewczuk, P., Kornhuber, J., Freiesleben, S. D., Schneider, L. S., Preis, L., Priller, J., Spruth, E. J., Altenstein, S., Lohse, A., Schneider, A., Fliessbach, K., Wiltfang, J., Hansen, N., . . . Peters, O. (2024). Abeta oligomers peak in early stages of Alzheimer's disease preceding tau pathology. *Alzheimers Dement (Amst)*, *16*(2), e12589.  
<https://doi.org/10.1002/dad2.12589>
- Bloom, G. S. (April 2014). Amyloid- $\beta$  and Tau The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis. *JAMA Neurology* *71*.
- Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., Younkin, S. G., & Sisodia, S. S. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, *17*(5), 1005-1013.
- Bourne, J., & Harris, K. M. (2007). Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol*, *17*(3), 381-386.  
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.009>
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2015). *Neuroanatomy and pathology of sporadic Alzheimer's disease*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 215:1-162. PMID: 25920101.
- Brozzi, F., Arcuri, C., Giambanco, I., & Donato, R. (2009). S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *J Biol Chem*, *284*(13), 8797-8811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805897200>
- Brylinski, L., Kostelecka, K., Wolinski, F., Duda, P., Gora, J., Granat, M., Flieger, J., Teresinski, G., Buszewicz, G., Sitarz, R., & Baj, J. (2023). Aluminium in the Human Brain: Routes of Penetration, Toxicity, and Resulting Complications. *Int J Mol Sci*, *24*(8).  
<https://doi.org/10.3390/ijms24087228>
- Budd Haeberlein, S., O'Gorman, J., Chiao, P., Bussiere, T., von Rosenstiel, P., Tian, Y., Zhu, Y., von Hehn, C., Gheuens, S., Skordos, L., Chen, T., & Sandrock, A. (2017). Clinical Development of Aducanumab, an Anti-Abeta Human Monoclonal Antibody Being Investigated for the Treatment of Early Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis*, *4*(4), 255-263. <https://doi.org/10.14283/jpad.2017.39>
- Cahoy, J. D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J., & Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, *28*(1), 264-278. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Campbell, N. L., Perkins, A. J., Gao, S., Skaar, T. C., Li, L., Hendrie, H. C., Fowler, N., Callahan, C. M., & Boustani, M. A. (2017). Adherence and Tolerability of Alzheimer's Disease Medications: A Pragmatic Randomized Trial. *J Am Geriatr Soc*, *65*(7), 1497-1504.  
<https://doi.org/10.1111/jgs.14827>
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*, *38*(9), 1205-1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>

- Chen, J., Buchanan, J. B., Sparkman, N. L., Godbout, J. P., Freund, G. G., & Johnson, R. W. (2008). Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system. *Brain Behav Immun*, 22(3), 301-311. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.08.014>
- Chen, P., Zhao, W., Guo, Y., Xu, J., & Yin, M. (2016). CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's Disease: A Target for Neuroprotection. *Biomed Res Int*, 2016, 8090918. <https://doi.org/10.1155/2016/8090918>
- Cho, S. H., Sun, B., Zhou, Y., Kauppinen, T. M., Halabisky, B., Wes, P., Ransohoff, R. M., & Gan, L. (2011). CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 286(37), 32713-32722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.254268>
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L. C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S. J., & Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394-400. <https://doi.org/10.1038/nature12776>
- Cision. (2019, January 16). *United Neuroscience Announces Positive Top-Line Results from Phase 2a Clinical Study of UB-311 Vaccine in Patients with Alzheimer's Disease*. <https://www.prnewswire.com/news-releases/united-neuroscience-announces-positive-top-line-results-from-phase-2a-clinical-study-of-ub-311-vaccine-in-patients-with-alzheimers-disease-300779315.html>
- Clark, I. C., Wheeler, M. A., Lee, H. G., Li, Z., Sanmarco, L. M., Thaploo, S., Polonio, C. M., Shin, S. W., Scalisi, G., Henry, A. R., Rone, J. M., Giovannoni, F., Charabati, M., Akl, C. F., Aleman, D. M., Zandee, S. E. J., Prat, A., Douek, D. C., Boritz, E. A., . . . Abate, A. R. (2023). Identification of astrocyte regulators by nucleic acid cytometry. *Nature*, 614(7947), 326-333. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05613-0>
- ClinicalTrials.gov. (2022, August 23). *Evaluation of Safety of Contraloid Acetate in Patients With Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease*. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04711486?intr=PRI-002&rank=1>
- ClinicalTrials.gov. (2023a, 21.07.2023). *A Study to Assess if BIIB080 Can Change Clinical Dementia Rating-Sum of Boxes Scores, and BIIB080 Safety and Tolerability When Injected Into the Cerebrospinal Fluid of Participants With Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease (AD) or Mild AD Dementia Between 50 to 80 Years of Age (CELIA)*. Retrieved 28.07.2023 from <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05399888>
- ClinicalTrials.gov. (2023b, 12.06.2023). *A Study to Confirm Safety and Efficacy of Lecanemab in Participants With Early Alzheimer's Disease (Clarity AD)*. Retrieved 27.07.2023 from <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03887455>
- Colom-Cadena, M., Davies, C., Sirisi, S., Lee, J. E., Simzer, E. M., Tzioras, M., Querol-Vilaseca, M., Sanchez-Aced, E., Chang, Y. Y., Holt, K., McGeachan, R. I., Rose, J., Tulloch, J., Wilkins, L., Smith, C., Andrian, T., Belbin, O., Pujals, S., Horrocks, M. H., . . . Spiers-Jones, T. L. (2023). Synaptic oligomeric tau in Alzheimer's disease - A potential culprit in the spread of tau pathology through the brain. *Neuron*, 111(14), 2170-2183 e2176. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.04.020>
- Cummings, J., Zhou, Y., Lee, G., Zhong, K., Fonseca, J., & Cheng, F. (2023). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2023. *Alzheimers Dement (N Y)*, 9(2), e12385. <https://doi.org/10.1002/trc2.12385>

- Czirr, E., & Wyss-Coray, T. (2012). The immunology of neurodegeneration. *J Clin Invest*, 122(4), 1156-1163. <https://doi.org/10.1172/JCI58656>
- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Jr., Baker, L. K., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem*, 277(35), 32046-32053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201750200>
- Dajas-Bailador, F. A., Lima, P. A., & Wonnacott, S. (2000). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca(2+) dependent mechanism. *Neuropharmacology*, 39(13), 2799-2807. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(00\)00127-1](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(00)00127-1)
- de Haas, A. H., Boddeke, H. W., & Biber, K. (2008). Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia*, 56(8), 888-894. <https://doi.org/10.1002/glia.20663>
- de Paula VJR, G. F., Diniz BS, Forlenza OV. (2009). Neurobiological pathways to Alzheimer's disease: Amyloid-beta, TAU protein or both? . *Dement Neuropsychol, Dement Neuropsychol*. 2009 Jul-Sep;3(3):188-194. (3), 188-194. <https://doi.org/10.1590/S1980-57642009DN30300003>
- Demattos, R. B., Lu, J., Tang, Y., Racke, M. M., Delong, C. A., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., Forster, B. M., McDonnell, P. C., Liu, F., Kinley, R. D., Jordan, W. H., & Hutton, M. L. (2012). A plaque-specific antibody clears existing beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron*, 76(5), 908-920. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.029>
- Di, J., Cohen, L. S., Corbo, C. P., Phillips, G. R., El Idrissi, A., & Alonso, A. D. (2016). Abnormal tau induces cognitive impairment through two different mechanisms: synaptic dysfunction and neuronal loss. *Sci Rep*, 6, 20833. <https://doi.org/10.1038/srep20833>
- Dorostkar, M. M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol*, 130(1), 1-19. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5>
- Dulin, F., Leveille, F., Ortega, J. B., Mornon, J. P., Buisson, A., Callebaut, I., & Colloc'h, N. (2008). P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett*, 582(13), 1865-1870. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.002>
- Dyer, O. (2022). Long delayed publication of data on Alzheimer's drug Aduhelm leaves questions unanswered. *BMJ*, 376, o808. <https://doi.org/10.1136/bmj.o808>
- Eikelenboom, P., Hoozemans, J. J., Veerhuis, R., van Exel, E., Rozemuller, A. J., & van Gool, W. A. (2012). Whether, when and how chronic inflammation increases the risk of developing late-onset Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 4(3), 15. <https://doi.org/10.1186/alzrt118>
- El-Agnaf, O. M., Mahil, D. S., Patel, B. P., & Austen, B. M. (2000). Oligomerization and toxicity of beta-amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(3), 1003-1007. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3051>
- EMA. (2022). Aduhelm: Withdrawal of the marketing authorisation application. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/withdrawn-applications/aduhelm> [13.06.2023]
- Fairen, A., Peters, A., & Saldanha, J. (1977). A new procedure for examining Golgi impregnated neurons by light and electron microscopy. *J Neurocytol*, 6(3), 311-337. <https://doi.org/10.1007/BF01175194>

- Fan, L., Mao, C., Hu, X., Zhang, S., Yang, Z., Hu, Z., Sun, H., Fan, Y., Dong, Y., Yang, J., Shi, C., & Xu, Y. (2019). New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Neurol*, 10, 1312. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01312>
- Fann, J. R., Ribe, A. R., Pedersen, H. S., Fenger-Gron, M., Christensen, J., Benros, M. E., & Vestergaard, M. (2018). Long-term risk of dementia among people with traumatic brain injury in Denmark: a population-based observational cohort study. *Lancet Psychiatry*, 5(5), 424-431. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(18\)30065-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(18)30065-8)
- Farlow, M., Anand, R., Messina, J., Jr., Hartman, R., & Veach, J. (2000). A 52-week study of the efficacy of rivastigmine in patients with mild to moderately severe Alzheimer's disease. *Eur Neurol*, 44(4), 236-241. <https://doi.org/10.1159/000008243>
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N., & van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 278(16), 1349-1356. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9343467>
- FDA. (2021). Letter of Accelerated Approval for Aduhelm (BLA 761178). Retrieved October 14, 2023, from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/appletter/2021/761178Orig1s0001tr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2021/761178Orig1s0001tr.pdf)
- FDA. (2023, 06.07.2023). *FDA Converts Novel Alzheimer's Disease Treatment to Traditional Approval*. Retrieved 27.07.2023 from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-disease-treatment>
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*, 14(1), 101-115. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>
- Fiala, J. C., Spacek, J., & Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev*, 39(1), 29-54. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(02\)00158-3](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(02)00158-3)
- Fogwe LA. Reddy V. Mesfin FB. ([Updated 2022 Jul 18]). *Neuroanatomy, Hippocampus* Retrieved June 27, 2023, from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482171/>
- Forschungszentrum Jülich. (2023, November 21). *Alzheimer-Medikament PRI-002 erhält EMA-Genehmigung für Phase-II-Studie*. Retrieved April 6, 2024, from <https://www.fz-juelich.de/de/aktuelles/news/pressemitteilungen/2023/alzheimer-medikament-pri-002-phase-ii>
- Frank, S., Burbach, G. J., Bonin, M., Walter, M., Streit, W., Bechmann, I., & Deller, T. (2008). TREM2 is upregulated in amyloid plaque-associated microglia in aged APP23 transgenic mice. *Glia*, 56(13), 1438-1447. <https://doi.org/10.1002/glia.20710>
- Fregerslev, S., Blackstad, T. W., Fredens, K., & Holm, M. J. (1971). Golgi potassium-dichromate silver-nitrate impregnation. Nature of the precipitate studied by x-ray powder diffraction methods. *Histochemie*, 25(1), 63-71. <https://doi.org/10.1007/BF00303947>
- Frydman-Marom, A., Rechter, M., Shefler, I., Bram, Y., Shalev, D. E., & Gazit, E. (2009). Cognitive-performance recovery of Alzheimer's disease model mice by modulation of early soluble amyloidal assemblies. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(11), 1981-1986. <https://doi.org/10.1002/anie.200802123>
- Galatro, T. F., Vainchtein, I. D., Brouwer, N., Boddeke, E., & Eggen, B. J. L. (2017). Isolation of Microglia and Immune Infiltrates from Mouse and Primate Central Nervous System. *Methods Mol Biol*, 1559, 333-342. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6786-5\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6786-5_23)

- Galimedix Therapeutics. (n.d.). *Our Pipeline - Providing Novel Therapies that are Designed to be more Effective, Have Fewer Side Effects and are Easier to Use than Currently Available Treatments*. Retrieved August 28, 2023, from <https://www.galimedix.com/our-pipeline/>
- Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G., & Sofroniew, M. V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 7(11), 1233-1241. <https://doi.org/10.1038/nn1340>
- Garcia-Esparcia, P., Diaz-Lucena, D., Ainciburu, M., Torrejon-Escribano, B., Carmona, M., Llorens, F., & Ferrer, I. (2018). Glutamate Transporter GLT1 Expression in Alzheimer Disease and Dementia With Lewy Bodies. *Front Aging Neurosci*, 10, 122. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00122>
- Garcia-Revilla, J., Alonso-Bellido, I. M., Burguillos, M. A., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Ruiz, R., Cruz-Hernandez, L., Garcia-Dominguez, I., Roca-Ceballos, M. A., Santiago, M., Rodriguez-Gomez, J. A., Soto, M. S., de Pablos, R. M., & Venero, J. L. (2019). Reformulating Pro-Oxidant Microglia in Neurodegeneration. *J Clin Med*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/jcm8101719>
- Gaur, A., Kaliappan, A., Balan, Y., Sakthivadivel, V., Medala, K., & Umesh, M. (2022). Sleep and Alzheimer: The Link. *Maedica (Bucur)*, 17(1), 177-185. <https://doi.org/10.26574/maedica.2022.17.1.177>
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G., & Hof, P. R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60(9), 1495-1500. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000063311.58879.01>
- Giuffrida, M. L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., Garozzo, D., Nicoletti, F., Rizzarelli, E., & Copani, A. (2009). Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci*, 29(34), 10582-10587. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009>
- Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984a). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 122(3), 1131-1135. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(84\)91209-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)91209-9)
- Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984b). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120(3), 885-890. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80190-4)
- Golgi C. (1873). Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazz Med Ita Lombarda* 33:244-246.
- Gonzalez-Prieto, M., Gutierrez, I. L., Garcia-Bueno, B., Caso, J. R., Leza, J. C., Ortega-Hernandez, A., Gomez-Garre, D., & Madrigal, J. L. M. (2021). Microglial CX3CR1 production increases in Alzheimer's disease and is regulated by noradrenaline. *Glia*, 69(1), 73-90. <https://doi.org/10.1002/glia.23885>
- Gorina, Y. V., Salmina, A. B., Erofeev, A. I., Gerasimov, E. I., Bolshakova, A. V., Balaban, P. M., Bezprozvanny, I. B., & Vlasova, O. L. (2022). Astrocyte Activation Markers. *Biochemistry (Mosc)*, 87(9), 851-870. <https://doi.org/10.1134/S0006297922090012>
- Goyal, D., Shuaib, S., Mann, S., & Goyal, B. (2017). Rationally Designed Peptides and Peptidomimetics as Inhibitors of Amyloid-beta (Abeta) Aggregation: Potential Therapeutics of Alzheimer's Disease. *ACS Comb Sci*, 19(2), 55-80. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.6b00116>
- Green, R. C., Cupples, L. A., Go, R., Benke, K. S., Edeki, T., Griffith, P. A., Williams, M., Hips, Y., Graff-Radford, N., Bachman, D., Farrer, L. A., & Group, M. S. (2002). Risk of

- dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA*, 287(3), 329-336. <https://doi.org/10.1001/jama.287.3.329>
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., & Wisniewski, H. M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*, 261(13), 6084-6089. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3084478>
- Gunawardena, I. P. C., Retinasamy, T., & Shaikh, M. F. (2021). Is Aducanumab for LMICs? Promises and Challenges. *Brain Sci*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/brainsci11111547>
- Guo, L., Salt, T. E., Luong, V., Wood, N., Cheung, W., Maass, A., Ferrari, G., Russo-Marie, F., Sillito, A. M., Cheetham, M. E., Moss, S. E., Fitzke, F. W., & Cordeiro, M. F. (2007). Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(33), 13444-13449. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703707104>
- H.Russ; C.G. Parsons; et al. (2019). Sustained neuroprotective effect of novel A $\beta$  aggregation modulator GAL- 101 shown in dry AMD and glaucoma models with transient peak concentrations using eye drops. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol.60, 5393. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2744709>
- Haass, C., & Selkoe, D. (2022). If amyloid drives Alzheimer disease, why have anti-amyloid therapies not yet slowed cognitive decline? *PLoS Biol*, 20(7), e3001694. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001694>
- Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., Green, G., Dionne, D., Nguyen, L., Marshall, J. L., Chen, F., Zhang, F., Kaplan, T., Regev, A., & Schwartz, M. (2020). Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat Neurosci*, 23(6), 701-706. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0624-8>
- Haley, J. E., Schaible, E., Pavlidis, P., Murdock, A., & Madison, D. V. (1996). Basal and apical synapses of CA1 pyramidal cells employ different LTP induction mechanisms. *Learn Mem*, 3(4), 289-295. <https://doi.org/10.1101/lm.3.4.289>
- Han, X., Liu, Y. J., Liu, B. W., Ma, Z. L., Xia, T. J., & Gu, X. P. (2022). TREM2 and CD163 Ameliorate Microglia-Mediated Inflammatory Environment in the Aging Brain. *J Mol Neurosci*, 72(5), 1075-1084. <https://doi.org/10.1007/s12031-022-01965-4>
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., & Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, 5(5), 405-414. <https://doi.org/10.1038/nn835>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hentschke, H., & Stutgen, M. C. (2011). Computation of measures of effect size for neuroscience data sets. *Eur J Neurosci*, 34(12), 1887-1894. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07902.x>
- Hey, J. A., Kocis, P., Hort, J., Abushakra, S., Power, A., Vyhnalek, M., Yu, J. Y., & Tolar, M. (2018). Discovery and Identification of an Endogenous Metabolite of Tramiprosate and Its Prodrug ALZ-801 that Inhibits Beta Amyloid Oligomer Formation in the Human Brain. *CNS Drugs*, 32(9), 849-861. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0554-0>
- Hey, J. A., Yu, J. Y., Versavel, M., Abushakra, S., Kocis, P., Power, A., Kaplan, P. L., Amedio, J., & Tolar, M. (2018). Clinical Pharmacokinetics and Safety of ALZ-801, a Novel Prodrug of Tramiprosate in Development for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clin Pharmacokinet*, 57(3), 315-333. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0608-3>

- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol*, 32, 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>
- Holtzman, D. M., Herz, J., & Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(3), a006312. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006312>
- Honea, R. A., Vidoni, E. D., Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2012). Maternal family history is associated with Alzheimer's disease biomarkers. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 31(3), 659–668.
- Houston, M. E., Jr., Campbell, A. P., Lix, B., Kay, C. M., Sykes, B. D., & Hodges, R. S. (1996). Lactam bridge stabilization of alpha-helices: the role of hydrophobicity in controlling dimeric versus monomeric alpha-helices. *Biochemistry*, 35(31), 10041-10050. <https://doi.org/10.1021/bi952757m>
- Hsieh, C. L., Koike, M., Spusta, S. C., Niemi, E. C., Yenari, M., Nakamura, M. C., & Seaman, W. E. (2009). A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia. *J Neurochem*, 109(4), 1144-1156. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06042.x>
- Huffels, C. F. M., Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2023). Ass Pathology and Neuron-Glia Interactions: A Synaptocentric View. *Neurochem Res*, 48(4), 1026-1046. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03699-6>
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T., Jr. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32(18), 4693-4697. <https://doi.org/10.1021/bi00069a001>
- Jawhar, S., Wirths, O., Schilling, S., Graubner, S., Demuth, H. U., & Bayer, T. A. (2011). Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate Abeta formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *J Biol Chem*, 286(6), 4454-4460.
- Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L. P., & Tsirka, S. E. (2013). Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLoS One*, 8(2), e56293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056293>
- Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R. R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O. A., . . . Stefansson, K. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488(7409), 96-99. <https://doi.org/10.1038/nature11283>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci*, 14, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 12, 25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kang et al., H. W. K., H.K. Kim, B.H. Moon, Seo Jun Lee, Se Jung Lee, I.J. Rhyu. (2017). Comprehensive review of golgi staining methods for nervous tissue, *Appl. Microsc.*, 47 (2017), pp. 63-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.9729/am.2017.47.2.63>

- Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 10(9), 698-712. <https://doi.org/10.1038/nrd3505>
- Kater, S. B., & Rehder, V. (1995). The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol*, 5(1), 68-74. [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80089-1](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80089-1)
- Kero, M., Paetau, A., Polvikoski, T., Tanskanen, M., Sulkava, R., Jansson, L., Myllykangas, L., & Tienari, P. J. (2013). Amyloid precursor protein (APP) A673T mutation in the elderly Finnish population. *Neurobiol Aging*, 34(5), 1518 e1511-1513. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.017>
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91(2), 461-553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Klein, W. L., Krafft, G. A., & Finch, C. E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci*, 24(4), 219-224. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(00\)01749-5](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(00)01749-5)
- Kleinknecht, K. R., Bedenk, B. T., Kaltwasser, S. F., Grunecker, B., Yen, Y. C., Czisch, M., & Wotjak, C. T. (2012). Hippocampus-dependent place learning enables spatial flexibility in C57BL6/N mice. *Front Behav Neurosci*, 6, 87. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00087>
- Kocis, P., Tolar, M., Yu, J., Sinko, W., Ray, S., Blennow, K., Fillit, H., & Hey, J. A. (2017). Elucidating the Abeta42 Anti-Aggregation Mechanism of Action of Tramiprosate in Alzheimer's Disease: Integrating Molecular Analytical Methods, Pharmacokinetic and Clinical Data. *CNS Drugs*, 31(6), 495-509. <https://doi.org/10.1007/s40263-017-0434-z>
- Koffie, R. M., Hashimoto, T., Tai, H. C., Kay, K. R., Serrano-Pozo, A., Joyner, D., Hou, S., Kopeikina, K. J., Frosch, M. P., Lee, V. M., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2012). Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid-beta. *Brain*, 135(Pt 7), 2155-2168. <https://doi.org/10.1093/brain/aws127>
- Kopeikina, K. J., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2012). Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease. *Transl Neurosci*, 3(3), 223-233. <https://doi.org/10.2478/s13380-012-0032-y>
- Kummer, M. P., Hermes, M., Delekarte, A., Hammerschmidt, T., Kumar, S., Terwel, D., Walter, J., Pape, H. C., Konig, S., Roeber, S., Jessen, F., Klockgether, T., Korte, M., & Heneka, M. T. (2011). Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron*, 71(5), 833-844.
- Kutzsche, J., Jurgens, D., Willuweit, A., Adermann, K., Fuchs, C., Simons, S., Windisch, M., Humpel, M., Rossberg, W., Wolzt, M., & Willbold, D. (2020). Safety and pharmacokinetics of the orally available antiprionic compound PRI-002: A single and multiple ascending dose phase I study. *Alzheimers Dement (N Y)*, 6(1), e12001. <https://doi.org/10.1002/trc2.12001>
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 27(4), 796-807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007>
- Lang, C., Barco, A., Zablow, L., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A., & Zakharenko, S. S. (2004). Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(47), 16665-16670. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407581101>

- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Clos, A. L., Jackson, G. R., & Kaye, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener*, 6, 39. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-39>
- Lee, J. H., Barral, S., & Reitz, C. (2008). The neuronal sortilin-related receptor gene SORL1 and late-onset Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 8(5), 384-391. <https://doi.org/10.1007/s11910-008-0060-8>
- Lee, S., Varvel, N. H., Konerth, M. E., Xu, G., Cardona, A. E., Ransohoff, R. M., & Lamb, B. T. (2010). CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am J Pathol*, 177(5), 2549-2562. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100265>
- Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., & Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440(7082), 352-357. <https://doi.org/10.1038/nature04533>
- Leszek, J., Mikhaylenko, E. V., Belousov, D. M., Koutsouraki, E., Szczechowiak, K., Kobusiak-Prokopowicz, M., Mysiak, A., Diniz, B. S., Somasundaram, S. G., Kirkland, C. E., & Aliev, G. (2021). The Links between Cardiovascular Diseases and Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*, 19(2), 152-169. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200729093724>
- Lewis, S. L. (2022). *Dementia Continuum - Lifelong Learning in Neurology, Volume 28, Issue 3, S.658*.
- Li, Y., Xu, H., Wang, H., Yang, K., Luan, J., & Wang, S. (2023). TREM2: Potential therapeutic targeting of microglia for Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, 165, 115218. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115218>
- Liang, X., Wu, H., Colt, M., Guo, X., Pluimer, B., Zeng, J., Dong, S., & Zhao, Z. (2021). Microglia and its Genetics in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*, 18(9), 676-688. <https://doi.org/10.2174/1567205018666211105140732>
- Lilly. (2023, January 19). *U.S. Food and Drug Administration Issues Complete Response Letter for Accelerated Approval of Donanemab*. <https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/us-food-and-drug-administration-issues-complete-response-0>
- Lilly. (2023, May 03). *Lilly's Donanemab Significantly Slowed Cognitive and Functional Decline in Phase 3 Study of Early Alzheimer's Disease*. <https://investor.lilly.com/news-releases/news-release-details/lillys-donanemab-significantly-slowed-cognitive-and-functional>
- Lindwall, G., & Cole, R. D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*, 259(8), 5301-5305. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6425287>
- Liu, Y. H., Bu, X. L., Liang, C. R., Wang, Y. R., Zhang, T., Jiao, S. S., Zeng, F., Yao, X. Q., Zhou, H. D., Deng, J., & Wang, Y. J. (2015). An N-terminal antibody promotes the transformation of amyloid fibrils into oligomers and enhances the neurotoxicity of amyloid-beta: the dust-raising effect. *J Neuroinflammation*, 12, 153. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0379-4>
- Lovestone S, B. M., Dubois B, Hüll M, Rinne JO, Huppertz HJ, Calero M, Andrés MV, Gómez-Carrillo B, León T, del Ser T; ARGO investigators. (2015). A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 45(1), 75-88. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>

- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., & Rogers, J. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, *155*(3), 853-862. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65184-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65184-x)
- Luttmann, W. B., K.; Küpper, M.; Myrtek, D. . (2014). *Der Experimentator: Immunologie* (4. ed.). Springer Spektrum
- MacLeod, R., Hillert, E. K., Cameron, R. T., & Baillie, G. S. (2015). The role and therapeutic targeting of alpha-, beta- and gamma-secretase in Alzheimer's disease. *Future Sci OA*, *1*(3), FSO11. <https://doi.org/10.4155/fso.15.9>
- Mandrekar, J. N. (2010). Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol*, *5*(9), 1315-1316. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, *4*(11), 1086-1092. <https://doi.org/10.1038/nn736>
- Mazaheri, F., Snaidero, N., Kleinberger, G., Madore, C., Daria, A., Werner, G., Krasemann, S., Capell, A., Trumbach, D., Wurst, W., Brunner, B., Bultmann, S., Tahirovic, S., Kerschensteiner, M., Misgeld, T., Butovsky, O., & Haass, C. (2017). TREM2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury. *EMBO Rep*, *18*(7), 1186-1198. <https://doi.org/10.15252/embr.201743922>
- McLaurin, J., Kierstead, M. E., Brown, M. E., Hawkes, C. A., Lambermon, M. H., Phinney, A. L., Darabie, A. A., Cousins, J. E., French, J. E., Lan, M. F., Chen, F., Wong, S. S., Mount, H. T., Fraser, P. E., Westaway, D., & St George-Hyslop, P. (2006). Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med*, *12*(7), 801-808. <https://doi.org/10.1038/nm1423>
- Medeiros, R., & LaFerla, F. M. (2013). Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol*, *239*, 133-138. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.007>
- Middeldorp, J., & Hol, E. M. (2011). GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol*, *93*(3), 421-443. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005>
- Mintun, M. A., Lo, A. C., Duggan Evans, C., Wessels, A. M., Ardayfio, P. A., Andersen, S. W., Shcherbinin, S., Sparks, J., Sims, J. R., Brys, M., Apostolova, L. G., Salloway, S. P., & Skovronsky, D. M. (2021). Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, *384*(18), 1691-1704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2100708>
- Molina, E. e. a. (2022). AB1601 topline results – Phase 2 study of ABvac40 in patients with amnesic mild cognitive impairment (a-MCI) or very mild Alzheimer's Disease (Vm-AD). *Alzheimer's Dementia*, *18*.
- Moser, M. T., M.; Andersen, P. (1994). An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.91,pp.12673-12675*.
- Mrak, R. E., & Griffinbc, W. S. (2001). The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *22*(6), 915-922. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(01\)00293-7](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(01)00293-7)
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G. Q., Mallory, M., Rockenstein, E. M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., & McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic

- mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*, 20(11), 4050-4058.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04050.2000>
- Mummery, C. J., Borjesson-Hanson, A., Blackburn, D. J., Vijverberg, E. G. B., De Deyn, P. P., Ducharme, S., Jonsson, M., Schneider, A., Rinne, J. O., Ludolph, A. C., Bodenschatz, R., Kordasiewicz, H., Swayze, E. E., Fitzsimmons, B., Mignon, L., Moore, K. M., Yun, C., Baumann, T., Li, D., . . . Lane, R. M. (2023). Tau-targeting antisense oligonucleotide MAPT(Rx) in mild Alzheimer's disease: a phase 1b, randomized, placebo-controlled trial. *Nat Med*, 29(6), 1437-1447. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02326-3>
- Mutschler E., S. H. G., Vaupel P. (2007). *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*, S. 830 (Vol. 6). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Nelson, P. T., Braak, H., & Markesbery, W. R. (2009). Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(1), 1-14. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181919a48>
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol*, 64, 313-353.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>
- Novak, P., Kovacech, B., Katina, S., Schmidt, R., Scheltens, P., Kontsekova, E., Ropele, S., Fialova, L., Kramberger, M., Paulenka-Ivanovova, N., Smisek, M., Hanes, J., Stevens, E., Kovac, A., Sutovsky, S., Parrak, V., Koson, P., Prcina, M., Galba, J., . . . Zilka, N. (2021). ADAMANT: a placebo-controlled randomized phase 2 study of AADvac1, an active immunotherapy against pathological tau in Alzheimer's disease. *Nat Aging*, 1(6), 521-534. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00070-2>
- Novartis. (2019). *Novartis Q3 and 9M 2019 Condensed Interim Financial Report – Supplementary Data*. <https://www.novartis.com/sites/novartiscom/files/2019-10-interim-financial-report-en.pdf>
- Okuzono, Y., Sakuma, H., Miyakawa, S., Ifuku, M., Lee, J., Das, D., Banerjee, A., Zhao, Y., Yamamoto, K., Ando, T., & Sato, S. (2021). Reduced TREM2 activation in microglia of patients with Alzheimer's disease. *FEBS Open Bio*, 11(11), 3063-3080.  
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.13300>
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhatsky, A., & Rodriguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58(7), 831-838. <https://doi.org/10.1002/glia.20967>
- Ortega-Martínez, S. (2017). Adult Hippocampal Neurogenesis and Memory. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 6(1) 360-379.
- Parsons, C. G., Ruitenber, M., Freitag, C. E., Sroka-Saidi, K., Russ, H., & Rammes, G. (2015). MRZ-99030 - A novel modulator of Abeta aggregation: I - Mechanism of action (MoA) underlying the potential neuroprotective treatment of Alzheimer's disease, glaucoma and age-related macular degeneration (AMD). *Neuropharmacology*, 92, 158-169.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.038>
- Pawelec, P., Ziemka-Nalecz, M., Sybecka, J., & Zalewska, T. (2020). The Impact of the CX3CL1/CX3CR1 Axis in Neurological Disorders. *Cells*, 9(10).  
<https://doi.org/10.3390/cells9102277>
- Perea, J. R., Lleo, A., Alcolea, D., Fortea, J., Avila, J., & Bolos, M. (2018). Decreased CX3CL1 Levels in the Cerebrospinal Fluid of Patients With Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 12, 609. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00609>
- Perry, V. H., & Teeling, J. (2013). Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic

- neurodegeneration. *Semin Immunopathol*, 35(5), 601-612.  
<https://doi.org/10.1007/s00281-013-0382-8>
- Piaceri, I., Nacmias, B., & Sorbi, S. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*, 5(1), 167-177. <https://doi.org/10.2741/e605>
- Pike, C. J., Overman, M. J., & Cotman, C. W. (1995). Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem*, 270(41), 23895-23898.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.41.23895>
- Popov, V. I., & Stewart, M. G. (2009). Complexity of contacts between synaptic boutons and dendritic spines in adult rat hippocampus: three-dimensional reconstructions from serial ultrathin sections in vivo. *Synapse*, 63(5), 369-377.  
<https://doi.org/10.1002/syn.20613>
- Pottier, C., Hannequin, D., Coutant, S., Rovelet-Lecrux, A., Wallon, D., Rousseau, S., Legallic, S., Paquet, C., Bombois, S., Pariente, J., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Croisile, B., Etcharry-Bouyx, F., Berr, C., Dartigues, J. F., Amouyel, P., Dauchel, H., Boutoleau-Bretonniere, C., . . . Collaborators, P. G. (2012). High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*, 17(9), 875-879. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.15>
- Purves D. Augustine GJ. Fitzpatrick D. et al. editors. (2001a). *Excitatory and Inhibitory Postsynaptic Potentials*. Retrieved August 29, 2023, from  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11117/>
- Purves D. Augustine GJ. Fitzpatrick D. et al. editors. (2001b). *Long-Term Synaptic Potentiation* Retrieved June 27, 2023, from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10878/>
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fa, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci*, 28(53), 14537-14545.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008>
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(12), 4003-4008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307446101>
- Rajan, K. B., Weuve, J., Barnes, L. L., McAninch, E. A., Wilson, R. S., & Evans, D. A. (2021). Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020-2060). *Alzheimers Dement*, 17(12), 1966-1975.  
<https://doi.org/10.1002/alz.12362>
- 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, E. M., Bywalez, W., Egger, V., & Parsons, C. G. (2015). 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*, 92, 170-182.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.037>
- Rammes, G., & Parsons, C. G. (2020). The Abeta aggregation modulator MRZ-99030 prevents and even reverses synaptotoxic effects of Abeta(1-42) on LTP even following serial dilution to a 500:1 stoichiometric excess of Abeta(1-42), suggesting a beneficial prion-like seeding mechanism. *Neuropharmacology*, 179, 108267.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108267>
- Rammes, G., Seeser, F., Mattusch, K., Zhu, K., Haas, L., Kummer, M., Heneka, M., Herms, J., & Parsons, C. G. (2018). The NMDA receptor antagonist Radiprodil reverses the synaptotoxic effects of different amyloid-beta (Abeta) species on long-term potentiation (LTP). *Neuropharmacology*, 140, 184-192.

- Ramon y Cajal S. (1909). *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertebres*.
- Ramon y Cajal S. (1954). Neuron Theory or Reticular Theory? Objective Evidence of the Anatomical Unity of the Nerve Cells. *Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Madrid, Spain*.
- Ramos-Rodriguez, J. J., Pacheco-Herrero, M., Thyssen, D., Murillo-Carretero, M. I., Berrocoso, E., Spires-Jones, T. L., Bacskai, B. J., & Garcia-Alloza, M. (2013). Rapid beta-amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72(4), 272-285.  
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318288a8dd>
- Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P., & Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(9), 6364-6369.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.092136199>
- Reddy, P. H., & Beal, M. F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*, 14(2), 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.002>
- Ricciarelli, R., & Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol*, 15(6), 926-935.  
<https://doi.org/10.2174/1570159X15666170116143743>
- Riemann & von Ahsen et al. in preparation.
- Risher, W. C., Ustunkaya, T., Singh Alvarado, J., & Eroglu, C. (2014). Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. *PLoS One*, 9(9), e107591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107591>
- Rothman, K. J. (1990). No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology*, 1(1), 43-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081237>
- Rountree, S. D., Atri, A., Lopez, O. L., & Doody, R. S. (2013). Effectiveness of antidementia drugs in delaying Alzheimer's disease progression. *Alzheimers Dement*, 9(3), 338-345.  
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.01.002>
- Russ, H., Danysz, W., Parsons, C.G., 2013. (2016). Interval Therapy for the Treatment of Loss of Eyesight in Humans with Glaucoma and Other Degenerative Eye Diseases. In M. P. G. C. K. W. P. W. (A3) (Ed.).
- Russ, H., Mazzanti, M., Parsons, C., Riemann, K., Gebauer, A., & Rammes, G. (2022). The Small Molecule GAL-201 Efficiently Detoxifies Soluble Amyloid beta Oligomers: New Approach towards Oral Disease-Modifying Treatment of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105794>
- Russo, C., Violani, E., Salis, S., Venezia, V., Dolcini, V., Damonte, G., Benatti, U., D'Arrigo, C., Patrone, E., Carlo, P., & Schettini, G. (2002). Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J Neurochem*, 82(6), 1480-1489.
- Saceleanu, V. M., Covache-Busuioc, R. A., Costin, H. P., Glavan, L. A., & Ciurea, A. V. (2022). An Important Step in Neuroscience: Camillo Golgi and His Discoveries. *Cells*, 11(24).  
<https://doi.org/10.3390/cells11244112>
- Saido, T. C., Iwatsubo, T., Mann, D. M., Shimada, H., Ihara, Y., & Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron*, 14(2), 457-466.
- Salehi, A., Ashford, J. W., & Mufson, E. J. (2016). The Link between Alzheimer's Disease and Down Syndrome. A Historical Perspective. *Curr Alzheimer Res*, 13(1), 2-6.  
<https://doi.org/10.2174/1567205012999151021102914>

- Salloway, S., Sperling, R., Keren, R., Porsteinsson, A. P., van Dyck, C. H., Tariot, P. N., Gilman, S., Arnold, D., Abushakra, S., Hernandez, C., Crans, G., Liang, E., Quinn, G., Bairu, M., Pastrak, A., Cedarbaum, J. M., & Investigators, E. A. (2011). A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 77(13), 1253-1262. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182309fa5>
- Satoh, J., Kino, Y., Asahina, N., Takitani, M., Miyoshi, J., Ishida, T., & Saito, Y. (2016). TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology*, 36(1), 39-49. <https://doi.org/10.1111/neup.12235>
- Schartmann, E., Schemmert, S., Niemietz, N., Honold, D., Ziehm, T., Tusche, M., Elfgen, A., Gering, I., Brener, O., Shah, N. J., Langen, K. J., Kutzsche, J., Willbold, D., & Willuweit, A. (2018). In Vitro Potency and Preclinical Pharmacokinetic Comparison of All-D-Enantiomeric Peptides Developed for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 64(3), 859-873. <https://doi.org/10.3233/JAD-180165>
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., & Demuth, H. U. (2004). Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett*, 563(1-3), 191-196.
- Schlepckow, K., Monroe, K. M., Kleinberger, G., Cantuti-Castelvetri, L., Parhizkar, S., Xia, D., Willem, M., Werner, G., Pettkus, N., Brunner, B., Sulzen, A., Nuscher, B., Hampel, H., Xiang, X., Feederle, R., Tahirovic, S., Park, J. I., Prorok, R., Mahon, C., . . . Haass, C. (2020). Enhancing protective microglial activities with a dual function TREM2 antibody to the stalk region. *EMBO Mol Med*, 12(4), e11227. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911227>
- Scholl, M., Carter, S. F., Westman, E., Rodriguez-Vieitez, E., Almkvist, O., Thordardottir, S., Wall, A., Graff, C., Langstrom, B., & Nordberg, A. (2015). Early astrocytosis in autosomal dominant Alzheimer's disease measured in vivo by multi-tracer positron emission tomography. *Sci Rep*, 5, 16404. <https://doi.org/10.1038/srep16404>
- Schramm, C., Charbonnier, C., Zarea, A., Lacour, M., Wallon, D., collaborators, C., Boland, A., Deleuze, J. F., Olaso, R., consortium, A., Alarcon, F., Campion, D., Nuel, G., & Nicolas, G. (2022). Penetrance estimation of Alzheimer disease in SORL1 loss-of-function variant carriers using a family-based strategy and stratification by APOE genotypes. *Genome Med*, 14(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01070-6>
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8(6), 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Serrano-Pozo, A., Gomez-Isla, T., Growdon, J. H., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2013). A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *Am J Pathol*, 182(6), 2332-2344. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.031>
- Shaftel, S. S., Griffin, W. S., & O'Banion, M. K. (2008). The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation*, 5, 7. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-5-7>
- Sheppard, O., & Coleman, M. (2020). Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis - Figure 2. In X. Huang (Ed.), *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. <https://doi.org/10.36255/exonpublications.alzheimersdisease.2020.ch1>
- Sims, R., van der Lee, S. J., Naj, A. C., Bellenguez, C., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Kunkle, B. W., Boland, A., Raybould, R., Bis, J. C., Martin, E. R., Grenier-Boley, B., Heilmann-Heimbach, S., Chouraki, V., Kuzma, A. B., Sleegers, K., Vronskaya, M., Ruiz, A., Graham, R. R., . . . Schellenberg, G. D. (2017). Rare coding variants in PLCG2, ABI3,

- and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 49(9), 1373-1384. <https://doi.org/10.1038/ng.3916>
- Singh, A., Allen, D., Fracassi, A., Tumurbaatar, B., Natarajan, C., Scaduto, P., Woltjer, R., Kaye, R., Limon, A., Krishnan, B., & Taglialetela, G. (2020). Functional Integrity of Synapses in the Central Nervous System of Cognitively Intact Individuals with High Alzheimer's Disease Neuropathology Is Associated with Absence of Synaptic Tau Oligomers. *J Alzheimers Dis*, 78(4), 1661-1678. <https://doi.org/10.3233/JAD-200716>
- Streit, W. J., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*, 1(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-14>
- Su, S., Shi, L., Zheng, Y., Sun, Y., Huang, X., Zhang, A., Que, J., Sun, X., Shi, J., Bao, Y., Deng, J., & Lu, L. (2022). Leisure Activities and the Risk of Dementia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neurology*, 99(15), e1651-1663. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200929>
- Takahashi, K., Rochford, C. D., & Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med*, 201(4), 647-657. <https://doi.org/10.1084/jem.20041611>
- Talantova, M., Sanz-Blasco, S., Zhang, X., Xia, P., Akhtar, M. W., Okamoto, S., Dziejczapolski, G., Nakamura, T., Cao, G., Pratt, A. E., Kang, Y. J., Tu, S., Molokanova, E., McKercher, S. R., Hires, S. A., Sason, H., Stouffer, D. G., Buczynski, M. W., Solomon, J. P., . . . Lipton, S. A. (2013). Abeta induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(27), E2518-2527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306832110>
- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Vasciaveo, V., & Tabaton, M. (2021). Oxidative Stress and Beta Amyloid in Alzheimer's Disease. Which Comes First: The Chicken or the Egg? *Antioxidants (Basel)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/antiox10091479>
- Teplow, D. B. (2006). Preparation of amyloid beta-protein for structural and functional studies. *Methods Enzymol*, 413, 20-33. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)13002-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)13002-5)
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, 30(4), 572-580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Tolar, M., Hey, J. A., Power, A., & Abushakra, S. (2024). The Single Toxin Origin of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders Enables Targeted Approach to Treatment and Prevention. *Int J Mol Sci*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/ijms25052727>
- Tomiyama, T., Matsuyama, S., Iso, H., Umeda, T., Takuma, H., Ohnishi, K., Ishibashi, K., Teraoka, R., Sakama, N., Yamashita, T., Nishitsuji, K., Ito, K., Shimada, H., Lambert, M. P., Klein, W. L., & Mori, H. (2010). A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J Neurosci*, 30(14), 4845-4856. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5825-09.2010>
- Trepel, M. (2022a). *Neuroanatomie - Struktur und Funktion* (Vol. 8). Elsevier GmbH, Deutschland, S. 218-219.
- Trepel, M. (2022b). *Neuroanatomie - Struktur und Funktion* (Vol. 8). Elsevier GmbH, Deutschland, S.220-221.

- Ulland, T. K., & Colonna, M. (2018). TREM2 - a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 14(11), 667-675. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0072-1>
- van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich, L., Katayama, S., Sabbagh, M., Vellas, B., Watson, D., Dhadda, S., Irizarry, M., Kramer, L. D., & Iwatsubo, T. (2023). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, 388(1), 9-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>
- van Groen, T., Schemmert, S., Brener, O., Gremer, L., Ziehm, T., Tusche, M., Nagel-Steger, L., Kadish, I., Schartmann, E., Elfgen, A., Jurgens, D., Willuweit, A., Kutzsche, J., & Willbold, D. (2017). The Abeta oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology. *Sci Rep*, 7(1), 16275. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16565-1>
- vaxxinity. (2023, January ). 41st Annual J.P. Morgan Healthcare Conference, Slide 10. <https://ir.vaxxinity.com/static-files/aa2d37c2-e159-4323-8c9a-6b86d885bfe4>
- Vaz, M., & Silvestre, S. (2020). Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *Eur J Pharmacol*, 887, 173554. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173554>
- Vlad, S. C., Miller, D. R., Kowall, N. W., & Felson, D. T. (2008). Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*, 70(19), 1672-1677. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000311269.57716.63>
- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J., & Teplow, D. B. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem*, 274(36), 25945-25952. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25945>
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., & Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), 535-539. <https://doi.org/10.1038/416535a>
- Wang, Y., Ulland, T. K., Ulrich, J. D., Song, W., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., Yuan, P., Mahan, T. E., Shi, Y., Gilfillan, S., Cella, M., Grutzendler, J., DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., & Colonna, M. (2016). TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med*, 213(5), 667-675. <https://doi.org/10.1084/jem.20151948>
- Westerman, M. A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Carlson, G. A., Younkin, S. G., & Ashe, K. H. (2002). The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 22(5), 1858-1867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-05-01858.2002>
- Witnam, J. L., Portelius, E., Zetterberg, H., Gustavsson, M. K., Schilling, S., Koch, B., Demuth, H. U., Blennow, K., Wirths, O., & Bayer, T. A. (2012). Pyroglutamate amyloid beta (Aβ) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 287(11), 8154-8162.
- Wosiski-Kuhn, M., & Stranahan, A. M. (2012). Transient increases in dendritic spine density contribute to dentate gyrus long-term potentiation. *Synapse*, 66(7), 661-664. <https://doi.org/10.1002/syn.21545>
- Xu, T., Yu, X., Perlik, A. J., Tobin, W. F., Zweig, J. A., Tennant, K., Jones, T., & Zuo, Y. (2009). Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*, 462(7275), 915-919. <https://doi.org/10.1038/nature08389>

- Yang, Y., Wang, X. B., Frerking, M., & Zhou, Q. (2008). Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *J Neurosci*, *28*(22), 5740-5751. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3998-07.2008>
- Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2020). Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis*, *12*, 1179573520907397. <https://doi.org/10.1177/1179573520907397>
- Younkin, S. G. (1998). The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris*, *92*(3-4), 289-292. [https://doi.org/10.1016/s0928-4257\(98\)80035-1](https://doi.org/10.1016/s0928-4257(98)80035-1)
- Zhang, G., Wang, Z., Hu, H., Zhao, M., & Sun, L. (2021). Microglia in Alzheimer's Disease: A Target for Therapeutic Intervention. *Front Cell Neurosci*, *15*, 749587. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.749587>
- Zhang, H., Weng, S. J., & Hutsler, J. J. (2003). Does microwaving enhance the Golgi methods? A quantitative analysis of disparate staining patterns in the cerebral cortex. *J Neurosci Methods*, *124*(2), 145-155. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(03\)00002-5](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(03)00002-5)
- Zheng, H., & Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*, *1*, 5. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-5>
- Ziv, N. E., & Smith, S. J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, *17*(1), 91-102. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80283-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80283-4)

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Betreuer, Herrn Apl. Prof. Dr. Gerhard Rammes, der diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat und mir jederzeit mit seinem Rat und seiner fachlichen Expertise zur Seite gestanden hat. Ich danke auch Hermann Russ, M.D. PhD. und der gesamten Firma Galimedix Therapeutics, Inc., ohne deren Kooperation diese Arbeit ebenfalls nicht entstanden wäre. An dieser Stelle möchte ich mich außerdem bei Herrn Professor Ehud Gazit bedanken, dem Entwickler dieses großartigen Moleküls, der sich sogar die Zeit genommen hat mir meine Fragen zu beantworten. Des Weiteren bedanke ich mich bei PD Dr. med. Cornelius Schüle und PD Dr. med. Thomas Köglspenger dafür, dass sie sich bereit erklärt haben diese Arbeit mitzubetreuen.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Schneider und der gesamten Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Klinikums rechts der Isar (TU München) für die Unterstützung dieser Arbeit. An dieser Stelle möchte ich mich besonders bedanken bei PD Dr. Martin Schlegel, ohne dessen Hilfe die FACS-Analyse nicht möglich gewesen wäre sowie bei Dr. Matthias Kreuzer, der mir mit seinem statistischen Fachwissen und seiner Hilfe enorm weitergeholfen hat. Zudem danke ich der Arbeitsgruppe Experimentelle Neuropharmakologie für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Mein besonderer Dank gilt dabei Markus Ballmann und Josefina Vogelgsang, ohne deren Unterstützung ich an so manchen Tagen verzweifelt wäre. Danke, dass ihr mich immer wieder motiviert habt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt. Außerdem bedanke ich mich bei Xenia Puig-Bosch, die mir ihre LTP-Daten für GAL-201/A $\beta$ 1-42SD5 (20 min) und GAL-201/A $\beta$ pE3SD5 (20 min) zur Verfügung gestellt hat und Andreas Blaschke, der die Aufbereitung von A $\beta$  übernommen hat.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir Studium und Promotion ermöglicht hat. Bei meinem Freund Dr. med. Nikolaus Wimmer, der mir in jeder Lage geholfen und mich motiviert hat. Bei Dr. med. univ. Benjamin Reumann für den technischen Support und Dr. med. Gerhard Wimmer fürs Korrekturlesen, sowie bei allen meinen Freunden für ihr Verständnis und die stetige Unterstützung.

## 9 Anhang

### 9.1 Verwendete Chemikalien

**Tabelle 2: Zusammensetzung Präparations-Ringer und aCSF**

Präparations-Ringer	aCSF (auch Mess-Ringer genannt)	CAS (alle Sigma Aldrich)
125 mM NaCl	125 mM NaCl	7647145
2,5 mM KCl	2,5 mM KCl	7447407
1,25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10049215
25 mM D-Glucose	25 mM D-Glucose	14431437
25 mM NaHCO <sub>3</sub>	25 mM NaHCO <sub>3</sub>	144558
6 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM MgCl <sub>2</sub>	7791186
0,25 mM CaCl <sub>2</sub>	2 mM CaCl <sub>2</sub>	10035048
<i>pH 7,3</i>	<i>pH 7,3</i>	

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung von Präparations- und Mess-Ringer-Lösung (inklusive der CAS-Nummern), die zur Präparation der Schnitte, beziehungsweise für die LTP-Messungen und die Herstellung der seriellen Verdünnung verwendet wurden (siehe 3.1.2).

**Tabelle 3: Verwendete A $\beta$ -Peptide und bei der A $\beta$ -Aufbereitung genutzte Chemikalien**

Chemikalien	Firma	Charge oder CAS
Amyloid $\beta$ -Protein (1-42) hydrochloride salt	Bachem	Charge: 1000039223
Amyloid $\beta$ -Protein (1-40) hydrochloride salt	Bachem	Charge: 1066313
(Pyr <sup>3</sup> )-Amyloid $\beta$ -Protein (1-42) ammonium salt	Bachem	Charge: 1061309
Peroxyinitrit	Cayman	CAS: 14042-01-4
NaOH	Sigma Aldrich	CAS: 1310-73-2
Hexafluoroisopropanol 100 %	Sigma Aldrich	CAS: 920-66-1
DMSO 99,9 %	Sigma Aldrich	CAS: 67-68-5

Tabelle 3 zeigt die verwendeten A $\beta$ -Peptide sowie die bei ihrer Aufbereitung genutzten Chemikalien, inklusive ihrer Chargen- beziehungsweise CAS-Nummer (siehe 3.1.2.3).

**Tabelle 4: Informationen über GAL-201, inklusive der verwendeten Charge**

IUPAC Nomenklatur	(2R)-2-amino-N-(1-carbamomyl-1-methlyethyl)-3-(1H-indol-3-yl)propanamide
Summenformel	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Molekulargewicht	288.34 g/mol
Hersteller	Soneas Research Ltd. in Budapest, Ungarn
Verwendete Charge	Fumarat-Salz mit 99,4 % Reinheit; Analysenzertifikat: # QAF-10175 v1 vom 3. Dezember 2018

Tabelle 4 zeigt die schon von Russ et al. (2022) publizierten Informationen über GAL-201 inklusive der verwendeten Charge.

**Tabelle 5: Übersicht über die im sliceGolgi Kit von Bioenno Tech LLC enthaltenen Lösungen**

A1	Puffer (Stamm-)Lösung mit Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> und Ca <sup>2+</sup> pH 7.4 ± 0.1
A2	Formaldehyd-Stammlösung
A3	Glutaraldehyd-Stammlösung
B	Stammlösung für die Imprägnation (Kaliumdichromat, Kaliumchromat, Quecksilberchlorid jeweils < 1 %)
C	Färbelösung (CAVE: enthält zusätzlich Ammoniumhydroxid)
D	Post-Färbelösung

Tabelle 5 dient dem Überblick über die im sliceGolgi Kit von Bioenno Tech LLC enthaltenen Lösungen. Lösung A1 bis A3 werden zusammen mit dH<sub>2</sub>O zu einer Fixationslösung gemischt, Lösung B stellt eine 5x Stammlösung dar, welche 1:4 mit dH<sub>2</sub>O vor Gebrauch verdünnt wird und Lösung C und D sind gebrauchsfertig (siehe 3.2.2.1).

**Tabelle 6: Für die Golgi-Färbung selbst herzustellende Lösungen**

0,1 M PB-Puffer; pH 7,4	für 1000 ml	0,01 M PBS-T; pH 7,4	für 1000 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma Aldrich, CAS: 7558794)	2,62 g	NaCl (Sigma Aldrich, CAS: 7647145)	8,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma Aldrich, CAS: 782856)	21,73 g	<b>0,1 M PB-Puffer</b>	100 ml
ad dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml	<b>Triton X-100</b> (Sigma Aldrich, CAS: 9002931)	3 ml
		ad dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Tabelle 6 zeigt die, für die Golgi-Färbung zusätzlich zu den, im Kit enthaltenen Lösungen, selbst herzustellenden Lösungen. Es wird ein 0,1 M PB-Puffer für die Lagerung sowie ein 0,01 M PBS-T-Puffer für das Waschen der Schnitte benötigt (siehe 3.2.2.1).

**Tabelle 7: Für die FACS-Analyse verwendete Lösungen und Antikörper**

<b>Selbst herzustellen:</b>	
Blockungs-Lösung	<p>Pro Probe:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 49 µl PermWash</li> <li>• 1 µl TrueStain FcX™ (anti-mouse CD16/32, BioLegend, Cat: 101320)</li> </ul> <p>Kühl lagern &amp; immer frisch!!!</p>
FACS-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 ml EDTA 0,5 M (Sigma Aldrich, CAS: 60004)</li> <li>• 0,5 g Natriumazid (Merck, Ref: 8.22335.0100)</li> <li>• 5 g BSA - bovines Serumalbumin (Roth, CAS: 90604298)</li> <li>• Auf 500 ml mit HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution (CAT: P0434500) auffüllen</li> </ul>
FACS-Fixations-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 % FACS-Puffer</li> <li>• 50 % PFA 4 % (Merck, CAS: 30525894)</li> </ul>
PBS-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>10x Puffer:</b> 95,50 g/L (Herstellerangabe), mit dH<sub>2</sub>O auffüllen (PBS buffer (10x Dulbecco's) - Powder, PanReac - AppliChem, A0965, 9050)</li> <li>• <b>1x Puffer:</b> für 1L: 100 ml PBS 10x mit 900 ml dH<sub>2</sub>O auffüllen</li> </ul>
Aufschlusslösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,0292 g EDTA (Sigma Aldrich, CAS: 60004)</li> <li>• 0,0302 g L-Lysin (Sigma Aldrich, CAS: 52904)</li> <li>• Auf 50ml mit PBS 1x auffüllen</li> </ul>
Freezing-Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 40 ml DMEM (1x) + GlutaMax™ – I (gibco, Ref: 61965-026) steril abfüllen</li> <li>• 10 % DMSO, entsprechend 4 ml (Sigma Aldrich, CAS: 67685)</li> </ul>
<b>Fertige Lösungen:</b>	
FixPerm	BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, CAT: 554722, FixPerm gebrauchsfertig)
PermWash	BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences, CAT: 554722, PermWash 1:10 Verdünnung mit dH <sub>2</sub> O)
FACSFlow	BD FACSFlow™ - Sheath Fluid (BD Biosciences, CAT: 342003)
<b>Verwendete Antikörper:</b>	
CD45	Brilliant Violet 510™ anti-mouse CD45, BioLegend, CAT: 103137
CD11b	Brilliant Violet 785™ anti-mouse/human CD11b, BioLegend,

	CAT: 101243
F4/80	PerCP/Cyanine5.5 anti-mouse F4/80, BioLegend, CAT: 123127
TMEM119	Anti-Mo, TMEM119 PE_Cyanine7, Invitrogen, CAT: 25-6119-80
P2RY12	APC anti-P2RY12, BioLegend, CAT: 848005
CD163	Anti-Mo CD163 SuperBright™ 702, Invitrogen, CAT: 67-1631-82
CD80	Brilliant Violet 605™ anti-mouse CD80, BioLegend, CAT:104729
CX3CR1	Brilliant Violet 421™ anti-mouse CX3CR1, BioLegend, CAT: 149023
TREM-2	TREM-2 Monoclonal Antibody FITC, Invitrogen, CAT: MA5-28223
IL-1β	IL-1Beta Rabbit anti-Mouse Polyclonal (aa118-269) (APC, Cy7) Antibody, LS Bio, CAT: LS -C730762-100
GFAP	Mouse anti-GFAP (SFM248) [DyLight 594], Novus Biologicals, CAT: NBP2-34401DL594
ALDH1L1	ALDH1L1 Antibody (2E7) [DyLight 680], Novus Biologicals, CAT: NBP2-50033FR
S100B	Mouse anti-S100B (4C4_9+S100B+1012) [PE], Novus Biologicals, CAT: NBP2-54559PE

Tabelle 7 beinhaltet alle Lösungen, die für die FACS-Analyse gebraucht wurden, inklusive der Zusammensetzung bei den selbst herzustellenden Lösungen sowie der Katalogbeziehungswise CAS-Nummern. Außerdem sind alle verwendeten Antikörper mit Katalognummer gelistet.

## 9.2 Herstellung von 3NTyr10A $\beta$

Das Lösen von A $\beta$  erfolgt bei der Nitrierung in Anlehnung an (Teplow, 2006) mit NaOH, um eine frühzeitige Aggregation der A $\beta$ -Monomere zu vermeiden.

### **Material:**

A $\beta$ <sub>1-42</sub> 1 mg (Amyloid  $\beta$ -Protein (1-42) hydrochloride salt, Bachem)

Pi-Buffer, 100 mM pH 7.3 (für Zusammensetzung siehe Protokollende)

Peroxyinitrit, Cayman, 110 mM in 0.3 M NaOH

Nanosep Columns, cut off 3000 Da

### **Lösen von A $\beta$ <sub>1-42</sub>:**

1. 40 mM NaOH wird zu A $\beta$ <sub>1-42</sub> hinzugefügt und vorsichtig gemischt (Zielkonzentration 4mg/ml)
2. Lagerung auf Trockeneis

### **Nitrierung:**

1. Durch Verdünnung mit Pi-Puffer 2 x 1000  $\mu$ l 50  $\mu$ M A $\beta$  Lösung herstellen
2. 22.7  $\mu$ l einer 110 mM Peroxyinitritlösung hinzufügen und für eine Minute vortexen
3. In 2 x 500  $\mu$ l aufteilen und in Nanosep Columns 20 Minuten bei 14000xg spinnen
4. 3x mit 500  $\mu$ l Pi-Puffer waschen
5. In 300  $\mu$ l Pi-Puffer resuspendieren und in ein neues Gefäß überführen
6. Auf 500  $\mu$ l Pi-Puffer auffüllen
7. Sofort in flüssigem Stickstoff oder Trockeneis gefrieren

### **Pi-Puffer nach Sörrenson:**

- 0.2 M monobasische Stammlösung:  
1.56 g Natriumphosphat-monobasisches Dihydrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, MW 155.99 g/mol) in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen
- 0.2 M dibasische Stammlösung:  
2.682 g Natriumphosphat-dibasisches Heptahydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MW 268.07 g/mol) in 50 ml H<sub>2</sub>O lösen
- 0,1 M Natriumphosphat-Puffer  
Für 600 ml 0.1 M Natriumphosphat-Puffer, die folgenden Mengen, einer jeden Stammlösung kombinieren und auf 600 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

*Monobasische Stammlösung (ml):* 280, 5 oder 276 (pH 5,7 oder 5,8)

*Dibasische Stammlösung (ml):* 19,5 oder 24 (pH 5,7 oder 5,8)

### 9.3 Vorveröffentlichungen

- Russ, H., Mazzanti, M., Parsons, C., Riemann, K., Gebauer, A., & Rammes, G. (2022). The Small Molecule GAL-201 Efficiently Detoxifies Soluble Amyloid beta Oligomers: New Approach towards Oral Disease-Modifying Treatment of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105794>
- Riemann & von Ahsen et al. in preparation

## 9.4 Eidesstattliche Erklärung



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



### Eidesstattliche Versicherung

Riemann, Katrin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Einfluss des A $\beta$ -Aggregations-Modulators GAL-201  
auf neurotoxische Effekte unterschiedlicher Amyloid- $\beta$ -Subspezies –  
elektrophysiologische und molekularbiologische Betrachtung**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.07.24

Ort, Datum

Katrin Riemann

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Eidesstattliche Versicherung Humanbiologie

Datum: 21.07.2024