

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Destabilisierung von Synapsen durch beta-Amyloid
in kultivierten Mausneuronen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Katharina Achtzehn

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinische Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Gottmann

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Müller

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Andreyeva, A; Nieweg, K; Horstmann, K*; Klapper, S; Müller-Schiffmann, A; Korth, C; Gottmann, K. C-terminal fragment of N-cadherin accelerates synapse destabilization by amyloid- β . Brain 2012; 135(7): 2140-5

* Katharina Achtzehn, geb. Horstmann

Zusammenfassung

Die molekularen Pathomechanismen der Alzheimerschen Demenz (AD) sind nicht vollständig geklärt. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang der funktionellen und strukturellen Beeinträchtigungen von Synapsen durch Amyloid β (A β) mit einer Störung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin.

Das Ziel dieser Arbeit war es, diesen Zusammenhang zu untersuchen. Dazu wurden primäre Zellkulturen aus kortikalen Mausneuronen angefertigt. An DIV 9 (*days in vitro*) wurde ein Medienwechsel mit 7PA2 konditioniertem Medium (KM) vorgenommen, welches zellulär sezernierte A β Peptide enthält. Nach mehreren Tagen Inkubation wurden durch immunocytochemische Färbung der dendritische Marker MAP2, Mikrotubuli-assoziiertes Protein, sowie der synaptische Marker VAMP2, vesikelassoziiertes Membranprotein, auch Synaptobrevin (Präsynapse) und das postsynaptische Dichte-Protein PSD95 (Postsynapse) dargestellt. Die quantitative Auswertung der VAMP2 *Puncta* ergab nach 3 Tagen Inkubation mit 7PA2 KM eine signifikante Abnahme der Dichte der VAMP2 *Puncta*, nach 4 Tagen zeigte sich zusätzlich eine signifikante Reduktion der Größe der VAMP2 *Puncta*. Die Gesamtfluoreszenz (Produkt aus Fläche und mittlerer Intensität der Fluoreszenz) der VAMP2 *Puncta* zeigte nach 3 Tagen eine signifikante Verminderung. Dies war nach 4 Tagen weiterhin als Tendenz, jedoch nicht statistisch signifikant zu beobachten. Die quantitative Auswertung der PSD95 *Puncta* ergab uneindeutige Effekte, sodass ein unspezifischer Einfluss des 7PA2 KM auf die PSD95 *Puncta* nicht ausgeschlossen werden konnte.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde den Zellkulturen zusätzlich zu 7PA2 KM das INP *blocking* Peptid zugegeben, welches die Funktion des Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin inhibiert. Die quantitative Auswertung der VAMP2 *Puncta* ergab unter diesen Bedingungen bereits nach 2 Tagen eine signifikante Reduktion sowohl der Dichte als auch der Größe der VAMP2 *Puncta*. Die quantitative Auswertung der PSD95 *Puncta* zeigte keine Effekte auf die Dichte und Gesamtfluoreszenz der *Puncta*. Es zeigte sich nach 2 Tagen eine signifikante Reduktion der Größe der PSD95 *Puncta*, welche aufgrund der unspezifischen Effekte der Vorversuche ebenfalls als unspezifischer Effekt einzuordnen ist.

Die beschriebenen Befunde geben einen starken Hinweis darauf, dass die Blockierung von N-Cadherin vermittelter synaptischer Adhäsion einen beschleunigenden Effekt auf die Synaptotoxizität von A β ausübt, was einen neuen Ansatz zur Klärung der synaptischen Pathomechanismen der AD darstellen könnte.

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid beta
AD	Alzheimer Demenz
ADAM10	<i>A Disintegrin and metalloproteinase domain- containing protein 10</i>
AICD	<i>APP intracellular domain</i> , auch ϵ CTF
Ala	Alanin
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
AP	Aktionspotential
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
APP-CTF83	C-terminales Transmembranfragment des APP nach enzymatischer Spaltung
A.U.	<i>Augmented units</i>
BACE	<i>Beta-site APP cleaving enzyme</i>
BME	<i>Basal medium eagle</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i>
CCD	Charge coupled device
CHO	<i>Chinese hamster ovary cell-line</i>
β CTF	C-terminales, die A β Sequenz enthaltendes APP- Fragment nach enzymatischer Spaltung
ϵCTF	C-terminales Fragment des APP, auch AICD
Cy3	Lichtfilter (Zeiss), Anregung 545/25nm
C99	APP-Fragment nach enzymatischer Spaltung, welches sezerniert wird; auch P3
DAPI	Lichtfilter (Zeiss), Anregung 356nm
DIV	<i>Days in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EC	<i>Extracellular domain</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPSC	<i>Excitatory postsynaptic current</i>
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
E(X)	<i>Embryonic day X</i>

FAD	Familiäre Alzheimer Demenz
FITC	Lichtfilter (Zeiss), Anregung 485/20nm
GABA	Gamma-amino-Buttersäure
GKAP	Guanylatkinase-assoziiertes Protein
HAV	Histamin, Alanin und Valin enthaltenes Motiv in der EC1 des N-Cadherins
INP(ISGQ)	Motiv in der EC1 des N-Cadherins, welches das HAV Motiv flankiert. Angriffstelle für das INP Peptid zur Blockierung der Adhäsion
IPSP	Inhibitorisches postsynaptisches Potential
KM	Konditioniertes Medium
Leu	Leucin
LTD	<i>Long term depression</i>
LTP	<i>Long term potentiation</i>
LV(RIRS)	Kontrollpeptid, enthält identische Aminosäuren wie INP, jedoch in veränderter Sequenz
MAGUK	Membran-assoziierte Guanylatkinase
MAP2	<i>Membrane associated protein 2</i>
mEPSC	<i>miniature excitatory postsynaptic current</i>
NB	Neurobasal-Medium
Ncad//CTF	C-terminales Fragment des N-Cadherins nach enzymatischer Spaltung
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NS21	Neuronal supplement 21
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PO	Poly-L-Ornithin
PS	Presenilin
PSD95	<i>Postsynaptic density protein 95</i>
PSF	<i>Point spread function</i>
P3	APP-Fragment nach enzymatischer Spaltung, welches sezerniert wird; auch C99
ROI	<i>Region of interest</i>
SAP	<i>Synapse associated protein</i>
SNAP25	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment-protein 25</i>

SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
Val	Valin
VAMP2	<i>Vesicle associated membrane protein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
3D	Dreidimensional
7PA2	APP-überexprimierende CHO Zellen mit V717F Mutation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Morbus Alzheimer.....	1
1.2. Pathologie: Amyloid β an der Synapse	2
1.3. Synapsen	3
1.3.1. Chemische Synapsen	3
1.3.2. Exzitatorische und inhibitorische Synapsen.....	5
1.3.3. Moleküle an Synapsen	5
1.4. Neuronale Zelladhäsionsmoleküle.....	7
1.4.1. Struktur und Verteilungsmuster von N-Cadherin an der Synapse	9
1.4.2. Funktionen an der Synapse	10
1.4.3. Prozessierung von N-Cadherin und Blockierung durch das INP Peptid	11
2. Materialien und Methoden	13
2.1. Zellkulturmedien	13
2.2. Immuncytochemie	15
2.3. Peptide.....	16
2.4. Zellkultur.....	16
2.4.1. Herstellung steriler PO-Coverslips	16
2.4.2. Präparation von Mäuseföten und Herstellung von primären kortikalen Neuronen.....	17
2.5. Medienwechsel	18
2.5.1. 7PA2 <i>Supernatant</i>	18
2.5.2. Immundepletion.....	19
2.5.3. Peptide	19
2.5.4. Kontrollmedium	20
2.6. Immunocytochemie	20
2.6.1. Was ist Fluoreszenz?.....	20
2.6.2. Immuncytochemische Färbung	21
2.7. Fluoreszenzimaging	22
2.7.1. Das Setup	22
2.7.2. Bildbearbeitung und Bildanalyse	22
2.8. Statistik.....	24
3. Ergebnisse	25

3.1. Auswirkung von Aβ Peptiden auf die Morphologie kultivierter neocortikaler Neurone	25
3.1.1. Immuncytochemische Färbung synaptischer Strukturen in kultivierten neocortikalen Neuronen	26
3.1.2. Quantitative Auswertung der immuncytochemischen Färbungen	33
3.2. Effekte von Aβ auf kultivierte neokortikale Neurone unter Blockierung des neuronalen Adhäsionsmoleküls N-Cadherin.....	46
3.2.1. Quantitative Auswertung der immuncytochemisch angefärbten synaptischen Strukturen	48
4. Diskussion.....	54
4.1. Vorteile primär kultivierter neokortikaler Neurone.....	54
4.2. Etablierung der immuncytochemischen Dreifachfärbung.....	55
4.3. Amyloid β	55
4.3.1. Aufbau und Stoffwechsel von A β	57
4.3.2. Molekulare Wirkungsweise von A β	58
4.4. Auswirkung von A β auf kultivierte neokortikale Neurone	59
4.4.1. Effekt von zellulär sezerniertem A β auf den präsynaptischen Marker VAMP2	60
4.4.2. Effekt von zellulär sezerniertem A β auf den postsynaptischen Marker PSD95	62
4.5. Auswirkung der Hemmung von N-Cadherin auf den A β -induzierten Effekt auf Synapsen	64
4.5.1. Auswirkung der Hemmung von N-Cadherin auf den Effekt von A β auf VAMP2 <i>Puncta</i>	66
4.5.2. Auswirkung der Hemmung von N-Cadherin auf den Effekt von A β auf PSD95	67
4.6. Schlussfolgerungen	68
5. Literaturverzeichnis.....	69

1. Einleitung

1.1. Morbus Alzheimer

Die Alzheimer-Krankheit wurde erstmals 1907 von Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907). Sie gehört zu den Demenzen und ist mit etwa zwei Dritteln der Betroffenen die häufigste Form (Leicht et al., 2011). Der Begriff der Demenz ist eine Zusammenfassung unspezifischer Symptome, bei denen der Übergang vom Physiologischen zum Pathologischen fließend ist, was die Diagnostik bedeutend erschwert. Charakteristisch für die Erkrankung ist der progrediente Verlust kognitiver Funktionen, dem eine langjährige präklinische Phase vorausgeht. Im frühen Stadium haben Betroffene meist Schwierigkeiten, neue Gedächtnisinhalte zu festigen. Üblicherweise fehlen zunächst jegliche Anzeichen von Beeinträchtigungen des Gehirns, die nicht das Gedächtnis betreffen. Erkrankte können meist über längere Zeit eine gute Fassade bewahren. In späten Erkrankungsstadien kommt es zu Apraxie, Agnosie und dem Verlust der normalen Körperfunktionen, wie dem Schlucken oder der Kontinenz. Im Endstadium benötigen die Betroffenen ein hohes Maß an pflegerischer Versorgung. Häufig sind sie bettlägerig und anfällig für Infektionen. Alzheimer endet stets tödlich.

Die Alzheimer Demenz betrifft vor allem die ältere Bevölkerung. Beachtet man die demographische Entwicklung der Industriestaaten - und zunehmend auch der Entwicklungsländer - so überrascht es nicht, dass 2010 schätzungsweise 36 Millionen Menschen weltweit davon betroffen waren. In Deutschland leben im Mittel etwa 650.000 Menschen mit dieser Erkrankung. Etwa 1% der 65- bis 69-jährigen leidet an einem Demenzsyndrom, bei den über 90-jährigen sind es rund 30%. Die Gesamtprävalenz bei den über 65-Jährigen beträgt 7% (Bickel, 2000).

Um ein demenzielles Syndrom zu diagnostizieren ist eine gründliche Eigen- und Fremdanamnese der Betroffenen nötig, ebenso wie ein neurologischer Status. Des Weiteren gibt es zahlreiche Screening-Tests für kognitive Störungen, wie zum Beispiel den Mini Mental Status Test, den DemTect und der Uhren-Test. Auch ein Geruchsidentifikationstest kann herangezogen

werden, da der Geruchssinn bei AD früh beeinträchtigt sein kann. Zusätzlich gibt es eine Reihe von Laborparametern, die auf eine Demenz vom Alzheimer Typ hinweisen können. Dazu gehören Veränderungen der Liquorparameter wie eine Verminderung von Amyloid β ($A\beta$) Peptiden und eine Zunahme von Phospho-Tau. Des Weiteren sollten Differenzialdiagnosen wie beispielsweise Bewusstseinsbeeinträchtigung, etwa durch ein Durchgangssyndrom, sowie depressive Störungen ausgeschlossen werden. Auch zerebrale Bildgebung kann in der Zusammenschau aller Befunde hilfreich sein. Sie kann Aufschluss auf Atrophiemuster geben und gegebenenfalls vaskuläre Veränderungen aufdecken. Dennoch lassen sich bisher insbesondere frühe Stadien einer Demenz häufig nicht sicher diagnostizieren.

Trotz exzessiver Forschung auf dem Gebiet der Demenzen ist die Frage nach den genauen Pathomechanismen nur unzureichend geklärt. Bisherige Therapieansätze sind rein symptomatisch und können weder die zugrunde liegende Pathologie beeinflussen noch das Fortschreiten der Erkrankung verhindern. Um bessere, zielgerichtete Therapieansätze zu erarbeiten ist es daher essentiell, die genauen Pathomechanismen weiter aufzudecken.

1.2. Pathologie: Amyloid β an der Synapse

Pathomorphologische Kennzeichen der Alzheimer Erkrankung sind postmortem identifizierbare neurofibrilläre *Tangles* und extrazelluläre senile Plaques. Hauptkomponente der Plaques ist das Peptid $A\beta$, das Spaltprodukt des Amyloid-Precursor-Proteins (APP). Es konnte belegt werden, dass $A\beta$ Oligomere zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Synapse führen. In Rattenhirnen zeigte die Applikation von $A\beta$ Oligomeren eine deutliche Hemmung der Langzeit-Potenzierung (LTP) im Hippocampus (Walsh et al., 2002; Shankar et al., 2008), einem Mechanismus des Lernens und der Gedächtnisbildung. Außerdem konnte eine Steigerung der Langzeit-Depression (LTD) beobachtet werden, was zu einer Reduktion in der Leistungsfähigkeit neuronaler Synapsen führt (Walsh et al., 2002; Shankar et al., 2008; Li et al., 2009). Es konnte wiederholt ein Verlust an Miniatur-EPSCs (excitatory postsynaptic currents) beobachtet werden, was einer reduzierten Freisetzung neuronaler Transmitter in den synaptischen Spalt entspricht (Chang et al.,

2006; Shankar et al., 2007; Nimmerich et al., 2008; Parodi et al., 2010). Letztendlich resultiert die Applikation von A β in einen Verlust synaptischer Strukturen (Walsh und Selkoe, 2007; Koffie et al., 2009). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind unklar, jedoch korreliert das Ausmaß kognitiver Beeinträchtigung von Alzheimer-Erkrankten wesentlich besser mit dem Verlust synaptischer Strukturen als mit der Ansammlung seniler Plaques (Terry et al., 1991).

1.3. Synapsen

Das menschliche Gehirn besteht aus 10^{11} Nervenzellen, eine Größenordnung, die in Metern der Entfernung zwischen Sonne und Erde entspricht. Die Kontaktstelle zweier Neurone ist die Synapse. Hier findet die Informationsübertragung statt. Etwa 100 Billionen Synapsen finden sich im Gehirn eines Erwachsenen. Man unterscheidet elektrische von chemischen Synapsen. Elektrische Synapsen sind über sogenannte *Gap junctions* verbunden, einer direkten Verbindung zwischen benachbarten Zellen in Form von Proteinen. Dieser Übertragungsweg ist besonders schnell und kann bidirektional verlaufen. Im Gegensatz dazu ist die Informationsübertragung an chemischen Synapsen langsamer und unidirektional. Das elektrische Signal muss präsynaptisch in ein chemisches Signal umgewandelt werden, postsynaptisch wieder in ein elektrisches Signal. Dies ermöglicht Modulationen in der Informationsverarbeitung, was wesentlich zur Komplexität des neuronalen Netzwerks beiträgt.

1.3.1. Chemische Synapsen

Eine chemische Synapse beinhaltet das präsynaptische Terminal, den synaptischen Spalt mit einer Weite von 20-40 nm und die postsynaptische Struktur. Im präsynaptischen Terminal befinden sich unter anderem die synaptischen Vesikel, welche Neurotransmitter enthalten, sowie zahlreiche Ionenkanäle und Adhäsionsmoleküle. Die Postsynapse ist besonders durch ihre sogenannte *postsynaptic density* (PSD) charakterisiert. Dies ist ein Netzwerk aus Proteinen, darunter Rezeptoren, Ionenkanäle und Adhäsionsmoleküle,

Einleitung

welches unter anderem durch das *postsynaptic density* Protein 95 (PSD95) zusammengehalten wird. Gelangt ein elektrisches Aktionspotential (AP) in die Präsynapse, erfolgt ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und über einen komplexen Prozess die Freisetzung von Neurotransmittern aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt (Südhof und Riza 2011; Augustine et al., 1987; Heuser et al., 1979). An der postsynaptischen Membran binden sie an spezifische Rezeptoren (siehe unten), was zu einer Depolarisation oder Hyperpolarisation der postsynaptischen Zelle führt. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung einer chemischen Synapse.

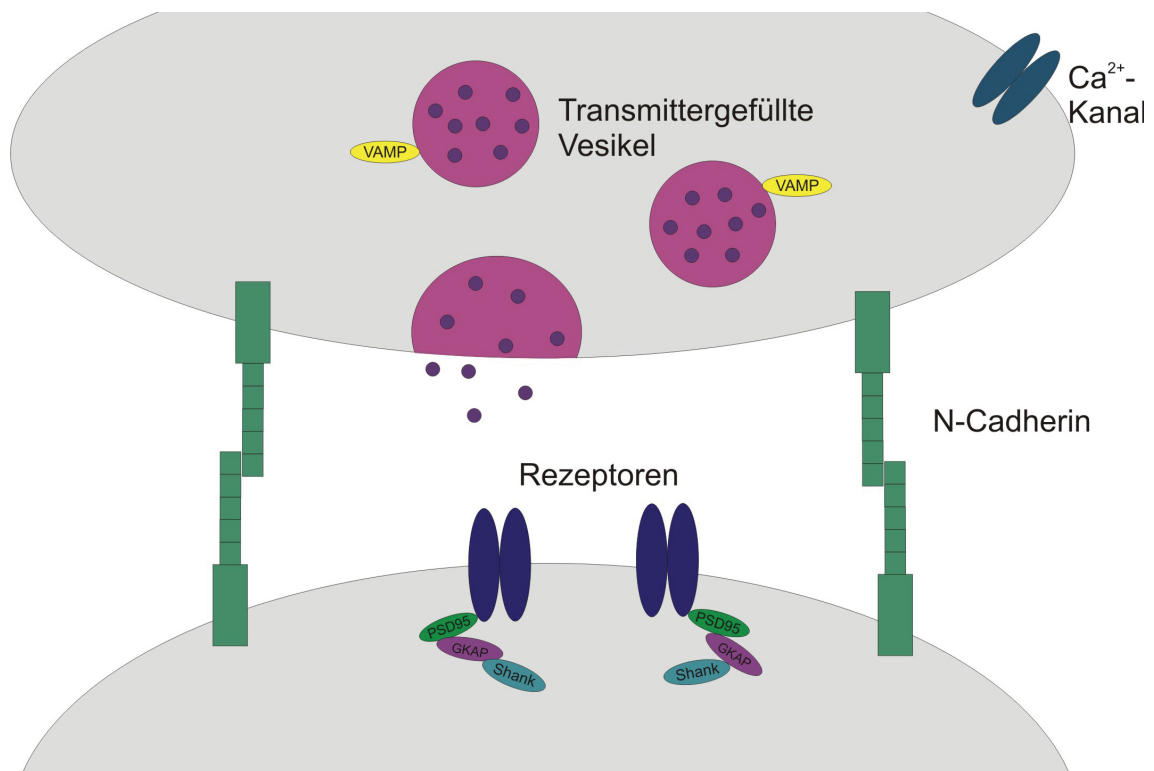


Abb. 1.1 Schematische Darstellung einer chemischen Synapse.

Infolge von Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle des präsynaptischen Terminals kommt es zur Fusion der Neurotransmitter-haltigen Vesikel mit der Zellmembran und zur Ausschüttung der Transmitter in den synaptischen Spalt. Wichtig für den Fusionsvorgang ist unter anderem das vesikelassoziierte Protein VAMP (*vesicle associated membrane protein*, Synaptobrevin). Durch Binden der Transmitter an ihre spezifischen Rezeptoren kommt es zu einem selektiven Einstrom von Kationen in die postsynaptische Struktur, wodurch diese depolarisiert wird. Charakteristische Merkmale der Postsynapse sind die postsynaptische Dichte 95 (PSD95) ebenso wie das Guanylatkinase-assoziierte Protein (GKAP) und das Protein Shank, welche als Gerüstproteine dienen. Stabilisiert wird die Synapse durch das neuronale Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin.

Modifiziert nach Li und Sheng, 2003.

1.3.2. Exzitatorische und inhibitorische Synapsen

Die Übertragung eines AP kann in der Postsynapse eine inhibitorische Wirkung in Form eines IPSP (inhibitorisches synaptisches Potential) oder eine exzitatorische Wirkung in Form eines EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Potential) erreichen. Ein IPSP, meist durch die Neurotransmitter GABA (gamma-amino-Buttersäure) oder Glyzin ausgelöst, wird durch einen Einstrom von Cl^- -Ionen in die Postsynapse hervorgerufen, wodurch diese hyperpolarisiert wird. Glutamat, der wichtigste exzitatorische Transmitter im ZNS, führt zu EPSPs, indem es unspezifische Kationenkanäle öffnet und so einen depolarisierenden Einstrom von Kationen in die Postsynapse erzeugt.

1.3.3. Moleküle an Synapsen

Um eine reibungslose Informationsverarbeitung im ZNS zu gewährleisten ist eine hochspezialisierte Zusammenarbeit verschiedener Moleküle notwendig. Auf eine für diese Arbeit relevante Auswahl an Molekülen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.3.3.1. Synaptischer Fusionsapparat, VAMP2

Damit ein AP an der Synapse übertragen werden kann, muss es zu einer Transmitterfreisetzung aus den synaptischen Vesikeln kommen. Dies geschieht an der sogenannten aktiven Zone, wo sich ein Teil der Vesikel im *readily releasable pool* befindet. Der Großteil der Vesikel befindet sich im Reservepool (Garner et al., 2000). Das einlaufende AP öffnet spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, was zu einer intrazellulären Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration führt. Wichtig für den Fusionsvorgang ist der SNARE-Komplex. Dieser besteht aus dem membranassoziierten SNAP-25 und Syntaxin, sowie dem vesikelassoziierten Protein VAMP2 (*vesicle associated membrane proteins*, Synaptobrevin) (Mochida, 2000; Brunger, 2000). Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration führt über das mit dem SNARE-Komplex assoziierte Protein Synaptotagmin zu einer Fusion der Vesikel mit der Zellmembran in der aktiven Zone und über eine Fusionspore zur Freisetzung der Transmitter (Geppert et al., 1994).

1.3.3.2. Postsynaptische Rezeptoren

Grundsätzlich werden 2 Arten von postsynaptischen Rezeptoren unterschieden: ionotrope und metabotrope Rezeptoren.

Bei den ionotropen Rezeptoren handelt es sich um Ionenkanäle, die sich nach dem Binden ihres spezifischen Transmitters öffnen. Ist der Ionenkanal selektiv für Kationen, so können diese in die postsynaptische Zelle einströmen und es kommt zu einer Depolarisation und somit zu einem EPSC. Bei einem für Anionen selektiven Kanal kommt es zu einer Hyperpolarisation, einem IPSC. Die wichtigsten ionotropen Rezeptoren sind der inhibitorische GABA_A-Rezeptor, der exzitatorische ionotrope Glutamat-Rezeptor sowie der exzitatorische nikotinische Acetylcholin-Rezeptor.

Metabotrope Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt. Durch Bindung eines Liganden kommt es zur Modulation des G-Proteins. Dies löst eine Signalkaskade aus, an deren Ende die Öffnung oder Modulation von Ionenkanälen steht (Gasic und Hollmann, 1992; Nakanishi, 1994).

1.3.3.3. Postsynaptisches Terminal, PSD95

Ein charakteristisches Merkmal eines postsynaptischen Terminals ist die *postsynaptic density* (PSD). Mit durchschnittlich 200-300 Molekülen sehr häufig darin vertreten ist das Protein PSD95 aus der Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinasen (MAGUK). Neben PSD95 gehören dazu PSD-93, SAP-102 (*synapse-associated protein*) und SAP-97. Der Familie der MAGUKs wird eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität zugesprochen. PSD95 ist ein Strukturprotein, welches zahlreiche Interaktionspartner besitzt. Dazu zählen NMDA-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und weitere Gerüstproteine. Somit spielt es eine wichtige Rolle für die molekulare Organisation der PSD (Chen et al., 2011). Wie genau die postsynaptische Architektur jedoch durch PSD95 beeinflusst wird, ist noch unklar.

1.3.3.4. Zytoskelett, MAP2

Die Zelle erhält ihre Form und ihre mechanischen Eigenschaften durch das Zytoskelett. Dies besteht aus Proteinfilamenten, welche grob in 3 Gruppen eingeteilt werden: Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Mikrotubuli sind zuständig für Transportvorgänge innerhalb der Zelle und die

Bewegung bzw. Befestigung der Organellen im Zytosol. Das mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP2) reguliert unter anderem die Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli. MAP2 gehört zu einer Familie von hitzestabilen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, zu der auch das Tau-Protein gehört. Gemeinsam ist den Proteinen dieser Familie die Mikrotubuli-bindende Domäne. MAP2 ist ein Phosphoprotein, dessen Phosphorylierungszustand durch neuronale Aktivität moduliert wird. Es spielt eine wichtige Rolle in Wachstum und Entwicklung von Dendriten (Lim und Halpain, 2000). Aufgrund seines ubiquitären Vorkommens in Dendriten eignet es sich besonders gut als dendritischer Marker (Stan et al., 2010).

1.4. Neuronale Zelladhäsionsmoleküle

Für die komplexe Funktion und Leistungsfähigkeit des Säuger-ZNS sind differenzierte neuronale Schaltkreise essentiell. Die Informationsübertragung zwischen 2 Neuronen findet an der Synapse statt. Ohne feste und dennoch dynamisch regulierbare interzelluläre Kontakte wäre eine effektive interzelluläre Kommunikation unmöglich. Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) sind Transmembranproteine, die in der Prä- und Postsynaptischen Membran exprimiert werden. Sie stellen durch eine Verbindung ihrer extrazellulären Domänen eine stabilisierende homo- beziehungsweise heterophile Verbindung zwischen Prä- und Postsynapse her, um eine spezifische Informationsübertragung zu gewährleisten. Dabei sind Neurone nicht willkürlich miteinander verbunden. Die Bildung von Synapsen unterliegt einem komplexen Erkennungsprozess. Auch dabei spielen CAMs eine wichtige Rolle, indem sie ihren angemessenen synaptischen Partner erkennen (Yamagata et al., 2002; Shen und Bargmann, 2003; Shen et al., 2004) und somit die Entstehung einer Synapse auslösen (Scheiffele et al., 2000; Biederer et al., 2002; Sytnyk et al., 2002; Fu et al., 2003; Washbourne et al., 2004). Der Vorgang der Synapsenbildung ist dynamisch, sodass die Formation von Synapsen keinesfalls starr und endgültig ist, sondern sich im ständigen Wandel befindet: Synaptische Verbindungen können sich neu formen und festigen, aber auch aufgelöst werden. Somit sind die CAMs beteiligt an Wachstum, Migration, Proliferation und Differenzierung von Neuronen, sowie an der Modulation

synaptischer Funktionen (Green et al., 1997; Kiryushko et al., 2004; Washbourne et al., 2004). Zu den CAMs zählen unter anderem Immunglobuline, Integrine, Selectine und Cadherine.

Cadherine sind kalziumabhängige homophile Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (Yoshida und Takeichi 1982, Gallin et al., 1983; Peyrieras et al. 1983). Zur Proteinfamilie der Cadherine gehören klassische Cadherine und Protocadherine (Shapiro und Colman, 1999; Angst et al., 2001). Das wichtigste im Säuger-ZNS exprimierte Cadherin ist das neuronale Cadherin (N-Cadherin). Wie auch die anderen Cadherine ist es charakterisiert durch die sich wiederholenden Sequenzmotive in seinem extrazellulären Anteil und seine Ca^{2+} -abhängigen adhäsiven Eigenschaften.

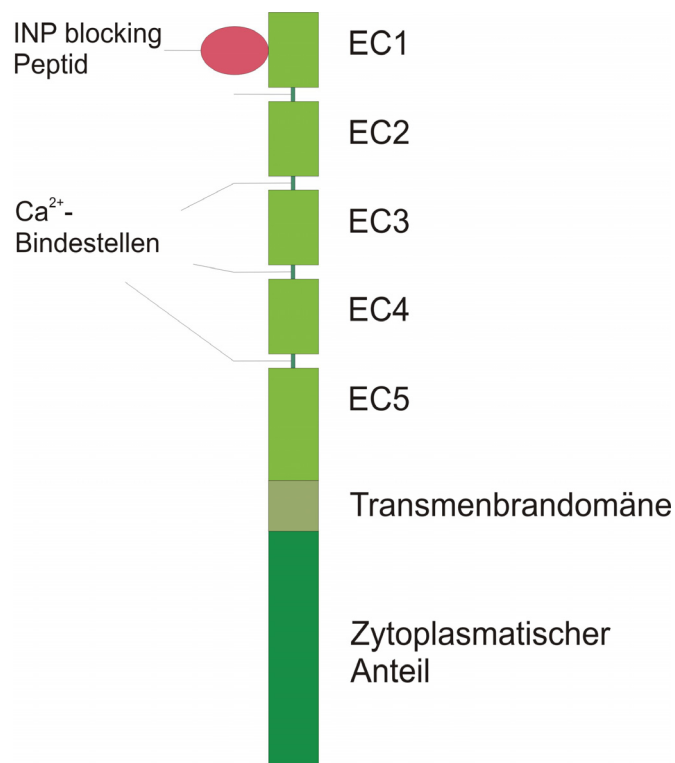


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls N-Cadherin. Der C-terminale, zytoplasmatische Anteil verankert das Molekül im Zytoskelett. Die Transmembrandomäne befindet sich innerhalb der Zellmembran. Der N-terminale, extrazelluläre Anteil besteht aus 5 sich wiederholenden Sequenzmotiven (EC1-EC5). Welche durch Ca^{2+} -Bindestellen unterbrochen werden. EC1 enthält das INP-Motiv, welches spezifisch für N-Cadherin ist. Das INP *blocking* Peptid bindet an dieses Motiv, wodurch die transsynaptische homophile Interaktion zwischen 2 N-Cadherin Molekülen aufgehoben wird. Modifiziert nach Yu, 2011.

1.4.1. Struktur und Verteilungsmuster von N-Cadherin an der Synapse

N-Cadherin gehört zur Typ I Familie der klassischen Cadherine und entsteht aus einem Vorläuferpolypeptid durch intrazelluläre proteolytische Abspaltung der N-terminalen Propeptidsequenz. Es wird an kortikalen exzitatorischen glutamatergen Synapsen exprimiert (Benson und Tanaka, 1998; Huntley und Benson, 1999). Der Aufbau des N-Cadherins lässt sich in einen zytoplasmatischen Anteil, eine Transmembrandomäne und einen extrazellulären Anteil gliedern. Der zytoplasmatische Anteil verankert das N-Cadherin im Zytoskelett. Er besteht aus etwa 100 Aminosäuren und besitzt Bindestellen für Catenine, welche das N-Cadherin mit dem Zytoskelett verbinden und Signaltransduktion zum Aktin-Zytoskelett ermöglichen (Kemler und Ozawa, 1989; Stappert und Kemler, 1994; Takeichi, 1990; Aberle et al., 1994; Barth et al., 1997; Halbleib und Nelson, 2006; Stan et al., 2010; Kwiatkowski et al., 2007; Arrikath und Reichardt, 2008). Dabei sind die β - und γ -Catenine direkt mit dem C-Terminus des N-Cadherins verbunden, und stellen via α -Catenin die Verbindung zum Aktin her (Arrikath und Reichardt, 2008; Bamji, 2006). Der extrazelluläre Anteil des N-Cadherins besteht aus 5 sich wiederholenden Sequenzmotiven mit jeweils etwa 110 Aminosäuren, die vom N-Terminus zum C-Terminus mit EC1-EC5 durchnummeriert werden. Diese 5 Domänen werden durch Ca^{2+} - Bindestellen unterbrochen, die jeweils 3 Ca^{2+} -Ionen binden können (Nagar et al., 1996). Für die adhäsive Eigenschaft des N-Cadherins ist EC1 von besonderer Wichtigkeit. EC1 enthält ein sogenanntes HAV-Motiv, bestehend aus den Aminosäuren Histamin, Alanin und Valin, welches in allen Typ I Cadherinen vorkommt und eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung spielt. Das HAV-Motiv wird unmittelbar umgeben von einem INP-Motiv, welches spezifisch für N-Cadherin ist, und die Spezifität der N-Cadherin Bindung definiert (Williams et al., 2000; Nose et al., 1990; Patel et al., 2006). Die Dimerisierung zweier N-Cadherin Moleküle findet über eine homophile Bindung an ihren EC1-Regionen statt und ist kalziumabhängig (Pokutta und Weis, 2007). Durch die Bindung von Ca^{2+} wird das Molekül linearisiert und stabilisiert, sowie dessen Dimerisierung begünstigt (Nagar et al., 1996). N-Cadherin ist auch zu einer heterophilen Interaktion mit anderen Typ I Cadherinen in der

Lage, diese ist jedoch schwächer (Inuzuka et al., 1991). Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung eines N-Cadherin Moleküls.

Das Ausmaß der Expression von N-Cadherin ist dynamisch (Thoumine et al., 2006). So können beispielsweise N-Cadherin Moleküle wieder aus der Zellmembran endozytiert werden. Dieser Vorgang wird unter anderem durch die Aktivität von NMDA-Rezeptoren beeinflusst (Tai et al., 2007). Eine Verstärkung neuronaler Aktivität erhöht die Anreicherung von Cadherinen und Cateninen in Synapsen (Murase und Schumann 1999; Tanaka et al., 2000; Abe et al., 2004, Abe und Takeichi 2007), während eine Blockierung der neuronalen Aktivität mit Tetrodotoxin eine Verringerung von α N-Catenin bewirkt (Abe et al., 2004). Außerdem verändert sich die Expression von N-Cadherin während des Reifungsprozesses der Synapse. In der frühen Entwicklungsphase der Synapse findet sich N-Cadherin gleichmäßig über der aktiven Zone exprimiert. In späteren Phasen findet die Expression vor allem perisynaptisch am Rande der aktiven Zone und der PSD statt (Elste und Benson, 2006; Benson und Tanaka, 1998).

1.4.2.Funktionen an der Synapse

N-Cadherin hat eine Vielzahl von Funktionen an der Synapse. Neben der morphologischen Stabilisierung zählt dazu auch die funktionelle Beeinflussung des neuronalen Netzwerks. N-Cadherin leistet einen bedeutenden Beitrag zur Synaptogenese und morphologischen Reifung der Synapsen. Dazu gehören die Bildung und Aufrechterhaltung von Neuroepithel, das Auswachsen von Neuriten und Migration neuronaler Zellen (Suzuki et al., 2008). Die Anreicherung von Cadherin/Catenin Komplexen während der Synaptogenese durch Überexprimierung von α -Catenin führt zu einer Stabilisierung der Synapse: Die Köpfchen der *Spines* sind größer, es zeigt sich eine geringere Länge und Motilität der Spines, sowie ein Anstieg der synaptischen Dichte (Abe et al., 2004).

Die Funktion von N-Cadherin ist in der embryonalen Entwicklung nicht auf das ZNS beschränkt. In Studien mit N-Cadherin *knockout* Embryos verstarben diese am zehnten Entwicklungstag aufgrund drastischer Missbildungen von Myokardgewebe (Radice et al., 1997). Ein konditionaler

Knockout von N-Cadherin im zerebralen Cortex zeigte eine vollständig desorganisierte Anordnung der Zytoarchitektur (Kadowaki et al., 2007). Dies legt eine Funktion von N-Cadherin in der Migration und im axonalen *targeting* nahe, wodurch eine selektive Verbindung zwischen geeigneten synaptischen Partnern gewährleistet wird. Stabiles Wachstum von *Spines* an Dendriten setzt ebenso eine intakte N-Cadherin Funktion voraus (Bozdagi et al., 2010). Experimentell konnte gezeigt werden, dass ein *Knockdown* von N-Cadherin zu filopodienähnlichen Konfigurationen und einer verminderten Dichte dendritischer *Spines* führt (Togashi et al., 2002; Saglietti et al., 2007).

Eine ebenfalls wichtige Rolle spielt N-Cadherin für die synaptische Plastizität. Es moduliert die Anordnung der Vesikel in der Präsynapse und die *Short Term* Plastizität der Vesikelfreisetzung (Togashi et al., 2002; Murase et al., 2002; Bamji et al., 2003; Bozdagi et al., 2004; Jüngling et al., 2006; Stan et al., 2010). *In vitro* Experimente mit N-Cadherin-defizienten embryonalen Stammzellkulturen konnten eine Minderung der präsynaptischen Verfügbarkeit von Vesikeln für die Exozytose während hochfrequenter Stimulierung zeigen (Jüngling et al., 2006). Außerdem ist N-Cadherin nötig für die Induktion von LTP (Bozdagi et al., 2010). Blockierung von N-Cadherin in hippocampalen Hirnschnitten zeigte eine signifikante Reduktion der LTP (Tang et al., 1998).

1.4.3. Prozessierung von N-Cadherin und Blockierung durch das INP Peptid

N-Cadherin ist ein essentieller Bestandteil der exzitatorischen Synapse. Es handelt sich um ein Transmembranprotein, welches durch proteolytische Spaltung aus einem Vorläuferpolypeptid entsteht. Auch der Abbau erfolgt durch proteolytische Spaltung. Dabei durchläuft das Molekül interessanter Weise einen ähnlichen Prozess, wie auch für APP beschrieben (Maramboud et al., 2003; Reiss et al., 2005; Uemura et al., 2006). Zunächst wird, ausgelöst durch Stimulierung von NMDA-Rezeptoren, die N-terminale Ektodomäne des N-Cadherin (EC1-EC5) von der membranassoziierten Metalloprotease ADAM10 abgespalten. Dabei entsteht das C-terminale Fragment Ncad/CTF1, bestehend aus der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Anteil. Ncad/CTF1 wird weiter prozessiert durch Presenilin1/ γ -Secretase, sodass der

Einleitung

zytoplasmatische C-Terminus (NcadCTF2) von der Transmembrandomäne gespalten wird (Reiss et al., 2005; Uemura et al., 2006; Malinverno et al., 2010).

Die Funktion von N-Cadherin lässt sich mit dem INP Peptid blockieren (Williams et al., Siu et al., 2006; Andreyeva et al., 2012). Dieses Peptid imitiert eine kurze Sequenz der EC1-Domäne des N-Cadherins und kann kompetitiv an die EC1-Domäne binden. Somit wird die transsynaptische homophile Interaktion zweier N-Cadherin Moleküle verhindert (Williams et al., 2000).

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellkulturmedien

Vorbereitung der Coverslips

Poly-L-Ornithin	1 mg/ml
Borsäure	0,15 M

Tabelle 1: Materialien zur Bearbeitung der *Coverslips*.

Der pH-Wert des Borphuffers wurde mit NaOH auf 8,35 eingestellt.

BME-Medium

BME-Medium	500 ml	Gibco; Cat. No. 21370-028
Fötales Kälberserum (hitzeaktiviert)	50 ml	Gibco; Cat. No. 10500-064
Penicillin- Streptomycin Lösung	5 ml	Gibco; Cat. No. 15140-122
L-Glutamin 200mM	5 ml	Gibco; Cat. No. 25030-024
Glucose (40%) 20 mM	3 ml	JT Baker; Cat. No. 0114
Insulin-Transferrin-Selenium Lösung	5 ml	Gibco; Cat. No. 5130-044

Tabelle 2: Materialien für das BME-Medium

NB-Medium		
NB-Medium	500 ml	Gibco; Cat. No. 21103-049
Penicillin-Streptomycin	5 ml	Gibco; Cat. No. 15140-122
Lösung 100X		
GlutaMAX1 Supplement	2,5 ml	Gibco; Cat. No. 35050-038
NS21 (nach Chen et al., 2008)	10 ml	
Bovine Albumin	37 µM	Sigma; Cat. No. A4919
Katalase	0,01 µM	Sigma; Cat. No. C40
Glutathion (<i>red.</i>)	3,2 µM	Sigma; Cat. No. G6013
Insulin	0,6 µM	Sigma; Cat. No. I1882
Superoxidase-Dismutase	0,077 µM	Sigma; Cat. No. S5395
Holo-Transferrin	0,062 µM	Calbiochen; Cat. No. 616426
Trijod-L-Tyronin (T3)	0,0026 µM	Sigma; Cat. No. T6397
L-Carnitin	12 µM	Sigma; Cat. No. C7518
Ethanolamin	16 µM	Sigma; Cat. No. E9508
D(+)-Galaktose	83 µM	Sigma; Cat. No. G0625
Putrescin	183 µM	Sigma; Cat. No. P5780
Natriumselenit	0,083 µM	Sigma; Cat. No. S9133
Kortikosteron	0,058 µM	Sigma; Cat. No. C2505
Linolsäure	3,5 µM	Sigma; Cat. No. L1012
Linolensäure	3,5 µM	Sigma; Cat. No. L2376
Lipoic acid (thioctic acid)	0,2 µM	Sigma; Cat. No. T1395
Progesteron	0,02 µM	Sigma; Cat. No. P8783
Retinolsäure	0,2 µM	Sigma; Cat. No. R7882
Retinol, all trans	0,3 µM	Sigma; Cat. No. 95144
D,L- alpha-Tocopherol	2,3 µM	Sigma; Cat. No. 95240
D,L- alpha Tocopherolacetat	2,1 µM	Sigma; Cat. No. T3001

Tabelle 3: Materialien für das NB-Medium

Weitere Substanzen

Dulbecco's Phosphatgepufferte Saline
(PBS +/-)

Dulbecco's Phosphatgepufferte Saline (ohne Ca²⁺, Mg²⁺, Natriumbikarbonat:
PBS -/-)

Trypsin 0,25%

Tabelle 4: Weitere Substanzen

2.2. Immuncytochemie

Antikörper-Puffer

NaCl	150 mM	
Tris-HCl Puffer, pH 7,5	50 mM	
BSA	1 %	Roche; Cat. No. 10735086001
L-Lysin	100 mM	Sigma-Aldrich; Cat. No. 62840-25G-F
Na-Azid	0,04 %	Sigma-Aldrich; Cat. No. S2002-25G

Tabelle 5: Materialien für den Antikörper-Puffer

Zum endgültigen Volumen wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt; der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Blocking Puffer

Antikörper-Puffer	90 %		
Ziegeneserum	9,7 %		
Triton-X-100	0,3 %	Sigma-Aldrich;	Cat. No. 028K0011

Tabelle 6: Materialien für den *Blocking* Puffer

TBS Waschpuffer	
Tris-HCl Puffer, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM

Tabelle 7: Materialien für den Waschpuffer

Zum endgültigen Volumen wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

2.3. Peptide

INP <i>blocking</i> Peptid (1mg/ml in 0,1% AcH)	
Ac-Ile-ASN-Pro-Ile-Ser-Gly-Gln-NH ₂	PolyPeptide Laboratories
LV <i>scrambled</i> Peptid (1mg/ml in 0,1% AcH)	
Ac-Leu-Val-Arg-Ile-Arg-Ser-NH ₂	PolyPeptide Laboratories

Tabelle 8: Peptide

2.4. Zellkultur

2.4.1. Herstellung steriler PO-Coverslips

Neuronale Zellkulturen wurden auf *Coverslips* kultiviert, die zu diesem Zweck speziell vorbereitet werden mussten. Zunächst wurden die *Coverslips* mit destilliertem Wasser gewaschen und 30 Minuten bei Raumtemperatur in 1M HCl Lösung inkubiert. Nach viermaligem Waschen in destilliertem Wasser wurde für weitere 30 Minuten reines Ethanol zugegeben. Nach Abschütten des Ethanols wurden die *Coverslips* für 1 Stunde bei 80°C unter gelegentlichem vorsichtigem Schütteln getrocknet und anschließend 3 Stunden bei 180 °C im Hitzesterilisator sterilisiert.

Um sicherzustellen, dass die neuronalen Zellkulturen auf den gereinigten *Coverslips* haften bleiben, mussten sie zunächst mit Poly-L-Ornithin (PO) beschichtet werden. Dazu wurden je 5 *Coverslips* in eine sterile Petrischale

(Falcon, 35x 10 mm) umgebettet. Jedes Coverslip wurde mit 70 µl PO-Lösung (1 mg/ml) beschichtet. Am Folgetag wurde überschüssiges PO viermal mit 2 ml sterilem, destilliertem Wasser abgespült und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Das PO wurde 50-fach in Borpuffer (150mM, pH 8.35) verdünnt, sodass eine Konzentration des PO von 1 mg/ml entstand. Zur Sterilisierung wurde die Lösung filtriert (Sterile Syringe Filter, 0,2µm Porengröße) und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

2.4.2. Präparation von Mäuseföten und Herstellung von primären kortikalen Neuronen

Für die Präparation der Mäuseembryonen wurde zunächst das trächtige Muttertier (C57/Black6) mit CO₂ Gas getötet, dekapitiert und die Föten (E19) entnommen. Um bakterielle Kontaminationen bestmöglich zu vermeiden, wurden die folgenden Schritte unter einer Sterilbank vorgenommen. Die Föten wurden auf Eis gebettet, um die Neurone bestmöglich zu erhalten und ebenfalls dekapitiert. Die weitere Präparation fand unter einem binokulären Mikroskop (Zeiss) statt. Mit 2 Pinzetten (Dumont 4-5) wurden Haut und Schädelknorpel entfernt. Das so freigelegte Gehirn konnte mit einem Mikrolöffel entnommen und in eine Petrischale mit gekühltem PBS +/- gegeben werden. Nach dem Entfernen der Meningen wurde mit dem Skalpell ein Medianschnitt vorgenommen, der die beiden Großhirnhemisphären voneinander trennte. Mit einem weiteren Schnitt wurden die Großhirnrinden abgetrennt und in eine separate Petrischale überführt. Mit Skalpell und Pinzette wurden die Großhirnrinden weiter zerteilt, bis sie pipettengängig waren. Zusammen mit 1 ml PBS +/- wurden sie in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben, dem zum Auflösen des Zellverbandes 200 µl Trypsin zugegeben wurde. Nach 5 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und durch 1 ml BME Medium ersetzt, welches die enzymatische Wirkung des Trypsins aufhebt. Anschließend wurde das BME wieder entfernt und durch 200 µl PBS +/- ersetzt. Um möglichst einzelne Neurone zu erhalten, folgte die mechanische Dissoziation der Zellen durch auf- und abpipettieren, zunächst mit einer 1000µl und dann mit einer 200µl

Pipettenspitze. Der homogenen, trüben Zellsuspension wurden 4 ml BME hinzugegeben. Um sicherzustellen, dass die Zellkulturen für die folgenden Experimente immer die gleiche Zelldichte aufweisen, wurden die Zellen in der Suspension mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Auf die zuvor vorbereiteten PO-Coverslips (5 Coverslips in einer Petrischale) wurde so viel Zellsuspension gegeben, dass die Kulturen eine konstante Anzahl an Neuronen von 40.000/ Coverslip aufwiesen. Die Zellen inkubierten 1 Stunde im Brutschrank. Anschließend wurden jeder Petrischale 2 ml NB Medium zugefügt, und die Neurone wurden 9 Tage im Brutschrank kultiviert.

2.5. Medienwechsel

Nach 9-tägiger Kultivierung wurde bei den Zellkulturen ein Medienwechsel vorgenommen. Jede Zellkultur mit Versuchsmedium bekam eine Zellkultur mit Kontrollmedium gegenübergestellt. Aus der Petrischale mit den *Coverslips* wurde das Medium vollständig entfernt, durch auf- und abpipettieren gemischt und 0,9 ml zurückgegeben. Zusätzlich wurde das Medium für den entsprechenden Versuchsansatz hinzugefügt. 2- 4 Tage nach dem Medienwechsel wurden die Zellen fixiert und immunocytochemisch gefärbt.

2.5.1. 7PA2 *Supernatant*

Zellulär sezerniertes A β wurde aus einer Zelllinie von chinesischen Hamsterovarien (7PA2 CHO Zellen) gewonnen. Diese Zellen exprimieren einen Überschuss an APP751, welches die familiäre APP V717F Indiana Mutation trägt (Podlisny et al., 1995). Die 7PA2 Zellen wurden in DMEM kultiviert (mit Zusatz von fötalem Kälberserum, Natriumpyruvat, Penicillin und Streptomycin). Nach einigen Tagen wurde das Medium durch NB Medium (mit Zusatz von NS21) ersetzt und für 72 Stunden inkubiert (Müller-Schiffmann et al., 2010). Die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt und mittels ELISA wurde in dem *Supernatant* eine A β -Konzentration von 25-50ng/ml nachgewiesen. 0,9 ml dieses Mediums, beziehungsweise des Kontrollmediums, wurden der entsprechenden Petrischale mit den Zellkulturen zugegeben.

Der 7PA2 *Supernatant* wurde freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. Carsten Korth und Dr. rer. nat. Andreas Müller-Schiffmann aus dem Institut für Neuropathologie der Universitätsklinik Düsseldorf.

2.5.2. Immundepletion

Um zu kontrollieren, ob der Effekt aus dem 7PA2 KM Experiment allein auf das A β zurückzuführen ist, wurde das 7PA2 KM durch Immundepletion von A β befreit.

Dazu wurde zunächst IC16-NHS Sepharose zu dem *Supernatant* gegeben. IC16 ist ein spezifischer Antikörper gegen Amyloid β . Dieser wurde kovalent an Sepharosekügelchen gebunden (sogenannte *Beads*), um das spätere Entfernen des Antigen-Antikörper-Komplexes zu erleichtern. Nach kurzer Inkubationszeit wurden die *Beads* durch Zentrifugation separiert. Im *Western Blot* erfolgte der Nachweis, dass der zu depletierende *Supernatant* tatsächlich A β enthält. Dieser Schritt wurde mit einer längeren Inkubationszeit wiederholt, um sicher zu gehen, dass alle Moleküle des A β an Antikörper gebunden waren. Erneut wurden die *Beads* durch Zentrifugation entfernt. In einem letzten Durchgang wurde dem *Supernatant* erneut IC16-NHS Sepharose zugegeben. Nach dem Zentrifugieren wurde im *Western Blot* gezeigt, dass im *Supernatant* keine Rückstände von A β mehr vorhanden waren.

Für dieses Experiment wurden zu den Petrischalen mit den Zellkulturen jeweils 0,9 ml 7PA2 *Supernatant*, immundepletierter *Supernatant*, beziehungsweise Kontrollmedium gegeben.

IC16-NHS Sepharose wurde zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. Carsten Korth und Dr. rer. nat. Andreas Müller-Schiffmann aus dem Institut für Neuropathologie der Universitätsklinik Düsseldorf.

Immundepletiertes Medium wurde freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Aksana Andreyeva aus dem Institut für Neurophysiologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

2.5.3. Peptide

Für den Peptidversuch wurden die synthetischen Peptide INPISGQ (funktionelle Blockierung von N-Cadherin; Williams et al., 2000)

beziehungsweise LVRIRS (Kontrolle; Williams et al., 2000) zu 1mg/ml mit 0,1% Essigsäure verdünnt, sodass eine Konzentration von 100µg/ml entstand. 190µl dieser Lösungen wurden separat zu je 2 Zellkulturen gegeben und 1 Stunde im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach wurden 0,9 ml 7PA2 *Supernatant* bzw. Kontrollmedium hinzugefügt, sodass sich folgende Zusammensetzung ergab:

1a) INP + 7PA2 *Supernatant*

1b) INP + Kontrollmedium

2a) LV + 7PA2 *Supernatant*

2b) LV + Kontrollmedium

2.5.4. Kontrollmedium

Als Kontrollmedium wurde das NB Medium verwendet, welches auch in der Herstellung der Zellkulturen verwendet wurde.

2.6. Immuncytochemie

In dieser Arbeit wurden verschiedene synaptische Moleküle mittels Fluoreszenzmarker immuncytochemisch dargestellt.

2.6.1. Was ist Fluoreszenz?

Bei optischer Anregung eines Fluorophors wird ein Photon absorbiert. Die Energie des Photons geht dabei auf ein Elektron der äußeren Schale des Fluorophors über. Das Elektron geht somit auf ein höheres Energielevel. Damit der Fluorophor zurück in seinen Ausgangszustand gelangen kann, muss die zuvor aufgenommene Energie wieder abgegeben werden. Dies geschieht unter anderem als Photon, was als Fluoreszenz sichtbar wird. Die Energie, welche als Fluoreszenz frei wird, kann nur gleich groß oder kleiner sein, als die Anregungsenergie (Stokes'sche Regel). Da die Energie in der Regel nicht nur als Photon frei wird, sondern zum Beispiel auch als Wärme, hat die Fluoreszenz meist eine längere Wellenlänge als die absorbierte Wellenlänge, ist also energieärmer.

2.6.2. Immuncytochemische Färbung

Die immuncytochemische Färbung liefert die Möglichkeit, einzelne Strukturen der Zelle mit hoher Sensitivität zu markieren. In dieser Arbeit diente sie dem Zweck, VAMP2 als präsynaptischen Marker, PSD95 als postsynaptischen Marker und den Dendritenmarker MAP2 sichtbar zu machen.

Alle Wasch- und Inkubationsschritte der immuncytochemischen Färbung wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und unter langsamem Schwenken durchgeführt.

Zur immuncytochemischen Färbung wurden die Zellkulturen auf den *Coverslips* in eine *24-well* Platte überführt. Um überschüssiges Zellkulturmedium und abgestorbene Zellbestandteile zu entfernen, wurden die *Coverslips* dreimal vorsichtig mit 0,5 ml PBS +/- gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten in 0,5 ml Fixationslösung (4 % Paraformaldehyd, 4 % Saccharose in PB) belassen. Nach diesem Schritt wurden die *Coverslips* dreimal 5 Minuten lang mit 0,5 ml PBS-/- gewaschen um das Paraformaldehyd zu entfernen. Die Zellen wurden 50 Minuten in 0,5 ml *Blocking* Puffer inkubiert. Dieser enthielt neben Triton-X-100 zur Permeabilisierung der Zellen auch BSA (in Antikörper-Puffer) zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen. Zu den Zellen wurden nach Entfernen des Puffers 0,25 ml der Primärantikörperlösung in Antikörper-Puffer hinzugegeben (VAMP2 *rabbit* 1:5000; PSD95 *mouse* 1:500; MAP2 *chicken* 1:500), und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellkulturen dreimal 10 Minuten mit TBS und einmal 10 Minuten in Antikörper-Puffer gewaschen. 0,25 ml der Sekundärantikörperlösung in Antikörper-Puffer wurden zugegeben und 1 Stunde inkubiert (*goat anti rabbit* 1:10000; *goat anti mouse* 1:1000; *goat anti chicken* 1:50). Da der Sekundärantikörper das Fluoreszenzmolekül trägt, wurden die Zellkulturen ab diesem Schritt vor Lichteinfall geschützt. Überschüssige Antikörper wurden entfernt, indem die Zellkulturen viermal für 10 Minuten mit TBS gewaschen wurden. Es folgte das *Imaging*.

2.7. Fluoreszenzimaging

2.7.1. Das Setup

Die Aufnahmen der gefärbten Zellkulturen wurden an einem inversen Mikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) mit einer CoolSnap ES2–CCD-Kamera (*Charge-coupled Device*) angefertigt. Für alle Aufnahmen wurde ein 63x Objektiv (Ölimmersion, Zeiss) verwendet. Damit die Fluoreszenzmoleküle mit ihrer spezifischen Wellenlänge angeregt werden konnten, wurden verschiedene Lichtfilter (Zeiss) eingesetzt:

Filtersatz	Anregung (nm)	Emission (nm)	Belichtungszeit
43 (Cy3)	545/25	650/70	0,3 Sek.
17 (FITC)	485/20	515- 565	0,2 Sek.
49 (DAPI)	365	445/50	0,5 Sek.

Tabelle 9: Die in dieser Arbeit verwendeten Lichtfilter Mit Angabe des Filtersatzes, der Anregung und Emission in nm sowie der Belichtungszeit in Sek.

Mit Hilfe der Software MetaVue 7.5.6. (Visitron Systems) wurden von den Neuronen Z-Stacks mit 10 - 12 Bildern mit einer Dicke von 0,5 μm angefertigt. Dies ermöglichte eine spätere 3D Analyse der Aufnahmen.

2.7.2. Bildbearbeitung und Bildanalyse

3D Deconvolution

Um die Unschärfe der Aufnahmen rückgängig zu machen, mussten sie zunächst deconvuliert werden. Die Unschärfe resultiert aus der PSF (point spread function), einer Funktion, welche beschreibt, wie das Licht von einem Punkt ausgehend gestreut wird. Durch die Deconvolution kann diese Unschärfe mathematisch erfasst und rückgängig gemacht werden, indem das gestreute Licht auf seinen Ursprungsort zurückgerechnet wird. In dieser Arbeit wurde eine blinde Deconvolution (blind deconvolution) mit der Software AutoDeblur vorgenommen. Das Programm wendet verschiedene PSFs an, basierend auf technischen Informationen über das verwendete Objektiv und Informationen aus der Aufnahme, um diejenige PSF zu finden, welche das beste Resultat hervorbringt. Aus den deconvulierten Bildern wurde mit dem Programm MetaMorph (Visitron Systems) eine Maximum Projektion erstellt. Dabei

entstand aus den Maximalwerten der Intensität der Pixel aus den Z-Stacks ein neues Bild.

Auto threshold

Die Aufnahmen der Neurone wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm MetaMorph (Visitron Systems) bearbeitet. Zunächst musste ein zu untersuchender Abschnitt eines Dendriten ausgewählt werden (region of interest, ROI). Um sicherzustellen, dass die ROI in allen 3 Images (MAP2, VAMP2, PSD95) exakt gleich ist, wurden sie zunächst zu einem Stack zusammengefügt. Um ein tatsächliches Signal von Hintergrundrauschen abzugrenzen, wurde mit der Autothreshold- Funktion ein Grenzwert (threshold) ermittelt und ein neues Bild erstellt, auf dem nur noch Signale erschienen, die über diesem Grenzwert lagen. Der ideale Grenzwert eines jeden Bildes wurde mit Hilfe seines individuellen Histogramms festgelegt. Dabei wurde angenommen, dass der größte Peak im Histogramm die Hintergrund-Fluoreszenz repräsentiert. Das lokale Minimum nach diesem Peak wurde als threshold zwischen Hintergrund- Fluoreszenz und tatsächlichem Signal festgelegt. In manchen Fällen musste der threshold anders bestimmt werden: Befanden sich weniger als 1 % der Pixel über der Grenzintensität oder konnte kein lokales Minimum bestimmt werden, so wurde angenommen, dass es sich bei dem größten Peak bereits um ein relevantes Signal handelte. Es wurde nach einem Peak bei geringerer Intensität gesucht, der als Hintergrund-Fluoreszenz festgelegt werden konnte. War dies nicht möglich, wurden alle Pixel mit höherer Intensität als der doppelten Standardabweichung des gesamten Histogramms als Signal gewertet. Vereinzelt mussten Bilder nachträglich um 1-2 Standardabweichungen korrigiert werden.

Low Pass Filter

Die Low Pass Filter Funktion unterdrückt extrem hohe beziehungsweise niedrige Intensitäten, indem die Intensität der einzelnen Pixel durch die durchschnittliche Intensität ihrer Umgebung ersetzt wird. So wurden einzelne Pixel aus dem Bild entfernt, die über dem errechneten threshold lagen, aber dennoch auf Hintergrund- Fluoreszenz zurückzuführen waren. Für die

Bearbeitung wurde ein Low Pass Filter von 3 Pixeln horizontal, und 3 Pixeln vertikal gewählt.

Auswertung der Fluoreszenzbilder

Um die auszuwertenden *Cluster* von VAMP2 und PSD95 (in dieser Arbeit als *Puncta* bezeichnet) festzulegen, musste bestimmt werden, welche davon mit dem Dendriten kolokalisiert waren. Dazu wurde ein Overlay der MAP2, VAMP2 und PSD95 Aufnahmen erstellt. Ausgewertet wurden alle *Puncta*, bei denen mindestens 1 Pixel mit dem Dendriten überlappte, oder von denen mindestens 1 Pixel den Dendriten berührte. Die gleiche Definition erfolgte für die Kolokalisation von VAMP2 und PSD95 *Puncta*. Die Informationen zur Anzahl der *Puncta*, deren Größe und Intensität, sowie der Gesamtfluoreszenz (mittlere Pixelintensität x Pixelanzahl, Fläche) und der Anzahl der Dendriten des ausgewerteten Neurons, wurden in Excel Tabellen importiert.

2.8. Statistik

Die statistische Auswertung und graphischen Darstellung erfolgte mit Sigma Plot 9.0. Um die statistische Signifikanz der ermittelten Werte zu überprüfen, wurden Student's t-Test und Bonferroni-Korrektur angewandt. Bei dem Vergleich von 2 Werten miteinander wurde der t-Test angewandt, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet wurde. Bei dem Vergleich von 3 Werten miteinander wurde der t-Test mit Bonferroni-Korrektur angewandt, um die Alphafehler-Kumulierung zu verhindern. Dabei wurde $P < 0,025$ als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

Die hier vorgestellten Ergebnisse erscheinen zum Teil in Andreyeva et al., 2012.

3.1. Auswirkung von A β Peptiden auf die Morphologie kultivierter neocortikaler Neurone

In dieser Arbeit wurden Kulturen primärer kortikaler Neurone aus Mäuseföten verwendet. Mit Hilfe definierter Versuchsmedien wurde der Effekt von zellulär sezernierten Amyloid β (A β) Peptiden auf diese Neurone untersucht. An DIV 9 (*days in vitro*) wurde das NB-Medium aus den Kulturen durch Kontrollmedium, A β enthaltendes 7PA2 konditioniertes Medium (KM) beziehungsweise immundepletiertes 7PA2 KM ohne A β ersetzt. Nach 4 Tagen Inkubation in dem jeweiligen Medium zeigten die Zellen in allen 3 Konditionen morphologisch gleich konfigurierte Somata und Zellfortsätze. Daraus kann gefolgert werden, dass A β Peptide aus 7PA2 KM keine unmittelbar toxischen Effekte auf die Zellmorphologie haben.

Abbildung 3.1 zeigt mit MAP2-Antikörpern immunocytochemisch angefärbte Neurone im direkten Vergleich. Es zeigten sich in allen 3 Konditionen morphologisch intakte Somata und Dendriten. Die Neurone zeigten darüber hinaus eine vergleichbare Größe.



Abb. 3.1: Fluoreszenzgefärbte neocortikale Neurone, 4 Tage Inkubation

Die Abbildung zeigt eine immunocytochemische MAP2-Färbung kultivierter neocortikaler Neurone, bei denen an DIV 9 ein Medienwechsel mit **A)** Kontrollmedium, **B)** 7PA2 konditioniertem Medium (KM, A β enthaltend) und **C)** immundepletiertem 7PA2 KM vorgenommen wurde. Balkenlänge: 20 μ m; Objektiv: 63x. Zellsoma und Dendriten sind gut zu erkennen. Auch 4 Tage nach Medienwechsel zeigten sich die Neurone in allen 3 Konditionen intakt.

In Abbildung 3.2 ist quantitativ die Anzahl primärer Dendriten pro Neuron graphisch dargestellt. Nach 2 Tagen war die Anzahl primärer Dendriten pro Neuron nicht signifikant verschieden. Gleiches zeigte sich nach 3 und 4 Tagen. Auch die Neurone in immundepletiertem 7PA2 KM zeigten nach 3 und 4 Tagen keine signifikante Abweichung zur Kontrolle in der Anzahl primärer Dendriten.

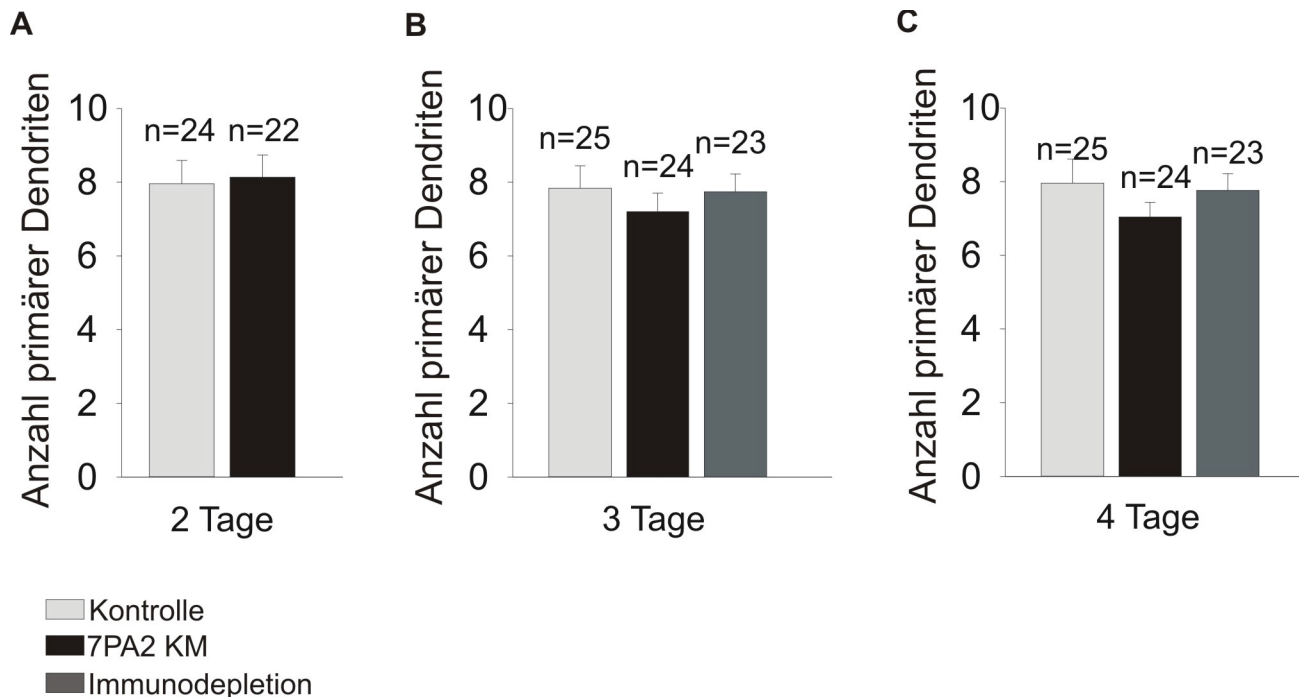


Abb. 3.2: Anzahl primärer Dendriten der Neurone in Kontrollmedium, 7PA2 KM und Immundepletiertem 7PA2 KM

Die Anzahl der Dendriten ist in den Zellkulturen **A)** 2, **B)** 3 und **C)** 4 Tage nach Medienwechsel bei den verschiedenen Konditionen nicht signifikant verschieden. Die Zellmorphologie ist nicht beeinträchtigt. „n“ gibt die Anzahl der untersuchten Neurone an.

3.1.1. Immunocytochemische Färbung synaptischer Strukturen in kultivierten neocortikalen Neuronen

Prä- und postsynaptische Strukturen von Neuronen zeichnen sich durch jeweils spezifische Marker aus. Es konnte bereits gezeigt werden, dass VAMP2 ein spezifischer Marker für präsynaptische Vesikel, und PSD95 ein spezifischer Marker für die postsynaptische Spezialisierung ist (Stan et al., 2010). Ebenso wurde MAP2 als Marker für Dendriten etabliert (Himeda et al., 2005). Um die Auswirkungen von A β Peptiden auf dendritische Synapsen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die Proteine VAMP2, PSD95 und MAP2 mit 3

verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen. So konnten an einem Dendriten simultan sowohl prä- als auch postsynaptische Strukturen sichtbar gemacht und analysiert werden.

Für diesen Teil der Arbeit wurden Zellkulturen aus primären kortikalen Neuronen der Maus hergestellt und 9 Tage in NB Medium bei 37°C in einem Inkubator kultiviert. An DIV 9 wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Zu einem Teil der Zellkulturen wurde Kontrollmedium gegeben, hierfür wurde ebenfalls NB-Medium verwendet. Zu einem weiteren Teil der Zellkulturen wurde ein Medium mit zellulär sezernierten A β Peptiden aus einer 7PA2 CHO Zelllinie hinzugegeben, welches mit NB Medium in einem Verhältnis von 1:1 verdünnt wurde. 7PA2 CHO Zellen sezernieren native A β -Oligomere (Walsh et al., 2002). Um zu kontrollieren, ob die Ergebnisse in der Zellkultur mit 7PA2 KM tatsächlich auf A β -Peptide zurückzuführen waren, wurde zu einem dritten Teil der Zellkulturen ein Immundepletiertes 7PA2 KM gegeben. Durch den Vorgang der Immundepletion wurde das 7PA2-KM von A β -Peptiden gereinigt. Nach erneuter Inkubation bei 37°C für 2-4 Tage wurden die Zellen fixiert und immunocytochemisch gefärbt.

Um die Immunfluoreszenz gefärbter Neurone sichtbar zu machen, wurden die Zellkulturen an einem inversen Mikroskop mit den für die verschiedenen Fluoreszenzmarker spezifischen Wellenlängen mit Hilfe verschiedener Filter angeregt. Es wurde eine zur Auswertung geeignete Region (ROI) gewählt und mit einem 63x Objektiv und einer CoolSnap ES2-CCD-Kamera ein *Z-Stack* mit einem Abstand der Einzelaufnahmen von 0,5 μ m von dieser Region angefertigt. Dieser Vorgang wurde mit den spezifischen Anregungswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzmarker für VAMP2, PSD95 und MAP2 durchgeführt. So entstand von einer ROI eine Abbildung der präsynaptischen Terminale (VAMP2), sowie der postsynaptischen Strukturen (PSD95) und dem zugehörigen Dendriten (MAP2).

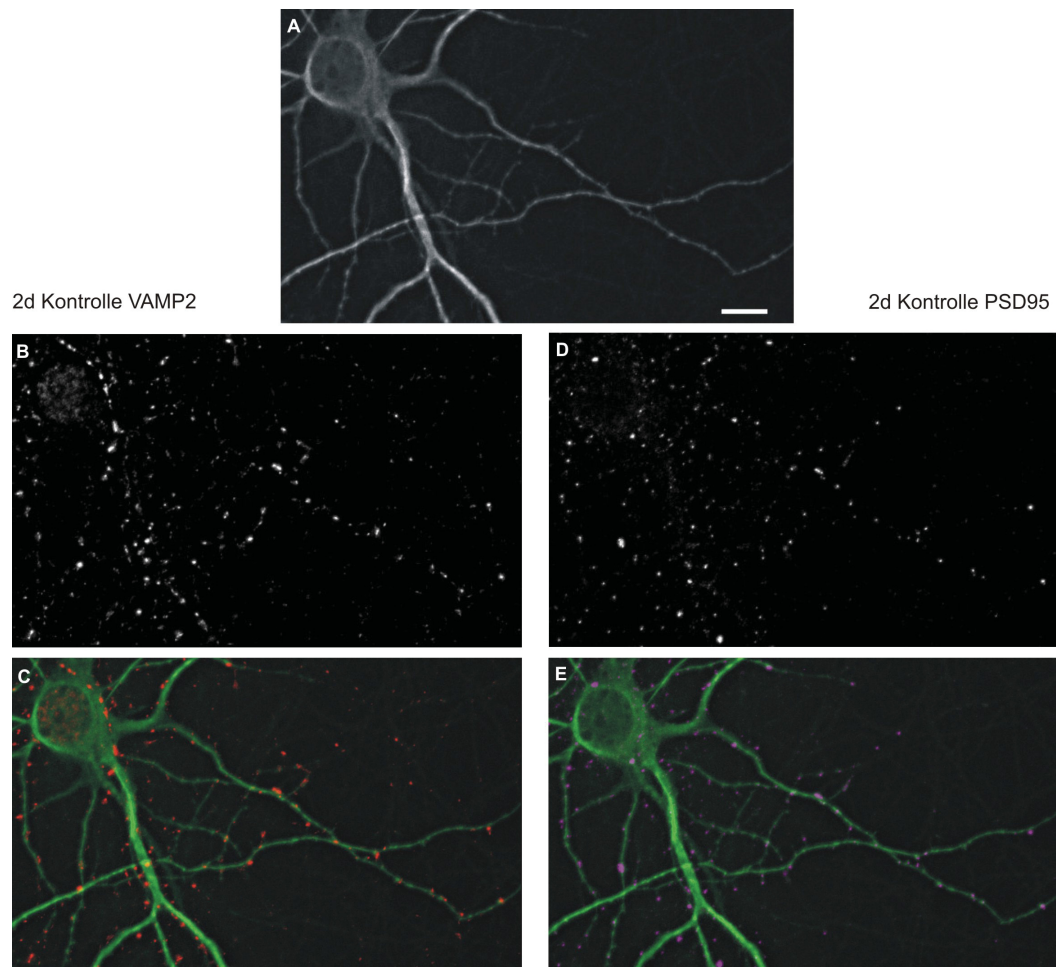


Abb. 3.3a: Immunocytochemische Färbung einer Zellkultur mit Kontrollmedium, 2 Tage Inkubation

Diese Abbildung zeigt ein Neuron an Tag 2 nach Medienwechsel mit Kontrollmedium. Balkenlänge: 5µm; Objektiv: 63x. **A)** zeigt eine ROI der MAP2-Färbung. In **B)** ist die VAMP2-Färbung der Region abgebildet. **C)** zeigt ein *Overlay* der MAP2- und VAMP2-Färbung. In **D)** ist die gleiche ROI mit einer PSD95-Färbung abgebildet und **E)** zeigt das *Overlay* von PSD95 mit MAP2. Die *Puncta* sind sehr gut mit den Dendriten kolokalisiert.

Ergebnisse

2d 7PA2 KM VAMP2

2d 7PA2 KM PSD95

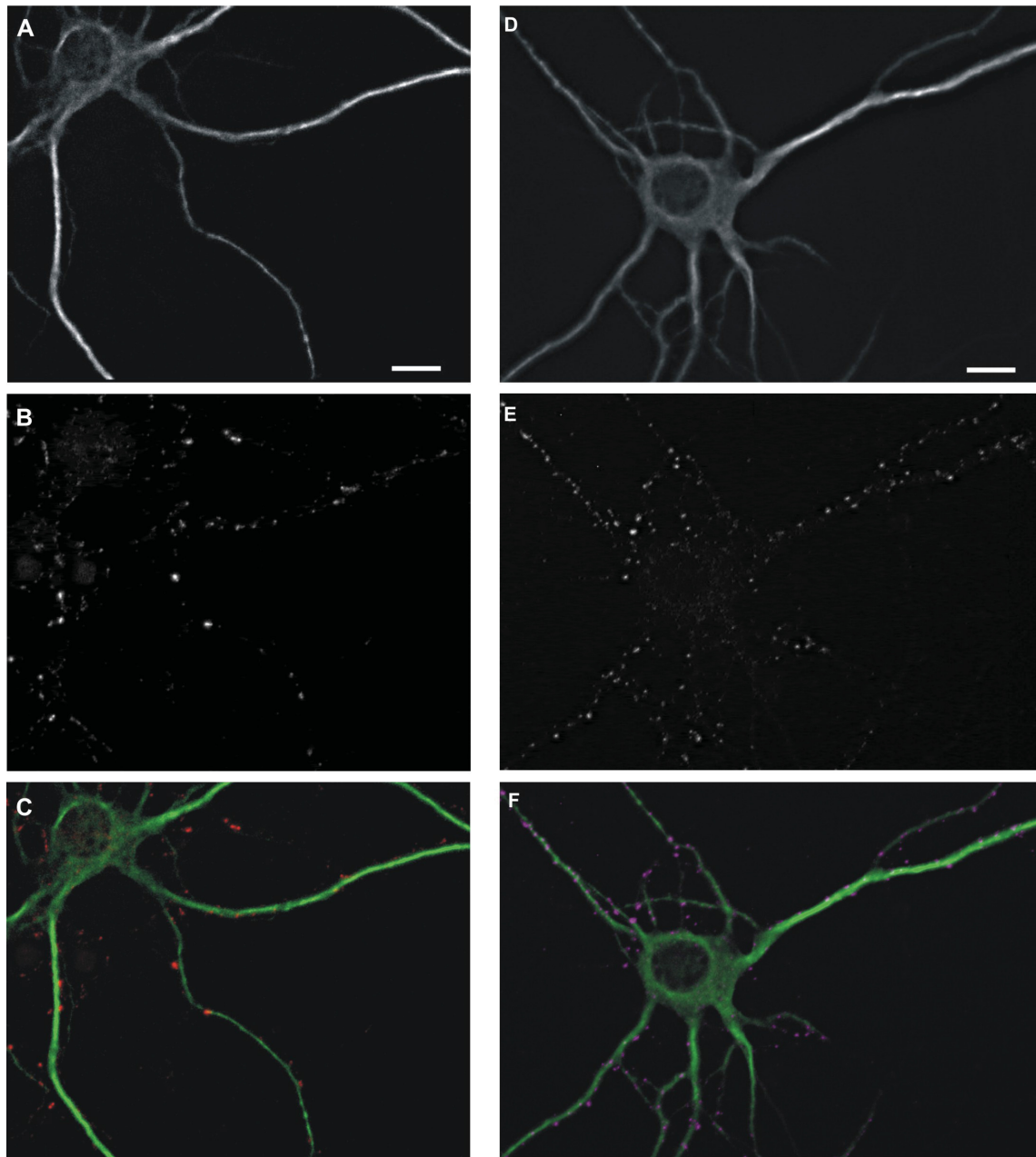


Abb. 3.3b: Immuncytochemische Färbung einer Zellkultur mit 7PA2 KM, 2 Tage Inkubation

Diese Abbildung zeigt Neurone an Tag 2 nach Medienwechsel mit 7PA2 KM. Balkenlänge: 5µm; Objektiv: 63x. **A)** zeigt eine ausgewählte ROI der MAP2-Färbung. In **B)** ist die VAMP2-Färbung der gleichen Region abgebildet. **C)** zeigt ein *Overlay* von MAP2- und VAMP2-Färbung. Entsprechend ist in **D)-F)** eine PSD95-Färbung abgebildet. Die *Puncta* sind sehr gut mit den Dendriten kolokalisiert. Es zeigte sich eine deutliche Darstellung der neuronalen Marker MAP2, VAMP2 und PSD95 in der immuncytochemischen Färbung. Um einen zeitlichen Verlauf der Auswirkungen der verschiedenen Versuchsmedien auf die Neurone zu untersuchen, wurden diese Färbungen an Tag 2, 3 und 4 nach Medienwechsel angefertigt.

Ergebnisse

Abbildung 3.3a zeigt vergleichend Neurone nach 2 Tagen Inkubation in Kontrollmedium. Es ist eine Färbung von MAP2 und VAMP2 bzw. MAP2 und PSD95 abgebildet. Die durch Immunfluoreszenz dargestellten *Puncta* sind deutlich voneinander zu trennen und sehr gut mit den Dendriten kolokalisiert. Analog dazu sind in Abbildung 3.3b Neurone nach 2 Tagen Inkubation in 7PA2 KM gezeigt. Auch hier sind die *Puncta* deutlich voneinander zu trennen und zeigen eine gute Kolokalisation mit dem Dendriten.

Auch nach der maximalen Inkubationsdauer von 4 Tagen in Kontrollmedium zeigt sich sowohl für VAMP2 als auch für PSD95 eine gute Darstellung der *Puncta* und eine gute Kolokalisation mit den Dendriten (Abbildung 3.3c). Nach 4 Tagen Inkubation mit 7PA2 KM lässt sich bereits eine verminderte Anzahl an VAMP2 *Puncta* feststellen (Abbildung 3.3d). Dennoch sind die einzelnen *Puncta* sowohl in der VAMP2-Färbung als auch in der PSD95-Färbung gut voneinander zu trennen und zeigen eine gute Kolokalisation mit dem Dendriten.

Ergebnisse

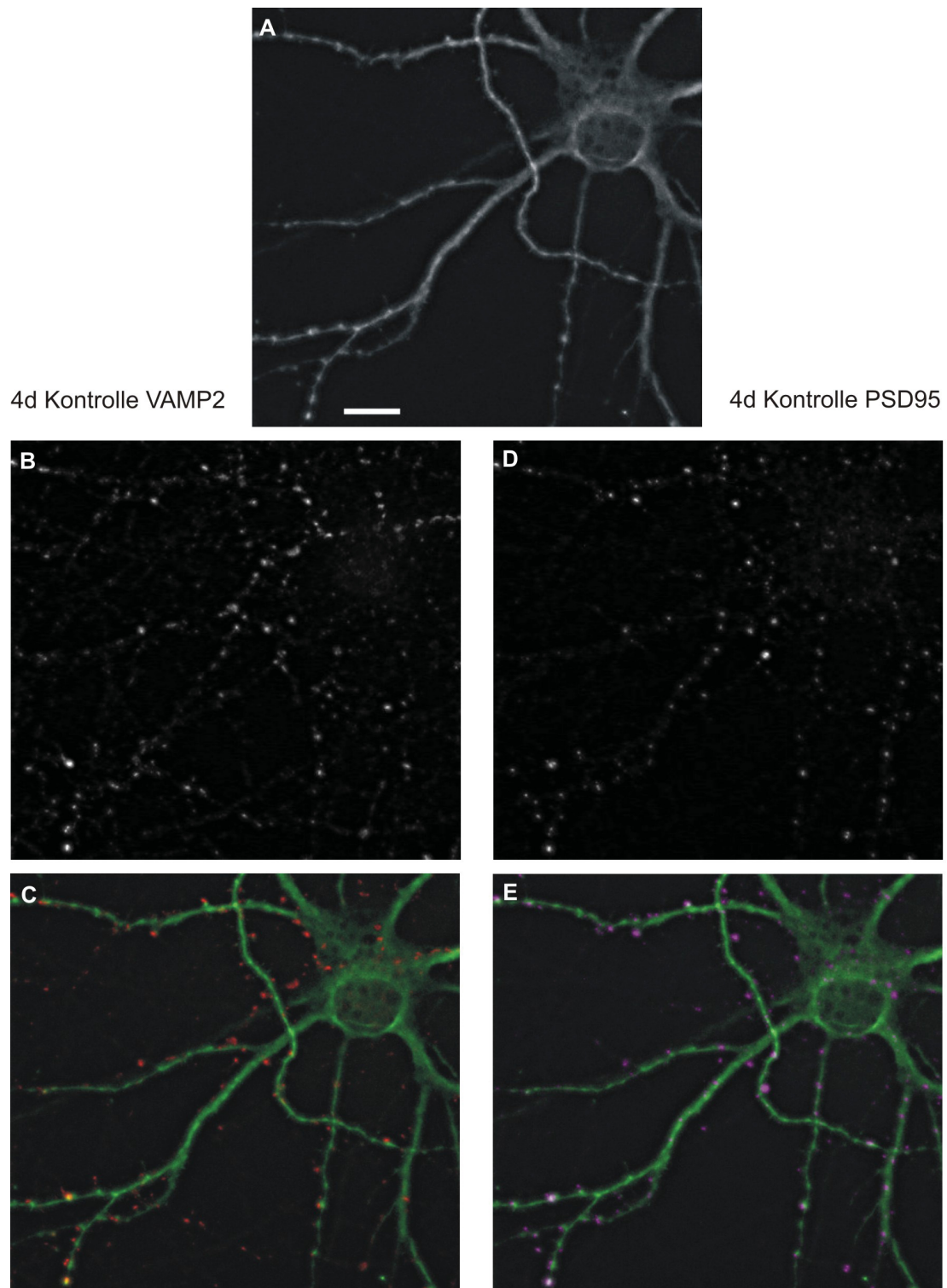
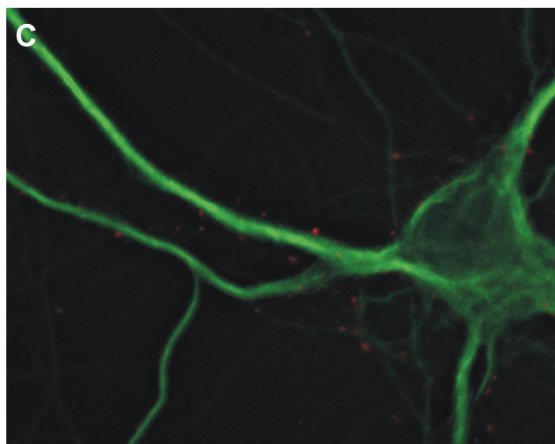
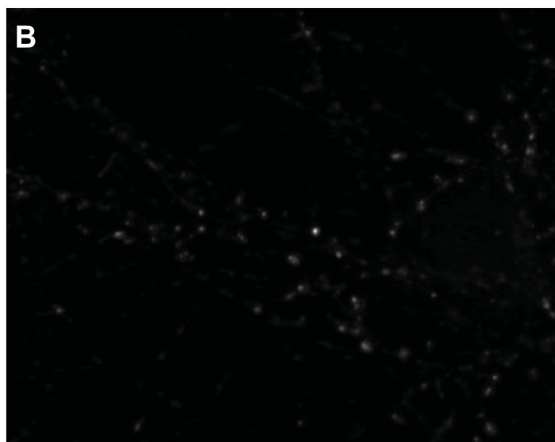
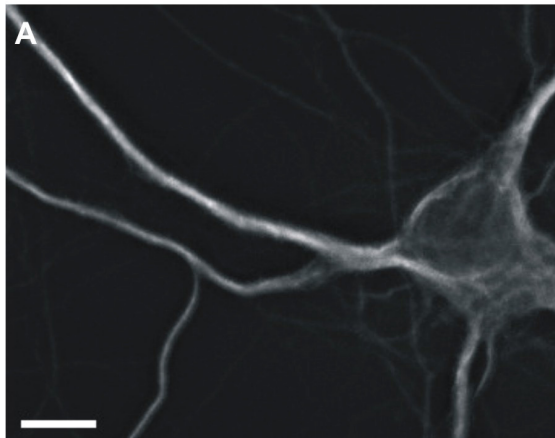


Abb. 3.3c: Immunocytochemische Färbung einer Zellkultur mit Kontrollmedium, 4 Tage Inkubation

Diese Abbildung zeigt ein Neuron an Tag 4 nach Medienwechsel mit Kontrollmedium. Balkenlänge: 5µm; Objektiv: 63x. **A)** zeigt eine ausgewählte Region der MAP2-Färbung. In **B)** ist die VAMP2-Färbung der gleichen Region abgebildet. **C)** zeigt ein *Overlay* von MAP2- und VAMP2-Färbung. Entsprechend zeigt **D)** die ROI mit PSD95-Färbung und **E)** das *Overlay* von PSD95 mit MAP2. Die *Puncta* sind gut mit den Dendriten kolokalisiert.

4d 7PA2 KM VAMP2



4d7Pa2 KM PSD95

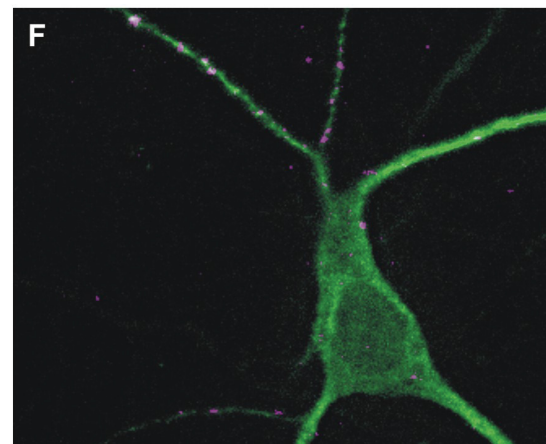
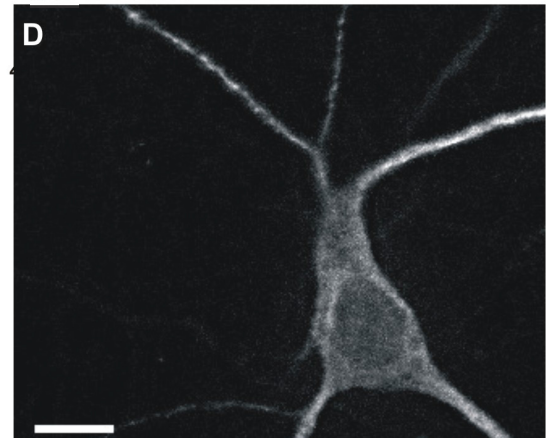


Abb. 3.3d: Immuncytochemische Färbung einer Zellkultur mit 7PA2 KM, 4 Tage Inkubation

Diese Abbildung zeigt Neurone an Tag 4 nach Medienwechsel mit 7PA2 KM. Balkenlänge: 5µm; Objektiv: 63x. **A)** zeigt eine ausgewählte ROI der MAP2-Färbung. In **B)** ist die VAMP2-Färbung der gleichen Region abgebildet. **C)** zeigt ein *Overlay* von MAP2- und VAMP2-Färbung. Entsprechend ist in **D)-F)** eine Färbung von PSD95 abgebildet. Auch hier sind die *Puncta* gut mit den Dendriten kolokalisiert. Es zeigt sich eine Verringerung der VAMP2 *Puncta*-Dichte.

3.1.2. Quantitative Auswertung der immunocytochemischen Färbungen

Zur Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale wurden von jedem ausgewählten Neuron 3-5 somanahe (proximale) Dendritenabschnitte ausgewählt und mit MetaMorph (Visitron Systems) bearbeitet (siehe 2.3.2.2.). Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen die ROI nach abgeschlossener Bearbeitung. Die ROI wurden auf folgende Parameter hin ausgewertet: Dichte (*Puncta*/ 10µm Dendrit), Fläche (µm²) und Gesamtfluoreszenz (mittlere Pixelintensität x Fläche) der VAMP2- und PSD95 *Puncta*. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.6-3.11 graphisch dargestellt.

Nach 2 Tagen Inkubation in Kontrollmedium und 7PA2 KM zeigten sich die VAMP2 und PSD95 *Puncta* in den ROI nach Bearbeitung mit MetaMorph sehr deutlich und sind sehr gut mit dem Dendriten kolokalisiert (Abbildung 3.4). Es zeigte sich eine qualitativ gleichbleibende Dichte der *Puncta*.

Nach 4 Tagen Inkubation in Kontrollmedium und 7PA2 KM sind die einzelnen VAMP2- und PSD95 *Puncta* ebenfalls deutlich zu erkennen (Abbildung 3.5). Bei den VAMP2 *Puncta* lässt sich bereits morphologisch eine Verminderung der Anzahl der *Puncta* in 7PA2 KM im Vergleich zum Kontrollmedium feststellen.

Ergebnisse

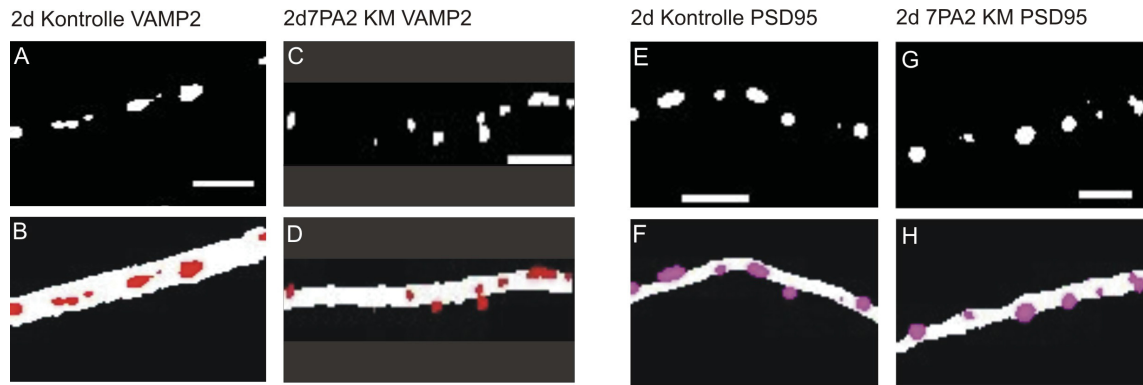


Abb. 3.4: Quantifizierung der VAMP2 und PSD95 *Puncta* der ROI, 2 Tage Inkubation mit Kontrollmedium bzw. 7PA2 KM

Diese Abbildung zeigt die immuncytochemische Färbung somanaher Dendriten an Tag 2 nach Medienwechsel mit Kontrollmedium bzw. 7PA2 KM. Die ROI wurden mit MetaMorph *threshold* bearbeitet. Balkenlänge: 5µm; Objektiv: 63x.

A) zeigt VAMP2 *Puncta* eines 22,5µm langen Dendritenabschnitts einer Kultur mit Kontrollmedium, **B)** das *Overlay* der VAMP2 *Puncta* mit dem Dendriten. Dem ist in **C)-D)** ein 19µm langer Dendritenabschnitt aus einer Kultur mit 7PA2 KM gegenübergestellt. Es zeigt sich eine gleichbleibende Dichte der *Puncta*.

E) zeigt PSD95 *Puncta* eines 20µm langen Dendritenabschnitts einer Kultur mit Kontrollmedium, **F)** das *Overlay* der PSD95 *Puncta* mit dem Dendriten. Entsprechend ist in **G)-H)** eine 24µm langer Dendritenabschnitt einer Kultur mit 7PA2 KM abgebildet. Auch hier ist eine gleichbleibende Dichte der *Puncta* zu erkennen.

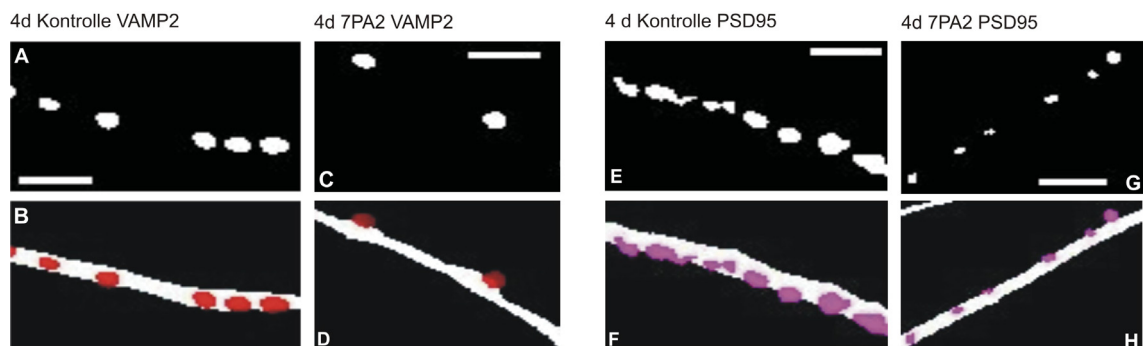


Abb. 3.5: Quantifizierung der VAMP2 und PSD95 *Puncta* der ROI, 4 Tage Inkubation mit Kontrollmedium bzw. 7PA2 KM

Diese Abbildung zeigt die immuncytochemische Färbung somanaher Dendriten an Tag 4 nach Medienwechsel mit Kontrollmedium bzw. 7PA2 KM. Die ROI wurden mit MetaMorph *threshold* bearbeitet. Balkenlänge: 5µm; Objektiv: 63x.

A) zeigt die VAMP2 *Puncta* eines 20,5µm langen Dendritenabschnitts aus einer Kultur mit Kontrollmedium, **B)** das *Overlay* der VAMP2 *Puncta* mit dem Dendriten. Dem ist in **C)-D)** ein 21µm langer Dendritenabschnitt gegenübergestellt, der aus einer Kultur mit 7PA2 KM stammt. Es ist deutlich eine verminderte Dichte der VAMP2 *Puncta* zu erkennen.

E) zeigt die PSD95 *Puncta* eines 21µm langen Dendritenabschnitts aus einer Kultur mit Kontrollmedium, **F)** das *Overlay* der PSD95 *Puncta* mit dem Dendriten. Entsprechend ist in **G)-H)** ein 22µm langer Dendritenabschnitt einer Kultur mit 7PA2 KM abgebildet. Die Dichte der PSD95 *Puncta* ist konstant.

3.1.2.1. Quantitative Auswertung der VAMP2 *Puncta*

Dichte der VAMP2 *Puncta* (*Puncta*/ 10µm Dendrit)

Die VAMP2 *Puncta* zeigten 2 Tage nach Medienwechsel eine Dichte von durchschnittlich $3,37 \pm 0,21$ / 10µm Dendrit im Kontrollmedium ($n = 24$) und $3,04 \pm 0,19$ / 10µm Dendrit im 7PA2 KM ($n = 22$). Es bestand kein signifikanter Unterschied (Abb. 3.6A).

Nach 3 Tagen hatten die Dendriten im Kontrollmedium ($n = 25$) eine etwas geringere VAMP2 *Puncta* Dichte von $2,99 \pm 0,17$ / 10µm. In 7PA2 KM ($n = 23$) war die Dichte der *Puncta* mit $2,21 \pm 0,12$ / 10µm deutlich geringer. Die verminderte Dichte der VAMP2 *Puncta* in 7PA2 KM im Vergleich zum Kontrollmedium war statistisch signifikant ($P < 0,025$, t-Test mit Bonferroni Korrektur), und in immundepletiertem 7PA2 KM ($n = 23$) nicht mehr vorhanden ($2,86 \pm 0,17$ / 10µm) (Abb.3.6B). Dies weist darauf hin, dass die Verringerung präsynaptischer Marker auf die im 7PA2 KM vorhandenen Aβ Peptide zurückzuführen ist.

Nach 4 Tagen zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied der VAMP2 *Puncta* Dichte zwischen Kontrollmedium ($3,44 \pm 0,24$ / 10 µm, $n = 25$) und 7PA2 KM ($2,82 \pm 0,19$ / 10µm, $P < 0,025$, t-Test mit Bonferroni Korrektur, $n = 24$), der durch Immundepletion ($n = 27$) aufgehoben werden konnte ($3,17 \pm 0,17$ / 10µm) (Abb.3.6C). Auch hier lässt die verminderte VAMP2 *Puncta* Dichte der Kultur in 7PA2 KM bei nicht signifikant unterschiedlicher *Puncta* Dichte in Kontrollmedium und immundepletiertem 7PA2 KM darauf Schließen, dass Aβ Peptide aus dem 7PA2 KM zum Verlust präsynaptischer Marker beitragen.

Fläche der VAMP2 *Puncta* (µm²)

Die VAMP2 *Puncta* zeigten 2 Tage nach Medienwechsel eine nicht signifikant verschiedene Fläche von durchschnittlich $1,56 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$ im Kontrollmedium ($n = 24$) und $1,20 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$ im 7PA2 KM ($n = 22$) (Abb. 3.7A).

Auch nach 3 Tagen war kein signifikanter Größenunterschied der *Puncta* zu erkennen (Kontrollmedium: $1,47 \pm 0,14 \mu\text{m}^2$ ($n = 25$), 7PA2 KM: $1,71 \pm 0,14 \mu\text{m}^2$ ($n = 23$), Immundepletion: $1,32 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$ ($n = 23$)) (Abb. 3.7B).

Ergebnisse

Nach 4 Tagen war die Fläche der VAMP2 *Puncta* von durchschnittlich $1,90 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$ im Kontrollmedium ($n = 25$) relativ zu $1,32 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$ im 7PA2 KM ($n = 24$) signifikant verringert ($P < 0,025$, t-Test mit Bonferroni Korrektur). Im immundepletierten Medium ($n = 27$) war dieser Effekt nicht zu finden ($1,80 \pm 0,19 \mu\text{m}^2$) (Abb. 3.7C), was erneut ein Hinweis darauf ist, dass der Effekt auf A β Peptide zurückzuführen ist.

Ergebnisse

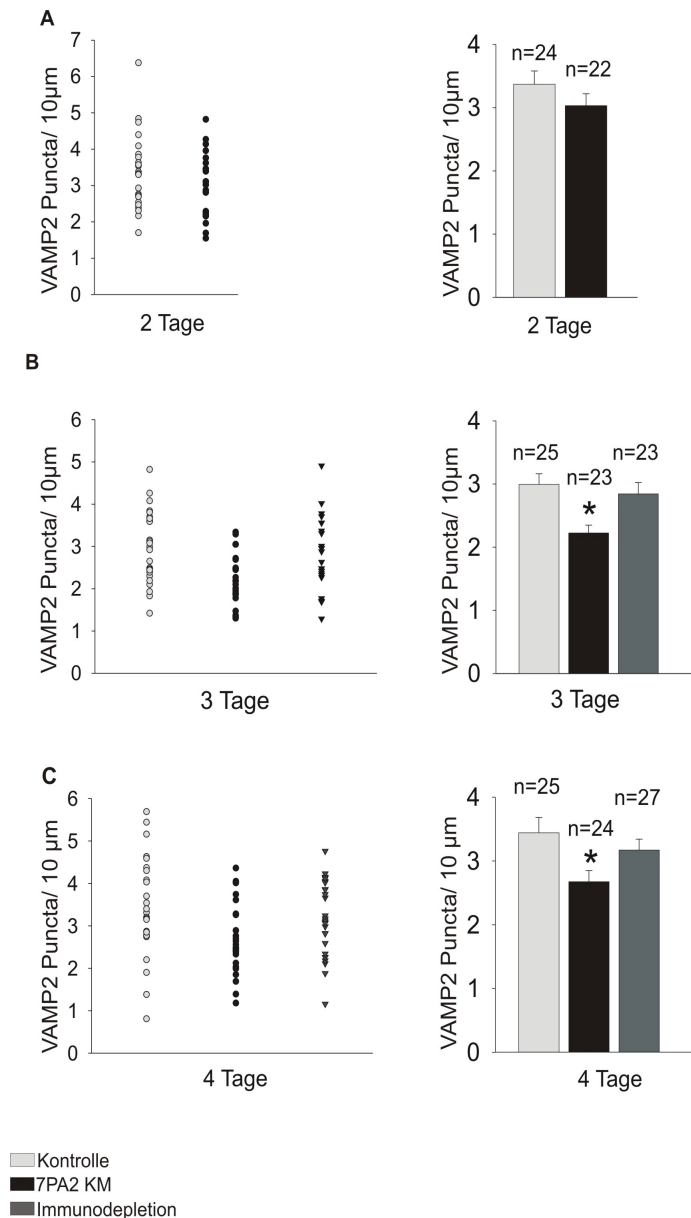


Abb. 3.6: Quantitative Auswertung der Dichte der VAMP2 *Puncta*

Einzeldarstellung der ROI links, Balkendiagramm mit Standardfehler rechts davon. Dargestellt sind Daten von Zellen aus Kontrollmedium (hellgrau), 7PA2 KM (schwarz) sowie immundepletiertem 7PA2 KM (dunkelgrau). Die Dichte der VAMP2 *Puncta* ist angegeben in *Puncta*/ 10µm Dendritenlänge. Zur statistischen Auswertung wurde in A) der t-Test verwendet, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde. In B) und C) wurde der t-Test mit Bonferroni Korrektur verwendet, wobei $P < 0,025$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde.

A) Anzahl der mit dem Dendriten kolokalisierten VAMP2 *Puncta* auf 10µm Dendritenlänge nach 2 Tagen Inkubation. Es war zwischen den verschiedenen Konditionen keine signifikante Veränderung der Dichte der *Puncta* festzustellen.

B) Dichte der VAMP2 *Puncta* an Tag 3. Zu erkennen ist ein signifikanter Abfall der *Puncta* Dichte in der 7PA2 Zellkultur gegenüber Kontrollmedium und Immunodepletion ($P < 0,025$, t-Test mit Bonferroni Korrektur). Dies lässt darauf schließen, dass der Effekt auf die im 7PA2 KM vorhandenen Aβ Peptide zurückzuführen ist.

C) Auch an Tag 4 war die VAMP2 *Puncta*-Dichte in 7PA2 KM signifikant gegenüber Kontrollmedium und immundepletiertem 7PA2 KM erniedrigt ($P < 0,025$, t-Test mit Bonferroni Korrektur).

Ergebnisse

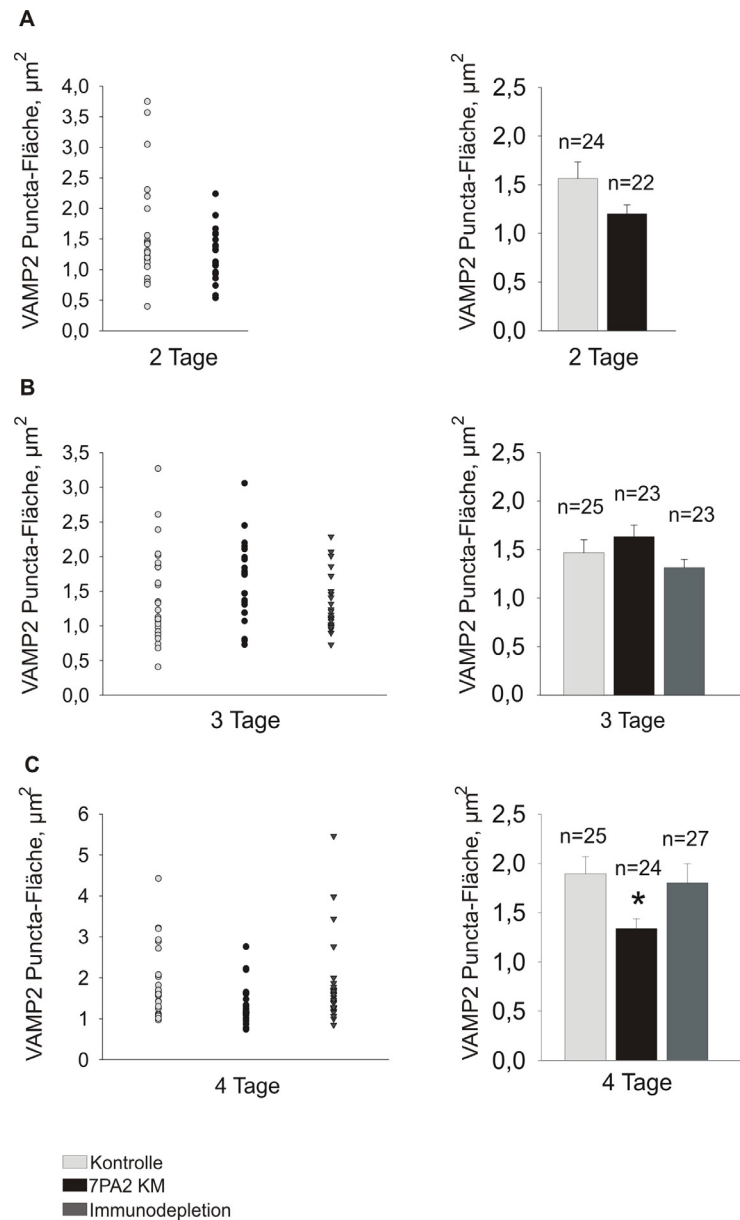


Abb. 3.7: Quantitative Auswertung der Fläche der VAMP2 *Puncta*

Einzeldarstellung der ROI links, das dazugehörige Balkendiagramm mit Standardfehler rechts davon. Dargestellt sind Daten von Zellen aus Kontrollmedium, 7PA2 KM sowie immunodepletiertem 7PA2 KM. Die Fläche der *Puncta* ist in μm^2 angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde in A) der t-Test verwendet, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde. In B) und C) wurde der t-Test mit Bonferroni Korrektur verwendet, wobei $P < 0,025$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde.

A) Fläche der VAMP2 *Puncta* nach 2 Tagen Inkubation. Die Fläche der VAMP2 *Puncta* von Zellen in Kontrollmedium war nicht signifikant verschieden verglichen mit der Fläche der VAMP2 *Puncta* von Zellen in 7PA2 KM.

B) Fläche der VAMP2 *Puncta* an Tag 3. Hier ließ sich zwischen den 3 Konditionen kein signifikanter Unterschied feststellen.

C) Fläche der VAMP2 *Puncta* an Tag 4. Die Fläche ist in 7PA2 KM signifikant gegenüber Kontrollmedium und immunodepletiertem 7PA2 KM verringert.

Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* (mittlere Pixelintensität x Pixelanzahl, A.U.)

Die Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* zeigte nach 2 Tagen ein tendenzielles Absinken in 7PA2 KM ($656,19 \pm 132,52$ A.U., $n = 24$) im Vergleich zum Kontrollmedium ($1349,71 \pm 326,61$ A.U., $n = 22$), dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 3.8A).

Nach 3 Tagen war die Gesamtfluoreszenz in 7PA2 KM signifikant geringer ($1893,47 \pm 294,26$ A.U. im Kontrollmedium ($n = 25$) relativ zu $1331,20 \pm 299,03$ A.U. im 7PA2 KM ($n = 23$, $P < 0,025$, t-Test mit Bonferroni Korrektur)). Durch Immundepletion des 7PA2 KM ($n = 23$) wurde der Effekt aufgehoben ($1742,18 \pm 234,18$ A.U.) (Abb. 3.8B).

Diese Signifikanz war zwar nach 4 Tagen nicht vorhanden, jedoch zeigte sich wieder eine tendenziell deutlich geringere Gesamtfluoreszenz im 7PA2 KM gegenüber Kontrolle und Immundepletion (Kontrolle $2306,13 \pm 447,07$ A.U., 7PA2 KM $1753,04 \pm 394,8$ A.U., Immundepletion $2910,02 \pm 486,34$ A.U.) (Abb. 3.8C).

Ergebnisse

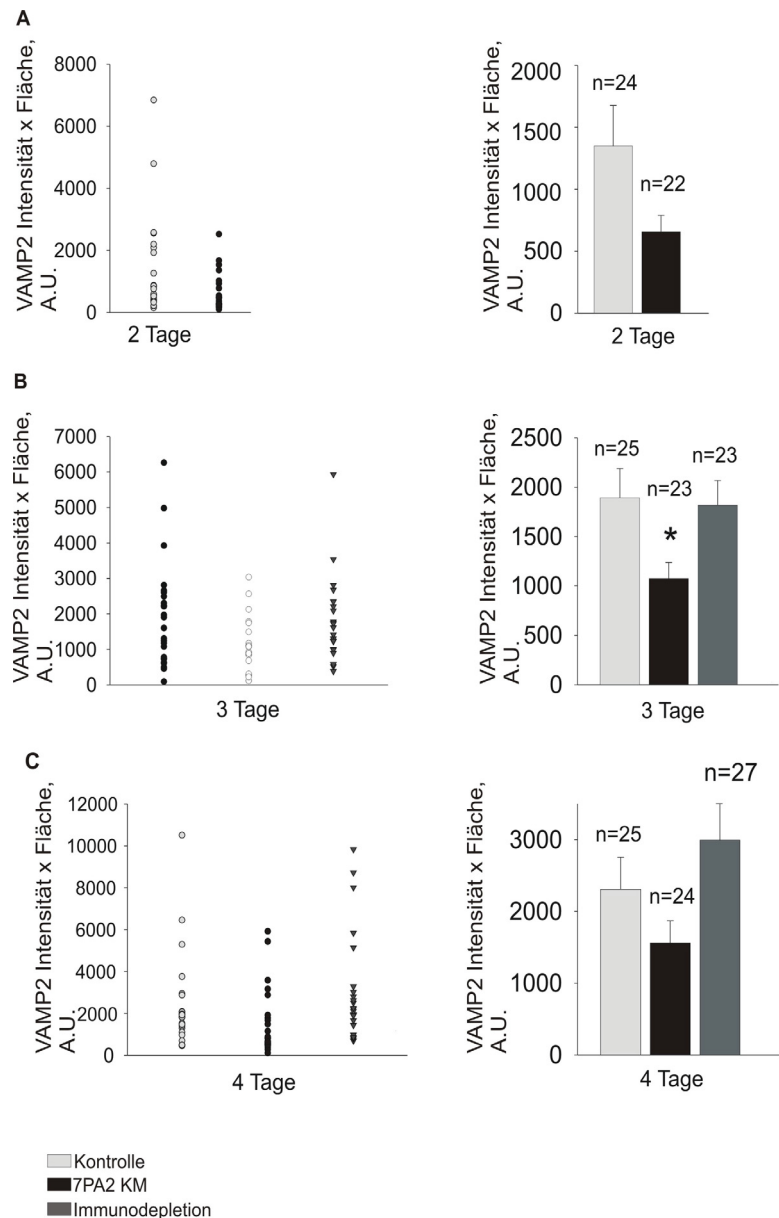


Abb. 3.8: Quantitative Auswertung der Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta*

Einzeldarstellung der ROI links, das dazugehörige Balkendiagramm mit Standardfehler rechts davon. Dargestellt sind Daten von Zellen aus Kontrollmedium, 7PA2 KM, sowie immunodepletiertem 7PA2 KM. Zur Berechnung der Gesamtfluoreszenz wurde das Produkt aus mittlerer Pixelintensität und Zahl der Pixel (Fläche) der VAMP2 *Puncta* gebildet und ist in A.U. Angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde in A) der t-Test verwendet, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde. In B) und C) wurde der t-Test mit Bonferroni Korrektur verwendet, wobei $P < 0,025$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde.

A) Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* nach 2 Tagen Inkubation. Die tendenziell niedrigeren Werte für die Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* in 7PA2 KM gegenüber Kontrollmedium zeigten keine statistische Signifikanz.

B) Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* nach 3 Tagen Inkubation. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* bei Zellen in 7PA2 KM gegenüber Zellen aus Kontrollmedium und immunodepletiertem 7PA2 KM.

C) Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* nach 4 Tagen Inkubation. Die Werte zeigten eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Verringerung der Gesamtfluoreszenz der *Puncta* in 7PA2 KM.

3.1.2.2. Quantitative Auswertung der PSD95 *Puncta*

Dichte der PSD95 *Puncta* (*Puncta*/ 10µm Dendrit)

2 Tage nach Medienwechsel zeigte sich eine *Puncta* Dichte von durchschnittlich $3,41 \pm 0,16$ / 10µm Dendrit im Kontrollmedium (n = 24) und $3,09 \pm 0,17$ / 10µm im 7PA2 KM (n = 22) (Abb. 3.9A).

Nach 3 Tagen hatten die Dendriten eine PSD95 *Puncta* Dichte von $3,14 \pm 0,24$ / 10µm im Kontrollmedium (n = 25), eine tendenzielle aber nicht signifikant niedrigere Dichte von $2,64 \pm 0,13$ / 10µm im 7PA2 KM (n = 23) und eine Dichte von $3,14 \pm 0,21$ / 10µm im immundepletierten 7PA2 KM (n = 23) (Abb. 3.9B).

Nach 4 Tagen zeigte sich eine *Puncta*-Dichte im Kontrollmedium (n = 25) von $3,31 \pm 0,20$ / 10µm, im 7PA2 KM (n = 24) von $2,82 \pm 0,15$ / 10µm und im immundepletierten 7PA2 KM (n = 25) von $2,67 \pm 0,25$ / 10 µm (Abb. 3.9C).

Keine der beschriebenen Unterschiede in der Dichte der PSD95 *Puncta* war statistisch signifikant.

Fläche der PSD95 *Puncta* (µm²)

Die Fläche der PSD95 *Puncta* war insgesamt etwas geringer als die der VAMP2 *Puncta* und zeigte an Tag 2 keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen (Kontrollmedium: $0,93 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$ (n = 24), 7PA2 KM: $0,78 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ (n = 22)) (Abb. 3.10A).

Auch an Tag 3 konnten keine signifikanten Größenunterschiede in den PSD95 *Puncta* festgestellt werden (Kontrollmedium: $1,00 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ (n = 25), 7PA2 KM: $0,90 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ (n = 23), Immundepletion: $0,79 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$ (n = 23)) (Abb. 3.10B).

Nach 4 Tagen war die Fläche der PSD95 *Puncta* im Kontrollmedium ($0,98 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$, n = 25) und 7PA2 KM ($0,86 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$, n = 25) nicht signifikant unterschiedlich, in der Immundepletion (n = 24) zeigte sich eine signifikante Größenreduktion auf $0,70 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ (p = < 0,025, t-Test mit Bonferroni Korrektur) (Abb. 3.10C). Dies deutet auf unspezifische, nicht durch Aβ verursachte Auswirkungen des 7PA2-Zellüberstandes auf die Zellkultur hin.

Ergebnisse

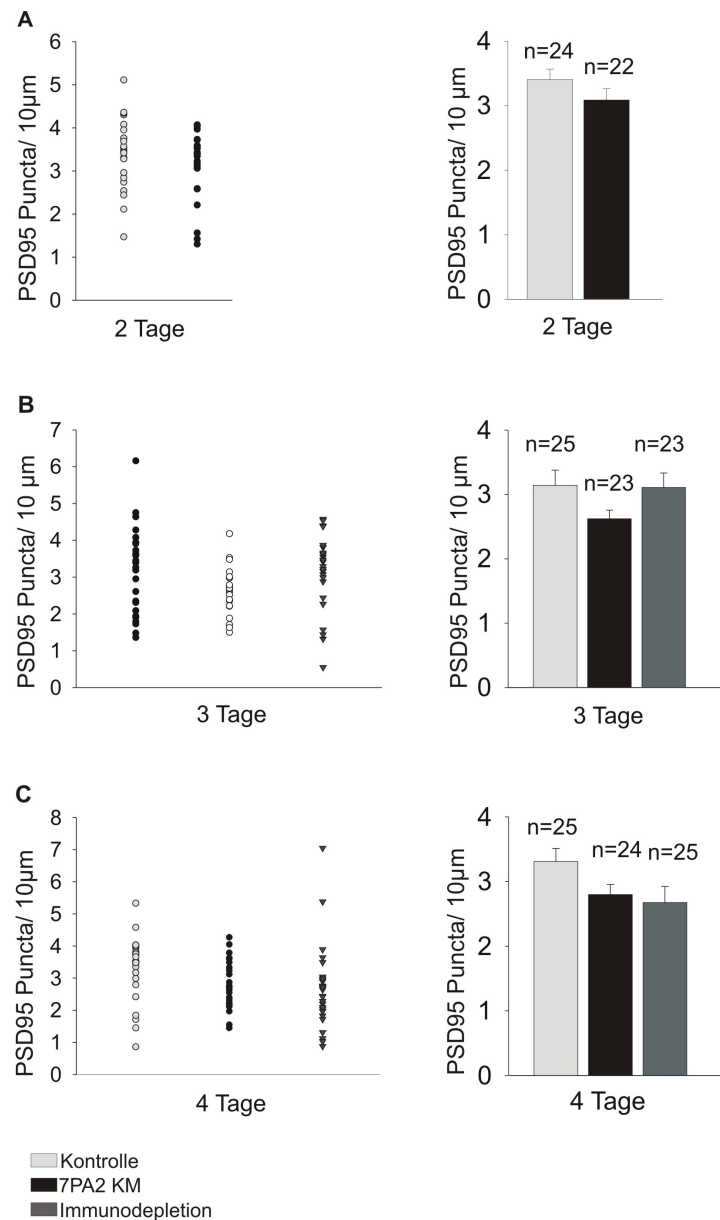


Abb. 3.9: Quantitative Auswertung der Dichte der PSD95 Puncta

Einzeldarstellung der ROI links, das dazugehörige Balkendiagramm mit Standardfehler rechts davon. Dargestellt sind Daten von Zellen aus Kontrollmedium, 7PA2 KM, sowie immundepletiertem 7PA2 KM. Die Dichte der PSD95 Puncta ist angegeben in Puncta/ 10µm Dendritenlänge. Zur statistischen Auswertung wurde in **A)** der t-Test verwendet, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde. In **B)** und **C)** wurde der t-Test mit Bonferroni Korrektur verwendet, wobei $P < 0,025$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde.

A) An Tag 2 waren keine signifikanten Unterschiede der Dichte der PSD95 Puncta in den verschiedenen Konditionen festzustellen.

B) Auch an Tag 3 war die Dichte der PSD95 Puncta bei den verschiedenen Konditionen nicht signifikant verschieden.

C) Die verschiedenen Konditionen zeigen auch an Tag 4 keine signifikanten Unterschiede in der Dichte der PSD95 Puncta.

Ergebnisse

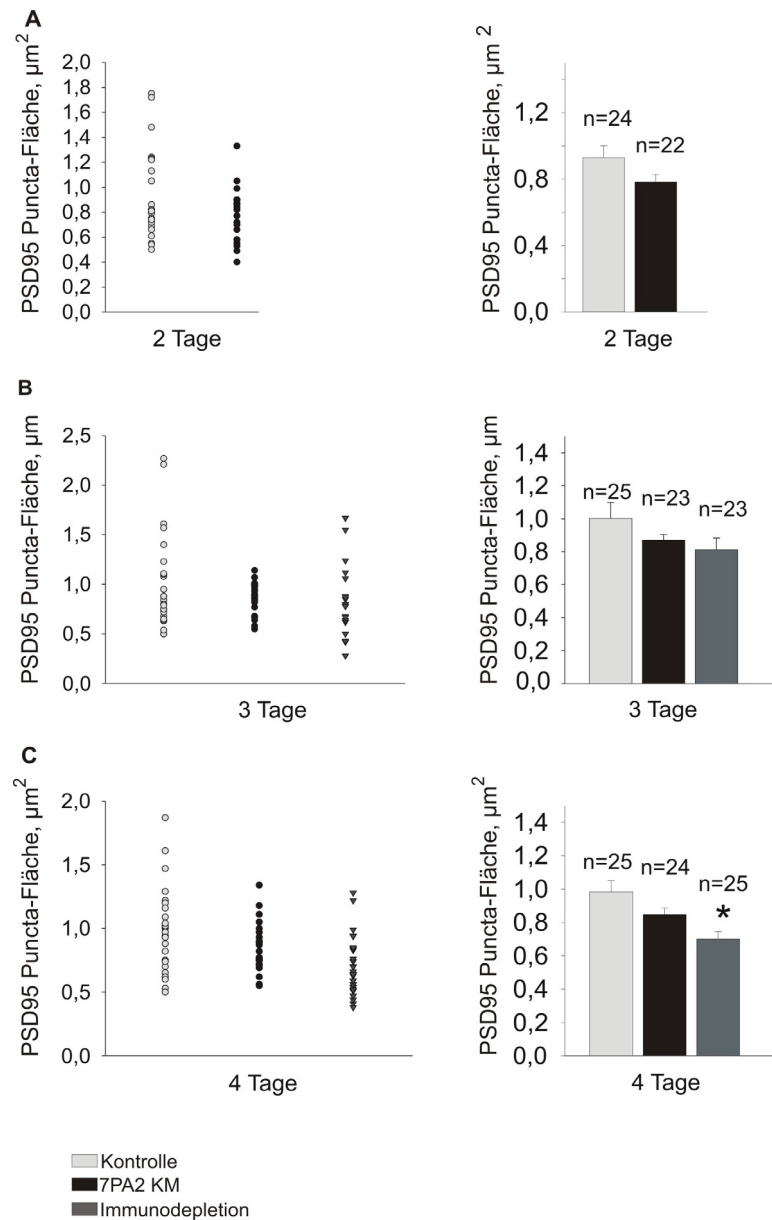


Abb. 3.10: Quantitative Auswertung der Fläche der PSD95 *Puncta*

Einzeldarstellung der ROI links, das dazugehörige Balkendiagramm mit Standardfehler rechts davon. Dargestellt sind Daten von Zellen aus Kontrollmedium, 7PA2 KM, sowie immunodepletiertem 7PA2 KM. Die Fläche der *Puncta* ist in μm^2 angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde in **A)** der t-Test verwendet, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde. In **B)** und **C)** wurde der t-Test mit Bonferroni Korrektur verwendet, wobei $P < 0,025$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde.

A) Es ist zu erkennen, dass die Fläche der PSD95 *Puncta* 2 Tage nach 7PA2 KM-Applikation nicht statistisch signifikant verändert ist.

B) Nach 3 Tagen ist die Fläche der PSD95 *Puncta* in allen 3 Konditionen nicht signifikant verschieden.

C) Nach 4 Tagen zeigt sich in immunodepletierten 7PA2 KM eine signifikant reduzierte Fläche der PSD95 *Puncta*. Dies deutet auf unspezifische Effekte des 7PA2 KM auf die Zellkultur hin.

Gesamtfluoreszenz der PSD95 *Puncta* (mittlere Pixelintensität x Pixelanzahl (Fläche), A. U.)

Die Gesamtfluoreszenz der PSD95 *Puncta* war im Vergleich zur Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* sehr viel geringer. Sie zeigte nach 2 Tagen einen gegenüber der Kontrolle ($408,41 \pm 51,66$ A.U., $n = 24$) signifikant geminderten Wert im 7PA2 KM ($175,62 \pm 17,62$ A.U., $n = 22$, $P < 0,05$) (Abb. 3.10A).

Nach 3 Tagen betrug die Gesamtfluoreszenz der Kontrolle ($n = 25$) $340,14 \pm 35,06$ A.U. und des 7PA2 KM ($n = 23$) $250,27 \pm 45,97$ A.U.. Die Immundepletion ($n = 23$) zeigte demgegenüber einen signifikant verminderten Wert von $204,54 \pm 23,95$ A.U. ($P < 0,025$, t-Test mit Bonferroni Korrektur) (Abb. 3.10B).

Nach 4 Tagen bestand zwischen Kontrolle ($365,89 \pm 52,69$ A.U., $n = 25$) und 7PA2 KM ($140,64 \pm 17,53$ A.U., $n = 24$) ein signifikanter Unterschied der Gesamtfluoreszenz ($P < 0,025$, t-Test mit Bonferroni Korrektur), der durch Immundepletion ($230,56 \pm 29,14$ A.U., $n = 25$) zum Teil reduziert war (Abb. 3.10C). Da auch nach Immundepletion eine signifikante Reduktion der Gesamtfluoreszenz der PSD95 *Puncta* sichtbar war, können hier unspezifische Effekte des 7PA2 KM nicht ausgeschlossen werden.

Ergebnisse

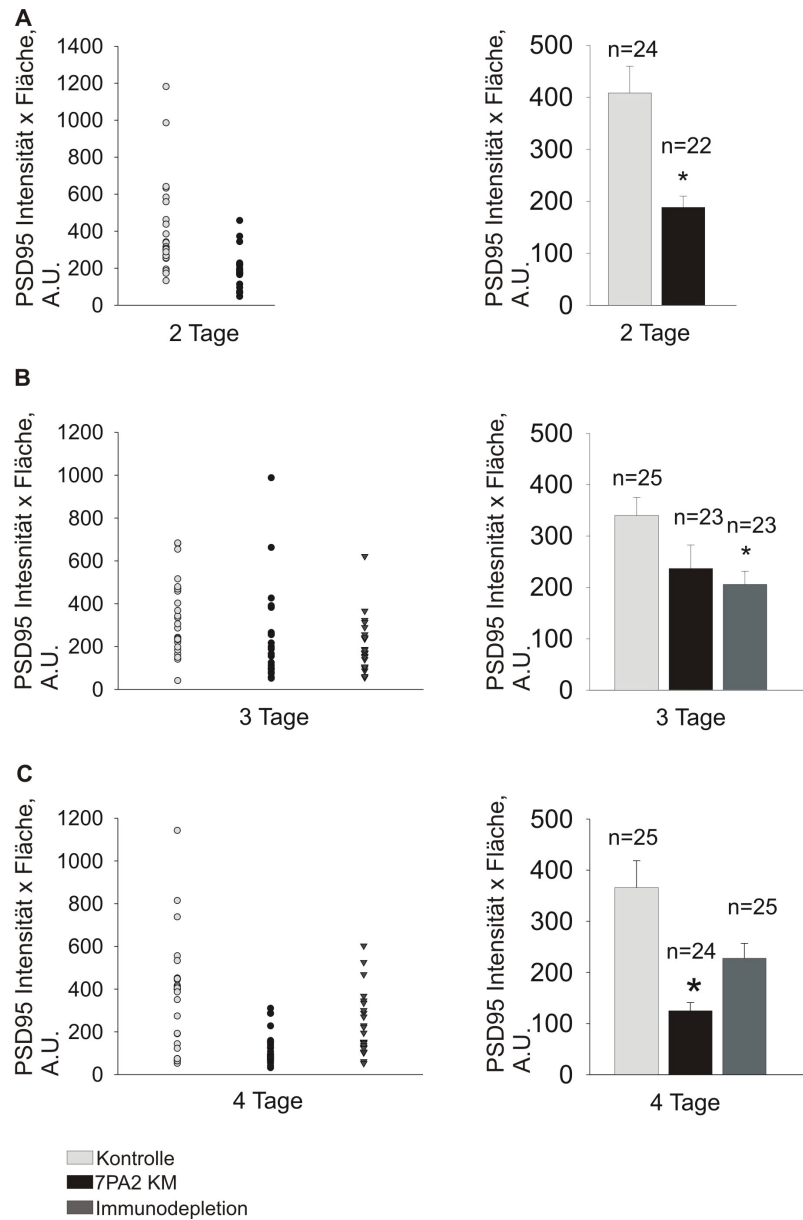


Abb 3.11: Quantitative Auswertung der Gesamtfluoreszenz der PSD95 *Puncta*

Einzeldarstellung der ROI links, das dazugehörige Balkendiagramm mit Standardfehler rechts davon. Dargestellt sind Daten von Zellen aus Kontrollmedium, 7PA2 KM, sowie immundepletiertem 7PA2 KM. Zur Berechnung der Gesamtfluoreszenz wurde das Produkt aus mittlerer Pixelintensität und Fläche der PSD95 *Puncta* gebildet und ist in A.U. angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde in **A**) der t-Test verwendet, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde. In **B**) und **C**) wurde der t-Test mit Bonferroni Korrektur verwendet, wobei $P < 0,025$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde.

A) In der mit 7PA2 behandelten Zellkultur zeigt sich nach 2 Tagen eine signifikante Reduktion der Gesamtfluoreszenz gegenüber der Kontrollbedingung.

B) Die Gesamtfluoreszenz in immundepletiertem 7PA2 KM ist nach 3 Tagen signifikant geringer als im Kontrollmedium und in 7PA2 KM. Im Vergleich zum Kontrollmedium zeigt außerdem die Gesamtfluoreszenz der PSD95 *Puncta* in 7PA2 KM ein tendenzielles Absinken. Dies deutet auf unspezifische Effekte des 7PA2 KM hin.

C) In 7PA2 KM zeigt sich nach 4 Tagen eine signifikant verringerte Gesamtfluoreszenz gegenüber Kontrollmedium. In immundepletiertem 7PA2 KM zeigt sich eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Regeneration der Gesamtfluoreszenz.

3.2. Effekte von A β auf kultivierte neokortikale Neurone unter Blockierung des neuronalen Adhäsionsmoleküls N-Cadherin

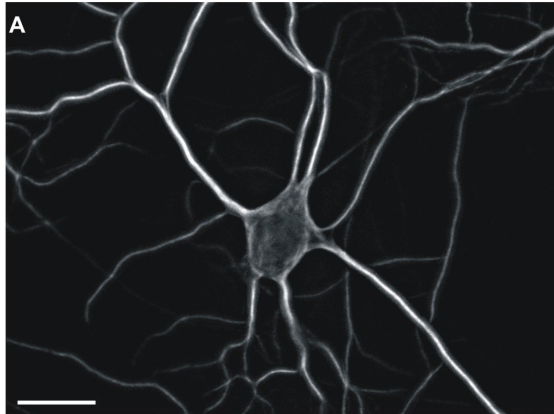
Um den Einfluss des neuronalen Adhäsionsmoleküls N-Cadherin auf den A β -Peptid-vermittelten Effekt auf die VAMP2- und PSD95 *Puncta* zu untersuchen, wurde ein weiterer Versuchsansatz gewählt. Dazu wurde nach 9 Tagen Inkubation der Zellkulturen in NB Medium bei 39°C ein Medienwechsel vorgenommen. Zu einem Teil der Zellkulturen wurde Kontrollmedium bestehend aus NB Medium gegeben. Zu den übrigen Zellkulturen wurde 7PA2 KM mit NB Medium in einer Verdünnung von 1:1 gegeben. Zusätzlich wurde zu einem Teil der Zellkulturen mit Kontrollmedium das INP Peptid zur Blockierung von N-Cadherin hinzugegeben, zum anderen Teil LV *scrambled* Kontroll-Peptid. Zu den Zellkulturen mit 7PA2 KM wurde ebenso INP- bzw. LV-Peptid hinzugegeben. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 100 μ g/ml verwendet.

Das INP-Peptid ist ein hochspezifischer und potenter Antagonist des N-Cadherins. Die adhäsiven Eigenschaften des N-Cadherins werden aufgehoben, indem durch das INP-Peptid eine kompetitive Hemmung der homophilen Bindung zweier N-Cadherin Moleküle verursacht wird (Williams et al., 2000). Das LV *scrambled* Peptid wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Dieses Peptid besteht aus den identischen Aminosäuren wie das INP-Peptid, jedoch ist die Sequenz der Aminosäuren verändert, wodurch das Peptid seine blockierende Funktion verliert.

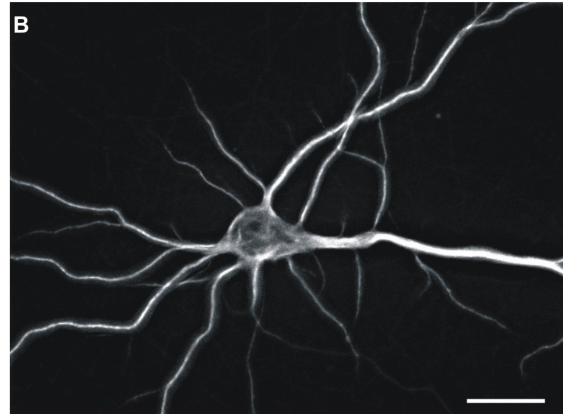
Nach zweitägiger Inkubationszeit wurden die Zellkulturen an DIV11 analog zu den vorherigen Versuchen fixiert und gefärbt (siehe 2.3.2.). Auch in dieser Versuchsreihe waren die Zellen zum Zeitpunkt der Auswertung in den verschiedenen Medien intakt und morphologisch im Hinblick auf Größe und Form von vergleichbarem Aufbau (Abb. 3.12). Die Anzahl primärer Dendriten der Neurone war in den unterschiedlichen Medien nicht signifikant verschieden (Abb. 3.13).

Ergebnisse

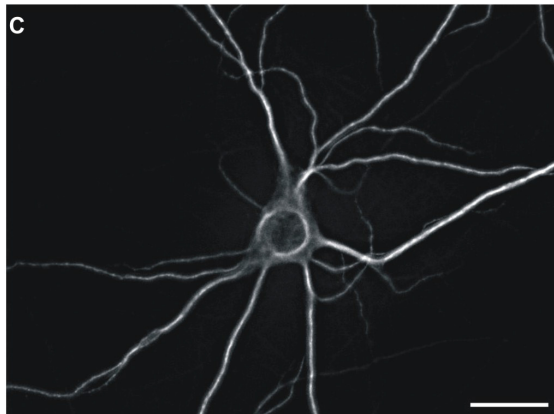
LV Kontrolle



LV 7PA2-KM



INP Kontrolle



INP 7PA2-KM

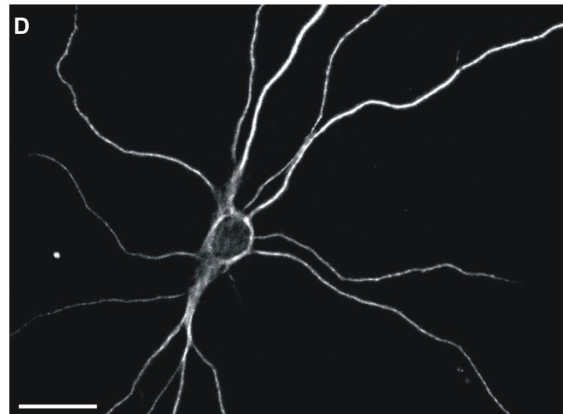


Abb. 3.12: Fluoreszenzgefärbte neocortikale Neurone, 2 Tage Inkubation

Die Abbildung zeigt eine Immunocytochemische MAP2-Färbung kultivierter neocortikaler Neurone an DIV11, bei denen an DIV 9 ein Medienwechsel mit **A)** Kontrollmedium und LV-Peptid, **B)** 7PA2 KM und LV-Peptid, **C)** Kontrollmedium und INP-Peptid und **D)** 7PA2 KM und INP-Peptid durchgeführt wurde. (Balkenlänge: 20µm; Objektiv: 63x). Die Peptide wurden in einer Konzentration von 100µg/ml verwendet. Zellsomata und Dendriten sind gut zu erkennen und in allen 4 Konditionen morphologisch intakt.

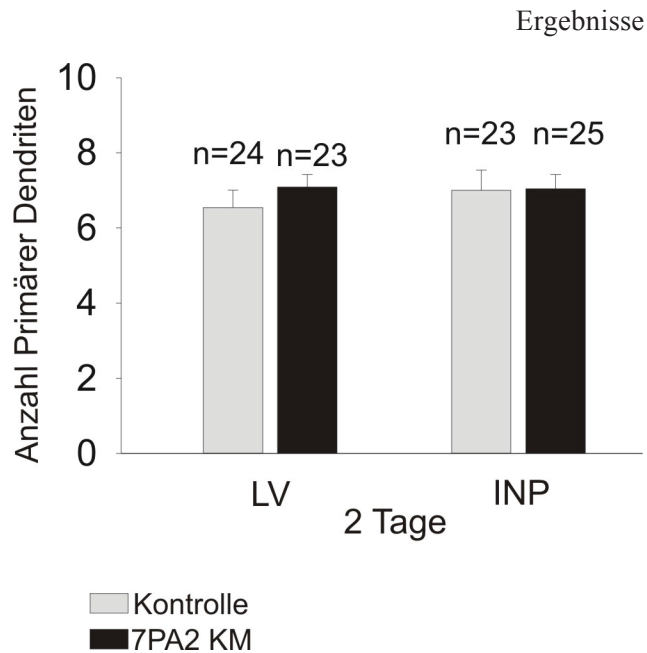


Abb. 3.13: Anzahl primärer Dendriten der Neurone in Kontrollmedium und 7PA2 KM mit Zusatz von LV- bzw. INP-Peptid

Die Anzahl der Dendriten in den Zellkulturen 2 Tage nach Medienwechsel (DIV 11) ist bei den verschiedenen Konditionen nicht signifikant verschieden.

3.2.1. Quantitative Auswertung der immuncytochemisch angefärbten synaptischen Strukturen

Wie bereits im ersten Teil der Arbeit wurden die aus Immuncytochemisch gefärbten Zellkulturen ROI ausgewählt und mithilfe eines inversen Mikroskops ein *Z-Stack* der Region angefertigt. Anschließend wurden die ROI auch in diesem Versuch mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms MetaMorph bearbeitet. Die Abbildungen 3.14 und 3.15 zeigen die ROI nach Bearbeitung. Es wurden erneut folgende Parameter untersucht: Dichte (*Puncta*/ 10µm Dendrit), Fläche (µm²) und Gesamtfluoreszenz (durchschnittliche Pixelintensität x Fläche) der VAMP2 und PSD95 *Puncta*.

In diesem Teil der Arbeit wurden die Zellen ausschließlich nach 2 Tagen Inkubation in Versuchsmedium ausgewertet, um beschleunigte Effekte von Aβ Peptiden nach Inhibition der N-Cadherin Funktion zu detektieren.

Ergebnisse

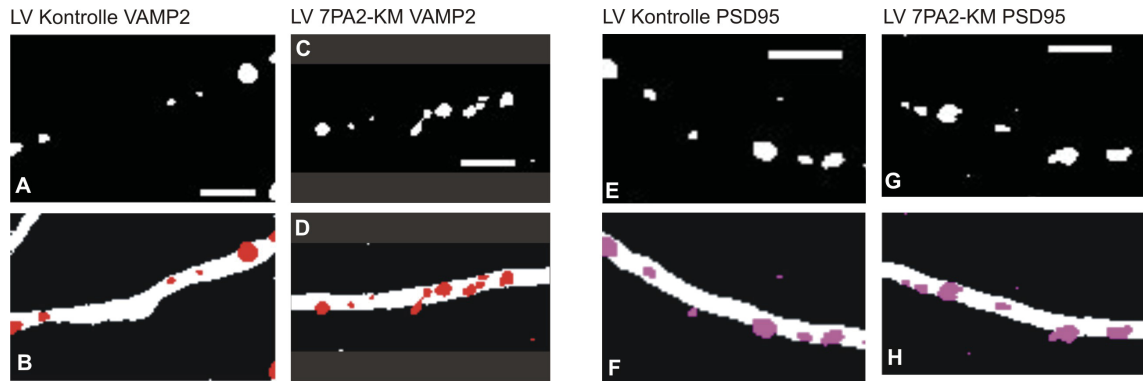


Abb. 3.14: Quantifizierung der VAMP2 und PSD95 *Puncta* der ROI bei gleichzeitiger Applikation von LV-Kontrollpeptid, 2 Tage Inkubation mit Kontrollmedium bzw. 7PA2 KM

Diese Abbildung zeigt die immuncytochemische Färbung somanaher Dendriten an Tag 2 nach Medienwechsel mit LV-Kontrollpeptid und Kontrollmedium bzw. 7PA2 KM. Die ROI wurden mit MetaMorph *threshold* bearbeitet. Balkenlänge: 5µm; Objektiv: 63x.

A) zeigt VAMP2 *Puncta* eines 25µm langen Dendritenabschnitts aus einer Kultur mit Kontrollmedium und LV-Peptid, **B)** das *Overlay* der VAMP2 *Puncta* mit dem Dendriten. Dem ist in **C)-D)** ein 19µm langer Dendritenabschnitt aus einer Kultur mit 7PA2 KM und LV-Peptid gegenübergestellt. Es zeigt sich eine gleichbleibende Dichte der *Puncta*.

E) zeigt PSD95 *Puncta* eines 20µm langen Dendritenabschnitts aus einer Kultur mit Kontrollmedium und LV-Peptid, **F)** das *Overlay* der PSD95 *Puncta* mit dem Dendriten. Entsprechend ist in **G)-H)** ein 22µm langer Dendritenabschnitt einer Kultur in 7PA2 KM mit LV-Peptid abgebildet. Auch hier ist eine gleichbleibende Dichte der *Puncta* zu erkennen.

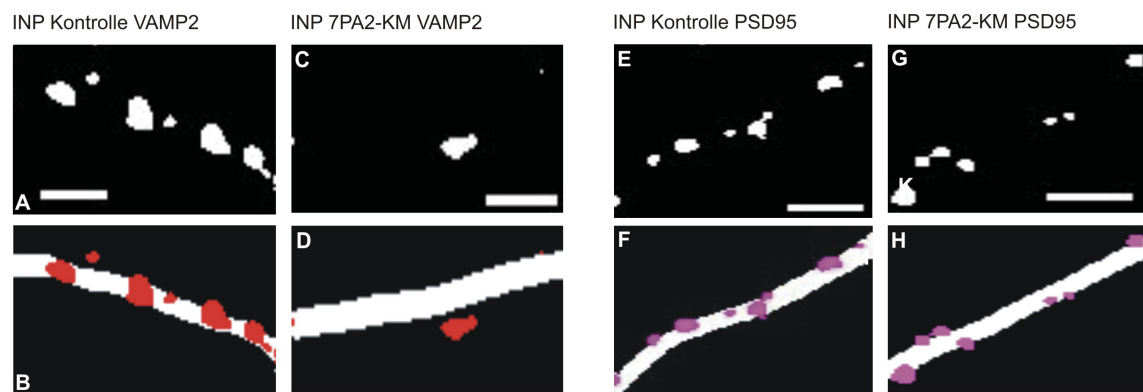


Abb. 3.15: : Quantifizierung der VAMP2 und PSD95 *Puncta* der ROI bei gleichzeitiger Applikation von INP-Peptid, 2 Tage Inkubation mit Kontrollmedium bzw. 7PA2 KM

Diese Abbildung zeigt die immuncytochemische Färbung somanaher Dendriten an Tag 2 nach Medienwechsel mit INP-Peptid und Kontrollmedium bzw. 7PA2 KM. Die ROI wurden mit MetaMorph *threshold* bearbeitet. Balkenlänge: 5µm; Objektiv: 63x.

A) zeigt die VAMP2 *Puncta* eines 19,5 µm langen Dendritenabschnitts aus einer Kultur mit Kontrollmedium und INP-Peptid, **B)** das *Overlay* der VAMP2 *Puncta* mit dem Dendriten. Dem ist in **C)-D)** ein 19,5µm langer Dendritenabschnitt aus einer Kultur mit 7PA2 KM und INP-Peptid gegenübergestellt. Zu erkennen ist, dass die Dichte der VAMP2 *Puncta* in 7PA2 KM und INP-Peptid geringer ist als in Kontrollmedium und INP-Peptid.

E) zeigt PSD95 *Puncta* eines 21,5µm langen Dendritenabschnitts aus einer Kultur mit Kontrollmedium und INP-Peptid, **F)** das *Overlay* der PSD95 *Puncta* mit dem Dendriten. Entsprechend ist in **G)-H)** eine 19µm langer Dendritenabschnitt einer Kultur mit 7PA2 KM und INP-Peptid abgebildet. Die Dichte der *Puncta* ist konstant.

3.2.1.1. Quantitative Auswertung der VAMP2 *Puncta*

Mit LV-Kontrollpeptid inkubiert zeigten die Dendriten 2 Tage nach Medienwechsel eine Dichte der VAMP2 *Puncta* von durchschnittlich $2,98 \pm 0,14 / 10 \mu\text{m}$ Dendrit im Kontrollmedium ($n = 26$) und $2,75 \pm 0,15 / 10 \mu\text{m}$ Dendrit im 7PA2 KM ($n = 22$). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Dichte der VAMP2 *Puncta*.

Mit INP-Peptid behandelte Neurone zeigten im Kontrollmedium ($n = 24$) eine VAMP2 *Puncta* Dichte von $3,46 \pm 0,11 / 10 \mu\text{m}$ und im 7PA2 KM ($n = 26$) eine signifikant niedrigere *Puncta* Dichte von $2,86 \pm 0,22 / 10 \mu\text{m}$ ($P < 0,05$, t-Test) (Abb. 14A).

In Medium mit LV-Kontrollpeptid zeigten die VAMP2 *Puncta* in Kontrollmedium ($n = 26$) eine Fläche von $1,90 \pm 0,15 \mu\text{m}^2$ und in 7PA2 KM ($n = 22$) eine Fläche von $1,77 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$. Dies entsprach keinem signifikanten Unterschied.

In Medium mit INP-Peptid hatten die VAMP2 *Puncta* eine Fläche von $2,28 \pm 0,20 \mu\text{m}^2$ in Kontrollmedium ($n = 24$) und in 7PA2 KM ($n = 26$) eine signifikant geringere Größe von $1,52 \pm 0,11 \mu\text{m}^2$ ($P < 0,05$, t-Test) (Abb. 14B)

Die Gesamtintensität der VAMP2 *Puncta* der mit LV-Kontrollpeptid behandelten Neuronen ergab in Kontrollmedium ($n = 26$) einen Mittelwert von $2682,11 \pm 323,48$ A.U. und in 7PA2 KM ($n = 22$) einen signifikant niedrigeren Mittelwert der Gesamtintensität von $1785,72 \pm 192,69$ A.U. ($P < 0,05$, t-Test). Dies deutet darauf hin, dass unspezifische Wirkungen der Peptidinkubation auf die Fluoreszenzintensität nicht ausgeschlossen werden können.

In Medium mit INP-Peptid ergab sich für die Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* in Kontrollmedium ($n = 24$) ein Mittelwert von $2868,54 \pm 284,24$ A.U. und ein ebenfalls signifikant niedrigerer Mittelwert der Gesamtintensität von $1970,79 \pm 197,98$ A.U. in 7PA2 KM ($n = 26$, $P < 0,05$, t-Test) (Abb. 14C).

Insgesamt konnte somit eine beschleunigte Wirkung von A β Peptid nach Inhibition der N-Cadherin Funktion bereits nach 2 Tagen Inkubation in 7PA2 KM beobachtet werden.

Ergebnisse

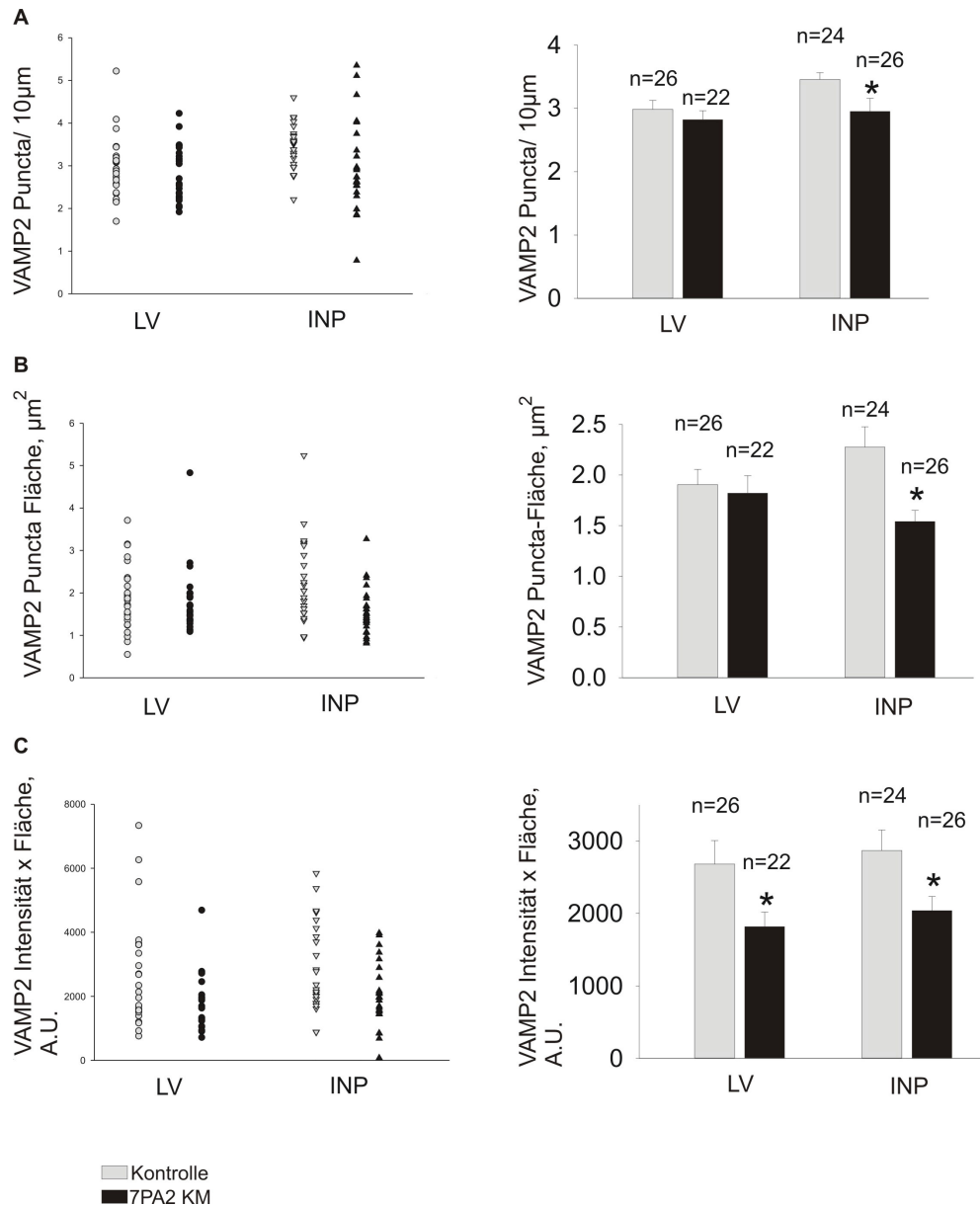


Abb. 3.16: Auswirkung von 7PA2 KM auf VAMP2 *Puncta* unter Einfluss von LV- und INP-Peptid, 2 Tage Inkubation

Zellen aus Kontrollmedium (grau) und 7PA2 KM (schwarz) an Tag 2 nach Medienwechsel. Punktdiagramm zur Darstellung der Werte der einzelnen ROI links, das dazugehörige Balkendiagramm rechts davon. Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test verwendet, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde.

A) Anzahl der mit dem Dendriten kolokalisierten VAMP2 *Puncta* auf 10µm. Unter Einfluss von INP-Peptid ist die Dichte der VAMP2 *Puncta* in 7PA2 KM im Vergleich zur Kontrolle signifikant erniedrigt. Die Zugabe von LV-Kontrollpeptid zu Kontrollmedium und 7PA2 KM zeigte diesen Effekt nicht.

B) Fläche der VAMP2 *Puncta* (µm²). Unter Einfluss von INP-Peptid ist die Fläche der VAMP2 *Puncta* in 7PA2 KM im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert. Die Zugabe von LV-Kontrollpeptid zu Kontrollmedium und 7PA2 KM zeigte diesen Effekt nicht.

C) Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* (Produkt aus mittlerer *Punctaintensität* und Pixelanzahl (Fläche der *Puncta*), A.U.). In 7PA2 KM ist die Gesamtintensität sowohl mit Zugabe von LV- als auch von INP-Peptid signifikant vermindert.

3.2.1.2. Quantitative Auswertung der PSD95 *Puncta*

In Medium mit LV-Kontrollpeptid zeigten die Dendriten eine Dichte der PSD95 *Puncta* von $3,29 \pm 0,19 / 10 \mu\text{m}$ im Kontrollmedium ($n = 26$) und $2,79 \pm 0,15 / 10 \mu\text{m}$ im 7PA2 KM ($n = 22$). Dies entsprach keiner signifikanten Abweichung.

Mit INP-Peptid behandelte Dendriten zeigten im Kontrollmedium ($n = 24$) eine PSD95 *Puncta* Dichte von $3,17 \pm 0,19 / 10 \mu\text{m}$ und im 7PA2 KM ($n = 26$) eine Dichte von $2,60 \pm 0,19 / 10 \mu\text{m}$. Auch mit INP-Peptid waren Unterschiede in der Dichte der PSD95 *Puncta* nicht signifikant (Abb. 15A).

In Medium mit LV-Kontrollpeptid zeigten die PSD95 *Puncta* in Kontrollmedium ($n = 26$) eine Fläche von $0,98 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$, in 7PA2 KM ($n = 22$) eine Fläche von $0,97 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$. Es bestand kein signifikanter Unterschied.

In INP-Peptid betrug die Fläche der PSD95 *Puncta* in Kontrollmedium ($n = 24$) $1,16 \pm 0,12 \mu\text{m}^2$ und in 7PA2 KM ($n = 26$) $0,85 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$, was einer signifikanten Reduktion der Fläche der PSD95 *Puncta* entsprach ($P < 0,05$, t-Test) (Abb. 15B). Dies war vermutlich auf unspezifische Effekte des 7PA2 KM zurückzuführen, da in den Vorversuchen ein unspezifischer Effekt nicht ausgeschlossen werden konnte.

Die Gesamtintensität der PSD95 *Puncta* ergab in Medium mit LV-Kontrollpeptid ein Mittelwert von $431,41 \pm 37,47$ A.U. in Kontrollmedium ($n = 26$) und $383,66 \pm 54,12$ A.U. in 7PA2 KM ($n = 22$). Der Unterschied war nicht signifikant.

In Medium mit INP-Peptid ergaben sich für die Gesamtintensität der PSD95 *Puncta* Mittelwerte von $499,11 \pm 59,57$ A.U. in Kontrollmedium ($n = 24$) und $363,49 \pm 45,35$ A.U., in 7PA2 KM ($n = 26$). Die Unterschiede in der Gesamtfluoreszenz der PSD95 *Puncta* waren statistisch nicht signifikant (Abb. 15C).

Ergebnisse

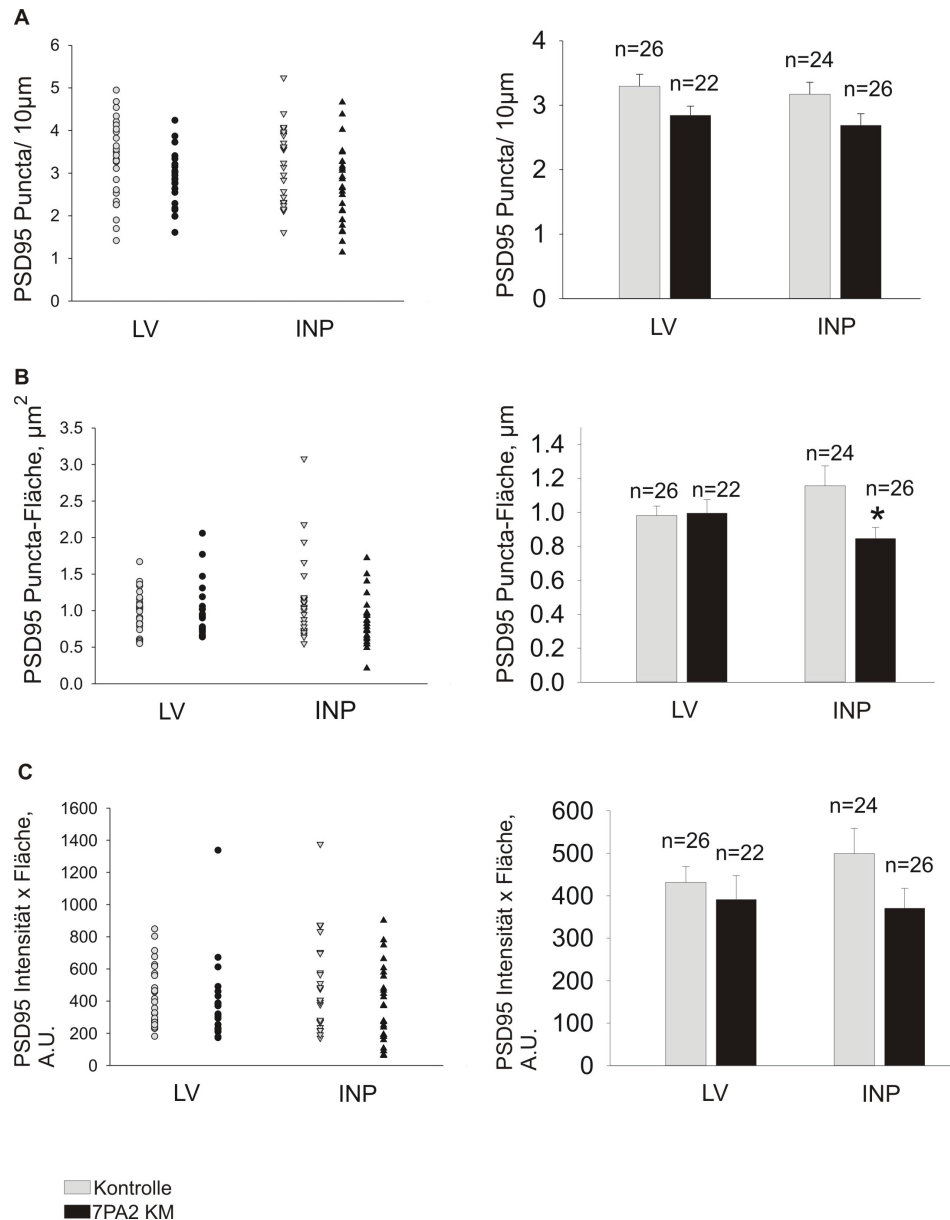


Abb. 3.17: Auswirkung von 7PA2 KM auf PSD95 *Puncta* unter Einfluss von LV- und INP-Peptid, 2 Tage Inkubation

Zellen aus Kontrollmedium und 7PA2 KM an Tag 2 nach Medienwechsel. Punktdiagramm zur Darstellung der Werte der einzelnen ROI links, das dazugehörige Balkendiagramm rechts davon. Zur statistischen Auswertung wurde der t-Test verwendet, wobei $P < 0,05$ als statistisch signifikant (*) angesehen wurde.

A) Anzahl der mit dem Dendriten kolokalisierten PSD95 *Puncta* auf 10µm. Die Dichte der *Puncta* ist mit LV- und INP-Peptid in Kontrollmedium und 7PA2 KM nicht signifikant verschieden.

B) Fläche der PSD95 *Puncta* (µm²). Unter Einfluss von INP-Peptid zeigt sich im 7PA2 KM eine signifikant geringere Fläche der PSD95 *Puncta*. Dieser Effekt ist vermutlich unspezifisch. In LV-Kontrollpeptid lässt sich dieser Effekt nicht nachweisen.

C) Gesamtfluoreszenz der PSD95 *Puncta* (Produkt aus mittlerer Pixelintensität und Pixelanzahl (Fläche der *Puncta*), A.U.). Die Gesamtfluoreszenz ist mit LV- und INP-Peptid in 7PA2 KM nicht signifikant verschieden.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, den Effekt von zellulär sezernierten A β Peptiden auf prä- und postsynaptische Strukturen in neuronalen Zellkulturen zu untersuchen. Von besonderem Interesse war dabei der Effekt von A β auf Synapsen, bei denen das Adhäsionsmolekül N-Cadherin blockiert wurde. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass die Simultanfärbung einer neuronalen Zellkultur mit MAP2, VAMP2 und PSD95 eine Möglichkeit darstellt, prä- und postsynaptische Terminale zu identifizieren und getrennt voneinander zu beurteilen. Mit diesem Protokoll konnten Veränderungen in Dichte, Größe und Gesamtfluoreszenz der angefärbten *Puncta* untersucht werden, die auf die Applikation von A β und die Blockierung von N-Cadherin zurückzuführen waren.

4.1. Vorteile primär kultivierter neokortikaler Neurone

In dieser Arbeit wurden als Modell Zellkulturen primär kultivierter neokortikaler Neurone verwendet. Auch wenn die sterile Zellkultur natürlich nicht dem komplexen Organismus entspricht, bietet sie den Vorteil, dass die verschiedenen Einflussgrößen exakt steuerbar und standardisierbar sind. Bei einer multifaktoriell bedingten Erkrankung wie dem Morbus Alzheimer können so die einzelnen Komponenten identifiziert und untersucht werden. Durch die besondere Charakteristik der Zellen und die enge Kontrolle der Wachstumsbedingungen waren die Ergebnisse reproduzierbar. So konnten die Auswirkungen kleiner Veränderungen im Versuchsaufbau auf die Zellen besonders gut untersucht werden.

In dieser Arbeit war die Auswirkung einer Blockade der adhäsiven Funktion von N-Cadherin von besonderem Interesse. Da N-Cadherin *knockout* Mäuse noch in der frühen embryonalen Entwicklung aufgrund von kardialen Fehlbildungen versterben (Radice et al., 1997), wurden funktionsblockierte Peptide verwendet.

4.2. Etablierung der immuncytochemischen Dreifachfärbung

Immuncytochemische Färbungen sind methodisch schon lange in allen Bereichen der biochemischen Forschung etabliert. Jedoch musste in dem methodisch orientierten Teil dieser Arbeit zunächst ein Protokoll etabliert werden, welches eine simultane Färbung von 3 verschiedenen Markern (VAMP2, PSD95 und MAP2) ermöglichte. Dazu wurden Fluorophore mit möglichst unterschiedlichen Emissionsspektren ausgewählt (Rot, 650-670nm; Grün, 515-565nm; Blau, 445-450nm) um eine Interferenz bei der Auswertung zu vermeiden. Zunächst trat bei der Anwendung von gängigen Protokollen für eine Zweifachfärbung eine zu hohe unspezifische Färbung auf. Durch Anpassung der Antikörperkonzentration, intensiver Blockierung von unspezifischer Antigen-Antikörper-Interaktion und Optimierung des Waschvorgangs konnten optimal Ergebnisse erzielt werden.

4.3. Amyloid β

Ein pathologisches Merkmal der Alzheimer Demenz (AD) ist die Ablagerung von Amyloid-Plaques. Amyloid- β ($A\beta$) wird auch in kognitiv unauffälligen Individuen gebildet, wo es zum Beispiel bereits im Liquor nachgewiesen werden konnte (Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992). Jedoch wurde in AD Individuen eine vielfach gesteigerte Menge $A\beta$ im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden (Kuo et al., 1996), sodass bei AD von einer gesteigerten Produktion oder einem gestörten Umsatz von $A\beta$ auszugehen ist.

Das Ausmaß kognitiver Beeinträchtigungen von Alzheimer-Erkrankten korreliert wesentlich besser mit dem Verlust synaptischer Strukturen als mit der Ansammlung der Amyloid-Plaques (Terry et al., 1991). Insbesondere Peptiden von $A\beta$, welche also noch keine Plaques gebildet haben, werden neurotoxische Wirkungen zugesprochen (Walsh et al., 2002).

Die Theorie der pathogenetischen Beteiligung von $A\beta$ an der Alzheimer Erkrankung wird durch die Tatsache unterstützt, dass familiäre Alzheimer Demenz (FAD) mit Genmutationen assoziiert ist, die zur vermehrten Produktion und Akkumulation von $A\beta$ führen (Scheuner et al, 1996; Lendon et al., 1997). Hierbei handelt es sich um Mutationen des Amyloid precursor protein (APP)

Gens auf Chromosom 21, des Präsenilin-1-Gens auf Chromosom 14 und des Präsenilin-2-Gens auf Chromosom 1. Ein weiterer überzeugender Hinweis auf den pathogenetischen Zusammenhang zwischen A β und AD ist die Erkenntnis, dass eine Trisomie des APP kodierenden Gens auf Chromosom 21 unweigerlich zu AD führt (Goldgraber et al., 1987; Olson und Shaw, 1969).

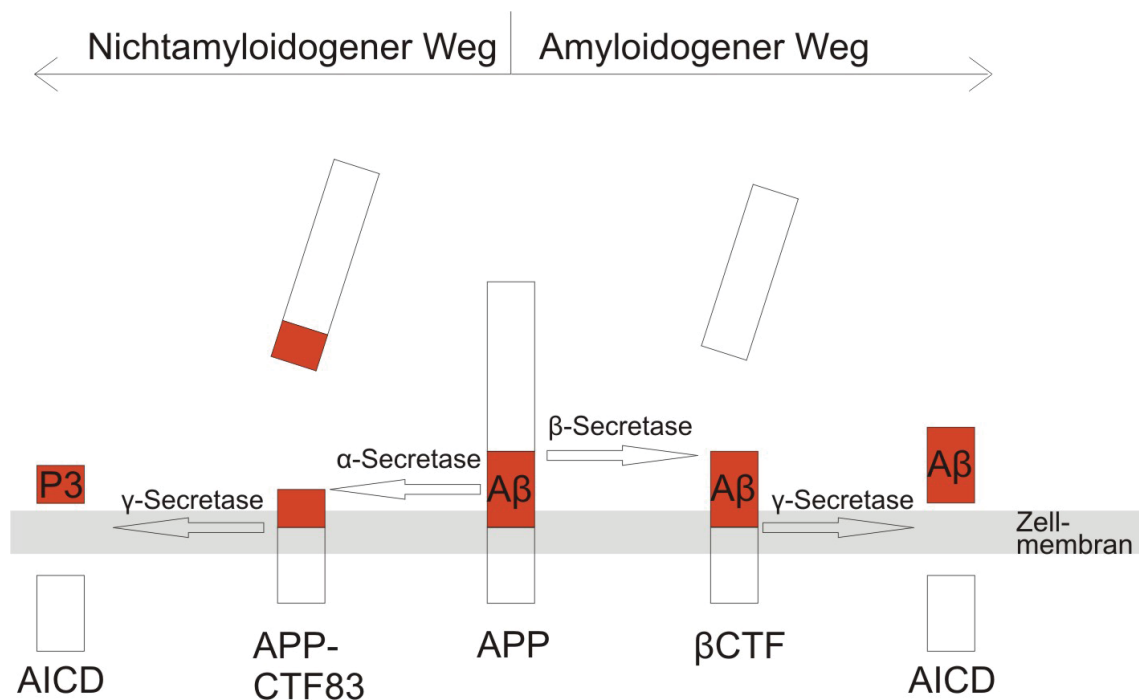


Abb. 4.1.: Schematische Darstellung der APP-Stoffwechselwege

Darstellung der Zellmembran in grau. Links Darstellung der nichtamyloiden proteolytischen Spaltung. Nach Spaltung durch die α -Secretase entsteht ein lösliches, N-terminales Fragment und ein C-terminales Transmembranfragment (APP-CTF83). Nach Spaltung durch die γ -Secretase entsteht aus dem APP-CTF83 ein P3-Fragment, welches sezerniert wird, und eine intrazelluläre APP- Domäne (AICD).

Rechts Darstellung der amyloiden Spaltung. Nach Spaltung durch die β -Secretase entsteht ein membrangebundenes C-terminales Fragment, welches die intakte A β Sequenz enthält (β CTF). Nach Spaltung durch die γ -Secretase entstehen je nach genauem Spaltungsort die verschiedenen A β Spezies.

Modifiziert nach: Wang et al., 2012

4.3.1. Aufbau und Stoffwechsel von A β

Das Vorläuferprotein von A β ist das *amyloid precursor protein* (APP). APP ist ein ubiquitär exprimiertes Typ 1 integrales Membranprotein mit einem zytoplasmatischen Anteil, einer singulären Transmembrandomäne und einer Ektodomäne (Kang et al., 1987). In verschiedenen Studien konnten unter anderem wichtige Funktionen des APP bei Synaptogenese, Wachstum von Neuriten und synaptischer Plastizität nachgewiesen werden (Dawson et al., 1999; Milward et al., 1992; Selkoe, 1994).

APP kann auf 2 verschiedene Wege, nichtamyloidogen und amyloidogen, proteolytisch gespalten werden. Aus dem nichtamyloidogenen Weg resultiert eine intrazelluläre APP-Domäne (AICD) und ein P3-Fragment. Hierbei wird zunächst die Ektodomäne von APP von der α -Secretase innerhalb der A β -Region gespalten, wodurch ein extrazelluläres, lösliches, N-terminales APP-Fragment und ein C-terminales Transmembranfragment, APP-CTF83, entstehen (Lammich et al., 1998). Anschließend folgt eine Spaltung des APP-CTF83 durch die γ -Secretase. Hierdurch entsteht das P3-Fragment, welches sezerniert wird (Haas und Selkoe, 1993).

Aus dem amyloidogenen Weg resultiert die Entstehung von A β (Seubert et al., 1993). In neuronalen Zellen dominiert dieser Prozessierungsweg (Tienari et al., 1996), während in den meisten peripheren Zellen der nicht-amyloidogene Weg dominiert (Li et al., 1998a). APP wird durch die β -Secretase innerhalb der Ektodomäne am N-Terminus der A β -Region gespalten, wodurch ein membrangebundenes C-terminales Fragment (β CTF, oder C99) entsteht, welches die intakte A β Sequenz enthält (Evin et al., 2003). Im ZNS ist das beta-site APP cleaving enzyme (BACE1), eine transmembrane Aspartatprotease, die überwiegende neuronale β -Secretase (Vassar et al., 1999; Cai et al., 2001). Experimentell konnte gezeigt werden, dass Mäuse ohne das BACE1 Gen keinerlei β -Secretaseaktivität und somit auch keine A β Produktion aufweisen (Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Dennoch spielt BACE1 eine wichtige physiologische Rolle im ZNS. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass BACE1 *-/- knockout* Mäuse defizitäre synaptische Transmission und Plastizität in den hippocampalen Schaffer Kollateralen aufweisen (Laird et al., 2005). Durch Western Blot Analyse konnte eine im Vergleich zu Kontrollen gesteigerte

Expression des BACE1 in AD Kortex nachgewiesen werden (Holsinger et al., 2002). Im zweiten Schritt des amyloidogenen Abbaupaths spaltet die γ -Secretase analog zu dem nichtamyloidogenen Weg am C-Terminus der A β -Region. Der γ -Secretase-Komplex besteht aus verschiedenen Protein-Untereinheiten mit Presenilin (PS) 1 und 2 als katalytische Hauptkomponente (Haas und Selkoe, 2007; de Strooper 2010). Für die γ -Secretase gibt es verschiedene Andockstellen in der Transmembrandomäne. Durch eine Spaltung nach Val40 entsteht A β (1–40), die häufigste A β Spezies; nach Ala42 entsteht A β (1–42), eine weniger häufige Spezies, die jedoch verstärkt zur Aggregation neigt. Nach Leu49 entsteht die zytoplasmatische APP *intracellular domain* (AICD, auch ϵ CTF) (Evin et al., 2003; Weidemann et al., 2002; Sastre et al., 2001). AICD diffundiert zum Zellkern und aktiviert dort Signaltransduktion (Cao und Südhof, 2001; Gao und Pimplikar, 2001; Kimberly et al., 2001; Leissring et al., 2002). Kurz nach der Entstehung von A β Peptiden formen diese Peptide, welche von der Zelle sezerniert werden (Walsh et al., 2002).

4.3.2. Molekulare Wirkungsweise von A β

Synaptische Aktivität moduliert die Bildung und Sezernierung von A β Peptiden. Kamenetz et al. wiesen dies in APP überexprimierenden hippocampalen Neuronen nach (Kamenetz et al., 2003). Außerdem konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass A β selektiv exzitatorische synaptische Übertragung auf Neuronen hemmt, welche mutiertes APP überexprimieren. Dieser Effekt erstreckte sich auch auf nahe benachbarte Neuronen mit normaler APP Expression. Diese selektive Hemmung war NMDA-Rezeptor abhängig und durch Blockade neuronaler Aktivität reversibel. Somit kann vermutet werden, dass A β eine physiologische Rolle in einer negativen Feedbackschleife besitzt, durch die neuronale Überaktivität verhindert werden kann. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte unter gesteigerter synaptischer Aktivität eine erhöhte A β Sekretion nachgewiesen werden (Kamenetz et al., 2003; Cirrito et al., 2005). Umgekehrt konnten im ZNS von Alzheimer-Mäusen durch Induktion von Schlaf und daraus resultierender Reduktion der neuronalen Aktivität sowohl reduzierte A β Sekretion als auch Verminderung von A β Plaques nachgewiesen werden (Kang et al., 2009).

Interessanterweise scheinen normale A β Konzentrationen lebenswichtig für Neurone zu sein. Neuronale Zellkulturen, bei denen die A β Produktion durch Inhibierung der β - oder γ - Secretase vermindert wurde, zeigten Zelltod, welcher durch Zugabe von synthetischem A β zu den Zellkulturmedien verhindert werden konnte (Plant et al., 2003).

Anscheinend gibt es eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte von A β (Wang et al., 2012). Eine A β Konzentration unterhalb der Norm scheint gewisse präsynaptische Funktionsdefizite wie beispielsweise eine verringerte Vesikelfreisetzung zu verursachen (Nimmrich et al., 2008). Normale Konzentrationen im picomolaren Bereich fördern LTP und Lernen (Dougherty et al., 2003; Puzzo et al., 2008, Abramov et al., 2009). Pathologisch hohe A β Konzentrationen, wie sie klassischerweise bei AD vorkommen, zeigten experimentell zahlreiche neurotoxische Wirkungen, die zu funktionellen und strukturellen Defiziten an Synapsen führten. Es konnte nachgewiesen werden, dass A β Oligomere potente Inhibitoren von LTP darstellen (Walsh et al., 2002a) und eine Steigerung von LTD verursachen können (Chen et al., 2000; Kim et al., 2001). A β zeigte experimentell Einfluss sowohl auf präsynaptische Strukturen, beispielsweise durch verminderte Vesikelfreisetzung in hippocampalen Neuronen (Abramov et al., 2008), als auch auf postsynaptische Strukturen, beispielsweise durch Reduktion von PSD95 und NMDA- sowie AMPA-Rezeptoren (Dinamarca et al., 2008; Roselli et al., 2005, Hsieh et al., 2006). Die durch Applikation von A β beobachteten Effekte reichten bis zum Verlust von Synapsen und Hemmung von neuritischem Wachstum (Shankar et al., 2007; Evans et al., 2008).

4.4. Auswirkung von A β auf kultivierte neokortikale Neurone

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des synaptischen Adhäsionsmoleküls N-Cadherin bei der durch A β induzierten Störung von Synapsen zu untersuchen. Dazu wurde zunächst isoliert der Effekt von A β Peptiden auf prä- und postsynaptische Terminale untersucht. In dieser Arbeit wurde A β aus chinesischen Hamsteroarialzellen (7PA2 CHO) verwendet und in einem Verhältnis von 1:1 mit standardisiertem Kulturmedium verdünnt. 7PA2 CHO Zellen exprimieren mutiertes (V717F) humanes APP (7PA2) und produzieren

hauptsächlich A β Dimere, Trimere und Tetramere (Walsh et al., 2002b). Experimentell konnte mit Medium von 7PA2 CHO Zellen, welches in das Ventrikelsystem von Ratten eingebracht wurde, eine Blockade von LTP beobachtet werden. Dieser Effekt konnte durch Immundepletion mit einem anti-A β -Antikörper verhindert werden (Walsh et al. 2002a). Auch in dieser Arbeit wurde auf diese Weise immundepletiertes Medium verwendet.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von zellulär sezernierten A β Peptiden auf Synapsen kortikaler Zellkulturen der Maus untersucht. Dazu wurde bei den Zellkulturen an DIV 9 ein Medienwechsel mit Medium von 7PA2 CHO Zellen (7PA2 KM) vorgenommen, welches zellulär sezernierte A β Peptide enthielt. Außerdem wurden Kontrollexperimente mit standardisiertem Kulturmedium als Kontrollmedium sowie immundepletiertem 7PA2 KM (s.o.) durchgeführt. Diese Medien enthielten kein A β (Andreyeva et al., 2012). Die in dieser Arbeit etablierte Dreifachfärbung von neuronalen Zellkulturen erlaubte es, dabei prä- und postsynaptische Marker getrennt voneinander in derselben Zellkultur zu untersuchen.

4.4.1. Effekt von zellulär sezerniertem A β auf den präsynaptischen Marker VAMP2

Für die Untersuchung präsynaptischer Terminale wurde das vesikelassoziierte Membranprotein Synaptobrevin 2 (VAMP2) als etablierter präsynaptischer Marker gewählt (Wilkinson et al., 2012; Stan et al., 2010; Russell et al., 2010).

Um eine Aussage über Veränderungen der synaptischen Marker machen zu können, wurden verschiedene Parameter untersucht: Zunächst wurde die Anzahl der VAMP2 *Puncta* pro 10 μ m Dendritenlänge ausgewertet. Dabei zeigte sich an Tag 2 nach Medienwechsel eine leichte tendenzielle Reduktion der VAMP2 *Puncta*. Die Anzahl der *Puncta* nach 2 Tagen ist mit durchschnittlich $3,37 \pm 0,21/10\mu\text{m}$ Dendrit im Kontrollmedium und $3,04 \pm 0,19/10\mu\text{m}$ Dendrit im 7PA2 KM vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (vergleiche Stan et al., 2010). Ab 3 Tagen Inkubation mit A β -Peptiden wiesen die Neurone signifikant weniger VAMP2 *Puncta* auf als die Kontrollen. Immundepletion von A β Peptiden konnte diese Reduktion der *Puncta* verhindern, was darauf

hindeutet, dass der Effekt auf die im 7PA2 KM enthaltenen A β Peptide zurückzuführen ist. Der Verlust von VAMP2 *Puncta* legt nahe, dass es 3 Tage nach Exposition mit A β Peptiden zu einem Verlust von Synapsen kommt, wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben (Shankar et al., 2007), und dass dies insbesondere mit dem Verlust präsynaptischer Terminale einher geht. Zur Auswertung wurden in dieser Arbeit nur makroskopisch intakte Neurone verwendet. Die Anzahl der Dendriten der ausgewerteten Neurone zeigte sich nach 2, 3 und 4 Tagen im jeweiligen Kulturmedium konstant. 4 Tage nach Medienwechsel wiesen die Kontrollzellen eine *Puncta*-Dichte von durchschnittlich $3,44 \pm 0,24/10 \mu\text{m}$ Dendrit auf. 7PA2 konditionierte Zellen hatten lediglich eine *Puncta*-Dichte von durchschnittlich $2,82 \pm 0,19/10 \mu\text{m}$ Dendrit.

Andere Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. So wurde von Mucke et al. der Effekt von A β auf präsynaptische Terminale untersucht, indem Synaptophysin, ebenfalls ein synaptisches Vesikelprotein, in Gegenwart von A β quantifiziert wurde (Mucke et al., 2000). Auch hier fand sich durch A β -Exposition eine Reduktion des präsynaptischen Markers. Versuche in AD transgenen Mäusen erbrachten eine stärkere Reduktion von Synaptophysin in deafferenzierten Kortexarealen im Vergleich zu synaptisch aktiven Arealen (Tampellini et al., 2010). Die Verminderung des präsynaptischen Markers konnte mit einem Synapsenverlust korreliert werden. Grund dafür ist möglicherweise der gleichzeitig nachgewiesene Anstieg von A β 42 in den deafferenzierten Neuronen. Somit konnte auch hier eine Reduktion präsynaptischer Marker und Synapsenverlust mit gesteigertem A β Level in Verbindung gebracht werden. Bereits 1997 konnte *post mortem* bei Alzheimer Patienten eine signifikante Reduktion von Synaptophysin im Hippocampus nachgewiesen werden (Sze et al., 1997).

Die Arbeitsgruppe um Russell experimentierte ebenfalls mit 7PA2 KM (Russell et al., 2012). Dabei konnte in hippocampalen Zellkulturen nachgewiesen werden, dass nach A β -Exposition das VAMP2 Verteilungsmuster diffus wurde, vermutlich aufgrund eines gestörten Synaptophysin-VAMP-Komplexes.

Elektrophysiologisch gemessene mEPSCs (miniature excitatory postsynaptic currents) von AMPA-Rezeptoren glutamaterger Synapsen zeigten nach 3 Tagen Inkubation mit A β Peptiden eine deutliche Reduktion der

durchschnittlichen Frequenz der mEPSCs, während nach 2 Tagen noch kein Effekt zu beobachten war (Andreyeva et al., 2012). Dieser funktionelle Aspekt stimmt im zeitlichen Ablauf mit denen in dieser Arbeit gefundenen strukturellen Alterationen präsynaptischer Marker überein.

Als weiterer Parameter der VAMP2 *Puncta* wurde in dieser Arbeit deren Größe ausgewertet. Nach 2 Tagen im jeweiligen Medium zeigte sich in der Größe der VAMP2 *Puncta* bereits eine leichte Verringerung. Nach 4 Tagen zeigten die noch vorhandenen *Puncta* dann eine deutliche, signifikante Größenreduktion von $1,90 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$ im Kontrollmedium relativ zu $1,32 \pm 0,09 \mu\text{m}^2$ in 7PA2 KM. Dies lässt vermuten, dass präsynaptische Terminale, die zunächst erhalten bleiben, dennoch Veränderungen der Vesikelakkumulation aufweisen.

Die Auswertung der Gesamtfluoreszenz als Produkt aus Fläche und Intensität der Fluoreszenz (A.U.) zeigte am zweiten Tag nach Medienwechsel bereits eine Reduktion unter Einfluss von A β . Am dritten Tag nach Medienwechsel war die Gesamtfluoreszenz der VAMP2 *Puncta* unter Einfluss von A β signifikant reduziert gegenüber den Kontrollen (7PA2 KM $1331,20 \pm 299,03$ A.U., Kontrolle $1893,47 \pm 294,26$ A.U.). Da dieser Effekt durch Immundepletion des 7PA2 KM aufgehoben werden konnte, kann vermutet werden, dass diese Reduktion der Gesamtfluoreszenz auf die im 7PA2 KM enthaltenen A β Peptide zurückzuführen ist. Am vierten Tag zeigte sich eine zwar nicht mehr statistisch signifikante, aber dennoch tendenzielle Verringerung von $2306,13 \pm 447,07$ A.U. in der Kontrolle relativ zu $1753,04 \pm 349,82$ A.U. in 7PA2 KM.

4.4.2. Effekt von zellulär sezerniertem A β auf den postsynaptischen Marker PSD95

Das in der postsynaptischen Dichte lokalisierte Protein PSD95 ist ein etablierter postsynaptischer Marker (Stan et al., 2010; Dinamarca et al., 2008; Roselli et al., 2005; Almeida et al., 2005; Pham et al., 2010). Um den Effekt von A β Peptiden auf die Postsynapse zu untersuchen wurden die immunocytochemisch gefärbten PSD95 *Puncta* ausgewertet.

Die Dichte der PSD95 *Puncta* zeigte 2 Tage nach Applikation von A β keine Veränderung gegenüber der Kontrolle. Nach 3 Tagen zeigte die Dichte der

Puncta eine tendenzielle Reduktion unter Einfluss von A β . Diese Tendenz war auch nach 4 Tagen zu beobachten, jedoch durch Immundepletion nicht aufzuheben, sodass dieses Ergebnis keine Rückschlüsse erlaubt, da möglicherweise diese Tendenz durch eine andere, nicht depletierte Substanz im 7PA2 KM hervorgerufen wurde.

Andere Arbeitsgruppen beschreiben eine signifikante Reduktion der PSD95 *Puncta* nach Inkubation mit A β . An hippocampalen Neuronen, denen A β Peptide zugegeben wurden, wurde eine Reduktion der PSD95 Dichte nachgewiesen (Dinamarca et al., 2008). Jedoch war dort die Inkubationszeit mit A β mit nur 4 Stunden deutlich kürzer als in dem hier gewählten Versuchsaufbau. Auch mit synthetischem A β konnte nach 24 Stunden eine PSD95-Reduktion festgestellt werden (Almeida et al., 2005), jedoch besteht synthetisches A β im Gegensatz zu A β aus 7PA2 KM hauptsächlich aus Monomeren. Eine Verringerung von PSD95 zeigte sich auch bei transgenen APP Mäusen, die mit Mono-, Di- und Trimeren von A β behandelt wurden (Pham et al., 2010).

Diese abweichenden Ergebnisse sind möglicher Weise durch unterschiedliche Inkubationszeiten mit A β zu erklären. Außerdem weicht in den verschiedenen Versuchsansätzen das Verhältnis von A β 40 zu A β 42 von dem hier gewählten Kulturmedium ab, sodass aufgrund der verschiedenen methodischen Ansätze die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind.

Die Auswertung der Fläche der PSD95 *Puncta* erbrachte keine eindeutigen Befunde. Zwar zeigte sich unter A β eine gewisse Größenreduktion der PSD95 *Puncta*, jedoch konnte dieser Effekt in der Immundepletion nicht aufgehoben werden, sodass die Befunde möglicherweise auf eine Substanz im Zellüberstand zurückzuführen sind, die nicht A β ist und Einfluss auf PSD95 hat.

In der Gesamtfluoreszenz war bereits am zweiten Tag eine deutliche Verminderung von $408,41 \pm 51,66$ A.U. im Kontrollmedium relativ zu $175,62 \pm 17,62$ A.U. in 7PA2 KM festzustellen. Am dritten Tag zeigte sich jedoch auch in der Immundepletion eine signifikante Erniedrigung der Gesamtfluoreszenz, sodass dieser Effekt nicht auf A β Peptide zurückgeführt werden kann. Auch an Tag 4 konnte wieder eine deutliche Reduktion der Gesamtfluoreszenz von $365,89 \pm 52,69$ A.U. im Kontrollmedium auf $140,64 \pm 17,53$ A.U. im 7PA2 KM beobachtet werden, was jedoch durch die

Immundepletion nicht vollständig aufgehoben werden konnte, und somit ebenfalls nicht eindeutig auf A β Peptide zurückgeführt werden konnte.

Die Ergebnisse der PSD95 Färbung deuten darauf hin, dass durch 7PA2 KM zwar ein starker Trend induzierbar ist, dies aber wahrscheinlich nicht einen spezifischen Effekt von A β widerspiegelt, da unter Immundepletion die Effekte nicht aufgehoben werden konnten. Daher ist insgesamt zu den Ergebnissen bei PSD95 festzuhalten, dass es Hinweise darauf gibt, dass neben A β Peptiden noch weitere Substanzen im 7PA2 *Supernatant* enthalten sind, die Einfluss auf PSD95 haben und daher aus den Ergebnissen kein eindeutiger Schluss möglich ist. VAMP2 hingegen ist davon nicht betroffen, denn hier konnte der Effekt des 7PA2 *Supernatant* durch Immundepletion von A β jedes Mal aufgehoben werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte auf VAMP2 *Puncta* tatsächlich durch A β Peptide verursacht wurden.

4.5. Auswirkung der Hemmung von N-Cadherin auf den A β -induzierten Effekt auf Synapsen

Ziel der nächsten Versuchsreihe war es, den Einfluss der Hemmung des synaptischen Adhäsionsmoleküls N-Cadherin auf die A β -induzierte Veränderung synaptischer Marker zu untersuchen. N-Cadherin wird im Säuger-ZNS an kortikalen exzitatorischen glutamatergen Synapsen exprimiert (Benson und Tanaka, 1998; Huntley und Benson, 1999) und ist unter anderem wichtig für die morphologische und funktionelle Stabilisation einer Synapse (Bozdagi et al., 2004). In dieser Arbeit wurde N-Cadherin funktionell durch die Zugabe von INPISGQ (INP)-Peptiden (100 μ g/ml) geblockt (vergleiche Williams et al., 2000; Siu et al., 2006; Andreyeva et al., 2012). INP-Peptide imitieren eine kurze, spezifische Sequenz der äußersten (EC1) Domäne des N-Cadherin und binden diese kompetitiv. Dadurch wird die homophile transsynaptische Interaktion zweier N-Cadherin Moleküle unterbunden und es kommt zum Verlust der adhäsiven Eigenschaft (Williams et al., 2000). INP- und Kontrollpeptide wurden den Zellkulturen an DIV 9 zugegeben. Gleichzeitig wurde den Zellkulturen auch hier Kontrollmedium beziehungsweise 7PA2 KM oder immundepletiertes 7PA2

KM zugegeben. Nach 2 Tagen Inkubation mit dem jeweiligen Medium erfolgte die Fixierung, Anfärbung und Auswertung.

Der Effekt einer Blockade von N-Cadherin allein ist bereits vielfach untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Unterbrechung der N-Cadherin abhängigen Adhäsion in unreifen Neuronen zu einer verminderten Synapsenproduktion, einer Reduktion dendritischer *Spines*, sowie zu einer Abnahme synaptischer Vesikelcluster führt (Togashi et al., 2006; Abe et al., 2004; Bamji et al., 2003; Murase et al., 2002). Zudem ist eine Hemmung synaptischer Plastizität beschrieben (Okuda et al., 2007; Tang et al., 1998). Auf der anderen Seite ist eine weniger stark ausgeprägte Reduktion von Synapsen in reifen Neuronen nachgewiesen (Togashi et al., 2002). Jedoch gibt es auch gegensätzliche Befunde: Jüngling et al. fanden an DIV 10-12 keine wesentliche Reduktion präsynaptischer Marker in N-Cadherin *knockout* Neuronen, die initiale Bildung von Synapsen war in Abwesenheit von N-Cadherin nicht gestört. Jedoch zeigte sich unter hoher synaptischer Aktivität ein selektives präsynaptisches Funktionsdefizit basierend auf einer reduzierten Effizienz der Vesikelexozytose (Jüngling et al., 2006). Die Hemmung von ADAM10-vermittelter Spaltung von N-Cadherin zeigte eine signifikante Vergrößerung von *Spines* sowohl in unreifen als auch in reifen Synapsen (Malinverno et al., 2010).

Im Gehirn von Alzheimer Patienten konnte postmortal eine erhöhte Konzentration von C-terminalen Fragmenten von N-Cadherin (NcadCTF1) nachgewiesen werden (Andreyeva et al., 2012). Diese Fragmente entstehen durch proteolytische Spaltung von N-Cadherin, wodurch dessen Funktion aufgehoben wird. Dieser Nachweis deutet auf eine gesteigerte Spaltung von N-Cadherin durch die α -Secretase (ADAM10) oder alternativ auf eine verminderte Prozessierung von NCadCTF1 durch die γ -Secretase hin. Außerdem hemmt NCadCTF1 wahrscheinlich die adhäsive Funktion von N-Cadherin (Andreyeva et al., 2012). Auch bei familiären Alzheimererkrankungen mit Mutation des Presenilin-Gens konnte eine erhöhte Rate an γ -Secretase Substraten, unter anderem NCadCTF1, nachgewiesen werden (Bentahir et al., 2006).

Eines der pathologischen Hauptmerkmale der Alzheimer Demenz sind intrazerebrale Ablagerungen seniler Plaques, deren Hauptkomponente A β ist (Selkoe, 2001). Der Pathomechanismus, wie es von diesen Ablagerungen zur Alzheimer Demenz kommt ist nicht zufriedenstellend aufgeklärt. Da sowohl A β

als auch NcadCTF1 im ZNS von Alzheimer Erkrankten nachgewiesen werden konnten, ist es von besonderem Interesse, das Zusammentreffen dieser beiden Faktoren zu untersuchen.

4.5.1. Auswirkung der Hemmung von N-Cadherin auf den Effekt von A β auf VAMP2 *Puncta*

Unter alleinigem Einfluss von A β konnte in dieser Arbeit nach 3 Tagen Inkubation mit 7PA2 KM eine Reduktion präsynaptischer Marker nachgewiesen werden. Bei gleichzeitiger Blockierung von N-Cadherin zeigte sich dieser Effekt bereits nach 2 Tagen. Dendriten, die mit INP *blocking* Peptid und Kontrollmedium behandelt wurden zeigten nach 2 Tagen eine VAMP2 *Puncta* Dichte von $3,46 \pm 0,11/10 \mu\text{m}$. Dendriten, die mit INP Peptid und 7PA2 KM behandelt wurden zeigten hingegen eine signifikant niedrigere VAMP2 *Puncta* Dichte von $2,86 \pm 0,22/10 \mu\text{m}$. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung der adhäsiven Eigenschaften von N-Cadherin den A β -induzierten Verlust präsynaptischer Strukturen beschleunigt.

Auch elektrophysiologische Eigenschaften an Synapsen werden durch A β gestört. Es konnte gezeigt werden, dass kultivierte kortikale Neurone nach dreitägiger Inkubation mit 7PA2 KM eine signifikante Reduktion der Frequenz und Amplitude von AMPA mEPSCs (*miniature excitatory postsynaptic currents*) aufweisen. Dies bedeutet, dass nach 3 Tagen Inkubation mit 7PA2 KM ein funktioneller Defekt glutamaterger exzitatorischer Synapsen vorliegt. Eine alleinige Blockade von N-Cadherin durch INP Peptid zeigte keinen Effekt auf die Funktion der Synapse. Zusammen mit A β zeigte sich jedoch bereits nach 2 Tagen eine starke Reduktion der AMPA mEPSC Frequenz (Andreyeva et al., 2012). Diese funktionellen Resultate stimmen in der zeitlichen Abfolge sehr gut mit den Befunden struktureller Veränderungen in dieser Arbeit überein. Ein Aspekt ist möglicherweise eine durch die Blockierung von N-Cadherin verursachte Störung der Kooperation von N-Cadherin und Neuroligin-1. Diese ist notwendig für die transsynaptische Induktion präsynaptischer Vesikelakkumulation (Stan et al., 2010). Auch durch Hemmung der γ -Secretase, wodurch der weitere Abbau von NCadCTF1 verhindert wird, sowie durch Überexprimierung von NCadCTF1 konnte eine Beschleunigung des

toxischen A β -Effekts nachgewiesen werden (Andreyeva et al., 2012). Dies kommt wahrscheinlich durch die hemmende Wirkung von freiem NCadCTF1 auf N-Cadherin zustande.

Die Fläche der VAMP2 *Puncta* im 7PA2 KM plus INP Peptid war bereits nach 2 Tagen deutlich reduziert. VAMP2 *Puncta* mit INP Peptid und Kontrollmedium erreichten eine Größe von $2,28 \pm 0,20 \mu\text{m}^2$, mit INP Peptid und 7PA2 KM lediglich $1,52 \pm \mu\text{m}^2$. Auch dies kommt einer Beschleunigung des A β -Effektes durch Blockierung von N-Cadherin gleich, denn in den Vorversuchen (s.o.) kam es unter alleinigem Einfluss von A β erst nach 4 Tagen zu einer Reduktion der Größe der VAMP2 *Puncta*. Inkubation mit LV-Peptid sowohl mit als auch ohne A β zeigte nach 2 Tagen keinerlei Auswirkung auf die Größe der VAMP2 *Puncta*.

Bei der Gesamtfluoreszenz kam es unter Einfluss von A β nach 2 Tagen sowohl mit INP Peptid als auch mit LV Peptid zu einer Reduktion, sodass der Effekt hier nicht auf eine Blockierung der N-Cadherin-vermittelten Adhäsion zurückzuführen ist. Problematisch bei der Berechnung der Gesamtfluoreszenz könnte die Auswirkung des Fotobleachings auf die Intensität der Fluoreszenz sein. Da pro Zellkultur mehrere Zellen in die Auswertung eingegangen sind ist damit zu rechnen, dass es bei jenen Zellen, die bereits einer längeren Belichtungszeit ausgesetzt waren, zu einer Reduktion der Fluoreszenz kam, die nicht auf einer Wirkung des Kulturmediums beruhte.

4.5.2. Auswirkung der Hemmung von N-Cadherin auf den Effekt von A β auf PSD95

Durch Applikation von A β konnten in dieser Arbeit keine deutlichen Effekte auf postsynaptische Marker nachgewiesen werden. Auch die zusätzliche Blockierung von N-Cadherin zeigte keinen spezifischen Effekt. Die Dichte der PSD95 *Puncta* zeigte keine relevante Abweichung in den verschiedenen Medien. Gleiches traf für die Gesamtfluoreszenz zu.

Allein die Fläche der PSD95 *Puncta* zeigte eine signifikante Reduktion unter Einfluss von INP Peptid plus A β im Vergleich zu INP Peptid plus Kontrollmedium. Dieser Effekt war mit LV Peptid nicht nachzuweisen. Die Zugabe von A β zeigte in dieser Arbeit jedoch keinen spezifischen Einfluss auf

die Größe der PSD95 *Puncta* (s.o.). Da in den Vorversuchen der Effekt des 7PA2 KM auf PSD95 wahrscheinlich nicht durch A β verursacht wurde, ist auch hier nicht auszuschließen, dass die Befunde auf eine andere, im 7PA2 KM enthaltene Substanz zurückzuführen sind, und sich aus der Auswertung der PSD95 *Puncta* keine eindeutigen Rückschlüsse ziehen lassen.

4.6. Schlussfolgerungen

Die Befunde in dieser Arbeit geben einen starken Hinweis darauf, dass die Hemmung von N-Cadherin vermittelter Adhäsion einen beschleunigenden Effekt auf die Synaptotoxizität von A β hat. Dies ist von besonderem Interesse, da im ZNS von Alzheimer Patienten eine Zunahme des N-Cadherin Spaltproduktes NCadCTF1 nachgewiesen werden konnte. Somit könnte dies einen bedeutenden Baustein in der Pathogenese des Morbus Alzheimer darstellen. Außerdem könnten sich Konsequenzen für potentielle therapeutische Ansätze daraus ableiten lassen. Der in der Literatur viel als therapeutischer Ansatz diskutierte γ -Secretase-Inhibitor (Ghosh et al., 2012) hemmt zwar die Entstehung von A β 42, jedoch auch den weiteren Abbau von NCadCTF1, was unter Berücksichtigung der neuen Erkenntnisse dieser Arbeit und der Arbeit von Andreyeva et al. nicht wünschenswert erscheint. Somit erscheint ein Ansatz, der zwar die Entstehung von A β 42 hemmt, jedoch nicht den weiten Abbau von NCadCTF1, vielversprechend. Denkbar ist beispielsweise ein möglichst selektiver Eingriff in den APP-Metabolismus.

5. Literaturverzeichnis

- Abe, K; Chisaka, O; Van Roy, F et al.** Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nat. Neurosci.* 2004; 7, 357–363.
- Abe, K; Takeichi, M.** NMDA-receptor activation induces calpain-mediated beta-catenin cleavages for triggering gene expression. *Neuron* 2007; 53, 387–397.
- Aberle, H; Butz, S; Stappert, J et al.** Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci* 1994; 107:3655-3663.
- Abramov, E; Dolev, I; Fogel, H et al.** Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nature Neuroscience* 2009; 12; 1567–1576
- Almeida, CG; Tampellini, D; Takahashi, RH et al.** Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis.* 2005; 20(2):187-98.
- Alzheimer, A.** Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie* 1907; 64: 146-8
- Andreyeva, A; Nieweg, K; Horstmann, K et al.** C-terminal fragment of N-cadherin accelerates synapse destabilization by amyloid- β . *Brain* 2012; 135(7): 2140-54
- Angst, BD; Marcozzi, C; Magee, AI.** The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 2001; 114:629–641.
- Arikkath, J; Reichardt, LF.** Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 2008; 31:487-94
- Augustine, GJ; Charlton, MP; Smith, SJ.** Calcium action in synaptic transmitter release. *Annu Rev Neurosci.* 1987;10:633-93.
- Bamji, SX; Shimazu, K; Kimes, N et al.** Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron* 2003 40: 719-731.
- Bamji, SX; Rico, B; Kimes, N et al.** BDNF mobilizes synaptic vesicles and enhances synapse formation by disrupting cadherin- β -catenin interactions. *J Cell Biol* 2006; 174:289-299.
- Bamji, SX; Shimazu, K; Kimes, N et al.** Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization

- and presynaptic assembly. *Neuron*. 2003;40:719–731.
- Barth, AI; Nathke, IS; Nelson, WJ.** Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997; 9: 683–690.
- Benson, DL; Tanaka, H.** N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998; 18:6892-6904.
- Bentahir, M; Nyabi, O; Verhamme, J et al.** Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem* 2006; 96: 732–42.
- Bickel, H.** Demenzsyndrom und Alzheimer Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland. *Gesundheitswesen* 2000; 62(4): 211-218; Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Bozdagi, O; Valcin, M; Poskanzer, K et al.** Temporally distinct demands for classic cadherins in synapse formation and maturation. *Mol Cell Neurosci* 2004; 27:509-521.
- Bozdagi, O; Wang, XB; Nikitczuk, JS et al.** Persistence of coordinated long-term potentiation and dendritic spine enlargement at mature hippocampal CA1 synapses requires N-cadherin. *J Neurosci* 2010; 28:9984-9989.
- Brunger AT.** Structural insights into the molecular mechanism of Ca(2+)-dependent exocytosis. *Curr Opin Neurobiol*. 2000; Jun;10(3):293-302.
- Cai, H; Wang, Y; McCarthy, D et al.,** BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nature Neuroscience* 2001; 4:233–234.
- Cao, XW; Südhof, TC.** A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 2001; 293:115–120.
- Chang, EH; Savage, MJ; Flood, DG et al.** AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 3410-3415.
- Chen, QS; Kagan, BL; Hirakura, Y et al.** Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 60:65–72.
- Chen, X; Nelson, CD; Li, X et al.** PSD-95 is required to sustain the molecular organization of

the postsynaptic density. *J Neurosci*. 2011 31: 6329-6338.

Cirrito, JR; Yamada, KA; Finn, MB et al. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 2005; 48:913–922.

Dawson, GR; Seabrook, GR; Zheng, H et al. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neurosci* 1999; 90:1–13

De Strooper B. Proteases and proteolysis in Alzheimer's disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* 2010; 90: 465–94.

Dinamarca, MC; Colombres, M; Cerpa, W et al. Beta-amyloid oligomers affect the structure and function of the postsynaptic region: role of the Wnt signaling pathway. *Neurodegener Dis*. 2008;5(3-4):149-52.

Dougherty, JJ; Wu, J; Nichols, RA. Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23: 6740–6747.

Elste, AM; Benson, DL. Structural basis for developmentally regulated changes in cadherin function at synapses. *J Comp Neurol* 2006; 495: 324-335.

Evans, NA; Facci, L; Owen, DE et al. Abeta(1-42) reduces synapse number and inhibits neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neurons: a quantitative analysis. *J Neurosci Methods*. 2008;175(1): 96-103.

Evin, G; Zhu, A.;Holsinger, RMD et al. Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. *Journal of Neuroscience Research* 2003; 74 (3): 386–392.

Gallin, WJ; Edelman, GM; Cunningham, BA. Characterization of L-CAM, a major cell adhesion molecule from embryonic liver cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983; 80, 1038–1042.

Gao, Y; Pimplikar, SW. The γ -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14979–14984.

Garner, CC; Kindler, S; Gundelfinger, ED. Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(3):321-7.

- Gasic, M; Hollmann, M.** Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 507-536.
- Geppert, M; Goda, Y; Hammer, RE et al.** Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for neurotransmitter release at a central synapse. *Cell* 1994; 79: 717-727.
- Ghosh, AK; Brindisi, M; Tang, J.** Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2012; 1:71-83.
- Goldgaber, D; Lerman, MI; McBride, OW et al.** Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*. 1987; 235(4791):877-80.
- Green, PJ; Walsh, FS; Doherty, P.** Signal transduction mechanisms underlying axonal growth responses stimulated by cell adhesion molecules. *Rev Neurol* 1997; 153: 509-514
- Haass, C; Selkoe, DJ.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid b-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 101–12
- Haass C, Selkoe DJ.** Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 1993; 75: 1039-1042.
- Halbleib, JM; Nelson, WJ.** Cadherins in development: cell adhesion, sorting and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 2006; 20: 3199-3214.
- Heuser, JE; Reese, TS; Dennis, MJ et al.** Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol*. 1979; 81(2): 275-300.
- Himeda, T; Mizuno, K; Kato, H et al.** Effects of age on immunohistochemical changes in the mouse hippocampus. *Mech Ageing Dev*. 2005; 126(6-7): 673-7.
- Holsinger, RM; McLean, CA; Beyreuther, K et al.** Increased expression of the amyloid precursor β -secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2002; 51: 783–786.
- Hsieh, H; Boehm, J; Sato, C et al.** AMPAR removal underlies Ab-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 2006; 52: 831–43.
- Wang, H; Megill, A; He, K et al.** Consequences of Inhibiting Amyloid Precursor Protein Processing Enzymes on Synaptic Function and Plasticity. *Neural Plast* 2012; 2012:272374

- Huntley, GW; Benson, DL.** Neural (N)-cadherin at developing thalamocortical synapses provides an adhesion mechanism for the formation of somatopically organized connections. *J Comp Neurol* 1999; 407:453–471
- Inuzuka, H; Miyatani, S; Takeichi, M.** R-cadherin: a novel Ca^{2+} -dependent cell–cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron* 1991; 7: 69–79.
- Jüngling, K; Eulenburg, V; Moore, R et al.** N-cadherin transsynaptically regulates short-term plasticity at glutamatergic synapses in embryonic stem cell-derived neurons. *J Neurosci* 2006; 26: 6968-6978.
- Kadowaki, M; Nakamura, S; Machon, O et al.** N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Dev Biol* 2007; 304:22-33.
- Kamenetz, F; Tomita, T; Hsieh, H et al.** APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003; 37(6):925-37.
- Kang, J; Lemaire, HG; Unterbeck, A et al.** The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987; 325: 733–736.
- Kang, JE; Lim, MM; Bateman, RJ et al.** Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science* 2009; 326:1005–1007.
- Kemler, R; Ozawa, M.** Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmatic anchorage of a Ca^{2+} dependent cell adhesion molecule. *Bioessay* 1989; 11: 88-91.
- Kim, JH; Anwyl, R; Suh, YH et al.** Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of beta-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus in vivo. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21(4): 1327–1333.
- Kimberly, WT; Zheng, JB; Guenette, SY et al.** The intracellular domain of the β -amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 2001; 276: 40288–40292.
- Kiryushko, D; Berezin, V; Bock, E.** Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1014: 140-54.
- Koffie, RM; Meyer-Luehmann, M; Hashimoto, T et al.** Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc*

Natl Acad Sci USA 2009; 106: 4012-4017.

Kuo, YM; Emmerling, MR; Vigo-Pelfrey, C et al. Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *J Biol Chem.* 1996 Feb 23; 271(8):4077-81.

Kwiatkowski, AV; Weis, WI; Nelson, WJ. Catenins: playing both sides of the synapse. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 551-6.

Laird, FM; Cai, H; Savonenko, AV et al., BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25(50): 11693-11709.

Lammich, S; Kojro, E; Postina, R et al. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(7): 3922-7.

Leicht, HHS; Heider, D; Bachmann, C et al. AdeCoDe study group: Net costs of dementia by disease stage. *Acta Psychiatr Scand.* 2011; 124(5): 348-395.

Leissring, MA; Murphy, MP; Mead, TR et al. A physiological signaling role for the γ -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4697-4702.

Lendon, CL; Ashall, F; Goate, AM. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. *Journal of the American Medical Association* 1997; 277(10): 825-831, 1997.

Li, S; Hong, S; Shepardson, NE et al. Soluble oligomers of amyloid β protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 2009; 62: 788-801.

Li, QX; Cappai, R; Evin, G et al. Products of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein generated by β -secretase are present in human platelets, and secreted upon degranulation. *Am J Alz Dis* 1998; 13: 236-244.

Li, Z; Sheng, M. Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4(11): 833-41.

Lim, RW; Halpain, S. Regulated association of microtubule-associated protein 2 (MAP2) with Src and Grb2: evidence for MAP2 as a scaffolding protein. *J Biol Chem.* 2000; 275:20578-20587

- Lobello, K; Ryan, JM; Liu, E et al.** Targeting Beta amyloid: a clinical review of immunotherapeutic approaches in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2012; 2012:628070
- Luo, Y; Bolon, B; Kahn, S et al.,** Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nature Neuroscience* 2001; 4(3): 231–232, 2001.
- Malinverno, M; Carta, M; Epis, R et al.** Synaptic localization and activity of ADAM10 regulate excitatory synapses through N-cadherin cleavage. *J Neurosci* 2010; 30: 16343-16355.
- Maramboud, P; Wen, PH; Dutt, A et al.** A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/ ϵ -cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 2003; 114: 635-645.
- Masters, CL; Simms, G; Weinman, NA et al.** Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1985; 82(12):4245-9.
- Malinverno, M; Carta, M; Epis, R et al.** Synaptic localization and activity of ADAM10 regulate excitatory synapses through N-cadherin cleavage. *J. Neurosci.* 2010; 30(48):16343-55.
- Milward, EA; Papadopoulos, R; Fuller, SJ et al.** The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* 1992; 9:129–137
- Mochida, S.** Protein-protein interactions in neurotransmitter release. *Neurosci Res.* 2000; 36(3):175-82.
- Mucke, L; Masliah, E; Yu, GQ et al.** High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 2000; 20:4050–4058.
- Murase, S; Schuman, EM.** The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11, 549–553.
- Murase, S; Mosser, E; Schuman, EM.** Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron* 2002; 35:91–105.
- Nagar, B; Overduin, M; Ikura, M et al.** Structural basis of calcium-induced E-cadherin

rigidification and dimerization. *Nature*. 1996; 28;380(6572):360-4

Nakanishi, S. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron* 1994 13: 1031-37.

Nimmrich, V; Grimm, C; Draguhn, A et al. Amyloid β oligomers (A β 1-42 globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium channels. *J Neurosci* 2008; 28: 788-797.

Nose, A; Tsuji, K; Takeichi, M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 1990; 61, 147-155

Okuda, T; Yu, LM; Cingolani, LA et al. Beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104:13479–13484.

Olson, MI; Shaw, CM. Presenile dementia and Alzheimer's disease in Mongolism. *Brain* 1969; 92 (1): 147-156.

Parodi, J; Sepulveda, FJ; Roa, J et al. Beta-amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure. *J Biol Chem* 2010; 285: 2506-2514.

Patel, SD; Ciatto, C; Chen, CP et al. Type II Cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell* 2006; 124, 1255-1268

Peyrieras, N; Hyafil, F; Louvard, D et al. Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983; 80, 6274–6277.

Pham, E; Crews, L; Ubhi, K et al. Progressive accumulation of amyloid- β oligomers in Alzheimer's disease and APP transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *FEBS J.* 2010; 277(14): 3051-67.

Plant, LD; Boyle, JP; Smith, IF et al. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *The Journal of Neuroscience* 2003; 23(13): 5531–5535.

Pokutta, S; Weis, WI. Structure and mechanisms of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:237-61

Puzzo, D; Privitera, L; Leznik, E. et al. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic

- plasticity and memory in hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 2008; 28(53): 14537–14545.
- Radice, GL; Rayburn, H; Matsunami, H et al.** Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol* 1997; 181: 64-78.
- Reiss, K; Maretzky, T; Ludwig, A et al.** ADAM 10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 2005; 24: 742-752.
- Roberds, SL; Anderson, J; Basi, G et al.** BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary β -secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Human Molecular Genetics* 2001; 10(12): 1317–1324.
- Roselli, F; Tirard, M; Lu, J et al.** Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci.* 2005; 25(48):11061-70.
- Russell, CL; Semerdjieva, S; Empson, RM et al.** Amyloid- β acts as a regulator of neurotransmitter release disrupting the interaction between synaptophysin and VAMP2. *PLoS One* 2012; 7(8): e43201.
- Saglietti, L; Dequidt, C; Kamieniarz, K et al.** Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* 2007 54: 461-477.
- Sastre, M; Steiner, H; Fuchs, K et al.** Presenilin-dependent γ -secretase processing of β -amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2001; 2: 835–841.
- Scheuner, D; Eckman, C; Jensen, M et al.** Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 1996; 2(8): 864–870.
- Selkoe, DJ.** Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci.* 1994; 17: 489-517.
- Selkoe, DJ.** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001; 81(2):741-66.
- Seubert, P; Oltersdorf, T; Lee, MG et al.** Secretion of β amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature* 1993; 361: 260–263.

- Seubert, P; Vigo-Pelfrey, C; Esch, F et al.** Isolation and quantification of soluble Alzheimer's betapeptide from biological fluids. *Nature* 1992; 359: 325-327.
- Shankar, GM; Li, S; Mehta, TH et al.** Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008; 14: 837-842
- Shankar, GM; Townsend, M; Walsh, DM et al.** (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid beta-protein induce hippocampal synapse loss but can be neutralized by antibodies and small molecules. *J. Neurosci.* 2007; 27(11): 2866-75.
- Shapiro, L; Colman, DR.** The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron* 1999; 23:427–430
- Shoji, M; Golde, TE; Ghiso, J et al.** Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 1992; 258: 126-129.
- Siu, R; Fladd, C; Rotin, D.** N-cadherin is an in vivo substrate for protein tyrosine phosphatase sigma (PTPsigma) and participates in PTPsigma-mediated inhibition of axon growth. *Mol Cell Biol.* 2007;27(1):208-19.
- Stan, A; Pielarski, KN; Brigadski, T et al.** Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin I in the transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 11116-11121.
- Stappert, J; Kemler, R.** A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. *Cell Adhes Commun* 1994 2: 319-327.
- Stern, Y.** Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2006; 20:S69–74.
- Südhof, TC; Rizo, J.** Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3(12): a005637.
- Suzuki, SC; Takeichi, M.** Cadherins in neuronal morphogenesis and function. *Dev Growth Differ.* 2008; 50 Suppl 1: 119-30.
- Sze, CI; Troncoso, JC; Kawas, C et al.** Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin

in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56(8):933-44.

Tai, CY; Mysore, SP; Chiu, C et al. Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron* 2007; 54: 771-785.

Takeishi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 237-252.

Tampellini, D; Capetillo-Zarate, E; Dumont, M et al. Effects of synaptic modulation on beta-amyloid, synaptophysin, and memory performance in Alzheimer's disease transgenic mice. *J Neurosci*. 2010; 30(43): 14299-304.

Tampellini, D; Rahman, N; Gallo, EF et al. Synaptic activity reduces intraneuronal Abeta, promotes APP transport to synapses, and protects against Abeta-related synaptic alterations. *J Neurosci*. 2009; 29(31): 9704-13.

Tanaka, H; Shan, W; Phillips, GR et al. Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron* 2000; 25, 93–107.

Tang, L; Hung, CP; Schuman, EM. A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 1998; 20: 1165-1175.

Terry, RD; Masliah, E; Salmon, DP et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991; 30: 572-580.

Tienari, PJ; De Strooper, B; Ikonen, E et al. Neuronal sorting and processing of amyloid precursor protein: implications for Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1996; 61: 575–585.

Thoumine, O; Lambert, M; Mège, RM et al. Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 862-875.

Togashi, H; Abe, K; Mizoguchi, A et al. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 2002; 35: 77-89.

Togashi, H; Miyoshi, J; Honda, T et al. Interneurite affinity is regulated by heterophilic nectin interactions in concert with the cadherin machinery. *The Journal of cell biology*. 2006;174:141–151.

- Uemura, K; Kihara, T; Kuzuya, A et al.** Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neurosci Lett* 2006; 402: 278-283.
- Vassar, R; Bennett, BD; Babu-Khan, S et al.** B-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 1999; 286 (5440): 735–741.
- Walsh, DM; Klyubin, I; Fadeeva, JV et al.** Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002a; 416: 535-539.
- Walsh, DM; Klyubin, I; Fadeeva, JV et al.** Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* 2002b 30, 552–557
- Walsh, DM; Selkoe, DJ.** A β Oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem* 2007; 101: 1172-1184.
- Washbourne, P; Dityatev, A; Scheiffele, P et al.** Cell adhesion molecules in synapse formation. *J Neurosci* 2004;24: 9244-9249.
- Weidemann, A; Eggert, S; Reinhard, FBM et al.** A novel ϵ -cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochem* 2002; 41: 2825–2835.
- Wilkinson, FL; Holley, RJ; Langford-Smith, KJ et al.** Neuropathology in Mouse Models of Mucopolysaccharidosis Type I, IIIA and IIIB *PLoS One* 2012; 7(4): e35787.
- Williams, EJ; Williams, G; Gour, B et al.** INP, a novel N-cadherin antagonist targeted to the amino acids that flank the HAV motif. *Molecular Cell Neurosci* 2000; 15:456-464.
- Wolfe, MS; Haass, C.** The role of presenilins in γ -secretase activity. *J Biol Chem* 2001; 276: 5413–5416.
- Yoshida, C; Takeichi, M.** Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* 1982; 28, 217–224.
- Yu, X.** Tools for studying the role of N-cadherin mediated extracellular interaction in neuronal development and function. *Cell Adh Migr* 2011; 5(3): 227–231

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, 15.11.2014, Katharina Achtzehn