

Aus der Technischen Universität Braunschweig

Zoologisches Institut

- Institutsleiter: Univ.-Prof. Dr. Martin Korte -

**Der Einfluss löslicher A β -Oligomere auf die Morphologie hippocampaler Pyramidenzellen
und die Rolle des p75-Neurotrophinrezeptors**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Kurbjeweit, Lisa-Maria

aus Köln

2013

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Wittkowski, WWU Münster

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Martin Korte, Technische Universität Braunschweig

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2013

Aus der Technischen Universität Braunschweig
Zoologisches Institut
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Korte-
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Wittkowski, WWU Münster
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Korte, TU Braunschweig

ZUSAMMENFASSUNG

„Der Einfluss löslicher A β -Oligomere auf die Morphologie hippocampaler Neurone und die Rolle des p75-Neurotrophinrezeptors“
Kurbjeweit, Lisa-Maria

Veränderungen in den Verschaltungseigenschaften von Neuronen bilden die Grundlage zur Feinjustierung von neuronalen Netzen während der Entwicklung und bei Lern- sowie Gedächtnisvorgängen von Menschen und Tieren. Diese synaptische Plastizität umfasst funktionelle und strukturelle Veränderungen an Synapsen, Axonen und Dendriten. Solche Veränderungen können sowohl „positiver“ (synaptische Verstärkung, dendritisches, axonales oder *Spine*-Wachstum) als auch „negativer“ (synaptische Abschwächung, Verlust von dendritischen oder axonalen Verzweigungen, *Spines*) Natur sein. Dies ist von besonderer Relevanz im Zusammenhang mit der Alzheimer-Erkrankung, die nicht nur durch ein Sterben von Nervenzellen, sondern auch durch funktionelle und strukturelle Veränderungen an Neuronen gekennzeichnet ist. Lösliche Oligomere des sich bei Alzheimer massiv ablagernden A β -Peptides können die Aufrechterhaltung einer Langzeit-Potenzierung behindern sowie die Anzahl dendritischer *Spines* reduzieren und die dendritische ebenso wie die axonale Morphologie verändern. Unbekannt ist bisher, was der vermittelnde Rezeptor für diese Effekte ist. In Frage kommt der p75-Neurotrophinrezeptor (p75^{NTR}), der u.a. A β binden, mit zahlreichen Rezeptoren interagieren und negative Plastizität vermitteln kann.

In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob A β seinen negativen Einfluss auf die Struktur und Funktionalität von Neuronen über das p75^{NTR}-System vermittelt. Für diesen Zweck werden verschiedene zelluläre Imaging-Verfahren etabliert, die die unterschiedlichen Reaktionen von WT- und p75^{NTR}ko-Neuronen auf A β -Exposition bildlich darstellen können. Eingesetzt wird zum einen die Analyse fixierter dissoziierter Zellen; ein Live Imaging-Verfahren ermöglicht zum anderen die Beobachtung lebender Einzelzellen. Als Korrelat synaptischer Plastizität werden die Anzahl sowie die Morphologie der dendritischen *Spines* systematisch ausgewertet.

Diese Arbeit bestätigt die grundsätzliche Richtigkeit der Hypothese, dass der p75^{NTR} ein möglicher Rezeptor für A β ist. Denn tatsächlich unterscheiden sich die p75^{NTR}ko-Zellen in ihrem Phänotyp nach A β -Gabe von den WT-Neuronen. Damit bietet diese Arbeit neue Hinweise, dass der p75^{NTR} eine zentrale Rolle in den frühen, präklinischen Krankheitsstadien der Alzheimer-Demenz spielt. In der Konsequenz werden neue, sehr früh wirksame Therapieansätze denkbar.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2013

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss löslicher A β -Oligomere auf die Morphologie hippocampaler Pyramidenzellen und die Rolle des p75-Neurotrophinrezeptors“ im Zoologischen Institut der Technischen Universität Braunschweig unter der Anleitung von Univ.-Prof. Dr. Martin Korte

1. Selbständig angefertigt,
2. Nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. Keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen,
4. Sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung eine in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum

Name

Unterschrift

Inhalt

1.	Einleitung.....	8
1.1	Alzheimer – eine medizinische, ethische und ökonomische Herausforderung.....	8
1.1.1	Alois Alzheimer, Auguste Deter und die „Krankheit des Vergessens“.....	8
1.1.2	Klinisches Bild.....	9
1.1.3	Statistik.....	10
1.2	Der Hippocampus.....	11
1.3	Spines als morphologisches Korrelat synaptischer Plastizität.....	13
1.4	Alzheimer-Pathologie.....	15
1.4.1	APP.....	16
1.4.2	A β	18
1.5	Alzheimer und der p75-Rezeptor.....	19
1.5.1	Einführung in Neurotrophine und ihre Rezeptoren.....	19
1.5.2	Die vielen Gesichter des p75 ^{NTR}	20
1.5.3	p75 ^{NTR} und A β	22
1.6	Ziel dieser Studie.....	23
2.	Materialien und Methoden.....	24
2.1	Materialien und Geräte.....	24
2.1.1	Geräte.....	24
2.1.2	Materialien.....	25
2.1.3	Reagenzien.....	25
2.1.4	Antikörper.....	27
2.1.5	Plasmide.....	27
2.1.6	Medien und Lösungen.....	27
2.2	Zellkultur.....	31
2.2.1	Präparation dissoziierter Kulturen.....	31
2.2.2	Präparation organotypischer Kulturen.....	32
2.3	Transfektionen.....	32
2.3.1	Transfektion dissoziierter Kulturen.....	32
2.3.2	Transfektion organotypischer Kulturen.....	32
2.4	A β	33
2.4.1	A β -Effekte auf dissoziierte Neuronen: Etablierung der Methode.....	33

2.4.2	A β -Applikation auf dissoziierte Kulturen	35
2.4.3	Oligomerisierung von A β	36
2.5	Auswahl und Aufnahme der dissoziierten Zellen.....	37
2.6	Lifeact.....	38
2.7	Time Lapse.....	39
2.8	Auswertung und Statistik	40
2.9	Molekularbiologische Methoden	40
2.9.1	Transformation sowie Präparation der Plasmid-DNA.....	40
2.9.2	Trizin-SDS-PAGE.....	41
2.9.3	Western Blot	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Molekularbiologie	43
3.1.1	Oligomerisierungsverhalten verschiedener A β -Spezies.....	43
3.2	Experimente mit dissoziierten Kulturen.....	46
3.2.1	Effekt von A β_{1-40} auf WT-Neuronen.....	48
3.2.2	Effekt von A β_{1-40} auf p75 ^{NTR} ko-Neuronen.....	50
3.2.3	Prozentuale Darstellung der Effekte von A β_{1-40}	51
3.2.4	Effekt von A β_{1-42} auf WT-Neuronen	52
3.2.5	Effekt von A β_{1-42} auf p75 ^{NTR} ko-Neuronen.....	53
3.2.6	prozentuale Darstellung der Effekte von A β_{1-42}	54
3.3	Time Lapse Experimente	55
3.3.1	Kein Effekt von A β auf CA1-Neuronen	55
3.3.2	A β senkt die <i>Spine</i> -Dichte von CA3-Neuronen.....	56
4.	Diskussion.....	58
4.1	Übertragung von Mauszell-Experimenten auf den Menschen	59
4.2	Auf der Suche nach dem richtigen zellkulturellen Setting.....	59
4.2.1	Stärken und Schwächen der dissoziierten Kulturen.....	60
4.2.2	Anmerkungen zu den Time Lapse-Experimenten	60
4.3	A β oder: Die Nadel im Heuhaufen	62
4.3.1	Identifikation der richtigen A β -Spezies	62
4.3.2	Identifikation der richtigen Konzentration und Zeitdauer	63
4.4	Anmerkungen zu den Western Blots	65
4.5	Mögliche Reversibilität der Effekte.....	66

4.6 Was bedeutet eine Änderung der Morphologie funktionell?	67
4.7 Lifeact	67
4.8 A β und p75	68
4.9 Ausblick	71
5. Danksagung	72
6. Lebenslauf	73
7. Literaturverzeichnis.....	74

1. Einleitung

1.1 Alzheimer – eine medizinische, ethische und ökonomische Herausforderung

1.1.1 Alois Alzheimer, Auguste Deter und die „Krankheit des Vergessens“

„Wie heißen Sie?“

„Auguste“

„Nachname?“

„Auguste“

„Wie heißt ihr Mann?“

„Auguste“

„Wo sind Sie gerade?“

„Hier und überall, hier und jetzt... (...) Es scheint, ich habe mich verloren.“

Als Alois Alzheimer die 51-jährige Auguste Deter im Jahr 1901 auf Bitten ihres Ehemannes zum ersten Mal untersuchte, sah er eine örtlich und zeitlich desorientierte Patientin, die sich kaum an Details oder Ereignisse ihres eigenen Lebens erinnern konnte und inkohärente, nicht zur Frage passende Antworten gab. Ihre Stimmung war von einem ständigen Wechsel von Angst, Misstrauen, Rückzug und Weinerlichkeit geprägt; andere Patienten pöbelte sie an. Nach stetig zunehmendem körperlichen und geistigen Verfall starb Auguste Deter fünf Jahre später an einer Sepsis aufgrund eines infizierten Dekubitus. In der Obduktion fand Alzheimer eigenartige Knäuel innerhalb ihrer Nervenzellen und auffällige Eiweißablagerungen. Auf einer Fachtagung am 06. November 1906 wurden die durch senile Plaques und neurofibrilläre Bündel charakterisierte Pathologie sowie die klinischen Symptome präseniler Demenz erstmalig gemeinsam präsentiert. (Alzheimer, 1907)

Hundert Jahre später ist „Alzheimer“ nicht nur zum geflügelten Wort für Vergesslichkeit geworden, sondern stellt in seiner Unheilbarkeit eine der größten medizinischen Herausforderungen der Industriestaaten dar. Allein in Deutschland sind derzeit etwa 1,1 Millionen Menschen von dieser neurodegenerativen Erkrankung betroffen. Ethische Fragen drängen sich auf zum Umgang mit erwachsenen Menschen, die Schritt für Schritt ihr Gedächtnis und ihre Intelligenz, ihre Persönlichkeit und Identität verlieren. Aus gesellschaftlicher Sicht sind enorme Belastungen für Pflege- und Gesundheitsversorgung die Folge.

Am Ende steht eine ausgeprägte Atrophie der Hirnrinde – doch die Ursachen und primären Krankheitsmechanismen der Alzheimer-Demenz sind noch immer weitgehend unbekannt. Dabei könnten sich gerade hier vielversprechende therapeutische Ansätze finden, um den Krankheitsverlauf nicht nur zu lindern und aufzuschieben, sondern auch zu verhindern oder zu heilen.

1.1.2 Klinisches Bild

Demenz ist definiert als erworbenes Syndrom, das mit der Verschlechterung oder dem Verlust von einst vorhandenen Gedächtnis- und anderen kognitiven Fähigkeiten einhergeht. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einer schweren Einschränkung sozialer und beruflicher Funktionen und letztendlich zum Tod. Die Alzheimer-Demenz, die in etwa 60-70 % der Demenzen vorliegt, wird abgegrenzt von vaskulären Demenzen (ca. 20%) und weiteren Krankheitsentitäten wie der Lewy-Körperchen-Demenz. Mischformen dieser unterschiedlichen Typen können ebenfalls vorliegen. Im klinischen Alltag schwierig ist die differenzialdiagnostische Abgrenzung von Demenz zu Depression, die zum einen als Komorbidität auftreten kann und zugleich eine ganz ähnliche Symptomatik aufweist wie die Demenzerkrankungen.

1.1.2.1 Diagnostische Kriterien

Die genauen diagnostischen Kriterien der Alzheimer-Demenz nach DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) werden in Tabelle 1 dargestellt. Sowohl im DSM-IV als auch in der ICD-10 (World Health Organization, 1992) werden weitere Merkmale neben den allgemeinen Demenzkriterien gefordert, wie etwa ein schleichender Beginn, Progredienz sowie eine differenzialdiagnostische Abklärung gegenüber anderen Demenz-Formen.

Tabelle 1 | Diagnostische Kriterien der Alzheimer-Demenz nach DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994, in der deutschen Bearbeitung von Saß, Wittchen, Zaudig, 1996)

- A) Entwicklung multipler kognitiver Defizite, die sich in folgenden Punkten manifestieren:
 - 1. Gedächtnisstörungen (beeinträchtigte Fähigkeit Neues zu lernen oder früher Gelerntes abzurufen)
 - 2. Zusätzlich eine (oder mehrere) der folgenden kognitiven Beeinträchtigungen:
 - a) Aphasie (Sprachstörung)
 - b) Apraxie (Beeinträchtigung motorische Handlungen durchzuführen, obwohl die motorischen Fähigkeiten intakt sind)
 - c) Agnosie (Unfähigkeit Dinge zu erkennen oder zu identifizieren, obwohl die sensorischen Fähigkeiten intakt sind)
 - d) Störung der exekutiven Funktionen (d.h. Planen, Organisieren, Abstraktionsvermögen)
- B) Die kognitiven Defizite der Kriterien A1 und A2 verursachen signifikante Beeinträchtigungen der sozialen und/oder beruflichen Tätigkeiten und stellen einen deutlichen Verlust präorbider Fähigkeiten dar.
- C) Der Verlauf ist charakterisiert durch einen schleichenden Beginn und eine kontinuierliche kognitive Verschlechterung.
- D) Die kognitiven Defizite sind nicht verursacht durch:
 - 1. Andere Erkrankungen des zentralen Nervensystems, die fortschreitende Defizite des Gedächtnisses und der Kognition verursachen (z.B. zerebrovaskuläre Erkrankungen, M. Parkinson, Chorea Huntington, subdurales Hämatom, Normaldruckhydrozephalus, Gehirntumor)

2. Systemische Erkrankungen, die zu einer Demenz führen können (z.B. Hypothyreose, Vitamin B12-Mangel, Folsäuremangel, Niazinmangel, Neurosyphilis, HIV-Infektion)
 3. Substanzinduzierte Erkrankungen
- E) Die Defizite treten nicht nur im Rahmen eines Delirs auf.
- F) Die Beeinträchtigungen werden nicht erklärt durch eine Störung der Achse I (z.B. Major Depression, Schizophrenie)
-

1.1.2.2 klinische Krankheitsstadien

Eine gewisse „Vergesslichkeit“ ist im Ansehen der Bevölkerung Teil eines normalen Alterungsprozesses. Die genaue Abgrenzung insbesondere der frühen Erkrankungsstadien vom Gesunden ist daher schwierig und hat den Begriff des *Mild Cognitive Impairments* (MCI) geprägt. MCI beschreibt die Manifestation subtiler kognitiver Defizite in der Prädemenzphase. Die Patienten erreichen statistisch bereits schlechtere Ergebnisse in psychometrischen und mentalen Tests wie dem Mini-Mental-Status-Examination-Test (MMSE). (Reisberg et al., 2008) Dementsprechend geht MCI bereits *per definitionem* über die Abnahme der kognitiven Leistungsfähigkeit im Rahmen physiologischer Alterungsprozesse hinaus. (Petersen et al., 1999) Bisher herrscht Uneinigkeit, ob es sich hierbei um eine Vorstufe der Alzheimer-Demenz oder eine eigene klinische Entität handelt. Von den Patienten, bei denen Angsterkrankungen, Depression oder andere Pathologien wie Trauma oder Schlaganfall als Ursache des MCIs ausgeschlossen werden können, gehen pro Jahr immerhin 15-20% in eine Alzheimer-Demenz über. (Grundman et al., 2004)

Das Vorliegen einer manifesten Alzheimer-Demenz wird allgemein in drei Stadien eingeteilt. Mit *leichter Demenz* bleibt die Fähigkeit erhalten unabhängig zu leben (mit entsprechender persönlicher Hygiene und intaktem Urteilsvermögen), obwohl Arbeit und soziale Aktivitäten schon deutlich beeinträchtigt sind. Eine selbständige Lebensführung ist im Stadium der *mittleren Demenz* nur noch mit Schwierigkeiten möglich und ein gewisses Ausmaß an Aufsicht ist erforderlich. In der *schweren Demenz* sind die Aktivitäten des täglichen Lebens weitgehend zusammenhanglos. Beispielsweise sind die Patienten unfähig eine minimale persönliche Hygiene aufrechtzuerhalten, und zeigen sinnlose Aktivitäten oder Apathie. Eine kontinuierliche Aufsicht ist notwendig. (Holtzman et al., 2011)

Es existieren detailliertere Stadienklassifikationen wie die Global Deterioration Scale (GDS) oder das Functional Assessment Staging (FAST). (Reisberg et al., 1982; Scian and Reisberg, 1992) Beide umfassen 7 Stadien von subjektivem und objektivem Normalzustand bis zu schwerer Demenz; mit Unterstadien beschreibt das FAST sogar 16 verschiedene Stadien. GDS und FAST eignen sich daher eher für Studienzwecke als für den klinischen Alltag.

1.1.3 Statistik

Derzeit sind etwa 5,4 Millionen Amerikaner an Alzheimer erkrankt. Das entspricht etwa 13% der Über 65-Jährigen und 43% der Über 85-Jährigen. Schätzungen zufolge wird die Prävalenz bis zum Jahr 2050 auf 11-16 Millionen Erkrankungen allein in den USA ansteigen. (Hebert et al.,

2003) Damit ist die Alzheimer-Demenz schon heute die fünfthäufigste Todesursache bei den Über 65-Jährigen; in der Gesamtbevölkerung steht sie an 6. Stelle. (Minino et al., 2010)

Die Erkrankung dauert im Mittel etwa vier bis acht Jahre, in Einzelfällen auch bis zu 20 Jahre (Brookmeyer et al., 2002), von denen statistisch der größte Anteil im voll pflegebedürftigen letzten Krankheitsstadium verbracht wird (Arrighi et al., 2010). Etwa 20% des Pflegeaufwandes werden derzeit von professionellen Pflegekräften übernommen. Nur um das derzeitige Verhältnis von Patienten zu Pflegenden zu wahren, werden in den USA bis 2030 geschätzte 3,5 Millionen zusätzliche Pflegekräfte benötigt. (Institute of Medicine, 2008) Damit werden die geschätzten Pflegekosten im Jahr 2050 etwa 1,1 Billionen US-Dollar betragen. (Thies and Bleiler, 2011)

Die Bewältigung der ethischen und ökonomischen Aspekte spielt eine wichtige Rolle in der Auseinandersetzung mit der Alzheimer-Demenz. Daneben kommt der Ergründung der zellulären und molekularen Krankheitsursachen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll, besondere Bedeutung zu.

1.2 Der Hippocampus

Der Hippocampus ist eines der ersten Areale, die von der Alzheimer-Krankheit angegriffen und geschädigt werden. Als zentrale Schaltstelle des limbischen Systems gehört er zum Archikortex und damit zu den ältesten Teilen des Kortex. Für Lern- und Gedächtnisprozesse ist er von großer Bedeutung, bildet sein Verschaltungsmuster doch die Grundlage für Gedächtniskonsolidierung und die Bildung eines deklarativen Langzeitgedächtnisses.

Da diese Arbeit sich mit der Morphologie hippocampaler Neurone im Zusammenhang mit Alzheimer beschäftigt, soll zunächst einmal auf wichtige Aspekte der Hippocampus-Anatomie und -Histologie eingegangen werden.

Der Gyrus dentatus (GD), das Cornu ammonis (CA) sowie das Subiculum (Sub) bilden anatomisch die drei Regionen des Hippocampus. Das Cornu ammonis wird anhand der Morphologie seiner Neurone weiter in die CA1- bis CA4-Regionen unterteilt.

Die verschiedenen Regionen des Hippocampus formen gemeinsam einen trisynaptischen Kreislauf: Die Granulazellen des Gyrus dentatus empfangen als afferentes Zentrum Signale der Sternzellen des entorhinalen Kortex. Sie leiten diese über ihre Axone (Moosfasern) weiter an die apikalen Dendriten der CA3-Neuronen. Diese wiederum projizieren via Schaffer-Kollateralen in die CA1-Region. Von hier aus können die Informationen dann ins Subiculum als efferentes Zentrum weitergeleitet werden, in den kontralateralen Hippocampus oder sogar zurück an den entorhinalen Kortex.

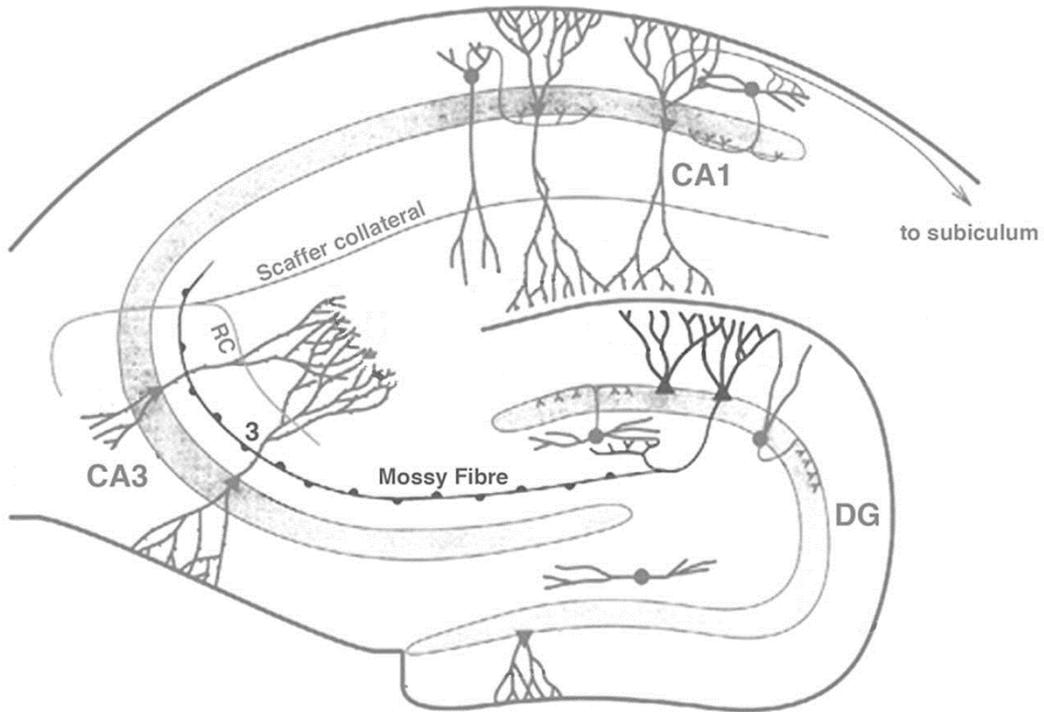


Abb. 1| Schematische Darstellung der hippocampalen Anatomie, angepasst nach Daumas et al., 2009



Abb. 2| CA1-Zellen des Hippocampus

Die im Hippocampus vorherrschenden Zellen sind Granula- und Pyramidalzellen. Letztere finden sich üblicherweise vor allem in Hirnregionen, die für komplexe kognitive Vorgänge verantwortlich sind, wie Hippocampus, Amygdala und zerebralem Kortex. Sie sind charakterisiert durch einen hochkomplexen Dendritenbaum, der über einen apikalen Dendriten mit dem dreieckigen Zellkörper verbunden ist. Des Weiteren verlassen einige kurze basale Dendriten den Zellkörper. Neben den zahlreichen Dendriten verzweigt sich ein einzelnes Axon, um zahlreiche synaptische Verbindungen einzugehen.

Die Granulazellen unterscheiden sich morphologisch deutlich von den Pyramidalzellen: ein eiförmiger Zellkörper trägt einen wenig bis nicht verzweigten dendritischen Baum. Die dendritische Länge der Granulazellen ist deutlich kleiner als die der CA1- und CA3-Neuronen. Gemeinsam hingegen sind allen drei Zelltypen die dendritischen *Spines* als Träger der exzitatorischen Synapsen. Allerdings modulieren inhibitorische

Interneurone, die sich über alle Schichten des Hippocampus verteilen, via feed-back- und feed-forward-Mechanismen die Signalverarbeitung.

1.3 Spines als morphologisches Korrelat synaptischer Plastizität

Nachdem im letzten Absatz bereits die vorherrschenden Zelltypen im Hippocampus behandelt worden sind, soll im Folgenden ein prototypisches Neuron kurz beschrieben werden. Darauf aufbauend soll auf mögliche molekulare Ursachen der Alzheimer-Demenz eingegangen werden.

Neurone gliedern sich in Zellkörper, Axon und Dendriten. Der Zellkörper, auch Soma genannt, bezeichnet den plasmatischen Bereich um den Zellkern, von dem Axone und Dendriten als Fortsätze auswachsen. Dendriten sind feine plasmatische Verästelungen, die über Synapsen Aktionspotentiale anderer Neuronen empfangen und daher die Afferenzen der Nervenzelle darstellen. Über ihren Dendritenbaum kann eine Nervenzelle Signale von bis zu 200.000 anderen Neuronen empfangen. Das Axon ist ein langer, mehr oder weniger verzweigter Fortsatz, der am Axonhügel des Zellkörpers entspringt und von dort Aktionspotentiale an andere Nervenzellen weiterleitet. Es stellt somit die Efferenz des Neurons dar.

Spines sind kleine protoplasmatische Ausstülpungen der Zellmembran von Dendriten, die etwa 90% allen exzitatorischen Inputs des Neokortex empfangen. Sie finden sich vorrangig auf exzitatorischen Neuronen wie den glutamatergen Pyramidalzellen des Neokortex und des Hippokampus, aber auch GABAerge Purkinje-Zellen des Cerebellums tragen *Spines*. (Calabrese et al., 2006)

Spines sind etwa 0,2-3 μm lang; in Abhängigkeit von Neuronen-Typ und -Reife treten etwa 1-10 *Spines*/ μm auf. Die Dichte variiert sowohl von Neuron zu Neuron als auch zwischen den einzelnen Regionen derselben Zelle und wird sowohl von physiologischen als auch pathologischen Ereignissen beeinflusst.

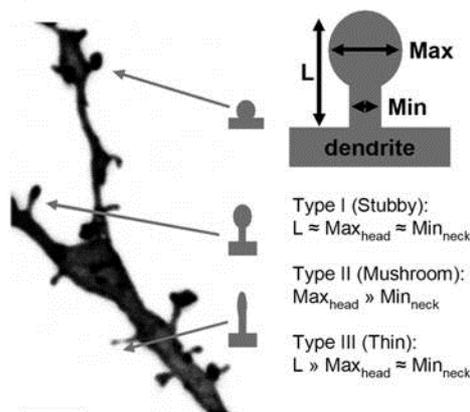


Abb. 3 | Definition verschiedener *Spine*-Typen über die Morphologie. Es werden Typ 1 (*stubby*), Typ 2 (*mushroom*) und Typ 3 (*thin*) unterschieden. Die Einteilung in die drei Kategorien erfolgt anhand des Verhältnisses von maximalem Durchmesser des Kopfes (Max_{head}) zum minimalen Durchmesser des Halses (Min_{neck}) sowie der Länge (L). Der Maßstabsbalken entspricht 2 μm . (Zagrebelsky et al., 2005)

Bereits 1888 von Ramon y Cajal beschrieben, wurden *Spines* lange für stabile Strukturen gehalten, bevor eine aktivitätsabhängige Bildung filopodienartiger Strukturen beobachtet wurde (Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999). Bei Filopodien handelt es sich um vorübergehende Ausstülpungen der Zellmembran, die dünner und schmaler als *Spines* sind und weniger F-Aktin enthalten. Sie haben eine durchschnittliche Lebensdauer von etwa 10 Min. (Ziv and Smith, 1996). In Live Imaging-Studien kann außerdem gezeigt werden, dass sich *Spines* in Abhängigkeit von Aktin rapide in ihrer Form verändern (Fischer et al., 1998); sie zeigen eine Lebenszeit von einigen Tagen oder weniger bis hin zu Stabilität im adulten Gehirn über lange Zeit. (Trachtenberg et al., 2002; Grutzendler et al., 2002) Tatsächlich sind *Spines* hochdynamische Strukturen: sowohl in der Entwicklungsphase als auch im adulten Gehirn ändern

sich Morphologie und Dichte; *Spines* können neu entstehen und sich wieder zurückziehen oder ihre Form ändern. Auch *in vivo* zeigen sich Einflüsse von Lern- und Erfahrungsprozessen auf die Dichte der *Spines*. (Hofer et al., 2009; Kolb et al., 2008; Leuner et al., 2003)

Zur Entstehung der *Spines* gibt es drei verschiedene Hypothesen, die sich keineswegs gegenseitig ausschließen. Nach dem Sotelo-Modell entwickeln sich *Spines* unabhängig von synaptischen Kontakten (Sotelo, 1990), nach dem Miller/Peter-Modell induzieren Kontakte des dendritischen Schaftes mit Axonendigungen die Bildung von *Spines*. (Miller, 1981) In einem dritten Modell stellen Filopodien als Vorstufe dendritischer *Spines* den Kontakt zum Axon her und entwickeln sich dann zu reifen *Spines*. (Yuste and Bonhoeffer, 2004; Portera-Cailliau et al., 2003) Diese Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung, dass Filopodien aktiv Kontakt zu Axonen „initiiert“. (Ziv and Smith, 1996)

Gemäß ihrer Form unterscheidet man Mushroom-, Stubby- und Thin-*Spines*, die anhand der Länge sowie des größten Durchmessers des Kopfes und des kleinsten Durchmessers ihres Halses definiert werden.

Der Kopf des *Spines* enthält die Postsynaptic Density (PSD), eine dichte Matrix, die direkt unter der postsynaptischen Membran liegt und die Rezeptoren und Signalmoleküle der Postsynapse organisiert. Weitere Bestandteile eines *Spines* sind Elemente des glatten ER, Polyribosomen, Teile des endosomal-lysosomalen Weges und der Endozytose-Maschinerie und der *Spine*-Apparat (Deller et al., 2003). Aktinfilamente regulieren die Motilität von *Spines* sowie ihre Morphologie. (Cingolani and Goda, 2008)

Der Aufbau der *Spines* mit einem Kopf und einem schmalen Hals bedingt, dass biochemische Signale sich in einzelnen *Spines* aufbauen können, ohne sich in Dendriten oder benachbarte *Spines* auszubreiten. Auf diese Weise können in einem derartigen biochemischen Mikrokompartment gezielt einzelne Signale isoliert und verstärkt werden. Gleichzeitig erlauben *Spines* die Erregung von einzelnen Synapsen durch spezifische Axone, während andere *Spines* desgleichen Neurons, die mit anderen Axonen in Verbindung stehen, dieses Signal nicht erhalten.

Da die PSD etwa 10% der Oberfläche eines *Spine*-Kopfes einnimmt, ist die Größe desselben proportional zur Größe der PSD, der Anzahl der Rezeptoren (Nusser et al., 1998) und der präsynaptischen Vesikel (Schikorski and Stevens, 1997). Eine Vergrößerung des Kopfes wird daher allgemein mit einer Erhöhung der synaptischen Signalstärke in Verbindung gebracht. Ein schmalerer Hals ermöglicht dazu eine geringere Diffusion von Ca^{2+} -Ionen in den Dendriten, sodass die Ca^{2+} -Konzentration im Kopf erhöht bleibt und für die Aktivierung von LTP-Signalkaskaden zur Verfügung steht. (Noguchi et al., 2005)

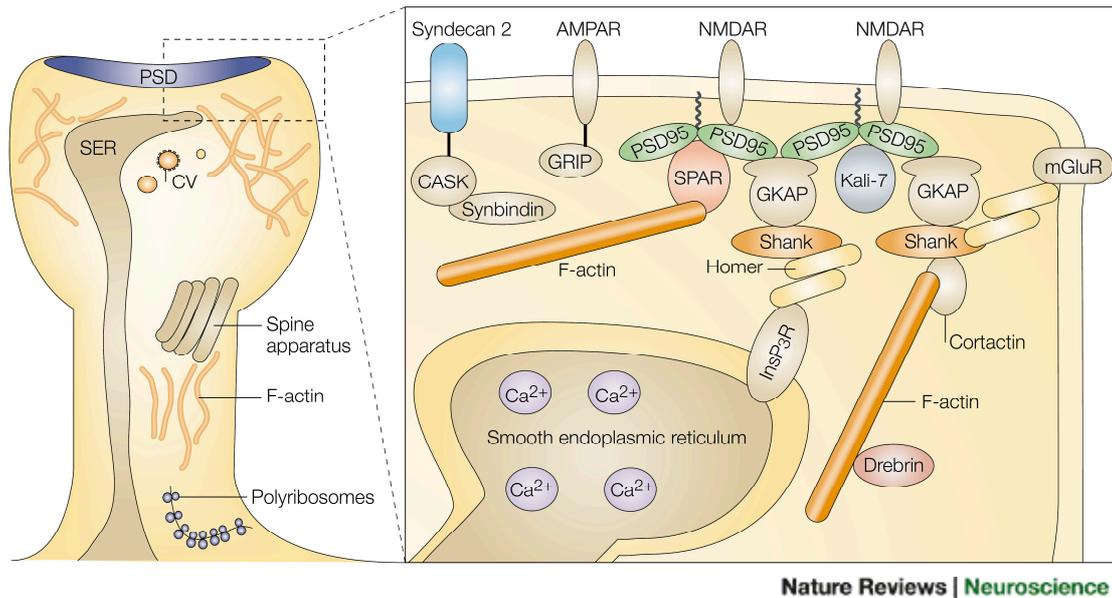


Abb. 4 | Wichtige Komponenten dendritischer Spines. AMPA und NMDA-Untertypen der Glutamat-Rezeptoren sind an der postsynaptischen Membran mit der Postsynaptic Density (PSD) verbunden. Aktinfilamente bilden die strukturelle Grundlage der *Spine*-Form. Über ein Netzwerk von Protein-Interaktionen verbinden sich die Aktinfilamente indirekt mit den Neurotransmitter-Rezeptoren und anderen Transmembranproteinen, die Form und Entwicklung der *Spines* regulieren. Aktin-regulierende Moleküle kontrollieren das Ausmaß und die Rate der Aktin-Polymerisation. Sie werden wiederum von Signalkaskaden der Transmembran-Rezeptoren kontrolliert. (Calabrese 2006; Hering and Sheng, 2001)

Tatsächlich korrelieren die Vergrößerung von *Spines* und LTP miteinander (Yang et al., 2008b; für einen Übersichtsartikel siehe Holtmaat and Svoboda, 2009). LTP-Induktion über hochfrequente Stimulation der Schaffer-Kollaterale im Hippocampus verstärkt CA1-Synapsen und geht somit auch einher mit der Bildung neuer *Spines*. (Engert and Bonhoeffer, 1999) Induktion von Langzeitdepression durch niedrigfrequente Stimulation der gleichen Region führt dagegen zum Verschwinden oder Verkleinern vorhandener *Spines*. (Nagerl et al., 2004; Zhou et al., 2004) So kann die strukturelle Plastizität und unterschiedliche Morphologie der *Spines* als Spiegel synaptischer Plastizität betrachtet werden; sie spielen eine zentrale Rolle in der Bildung, dem Erhalt und der Verstärkung neuronaler Schaltkreise.

Darauf aufbauend ist von Selkoe und anderen postuliert worden, dass Alzheimer in seinen frühen Stadien vor allem die Synapsen eines Neurons in ihrer Funktionalität einschränkt.

1.4 Alzheimer-Pathologie

Ausgeprägte extrazelluläre Ablagerungen des A β -Proteins sind möglicherweise neben tau-Hyperphosphorylierungen für einen Großteil der Alzheimer-Pathologie verantwortlich. Lösliche Oligomere als Vorstufen im Aggregationsprozess könnten synaptische Dysfunktionen verursachen, während die größeren Ablagerungen Entzündungsvorgänge aktivieren oder als biologisches Reservoir für die Oligomere dienen könnten. Auf die Rolle der A β -Oligomere soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Nach der derzeit vorherrschenden Amyloid-Kaskaden-Hypothese hat die Oligomerisierung von A β zunächst subtile Effekte auf die synaptische Funktion, bevor es zur Formierung der A β -Plaques kommt und Mikroglia sowie Astrozyten eine inflammatorische Antwort initiieren. In Folge kommt es zu einer Veränderung der neuronalen Ionen-Homöostase und damit zu oxidativen Schädigungen neuronaler Strukturen. Damit einhergehende Störungen von Kinasen- und Phosphatasenfunktionen werden für die aberrante Oligomerisierung und Hyperphosphorylierung von tau verantwortlich gemacht, welche schließlich in weitreichender neuronaler Dysfunktion und Zelltod resultieren. (Haass and Selkoe, 2007) Am Ende der Kaskade steht eine klinisch manifeste Demenz mit den bereits von Alzheimer beschriebenen A β -Plaques und neurofibrillären Bündeln. In späten Krankheitsstadien zeigt sich eine deutliche Gewichts- und Volumenreduktion des Kortex (insbesondere des Hippocampus) sowie eine Erweiterung der Ventrikel, die in bildgebenden Verfahren oder in Autopsien deutlich mit bloßem Auge erkannt werden können.

1.4.1 APP

Nahezu alle an Trisomie 21 Erkrankten entwickeln eine klinisch manifeste Alzheimer-Demenz in einem mittleren Alter von 50 Jahren. Die Vermutung, dass das A β -kodierende Gen auf dem Chromosom 21 zu finden sei, lag daher nahe, und tatsächlich: Verschiedenen Gruppen gelang es die zu A β komplementäre cDNA zu klonen und damit A β als Teil eines sehr viel größeren Vorläuferproteins, APP, zu identifizieren, das auf dem Chromosom 21 kodiert ist. (Tanzi et al., 1987;Goldgaber et al., 1987;Kang et al., 1987) APP steht für „ β -Amyloid Precursor Protein“, ein rezeptorartiges Transmembranprotein, das ubiquitär von neuronalen und nicht neuronalen Zellen exprimiert wird.

Die Aminosäuren 1-28 des A β liegen außerhalb der Zellmembran, die Aminosäuren 29-43 jedoch innerhalb der Transmembranregion von APP. Wie die A β -Region, die also teilweise intramembranös liegt, von ihrem Vorläuferprotein freigesetzt werden könnte, war lange Zeit unklar. Man ging davon aus, dass das hydrophobe Innere der Membran bereits vorgeschädigt sein müsse, um das Schneiden des Peptids durch Proteasen und Wasser zu ermöglichen. Diese Hypothese erwies sich als irrtümlich, als überraschenderweise sowohl festgestellt wurde, dass A β regelhaft durch intramembranöse Proteolyse produziert wird, als auch dass APP in extrazellulärer Flüssigkeit (z.B. Liquor spinalis) frei zirkuliert. (Seubert et al., 1992;Shoji et al., 1992;Busciglio et al., 1993;Haass, 2004)

1.4.1.1 Freisetzung von A β durch regulierte intramembranöse Proteolyse

A β -Produktion ist ein Beispiel der regulierten intramembranösen Proteolyse. Hierbei werden zunächst die Ectodomänen der Membranproteine durch membranverankerte Proteasen abgeschnitten, den sogenannten Sekretasen. Es werden hierbei also große Peptidbruchstücke in die Extrazellularflüssigkeit freigesetzt.

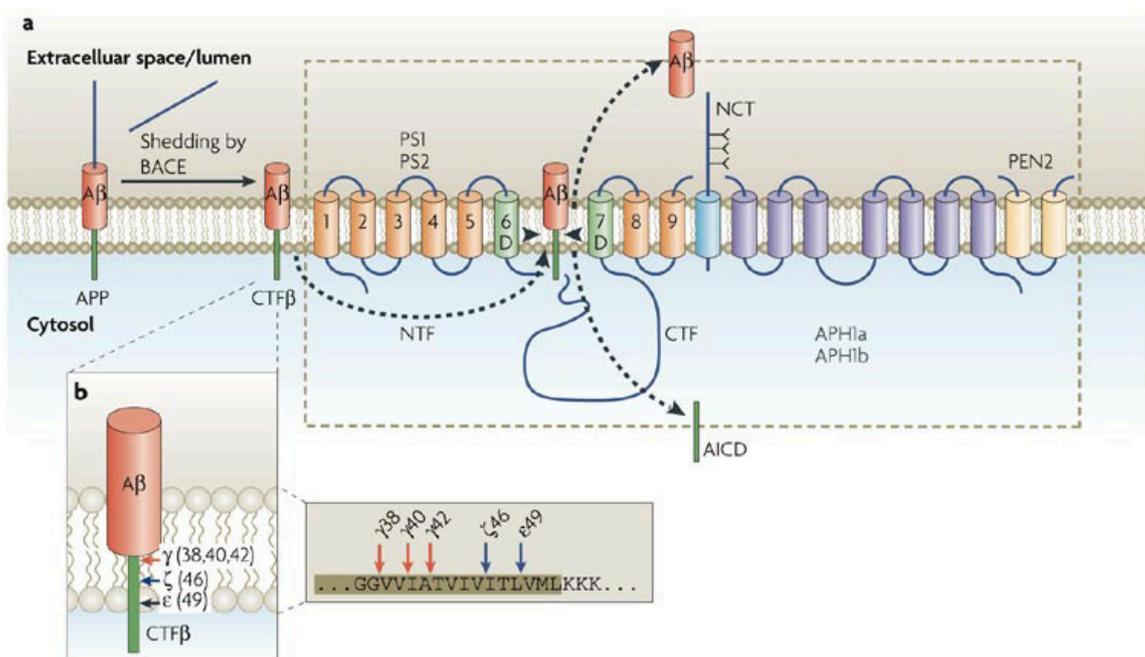
Die in der Membran verbliebenen Peptid-Stümpfe können nun in ihren Transmembrandomänen geschnitten werden, was wiederum zur Freisetzung kleinerer, hydrophober Peptide (z.B. A β im Falle von APP) in die extrazelluläre Flüssigkeit führt. Die intrazellulären Domänen werden dementsprechend ins Zytoplasma entlassen. Hier können sie

möglicherweise Signalfunktionen o.ä. übernehmen. (Brown et al., 2000;Weihofen and Martoglio, 2003;Haass, 2004)

Im Falle von APP können zwei verschiedene membranverankerte Proteasen, die α - und β -Sekretasen, die Ektodomäne abschneiden. Der Angriffspunkt der α -Sekretase liegt innerhalb der A β -Region, sodass eine hohe Aktivität der α -Sekretase die Freisetzung von A β verhindert und lediglich kleinere Fragmente entstehen lässt. (Holtzman et al., 2011)

Die β -Sekretase hingegen hinterlässt einen Peptid-Stumpf, der noch die vollständige A β -Region beinhaltet und nun von der γ -Sekretase intramembranös geschnitten werden kann. Die γ -Sekretase stellt einen Komplex dar, bestehend aus Presenilin-1 oder -2, Nicastrin, APH1 und PEN2. (Sastre et al., 2001;Edbauer et al., 2003;Kimberly et al., 2003;Haass, 2004) Sie kann an mehreren verschiedenen Stellen angreifen:

Die Σ -Spaltung der APP-Transmembrandomäne nahe des Zytoplasmas entlässt ihr Spaltprodukt ins Zytosol. Vermutlich wird das zurückbleibende membranverankerte Fragment anschließend zunächst an der ζ -Stelle geschnitten, bevor schließlich A β durch Schnitte an der γ -Stelle in die extrazelluläre Flüssigkeit freigesetzt wird. Die genaue Position der γ -Stelle ist variabel, sodass die Spaltung entweder an der Aminosäure 38, 40 oder 42 geschehen kann.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Abb. 5] A β -Generierung durch normale proteolytische Prozessierung des β -Amyloid Vorläufer Proteins (APP)
a) Amyloidogene Prozessierung von APP durch β -site APP-cleaving Enzyme (BACE) und den γ -Sekretasen-Komplex. **b)** Verschiedene mögliche Angriffspunkte der γ -Sekretase bei der intramembranösen Proteolyse. Die Aminosäuresequenz in dieser APP-Region ist dargestellt (die Nummern beziehen sich auf die AS-Sequenz von A β , hinterlegte Aminosäuren liegen in der Intramembran-Domäne).
 (Haass and Selkoe, 2007)

Die unterschiedlichen A β -Isoformen unterscheiden sich in der Lipophilie ihrer C-Termini und dementsprechend ihrer Fähigkeit zur Oligomerisierung. Nur das A β_{1-42} -Peptid zeigt eine starke Oligomerisierung *in vivo*. Daher hat die genaue Stelle der Peptidspaltung enormen Einfluss auf die Fähigkeit zur Selbstaggregation und – daraus folgend – der Pathogenität von A β . Einige Ansätze zur medikamentösen Behandlung von A β machen sich dies zunutze, indem sie die Aktivität der γ -Sekretase von Aminosäure 42 auf die Aminosäure 38 verlagern. So wird die Freisetzung des stark oligomerisierenden A β_{1-42} verringert, ohne dass die A β -Produktion an sich gedrosselt wird.

Alle bisher identifizierten APP-Mutationen, die Alzheimer hervorrufen, treten in der A β -Region oder ihr direkt benachbart auf. Mutationen nahe der γ -Schnittstelle führen zu einem erhöhten A β_{1-42} /A β_{1-40} -Verhältnis (Haass et al., 1994; Suzuki et al., 1994), während die sog. Schwedische Mutation nahe der β -Stelle die A β -Produktion allgemein steigert. (Mullan et al., 1992; Cai et al., 1993; Citron et al., 1992) Mutationen innerhalb der A β -Region selbst können die Fähigkeit des Peptids zu oligomerisieren oder Fibrillen zu bilden verstärken, oder aber den Abbau des Peptids verzögern. (Grabowski et al., 2001; Van Nostrand et al., 2001)

1.4.2 A β

Eine der zentralen Fragen in der Alzheimer-Forschung kann folgendermaßen formuliert werden: Was verursacht die leichte, intermittierende Schädigung hippocampaler Funktionen und des episodischen Gedächtnisses?

A β wird als „central player“ in der Alzheimer-Pathologie angesehen, seit es 1985 aus den Amyloid-Plaques von Alzheimer- und Trisomie-21-Erkrankten isoliert werden konnte. (Masters et al., 1985) Gegen die Hypothese, dass Amyloid-Ablagerungen pathogenetisch für die Entstehung von Alzheimer verantwortlich sind, kann jedoch eingewandt werden, dass sich auch bei vielen gesunden älteren Menschen postmortem Amyloid-Ablagerungen im limbischen System sowie dem Assoziationskortex finden. Diese sind allerdings diffus aufgebaut und zeigen weder die für Alzheimer typische Fibrillen-Struktur noch die umgebende neuritische und gliale Zytopathologie. Haass und Selkoe bezeichnen zudem leichte quantitative Korrelationen von unter dem Mikroskop gezählten Amyloid-Plaques zu dem vor dem Tod bestimmtem Ausmaß kognitiver Dysfunktionen als methodisch schwach. Dreidimensionale Ablagerungen in zweidimensionalen Mikroskop-Bildern zu zählen sei ungenau und verliere womöglich kleine und heterogene Ablagerungen; die kognitiven Fähigkeiten der Patienten würden außerdem oft mit einfachen, insensitiven Screening-Verfahren untersucht. (Haass and Selkoe, 2007)

Demgegenüber zeigen ELISA-Analysen in Kombination mit Western Blot und Massenspektrometrie bzw. Immunprecipitation, dass biochemisch gemessene Level von löslichem A β besser mit kognitiven Defiziten korrelieren als simple Zählung von A β -Plaques. (Naslund et al., 2000; Lue et al., 1999; McLean et al., 1999; Wang et al., 1999; Mc Donald et al., 2010). Große fibrilläre Plaques präsentieren überdies den neuronalen Membranen weniger A β -Oberfläche als viele kleine Oligomere, die in synaptische Strukturen hineindiffundieren können. Vor diesem Hintergrund erscheinen lösliche Strukturen als wahrscheinlichere Ursache neuronaler und synaptischer Dysfunktionen.

Unlösliche Aggregate hingegen können den Schaden verstärken, z.B. wurden fibrilläre Ablagerungen mit der Zerstörung neuronaler Fortsätze in Verbindung gebracht. (Tsai et al., 2004). Allerdings werden derartige Ablagerungen vermutlich von kleineren Oligomeren umgeben, sodass es schwierig ist abzugrenzen, ob die großen Ablagerungen tatsächlich direkt lokale Dysfunktionen verursachen oder ob vielmehr ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Ablagerungen und löslichen Oligomeren besteht.

Auf diesen Überlegungen aufbauend, basiert diese Arbeit auf der Hypothese, dass lösliche Oligomere eine Hauptrolle in den frühen, evtl. sogar präsymptomatischen Stadien der Alzheimer-Erkrankung spielen. (Haass and Selkoe, 2007)

1.4.2.1. Wie beeinflusst A β Gedächtnisverlust?

A β -Oligomere können die Aufrechterhaltung von LTP *in vivo* behindern. (Ondrejcek et al., 2012; Walsh et al., 2002) Außerdem konnte an hippocampalen Schnitten gezeigt werden, dass neuronale Aktivität die β -Sekretase stimuliert, und dass die in Folge erhöhte A β -Freisetzung wiederum die exzitatorische synaptische Transmission hemmt. (Kamenetz et al., 2003)

Im Falle von natürlich sezernierten A β -Peptiden erscheint diese LTP-Inhibition bei niedrigen (bis hin zu subnanomolaren) Konzentrationen, wie sie auch natürlicherweise in menschlichem Liquor gefunden werden. Die Effekte der Oligomere auf LTP spiegeln sich auch darin wider, dass bei Ratten die Einprägung eines gelernten Verhaltens durch Injektion von A β -Oligomeren gestört wird. (Cleary et al., 2005) Sowohl aktive als auch passive Immunisierungen gegen A β schützen die Tiere vor dessen Einfluss auf LTP. (Klyubin et al., 2005)

A β -Oligomere binden an Synapsen (Lacor et al., 2004) und sind in der Lage die molekulare Zusammensetzung der Synapse zu verändern (Roselli et al., 2005). Morphologisch spiegelt sich das in einer Verringerung der *Spine*-Dichte in organotypischen Kulturen (Hsieh et al., 2006; Shrestha et al., 2006; Shankar et al., 2007; Wei et al., 2010), dissoziierten Kulturen (Calabrese et al., 2007) und transgenen Mausmodellen (Jacobsen et al., 2006; Knafo et al., 2009) wider. Es ergibt sich in den vorliegenden Studien bisher kein eindeutiges Bild, ob die beschriebenen Effekte nur von A β -Oligomeren oder auch von Monomeren hervorgerufen werden können.

Wenn extrazelluläres, lösliches A β am Beginn einer Alzheimer-Demenz steht, so ist es von zentraler Bedeutung seinen zellulären Interaktionspartner zu identifizieren. In Frage kommt hier der p75-Neurotrophinrezeptor, der zahlreiche Einflüsse auf synaptische Strukturen zu vermitteln vermag; viele von ihnen gleichen den von A β hervorgerufenen synaptischen Veränderungen.

1.5 Alzheimer und der p75-Rezeptor

1.5.1 Einführung in Neurotrophine und ihre Rezeptoren

Als Neurotrophine werden eine Gruppe körpereigener Signalmoleküle bezeichnet, zu der der Nerve Growth Factor (NGF), der Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3

und Neurotrophin-4 gehören. Sie werden aktivitätsabhängig von Neuronen sezerniert und beeinflussen so gut wie alle biologischen Aspekte von Wirbeltierneuronen: Entwicklung und Überleben, Form und Funktion. (für einen Übersichtsartikel s. Huang and Reichardt, 2001)

Zwischen ihnen und den klassischen Neurotransmittern gibt es grundlegende Gemeinsamkeiten: Beide werden an Synapsen freigesetzt und beeinflussen die Permeabilität der Zellmembran für Na⁺-Ionen. Genau wie die Neurotransmitter sind auch die Neurotrophine unabdingbar für die aktivitätsabhängige synaptische Plastizität (für einen Übersichtsartikel s. Poo, 2001).

Ihr Einfluss auf Neuronen wird von zwei verschiedenen Arten von Neurotrophin-Rezeptoren vermittelt:

Die Tyrosinkinasen A (TrkA), TrkB und TrkC (Patapoutian and Reichardt, 2001) binden jeweils bevorzugt ein bestimmtes Neurotrophin (Trk steht für Tropomyosin-Rezeptorkinase). So ist NGF der bevorzugte Ligand von TrkA; TrkB bindet BDNF sowie NT-4 und TrkC das NT-3. Die Aktivierung der Trk-Rezeptoren durch Bindung ihrer Liganden wird allgemein mit Zellüberleben in Verbindung gebracht.

Dem gegenüber steht der Pan-Neurotrophin-Rezeptor p75^{NTR}. Er gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und bindet, anders als die Trk-Rezeptoren, alle Neurotrophine mit der gleichen Affinität. (Rodriguez-Tebar et al., 1991) Seine Aktivierung kann Apoptose induzieren, sodass er gemeinhin als Gegenspieler der Trk-Rezeptoren betrachtet wird.

Ein derartiger Antagonismus gilt auch für die Effekte der Neurotrophine auf synaptische Plastizität: BDNF und der TrkB-Rezeptor beispielsweise spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion und Erhaltung von LTP im Hippokampus (Korte et al., 1998; Chen et al., 1999), während ein Verlust von p75^{NTR} die LTD-Ausbildung behindert, ohne Einfluss auf die LTP zu nehmen. (Rosch et al., 2005; Woo et al., 2005) Dies weist darauf hin, dass die Neurotrophine antagonistische Effekte auf synaptische Plastizität ausüben können, je nachdem welchen Neurotrophin-Rezeptor sie aktivieren.

Da die Trk-Rezeptoren und p75^{NTR} gleichzeitig auf den Membranen der gleichen Zellen exprimiert werden, muss die Entscheidung für den pro- oder anti-apoptischen Weg allerdings von weiteren Faktoren oder Mechanismen abhängig sein.

1.5.2 Die vielen Gesichter des p75^{NTR}

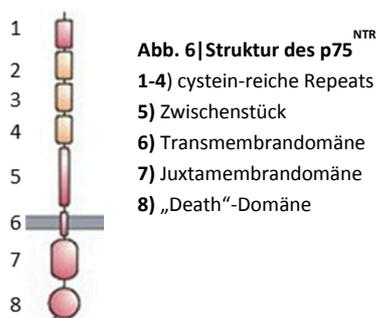


Abb. 6 | Struktur des p75^{NTR}
 1-4) cystein-reiche Repeats
 5) Zwischenstück
 6) Transmembrandomäne
 7) Juxtamembrandomäne
 8) „Death“-Domäne

Wie alle Mitglieder der TNF-Rezeptorenfamilie, hat der p75^{NTR} eine extrazelluläre Domäne, die aus vier cysteinreichen Untereinheiten aufgebaut ist. An diese schließt sich ein Zwischenstück an, das während der intrazellulären Prozessierung des Rezeptors von Bedeutung ist und wiederum in die Transmembrandomäne übergeht. Die intrazellulär gelegenen Juxtamembran- und „Todes“-Domänen zeichnen für die Transduktion pro-apoptischer Signale verantwortlich. (Liepinsh et al., 1997; Coulson et al., 2004)

Die Bindungsstelle für die

Neurotrophine findet sich an den Cystein-Wiederholungen 2-4 (orange). Doch die Affinität von $p75^{\text{NTR}}$ ist nicht auf Neurotrophine beschränkt: neben dem Prion-Proteinfragment Prp und einigen Viren kann auch $A\beta$ an $p75^{\text{NTR}}$ binden und dadurch u.a. den Untergang der Zelle induzieren. (Yaar et al., 1997; Kuner et al., 1998; Perini et al., 2002)

$p75^{\text{NTR}}$ kann mit diversen anderen Transmembranproteinen interagieren, darunter die Trk-Rezeptoren, der Nogo-Rezeptor, kleine Ganglioside sowie das Ankyrin-repeat rich membrane spanning-Protein (ARMS).

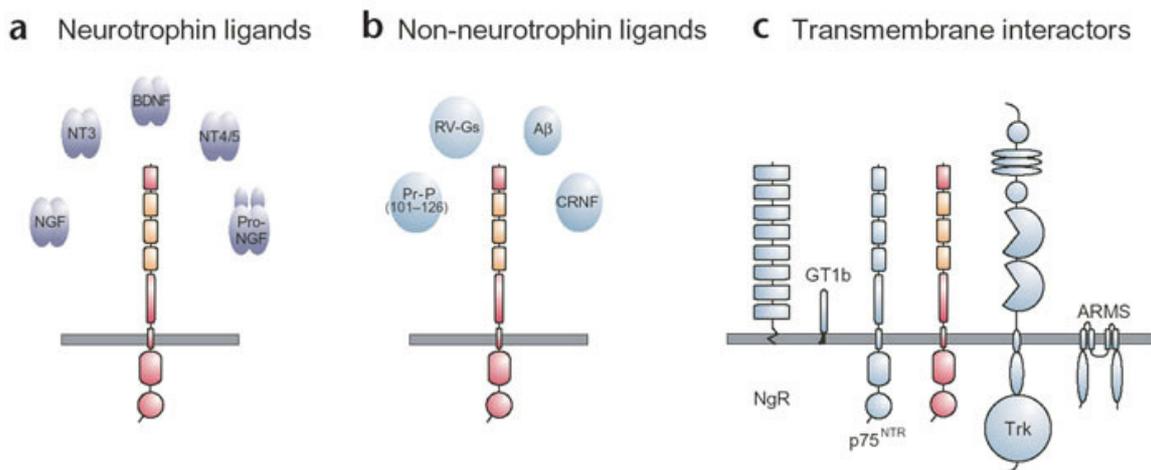


Abb. 7| $p75^{\text{NTR}}$: Liganden und Transmembran-Interaktionspartner

a) und b) extrazelluläre Liganden des $p75^{\text{NTR}}$ c) $p75^{\text{NTR}}$ interagiert mit bestimmten Gangliosiden wie GT1b und Membranproteinen wie dem Nogo-Rezeptor (NgR), sich selbst, den Trk-Rezeptoren und dem Ankyrin Repeat Rich Membrane spanning protein (ARMS). (Dechant and Barde, 2002)

Wie alle TNF-Rezeptoren, hat $p75^{\text{NTR}}$ selbst keine katalytische Aktivität; seine Signale sind daher abhängig von der Rekrutierung zyttoplasmatischer Wirkfaktoren. Verschiedene derartige Faktoren konnten bereits identifiziert werden (Dobrowsky and Carter, 2000), und tatsächlich kann $p75^{\text{NTR}}$ viele verschiedene intrazelluläre Signalwege aktivieren. So gilt dies beispielsweise für die Jun-N-terminale Kaspase (JNK) und p53; beides sind Proteasen der Kaspasen-Familie und dementsprechend direkt mit Zelltod assoziiert. (Yoon et al., 1998; Troy et al., 2002; Aloyz et al., 1998) Die enge Verwandtschaft mit anderen TNF-Rezeptoren bedingt, dass die zyttoplasmatische Domäne des $p75^{\text{NTR}}$ auch TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs) binden kann, die ebenfalls eine zentrale Rolle im Überleben der Zelle spielen. (Khursigara et al., 1999; Ye et al., 1999)

Die Vielzahl der möglichen Interaktionspartner des $p75^{\text{NTR}}$ erlaubt einen Einblick in die Vielfältigkeit der Effekte seiner Aktivierung. Die bekannteste und am besten untersuchte seiner Wirkungen ist nach wie vor die Induktion von Apoptose, die während der Entwicklung des Nervensystems und neuronaler Kreisläufe (Majdan and Miller, 1999) sowie im Rahmen von Entzündungen, Konvulsionen und Rückenmarksverletzungen von Relevanz ist. (Dowling et al., 1999; Roux et al., 1999; Beattie et al., 2002) Eine Interaktion mit dem Nogo-Rezeptor verhindert über den Signalweg des Myelin-based-Growth-Inhibitor (MAG) axonale Regeneration. (Wong et

al., 2002;Wang et al., 2002) Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass p75^{NTR} in der Lage ist das Überleben von Schwann-Zellen unter bestimmten Umständen sogar zu fördern. Erwähnenswert ist auch der Umstand, dass die Koexpression von p75^{NTR} die Affinität und Spezifität der Trk-Rezeptoren zu ihren Neurotrophin-Liganden erhöht. (Hempstead et al., 1991;Benedetti et al., 1993;Bibel et al., 1999)

Der negative Einfluss von p75^{NTR} auf synaptische Plastizität (s.oben) spiegelt sich auch morphologisch darin wider, dass p75^{NTR} die Komplexität dendritischer Verzweigung negativ zu modulieren vermag und die Dichte dendritischer Spines erniedrigt. (Zagrebelsky et al., 2005)

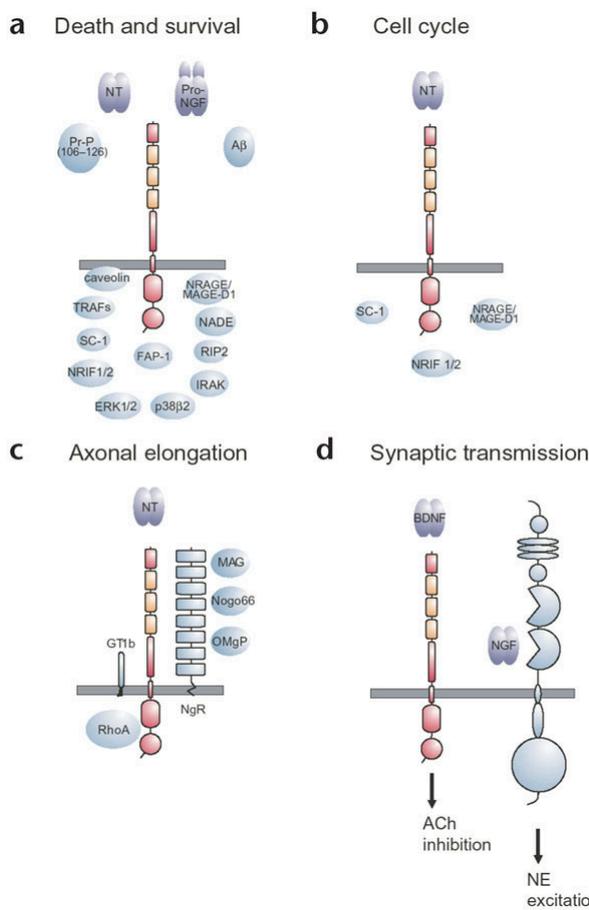


Abb. 8| Beteiligung von p75^{NTR} an zahlreichen verschiedenen biologischen Aktivitäten (Dechant and Barde, 2002)

1.5.3 p75^{NTR} und Aβ

Wie übt Aβ seinen Einfluss auf synaptische Strukturen aus? Einige Eigenschaften des p75^{NTR} machen ihn als vermittelnden Rezeptor wahrscheinlich.

So wird p75^{NTR} hauptsächlich von den cholinergen Neuronen des basalen Vorderhins exprimiert – Regionen, die bei Alzheimer besonders vulnerabel sind. Des Weiteren vermittelt p75^{NTR} negative synaptische Plastizität, programmierten Zelltod und seine Expression macht Zellen anfällig für Aβ-Toxizität. (Rabizadeh et al., 1994) Tatsächlich konnte eine direkte Interaktion von Aβ mit p75^{NTR} bereits gezeigt werden. (Yaar et al., 2002;Yaar et al., 1997;Kuner et al., 1998;Yaar et al., 2002)

Daher ist p75^{NTR} zwar ein wahrscheinlicher Interaktionspartner von Aβ, doch seine Rolle in der Pathogenese von Alzheimer ist bei weitem noch nicht geklärt. Außerdem konzentrieren sich die bisher vorliegenden Studien zur Interaktion von Aβ mit dem p75^{NTR} auf die toxischen Effekte von Aβ und vernachlässigen seinen offenbar regulierenden Einfluss auf neuronale Architektur.

1.6 Ziel dieser Studie

Vor diesem Hintergrund soll hier der Effekt von A β auf die synaptische Struktur p75^{NTR}-defizienter Neuronen untersucht werden. Dazu vergleichen wir die Reaktionen der *Spines* von WT- und p75^{NTR}ko-Zellen auf A β -Behandlungen. Wenn p75^{NTR} tatsächlich der Mediator für die vorpublizierten A β -Einflüsse auf *Spine*-Morphologie und -Dichte ist, erwarten wir hier eine vom WT abweichende Reaktion der p75^{NTR}ko-Zellen.

Als Voraussetzung für diese Versuche muss zunächst die Methodik etabliert werden, die sowohl die A β -Applikation in neuronalen Kulturen, die anschließende morphologische Auswertung als auch die Analyse und Identifikation der geeigneten A β -Spezies umfasst. Um die physiologischen und nicht die toxischen Effekte zu untersuchen, soll mit subletalen A β -Konzentrationen gearbeitet werden.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Geräte

Gerätename	Gerätetyp	Hersteller
ApoTom®		Zeiss
Binokular	Binokular	Zeiss
Blotter	Fastblot B44	Biometra
Digitalkamera	AxioCam MRm Olympus U-CMAD3	Zeiss
Gelkammer		Sigma
Gene Gun	Helios™ gene gun	Bio Rad
Heizrührer	IKA® RTC Basic	Ika-Werke
Inkubator	HERA cell 150	Thermo Scientific
Mikroliterpipetten		Gilson, Eppendorf
Mikroskope	Axioplan 2 imaging Olympus BX61WI	Zeiss Olympus
pH-Meter	pH 720	Inolab
Photometer	Ultrospec 2100 pro	GE Life Science
Schüttler (Vortexer)	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Sterilbank	SterilGARD Class II TypeA/B SterilGARD®III SGG03EN	The Baker Company/Concept GmbH The Baker Company/Concept GmbH
Tischzentrifuge	113 Eppendorf 5415 C	Sigma Eppendorf
Tissue chopper	Mc Ilwain tissue chopper	The Mickle Laboratory
Waage	BP 22 1S	Sartorius
Wasserbad	1003	GFL

2.1.2 Materialien

Material	Hersteller
Bullets	BioRad
Deckgläser (rund, Ø 13mm, Dicke 1)	Marienfeld
Einsätze für Zellkulturschalen	Millicell
Falcon-Röhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt, Greiner Bio One
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
Objektträger (76x26mm)	Menzel
Multiwellplatten	Techno Plastic Products AG
Petrischalen 30/60/100mm	Peske
Pipettenspitzen	PeqLab
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S (Ø 0.2µm)	Schleicher & Schuell
Zellkulturschalen	Techno Plastic Products AG

2.1.3 Reagenzien

Substanz	Hersteller
Acrylamid	Roth
Agar-Agar	Roth
APS	AppliChem
β-Amyloid ₁₋₄₀	American Peptide PSL GmbH Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, BS
β-Amyloid ₁₋₄₂	Prof. M. Henneka, Universität Bonn
B27-Zusatz	Gibco
BME-Medium	Invitrogen
Borax	Sigma
Borsäure	Merck
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth

Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem
BSA (bovine serum albumin)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
FBS/FCS (fetal calf/bovine serum)	Sigma
Fluoro-Gel	EMS Diasum
GlutaMAX	Gibco
Glycerol 87%	AppliChem
Goat Serum	Invitrogen
Hank's Balanzierte Salzlösung(HBSS)	Gibco
Kanamycin-Sulfat	MP Biomedicals
Kynurensäure	Sigma
L-Glutamin	Sigma
Lipofectamin2000®	Invitrogen
β-Mercaptoethanol	AppliChem
Neurobasal-Medium	Gibco
Paraformaldehyd	AppliChem
Pferdeserum	Hyclone
Plasmid-Präparationskit	Qiagen
Poly-L-Lysin	Sigma
SDS	Roth
TEMED	Sigma
TRIS-Puffer	AppliChem
Triton X-100	Sigma
Trizin	AppliChem
Trypsin-EDTA 1x	Sigma

2.1.4 Antikörper

Primär:

Bezeichnung	Quelle	Organismus	Art
Anti-A β ₁₋₁₆ IgG	Covance	Maus	monoklonal
Anti α -CamKII IgG	Zymed® Laboratories	Maus	monoclonal

Sekundär:

Bezeichnung	Quelle	Organismus	Art
Anti-mouse IgG cy5-konjugiert	Dianova	Ziege	polyklonal
Anti-mouse IgG Peroxidase-konjugiert	Sigma-Aldrich	Kaninchen	polyclonal

2.1.5 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pEGFP-N1	eGFP in eukyrotischem Expressionsvektor (CMV-Promotor)	Clontech
pRFPlifeact-N1 et al., 2008)	RFP-lifeact in eukaryotischem Expressionsvektor (CMV promoter) cloned in pEGFP-N1 Clontech	(Riedl

2.1.6 Medien und Lösungen

Organotypische Kulturen

Kulturmedium

BME-Medium	100	ml
HBSS	50	ml
Pferdeserum	50	ml
L-Glutamin	1	ml
50% Glucose	2	ml

Präparationslösung (pH 7,2)

GBSS	98	ml
Kynurensäure (5mM)	1	ml

50% Glucose	1	ml
-------------	---	----

Gey's balanzierte Salzlösung pH 7,4 (GBSS)

CaCl ₂ *2H ₂ O	1,5	mM
KCL	5	mM
KH ₂ PO ₄	0,22	mM
MgCl ₂ *6H ₂ O	1	mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,28	mM
NaCl	137	mM
Na ₂ HCO ₃	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	0,86	mM
D-Glucose	5,5	mM

MitosehemmerIn dest. H₂O:

Uridin	1	M
Cytosin-β-D- Arabinofuranosid *Hydrochlorid	1	M
5-Fluoro-2' -Deoxyuridin	1	M

Stammlösung für Präparation von gene gun-Patronen

CaCl ₂	1	M
Spermidine	0,05	M
PVP in 96% Ethanol	20	mg

*Dissoziierte Kulturen***Komplettmedium**

Neurobasal	50	ml
------------	----	----

B27	1	ml
Glutamin (200mM)	125	µl

Serummedium

2 % inaktiviertes FCS in DMEM

Borat-Puffer pH 8,5 (für Deckgläser)

1,24 g Boratsäure und 1,9 g Borax gelöst in 400 ml dest. H₂O und auf pH 8,5 eingestellt

Zell- und Molekularbiologie

Blockierungslösung Immunhistochemie

In 1x PBS:

Triton-X 100	0,2 %
Ziegenserum	10 %
BSA	1 %

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

KCL	2,7	mM
KH ₂ PO ₄	1,5	mM
NaCl	137	mM
Na ₂ HPO ₄	10,4	mM

TBS-T

Tris/HCL (pH 7,6)	20	mM
NaCl	140	mM

0,1% Tween 20

TBS-X

1 X TBS-T + Triton-X 100

Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4)

NaH₂PO₄*2H₂O 0,04 mM

Na₂HPO₄*2H₂O 0,17 mM

Trenngel für Trizin-SDS-PAGE (16%)

Acrylamid (40%) 49 mL

Gelpuffer 40 mL

Glycerol (87%) 16 g

H₂O 18 mL

APS (10%) 600 μL

TEMED 60 μL

Sammelgel für Trizin-SDS-PAGE (4%)

Acrylamid (40%) 8,7 mL

Gelpuffer 21 mL

H₂O 40 mL

APS (10%) 700 μL

TEMED 70 μL

Anodenpuffer (5x) für Trizin-SDS-PAGE

Tris-HCL pH7 1 mol/L

Gelpuffer für Trizin-SDS-PAGE (pH 8,45)

TRIS 3 mol/L

0,3 % SDS

Kathodenpuffer (5x, pH 8,25)) für Trizin-SDS-PAGE

TRIS 0,5 mol/L

Trizin 0,5 mol/L
0,5 % SDS

Trizin-Probenpuffer für SDS-PAGE

1M TRIS 0,63 mL
10% SDS 4 mL
87% Glycerol 1 mL
H₂O 0,88 mL

Bromphenolblau

10% Mercaptoethanol

Semidry-Blotpuffer (pH 8,5)

Tris/HCl 25 mM
Glycin 150 mM

10% Methanol

2.2 Zellkultur

2.2.1 Präparation dissoziierter Kulturen

Für diese Arbeit wurde als WT der Mausstamm C57BL/6 verwendet. Als p75^{NTR}ko-Stamm wurde p75^{NTR} *exonIV* (p75^{NTR/IV}) auf reinem C57/BL6-Hintergrund verwendet. Die Präparation der dissoziierten Kulturen der Hippocampus-Neuronen wurde am E18-Tag nach der Befruchtung durchgeführt. Die Embryonen wurden dekapitiert und das Gehirn sofort in kaltes GBSS mit Glucose-Zusatz gelegt. Die Hippocampi wurden herauspräpariert und für 30 min bei 37 °C in EDTA/Trypsin inkubiert. Der Trypsinverdau wurde durch 3x1 ml Serummedium gestoppt. Anschließend wurden die verdauten Hippocampi durch Syringieren in einer Pasteurpipette homogenisiert und die Zellen bei 1500 rpm für 5 min. abzentrifugiert sowie anschließend in Serummedium resuspendiert. Nachdem die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt worden war, wurden 500 µl Kompletmedium je Deckglas vorgelegt und 100.000 Zellen pro Deckglas ausplattiert. Nach etwa drei Stunden wurde das Serummedium gegen 500 µl Kompletmedium ausgetauscht.

In der Vorbereitung wurden die Deckgläser zunächst für 3-5 h bei 100 °C in 10 M NaOH inkubiert und anschließend mit dest. H₂O gewaschen. Danach wurden sie für 6 h bei 225 °C gebacken. Jedes Deckglas wurde anschließend mit 0,5 mg/ml Poly-L-Lysin in Borat-Puffer

beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit dest. H₂O wurden die Deckgläser in Multi-Well-Platten verteilt.

2.2.2 Präparation organotypischer Kulturen

Für die Präparation der organotypischen Kulturen wurden p5/6 Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden dekapitiert, die Schädeldecken entfernt und die dorsalen Hälften der Gehirne in kalte Präparationslösung überführt. Die Hippocampi wurden herauspräpariert. Anschließend wurden sie mit dem Gewebeschneider in 400 µm dicke Schnitte geschnitten und für 30 min in GBSS bei 4 °C gehalten. Nach Ende dieser Inkubationszeit wurden je 4 Schnitte auf eine Millicell-Membran in vorgewärmtem Medium gelegt. Nach 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium vollständig ausgetauscht; nach drei Tagen wurden in jedes well 15,4 µl Mitose-Hemmer für 24h gegeben, um die Anzahl der nicht-neuronalen Zellen zu minimieren. Das Medium der organotypischen Kulturen wurde alle drei Tage zur Hälfte gewechselt.

Alle Organentnahmen wurden nach den Richtlinien der Zentralen Tiereinrichtung in Braunschweig durchgeführt.

2.3 Transfektionen

2.3.1 Transfektion dissoziierter Kulturen

Die dissoziierten Kulturen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Lipofectamin 2000® auf Grundlage der Benutzeranweisung transfiziert. Vor Beginn der Transfektion wurde das Medium vollständig abgenommen und durch 300 µl Neurobasal-Medium ohne weitere Zusätze ersetzt.

Pro Deckglas wurden 2 µl Lipofectamin2000® in 50 µl reinem Neurobasal-Medium verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ebenfalls wurden 0,25 µg des ersten Plasmids (für gewöhnlich der zellfüllende Farbstoff fGFP) und 0,75 µg des zweiten Plasmids (der Aktin-markierende Farbstoff RFP-lifeact) gemeinsam ebenfalls in 50 µl Medium verdünnt und 5 min inkubiert. Beide Ansätze wurden zu einem gemeinsamen Transfektionsansatz vereinigt und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden auf jedes Deckglas tropfenweise 100 µl Transfektionsansatz gegeben. Nach einer 50-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen mit dem vor der Transfektion abgenommenen alten Medium versetzt. Im Anschluss an die Transfektion wurde das Medium der Zellen mit Neurobasal-Medium + B27+ L-Glutamin auf 500 µl pro Deckglas aufgefüllt.

2.3.2 Transfektion organotypischer Kulturen

Die organotypischen Kulturen wurden an DIV 7 mit einer Helios-Gene Gun (Bio-Rad) transfiziert.

Gold-Partikel mit einem Durchmesser von 600 nm wurden dabei als Träger der fGFP-DNA mit einem Helium-Druck von 100 psi auf die Schnitte geschossen. Um die Schnitte vor verklumpten

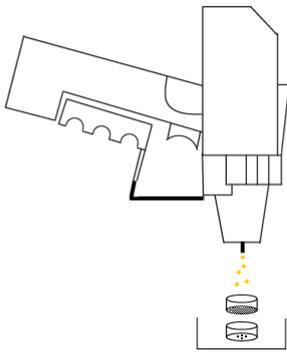


Abb. 9|Prinzip der Helios-Gene Gun

Gold-Partikeln zu schützen, wurde ein Zellkultur-Einsatz mit einer Porengröße von 3 µm als Filter zwischen die Gene Gun und die Schilddrüse gesetzt.

Die Gold-Partikel wurden mindestens einen Tag vor der Transfektion hergestellt, um eine ausreichende Trockenheit der Patronen zu gewährleisten. Für die Herstellung wurden 12,5 mg Gold mit 100 µl Spermidine versetzt. Nach einem Ultraschallbad von 10 s, das Verklumpungen der Goldpartikel löst, wurde das Plasmid hinzugegeben und vorsichtig gevortext,

während 100 µl 1 M CaCl₂ zugegeben wurden. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Plasmidansatz bei 1,5 rpm für 60 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet dreimal mit 96%igen Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurden die Goldpartikel in 96%igem Ethanol + 0,05 mg/ml PVP resuspendiert.

75 cm Tefzel-Schlauch wurden mit N₂ bei einer Flussgeschwindigkeit von 3-4 l/min für 10 min in der Tubing Prep Station gereinigt und getrocknet; anschließend wurde die Goldlösung in den Schlauch gezogen. In den folgenden 3-5 min setzte sich das Gold im Schlauch ab; um eine gleichmäßige Verteilung der Partikel zu gewährleisten, wurde der Schlauch für 30 s rotiert und anschließend wieder mit N₂ für 5 min getrocknet. Zuletzt wurde der Schlauch auf die passende Patronengröße zurecht geschnitten und mit einem Silicapad im Kühlschrank gelagert.

2.4 Aβ

2.4.1 Aβ-Effekte auf dissoziierte Neuronen: Etablierung der Methode

Um einen morphologischen Effekt geringer Aβ-Konzentrationen auf dendritische *Spines* zu zeigen, entschieden wir uns zunächst für einen stark vereinfachten Ansatz und behandelten dissoziierte Neuronen an DIV22 für eine Stunde mit 1µM Aβ (Calabrese et al., 2007). Unter diesen Bedingungen war kein Effekt nachweisbar (Daten hier nicht gezeigt), sodass wir diverse Parameter veränderten.

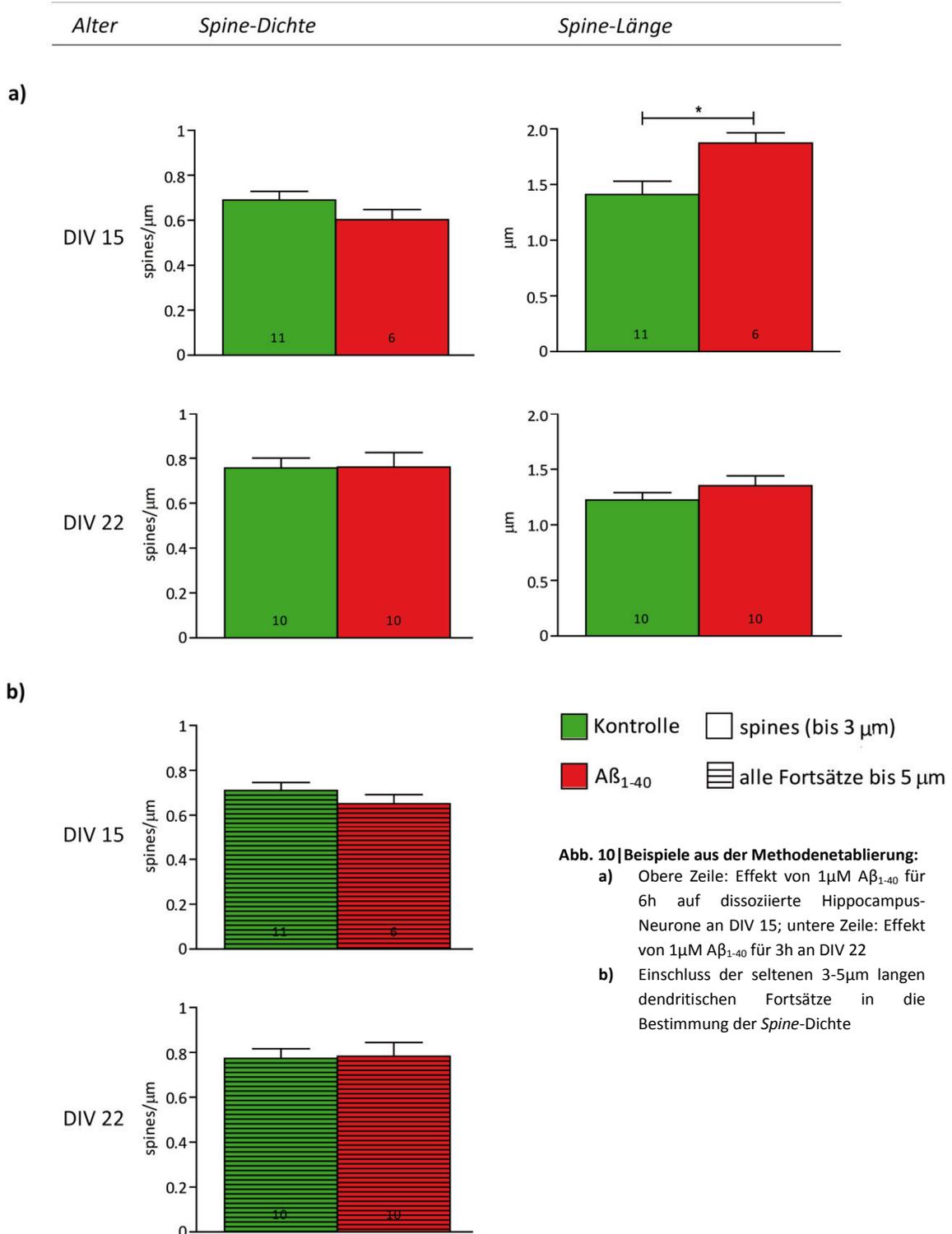
Tabelle 2|Übersicht Methodenetablierung: Spalten 1 und 2 zeigen die einzelnen Parameter und ihre im Laufe der Methodenetablierung durchgeführten Veränderungen. Spalte 3 stellt dar, welche Variationen schließlich etabliert wurden.

Parameter	Variationen	Etablierung
Alter der Zellen	a) 15 DIV b) 22 DIV	15 DIV
Auswahl der Zellen	a) alle lebenden Zellen b) Anwendung der Kriterien in Abb. 11	Anwendung der Kriterien
Aβ-Konzentration	a) 1µM b) 10µM c) 20µM	1µM

	d) 50 μ M	
Zeitdauer der Behandlung mit Aβ	a) 1h b) 3h c) 6h d) 12h e) 24h	Vergleich von 6h, 12h und 24h Behandlung
Aβ-Spezies	a) A β ₁₋₄₀ (Quelle: American Peptide) b) rein monomeres A β ₁₋₄₀ (Quelle: HZI BS) c) A β ₁₋₄₂ (Quelle: AG Henneka)	A β ₁₋₄₀ (Quelle: American Peptide) A β ₁₋₄₂ (Quelle: AG Henneka)
Aβ-Oligomerisierungszustand	a) monomerisch b) oligomerisiert	Vergleich monomerisch vs. Oligomerisiert
BSA im Medium als Schutz vor möglicher Prezipitation von Aβ	a) ja b) nein	Nein
Auswertung der Fortsätze	a) nur bei Erfüllung der <i>Spine</i> -Definition (bis 3 μ m Länge) b) separate Messung von Fortsätzen von 3-5 μ M Länge	nur bei Erfüllung der <i>Spine</i> -Definition

Auf eine detaillierte Präsentation aller während der Methodenetablierung durchgeführten Experimente und erhobenen Daten wird hier verzichtet; einige Beispieldaten sind in Abb. 10 dargestellt. Eine Reduktion der *Spine*-Dichte einhergehend mit einer signifikanten Verlängerung der *Spines* konnte erstmalig an 15 DIV alten Neuronen gezeigt werden (**a**). Bei 22 DIV alten Neuronen zeigte sich keine Veränderung (**a**), sodass die weiteren Experimente zu dissoziierten Neuronen mit 15 DIV alten Kulturen durchgeführt wurden.

Eine Verlängerung der *Spines* auf über 3 μ m würde bedeuten, dass diese aus der Definition eines *Spines* und somit aus der Bestimmung der *Spine*-Dichte herausfielen. Um hier keinen Phänotyp zu übersehen, wurden in einigen Vorexperimenten dendritische Fortsätze von 3-5 μ m in die *Spine*-Dichte eingeschlossen (**b**). Da sich hier keine Veränderung im Vergleich zur strengen Anwendung der *Spine*-Definition zeigte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.



2.4.2 Aβ-Applikation auf dissoziierte Kulturen

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Aβ₁₋₄₀ oder Aβ₁₋₄₂ bzw. der Kontrollsubstanz behandelt. Dafür wurde die Hälfte des Mediums abgenommen, mit der erforderlichen Menge Aβ oder der Kontrollsubstanz versetzt und anschließend zurück auf die

Zellen gegeben. Nach Ende der Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen für 15 min in kaltem 4% PFA bei 4°C oder über Nacht bei RT fixiert, anschließend dreimal in 1x PBS gewaschen und schließlich (wenn keine Immunhistofärbung durchgeführt wurde) mithilfe von Fluoro-Gel eingedeckelt.

2.4.3 Oligomerisierung von A β

Das Peptid wurde zunächst in 10 mM NaOH gelöst, sodass sich eine Konzentration von 220 μ M (oder 1mg/mL) ergab. Nach einem einminütigen Ultraschallbad wurde die Lösung aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zum Start der Oligomerisierung wurde das A β in Tris-Puffer (pH 7) bis zu der gewünschten Oligomerisierungs-Konzentration verdünnt und anschließend bei 37°C inkubiert. Da A β ₁₋₄₂ deutlich schneller oligomerisiert als A β ₁₋₄₀, wurden die Inkubationszeiten für die Oligomerisierung kürzer angesetzt als bei A β ₁₋₄₀.

Tabelle 3 | Darstellung der verschiedenen Ansätze zur Oligomerisierung von A β : Die Konzentrationen und Inkubationszeiten wurden variiert, um das Oligomerisierungsverhalten von A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ verfolgen zu können und u.a. per Western Blot die richtige A β -Spezies sowie das passende Oligomerisierungsprotokoll auswählen zu können.

<i>Peptid</i>	<i>Konzentration TRIS-Puffer pH7 [mM]</i>	<i>Konzentration Aβ [μM]</i>	<i>Inkubationszeit [h]</i>
Aβ₁₋₄₂	50	25	0
			3
			6
Aβ₁₋₄₀ (Quelle: PSL)	50	25	0
			6
			12
			24
Aβ₁₋₄₀ (Quelle: American Peptide)	50	25	0
			6
			12
			24
Aβ₁₋₄₀ (Quelle: American Peptide)	100	15	0
			6
			12
			24

2.5 Auswahl und Aufnahme der dissoziierten Zellen

Die Bilder der fixierten dissoziierten Neuronen wurden mithilfe eines Axioplan 2- Mikroskops (Zeiss) mit ApoTome®-Modul (Zeiss) aufgenommen. Es wurden etwa 10 repräsentative Zellen pro Deckglas ausgewählt, und mit einem 20x 0.8 NA Plan-APO-Objektiv (Zeiss) für Übersichtsaufnahmen und einem 63x 1.4 NA Plan-APO Ölimmersions-Objektiv für Detailaufnahmen aufgenommen. Für die Detailaufnahmen wurden Bildstapel in der z-Ebene mit einem Abstand von 0,5µm voneinander aufgenommen.

Um exzitatorische und inhibitorische Neuronen voneinander abgrenzen zu können, führte ich anfangs immunhistochemische Markierungen der Zellen mit dem CamKII-Antikörper durch. Die Zellen wurden über Nacht in 4%igen Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert. Vor Zugabe des ersten Antikörpers wurden unspezifische Bindungsstellen für 60 min bei Raumtemperatur mit 1,5% Ziegen Serum und 0,4% Triton-X 100 in 1xPBS blockiert. Der erste Antikörper wurde in der gleichen Blockierungslösung verdünnt und auf den Zellen zunächst für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der CamKII-Antikörper (aus der Maus) wurde 1:500 verdünnt. Am folgenden Tag wurde der zweite Antikörper in PBS hinzugegeben und 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Zellen bereits GFP und RFPLifeact exprimierten, wählte ich für den Anti-Maus-Antikörper eine cy5-Markierung (dunkelrot). Der sekundäre Antikörper wurde 1:200 verdünnt. Abschließend erfolgte das Eindeckeln der Zellen auf Objektträgern mithilfe von Fluoro-Gel.

Zur Analyse wurden zunächst ausschließlich Zellen herangezogen, die ein positives CamKII-Signal in der immunhistochemischen Färbung zeigten und sich somit als exzitatorische Neurone auswiesen. Die Kriterien zur Auswahl der Zellen wurden im Verlauf der Arbeit insoweit ergänzt, als dass die Zellen wenigstens einen Dendriten mit einer Länge von mind. 250 µm haben mussten, um die Ergebnisse nicht durch Granulazellen zu verfälschen. Im Laufe der Arbeit ließ sich beobachten, dass ausnahmslos alle Zellen mit einer Dendritenlänge von über 250µm CamKII-positiv waren, sodass letzteres Kriterium schließlich verworfen werden konnte. Da der Ansatz dieser Arbeit ist, die physiologischen Effekte von Aβ im nicht-toxischen Bereich zu untersuchen, wurden grundsätzlich nur gesund aussehende Zellen zur Auswertung herangezogen.

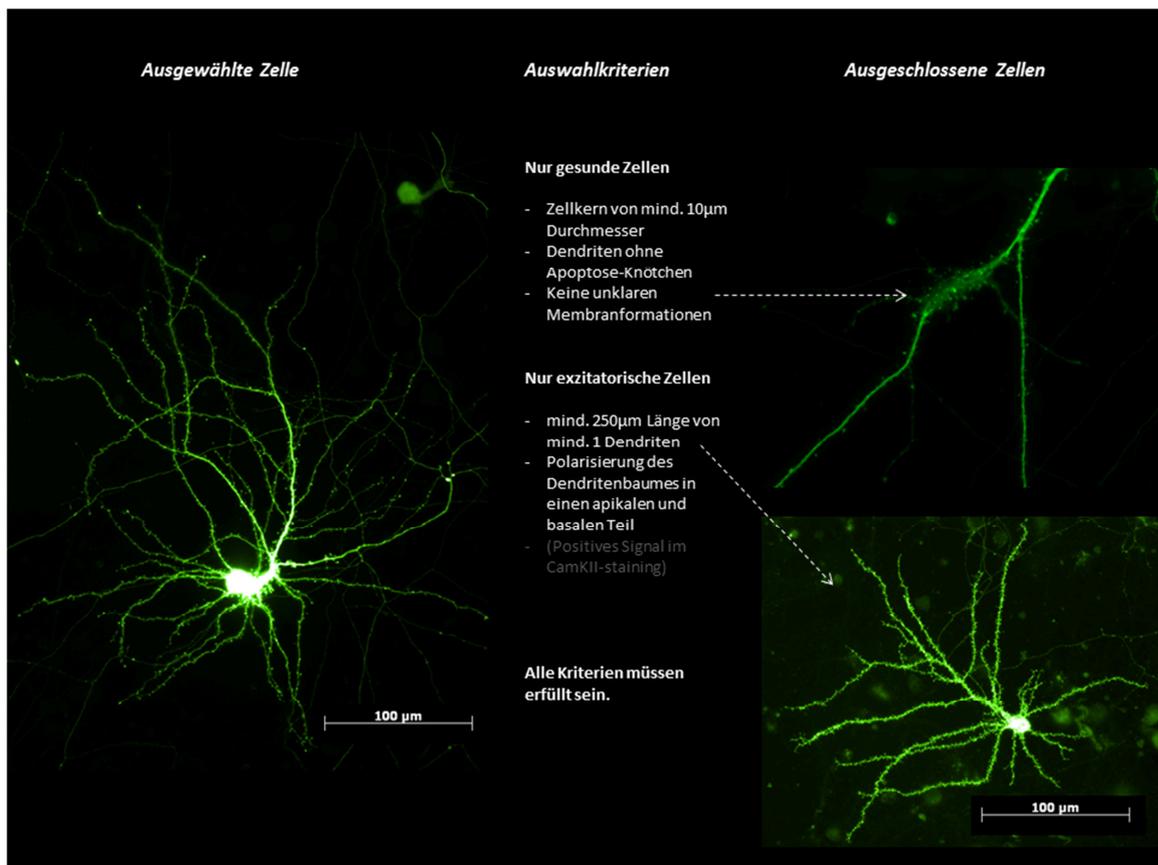


Abb.11 | Kriterien zur Auswahl der Neuronen

2.6 Lifeact

Es ist davon auszugehen, dass Veränderungen in der *Spine*-Morphologie und -Anzahl nur durch Umbauten des Zytoskeletts von statten gehen können. Als mögliches Werkzeug, die Effekte von A β nicht nur morphologisch, sondern auch anhand der Veränderungen des Zytoskeletts beschreiben zu können, bietet sich *Lifeact* als *in vivo*-Marker an. Dieses 17 Aminosäuren große Peptid kann mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert werden und bindet an F-Aktin-Strukturen eukaryotischer Zellen, ohne die Aktin-Dynamik zu beeinflussen.

Wir exprimierten fGFP und RFP-*Lifeact* in allen verwendeten dissoziierten Zellkulturen gemeinsam, um sowohl morphologische Veränderungen als auch Verschiebungen in der Konzentration von F-Aktin beobachten zu können. fGFP diente hierbei als grün fluoreszierende Membranmarkierung zur Zählung der Spines sowie Analyse ihrer Morphologie. Intensitätsmessungen des rot fluoreszierenden RFP-*Lifeact* sollten dabei die Rolle des Zytoskeletts beschreiben. Eine Abnahme der Intensität im Bereich des *Spine*-Kopfes wäre bei einer funktionellen Schwächung der Synapse zu erwarten, die schließlich mit der Bildung der sog. dünnen Dornen (*Thin Spines*) einhergehen würde.

Allerdings zeigte sich die Signalstärke der einzelnen Zellen im RFP-*Lifeact*-Kanal als schwach und unzuverlässig, obwohl alle transfizierten Zellen RFP-*Lifeact* exprimierten. Eine Auswertung und statistische Analyse der *Lifeact*-Bilder ließ sich letztendlich aufgrund der schlechten Bildqualität nicht durchführen.

2.7 Time Lapse

Anhand von organotypischen Kulturen wurden sog. *Time Lapse*-Experimente durchgeführt, bei denen ein und dieselbe Zelle mehrmals zu verschiedenen Zeitpunkten fotografiert und analysiert wurde. *Time Lapse*-Experimente erlauben somit zum einen eine „vorher-nachher“-Betrachtung einer einzelnen Zelle, zum anderen kann man den zeitlichen Verlauf möglicher Veränderungen genauer verfolgen.

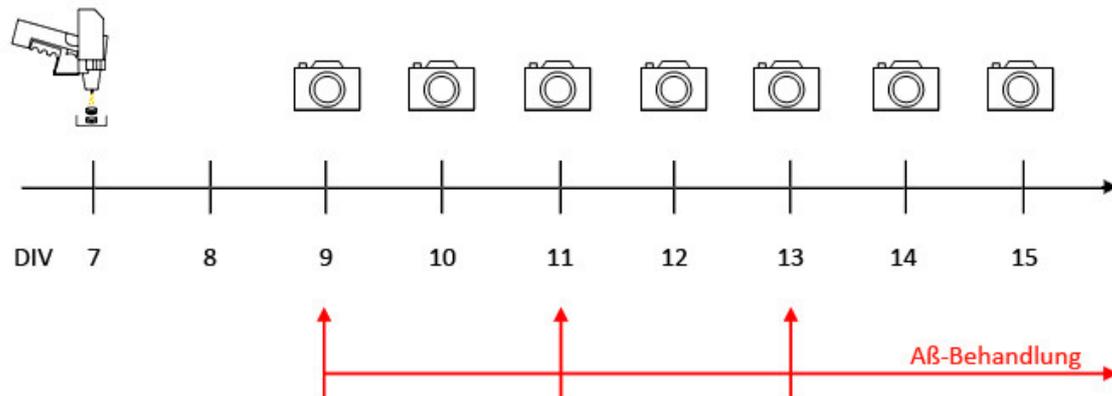


Abb. 12 | Gestaltung der Time Lapse-Experimente: Die Gene Gun stellt den Zeitpunkt der Transfektion der Zellen mit fGFP dar, die Kameras symbolisieren die Zeitpunkte der Bildaufnahmen. In rot ist die Zeitspanne der Aβ-Behandlung dargestellt, die Pfeile indizieren die Zeitpunkte des Wechsels des mit Aβ versetzten Mediums.

An DIV7 wurden die Kulturen mit der Gene Gun beschossen, sodass einzelne Zellen anschließend fGFP exprimierten. Nach einer Expressionszeit von 48 h wurden die Zellen zum ersten Mal mikroskopiert, ausgewählt und fotografiert. Das Treatment mit $1 \mu\text{M}$ A β_{1-40} erfolgte unmittelbar danach, indem die Hälfte des Mediums gewechselt und das frische Medium mit der erforderlichen Menge A β versetzt wurde. Anschließend wurden sowohl CA1- als auch CA3-Zellen für den Zeitraum von einer Woche täglich fotografiert. Ein vollständiger Mediumwechsel, bei dem selbstverständlich auch das A β erneut zugegeben wurde, erfolgte während dieser Woche alle 48h (Abb. 12, rote Pfeile).

Für die Aufnahme der Zellen wurden die Schnitte vom Medium in warmes HBSS umgesetzt, das zuvor mit Streptomycin, Penicillin und Fungiziden (je 1:200) versetzt worden war. Unmittelbar nach Aufnahme der Zellen wurden die Schnitte zurück auf das Medium gesetzt.

Die Aufnahme der Zellen wurde mithilfe eines Olympus-Mikroskop durchgeführt. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein 10x Objektiv (NA 0,30) verwendet, für die Detailaufnahmen ein 40x Objektiv (NA 0,80). Für die Detailaufnahmen wurden Bildstapel in der z-Ebene mit einem Abstand von $0,5 \mu\text{m}$ voneinander aufgenommen.

Die Time Lapse-Experimente wurden zum Teil durchgeführt und analysiert von Carolin Riemer.

2.8 Auswertung und Statistik

Die Bildanalyse erfolgte anhand der NeuroLucida®- und NeuroLucida Explorer®-Software (Microbrightfield) sowie ImageJ. Es wurden sekundäre und tertiäre Dendriten aus dem mittleren Teil des Dendritenbaumes zur Analyse verwendet. Die Zählung der *Spines* geschah auf einer Gesamtlänge von 280-380 μm je Zelle; die Ausmessung der *Spines* beschränkte sich auf 80-100 μm pro Zelle. Zu Beginn der Arbeit wurden nicht nur die Länge der *Spines*, sondern auch die Durchmesser von *Spine*-Kopf und -Hals bestimmt, um die Zuordnung zu den verschiedenen *Spine*-Typen vorzunehmen. Dies ist eine etablierte Methodik für organotypische Kulturen. Allerdings stellte sich im Laufe dieser Arbeit heraus, dass sie für dissoziierte Kulturen vermutlich aufgrund der höheren Heterogenität weniger geeignet ist und viel methodenbedingte Variabilität aufweist. Daher wurde sich hier auf die Bestimmung der *Spine*-Länge beschränkt.

Um sicherzugehen keinen Phänotyp zu übersehen, der sich in einer Verlängerung der *Spines* auf über 3 μm zeigen und somit aus der Definition der *Spines* herausfallen könnte, wurden bei einem Teil der Experimente zusätzlich separat dendritische Fortsätze von 3-5 μm Länge gezählt und ausgemessen.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel (Versionen 2007 und 2010) sowie Prism 5 (GraphPad Software). Es wurden zweiseitige t-Tests durchgeführt, wobei Werte mit $p < 0.05$ als signifikant und Werte mit $p < 0,01$ und $p < 0,001$ als hochsignifikant gewertet wurden.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Transformation sowie Präparation der Plasmid-DNA

Vor der Transfektion der Neuronen mussten zunächst die Plasmide für fGFP und RFP-lifeact vervielfältigt werden.

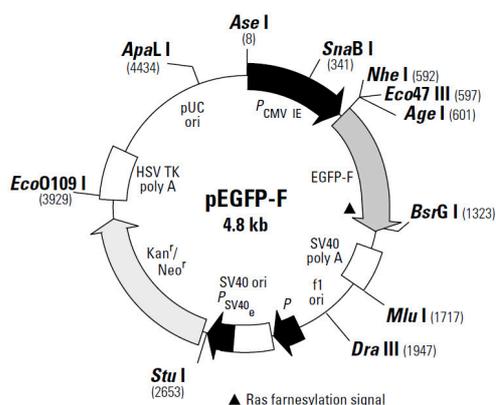


Abb. 13| Plasmidkarte des Vektors für fGFP (Clontech)

Bei der Transformation wird freie DNA, in diesem Fall in Plasmidform, auf kompetente E.Coli-Bakterien gegeben und von diesen aufgenommen. Neben der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz enthält ein solcher Vektor einen Selektionsmarker, wie z.B. eine Kanamycin- oder Ampicillin-Resistenz. Durch das Züchten der transformierten Bakterien auf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetztem Nährmedium können die Bakterien, die das gewünschte DNA-Konstrukt tatsächlich aufgenommen haben, selektiert werden.

Zunächst wurden pro Ansatz 30 μl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 μl

DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und einem Kälteschock für 5 min auf Eis wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 60 min bei 37 °C stark geschüttelt. Anschließend wurden pro Ansatz 100 µl auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte ausgewählt, in 3 ml LB-Medium mit Kanamycin angeimpft und für mehrere Stunden bei 37 °C wachsen gelassen. Diese Vorkultur wurde in ca. 300 ml LB-Medium mit Kanamycin (Verdünnung 1:1000) überführt und über Nacht bei 37 °C stark geschüttelt. Die DNA wurde am folgenden Tag mithilfe eines QIAGEN®-Midiprep-Kits präpariert.

2.9.2 Trizin-SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine biochemische Methode zur Auftrennung von Stoffgemischen im elektrischen Feld und kann somit zur Analyse von Proteinmischungen herangezogen werden. Hier habe ich sie eingesetzt, um das Auftreten und das Ausmaß der Oligomerisierung von A β nachzuweisen. SDS denaturiert Proteine und das β -Mercaptoethanol im Probenpuffer spaltet Disulfidbrücken. Da somit nicht-kovalent gebundene Oligomere wieder in die Monomere aufgespalten werden, beschränkt sich die Nachweiskraft auf SDS-stabile, also kovalent verbundene Oligomere. Das SDS belädt die Peptide mit zahlreichen negativen Ladungen, sodass sich die Proteine anschließend im elektrischen Feld nach ihrer Größe auftrennen und als einzelne Banden im Gel nachgewiesen werden können.

2.9.2.1 Crosslinking von A β -Oligomeren

Um die Problematik zu umgehen, dass eventuell vorhandene A β -Oligomere durch die Behandlung mit SDS-Probenpuffer wieder dissoziieren könnten und somit nicht nachweisbar wären, führte ich bei einem Teil der Proben zuvor ein Crosslinking durch. Ziel hierbei ist es, kovalente Quervernetzungen innerhalb der Oligomere zu erzeugen, die von der denaturierenden Wirkung des SDS nicht beeinflusst werden. Alle zuvor entstandenen Oligomere sind daher anschließend mit dem Western Blot nachweisbar.

Als Crosslinker nutzte ich BS³, das zunächst in DMSO gelöst und anschließend mit einer finalen Konzentration von 5 mM auf die Proben gegeben und für 30 min bei RT inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tris mit einer finalen Konzentration von 50 mM gestoppt. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation bei RT konnten die Proben erneut eingefroren oder sofort mit Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen werden.

2.9.2.2 Herstellung der Gele

Zunächst wurden die verschiedenen Bestandteile des Trenngels gemischt, sofort nach Zugabe des Katalysators TEMED und des Polymerisationstarters APS in die Gießkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Auspolymerisierung des Gels wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel über das Trenngel gegossen. Anschließend wurden die Kämme für die Probenaschen in das Sammelgel gesteckt. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, konnten die Gele für die Aufbewahrung im Kühlschrank verpackt und in Wasser getränkt werden.

2.9.2.3 Durchführung

Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit TRIZIN-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Der Prestained-Marker wurde für lediglich 30 s bei gleicher Temperatur aufgekocht.

Ein zuvor gegossenes Gel wurde in die Gelkammer eingespannt; diese wurde mit den entsprechenden Puffern für die Anode und die Kathode gefüllt. Es wurden 5 µL des Markers und 10 µL der Proben aufgetragen.

Zunächst wurde die Kammer bei 10 mA/Gel, 100V und max. 10 W laufen gelassen. Nach Erreichen der Trennschicht zwischen Sammel- und Trenngel nach etwa 40 min wurden die Stromstärke auf 20 mA/Gel und die Spannung auf 200 V erhöht.

2.9.3 Western Blot

Soll ein spezifisches Peptid nachgewiesen werden, dass sich in einem Peptid-Gemisch befindet (z.B. in Medium gelöstes Aβ), ist eine normale Coomassie-Färbung nicht ausreichend, da diese alle Peptide unspezifisch anfärbt. In diesem Falle muss ein Western Blot durchgeführt werden.

Dafür werden die Proteine nach dem Semidry-Blotprinzip anhand einer senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierbei wurden 100mA/Gel, 100 V und maximal 150 W für 1 h angelegt. Der Erfolg des Transfers der Proteine wurde anhand der reversiblen, wasserlöslichen Ponceau S-Proteinfärbung überprüft. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran bei 4°C ü.N. mit 5% Milch in TBS-T geblockt.

Als Erstantikörper verwendete ich einen Antikörper gegen Aβ₁₋₁₆ aus der Maus, den ich 1:5.000 verdünnte und für 1 h bei RT inkubierte. Der Meerrettich-Peroxidase (HRP)- gekoppelte Zweitantikörper band während seiner 30 min Inkubationszeit bei RT nun an den Erstantikörper. Ungebundene Antikörper wurden abermals durch Waschschriffe mit TBS-T und anschließend TBS-X entfernt.

Anschließend wurde eine „enhanced chemoluminescence (ECL)“-Entwicklung durchgeführt. Hierbei wurde das Substrat Luminol durch die Peroxidase des Antikörpers umgesetzt. Dadurch wird lokal Licht emittiert, welches mittels eines Röntgenfilmes detektiert werden kann.

3. Ergebnisse

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Oligomerisierungsverhalten verschiedener A β -Spezies

In den bisher publizierten Studien über A β wurde eine Vielzahl unterschiedlicher A β -Spezies eingesetzt (Tabelle 4 und 5). Dabei zeigt sich für die verschiedenen A β -Peptide unterschiedlicher Quellen, Aufarbeitungsmethoden, Peptidlängen und vor allem Oligomerisierungszustände ein sehr vielfältiges, teils widersprüchliches Bild der möglichen Einflüsse auf Neuronen (s. Kapitel 4.4). Daher ist es für die Fragestellung dieser Arbeit von großer Wichtigkeit, zum einen die hier geeignete A β -Spezies und ihre korrekte Aufarbeitung zu identifizieren, zum anderen zu kontrollieren in welchem Oligomerisierungszustand die Peptide tatsächlich eingesetzt werden. Für diese Analysen sind Western Blots die geeignete molekularbiologische Methode.

Abb. 14 und Abb. 15 zeigen eben jene Western Blots zur Analyse der Oligomerisierungsvorgänge von A β_{1-40} und A β_{1-42} . Die Peptide wurden jeweils einmal nativ (Abb. 14 a, Abb. 15 a) aufgetragen. Um auszuschließen, dass alle entstandenen Oligomere durch das SDS wieder dissoziieren, wurde jeweils auch ein Blot nach erfolgtem Crosslinking der Oligomere durch BS³ durchgeführt (Abb. 14 b, Abb. 15 b).

Da die A β -Peptide aus 40 bzw. 42 Aminosäuren aufgebaut sind, beträgt ihr Molekulargewicht etwa 4400 bis 4800 Da. In Abb. 14 a sind keine SDS-stabilen Oligomere sichtbar, lediglich die A β_{1-40} -Oligomere sind als Basislinie unterhalb des 6.500 Da-Markers erkennbar. Dass das Peptid dennoch oligomerisiert, zeigt der Crosslinking-Ansatz. Schwache Banden im Größenbereich von Di- bis Pentameren (ca. 9000 Da bis 22.000 Da) sind insbesondere in den 25 μ M-Ansätzen mit ansteigender Oligomerisierungsdauer zunehmend zu erkennen (Abb. 14 b, Pfeile 4-6), sodass für die weiteren Experimente mit A β_{1-40} identische Oligomerisierungsansätze verwendet wurden.

In den Crosslinking-Ansätzen zeigt sich unmittelbar oberhalb der untersten Bande, die die Monomere repräsentiert (Pfeil 1), eine weitere Bande (Pfeil 2). Die Basislinie scheint hier sozusagen gedoppelt zu sein. Bei dieser zweiten Bande kann es sich allerdings nicht um A β -Oligomere handeln, da diese sich frühestens als Dimere oberhalb des 6.500 Da-Markers zeigen würden. Selbiges trifft auch auf die zwischen der doppelten Basislinie und dem 6.500 Da-Marker sichtbare Bande zu (Pfeil 3). Die zusätzlichen Banden lassen sich durch den Crosslinker BS³ erklären, der kovalent an Lysin-Seitenketten bindet und selbst ein Molekulargewicht von etwa 500 Da hat. A β_{1-40} hat zwei Lysin-Seitenketten, sodass die Banden A β -Monomere mit je einem oder zwei gebundenen Crosslinker-Molekülen darstellen.

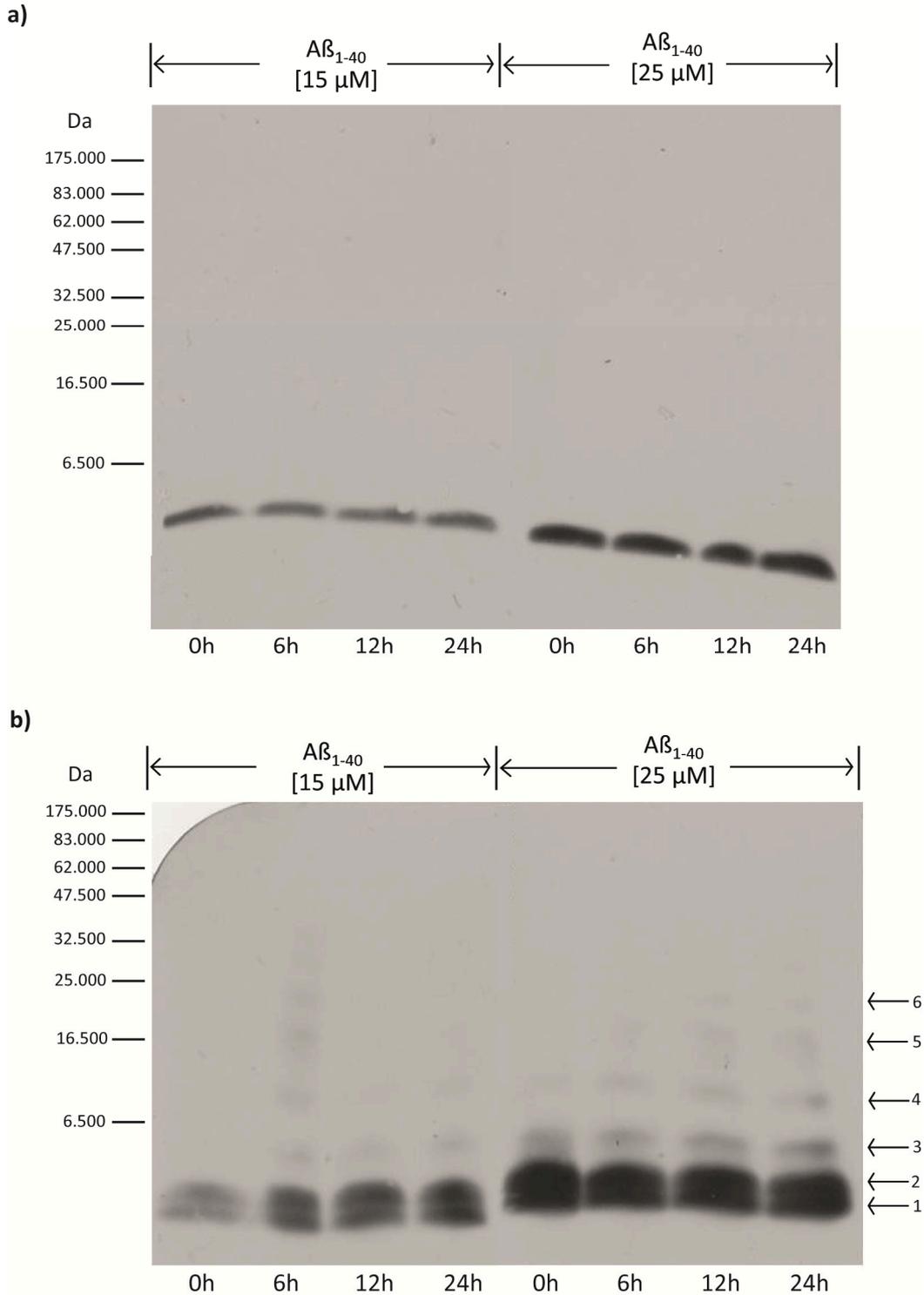
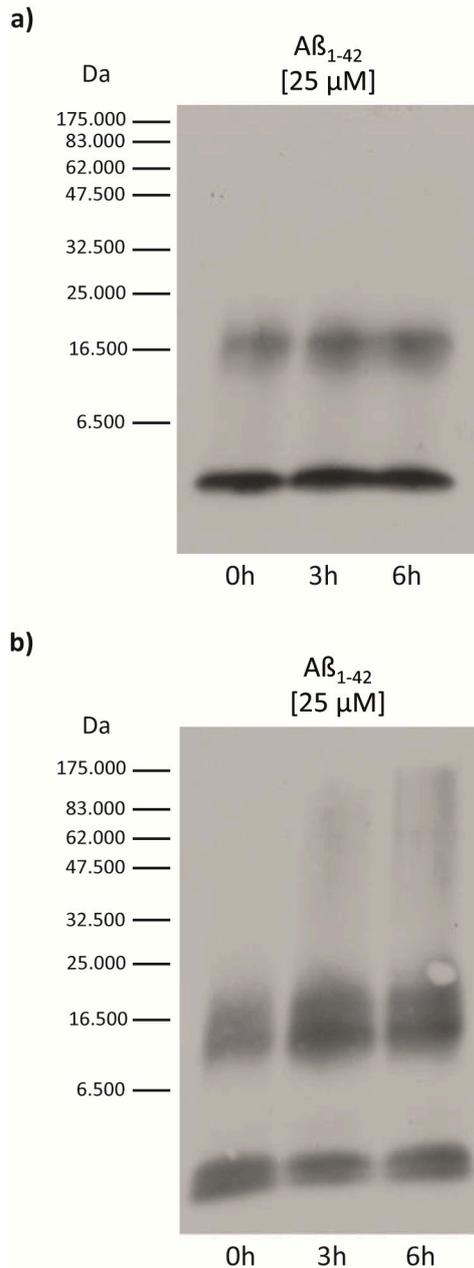


Abb. 14|Oligomerisierungsverhalten von $A\beta_{1-40}$: Um die geeignete $A\beta$ -Spezies für die folgenden Experimente zu identifizieren, wurde $A\beta_{1-40}$ in verschiedenen Ansätzen oligomerisiert und per Western Blot analysiert. Oberhalb der Blots sind die $A\beta$ -Konzentrationen der Ansätze angegeben, unterhalb der Blots die Zeitdauer der Oligomerisierung. **a)** nativer Ansatz, nur SDS-stabile Oligomere sind erkennbar. **b)** gleiche Ansätze nach unmittelbar vor dem Western Blot durchgeführtem BS^3 -Crosslinking. Die Pfeile beziehen sich auf die im Text beschriebenen Banden.

Abb. 15 bestätigt die deutlich raschere Oligomerisierung von $A\beta_{1-42}$. Auch in den nativen Ansätzen (Abb. 15 a) ist eine undeutlich abgegrenzte Bande SDS-stabiler Oligomere im



Größenbereich von Tri- bis Pentameren klar zu sehen. Diese Oligo- und Polymere zeichnen sich deutlicher und kontinuierlicher ab im Crosslinking-Ansatz (Abb. 15 b), schwach beginnend in Dimer-Größe (ca. 9.600 Da) bis hoch zu einer Größe von ca. 175.000 Da. Auch hier zeigen sich wieder die beiden zusätzlichen Banden unterhalb des 6500 Da-Markers als Zeichen für den kovalent gebundenen Crosslinker. Bemerkenswert ist, dass die offenbar sehr stabilen Oligomere im Bereich der 16.500 Da-Bande bereits in den Ansätzen vorliegen, bei denen keine Oligomerisierungszeit angesetzt war – ein weiterer Hinweis auf das starke Oligomerisierungsverhalten von $A\beta_{1-42}$. Für die weiteren Experimente wurde $A\beta_{1-42}$ nach 6h sowie 12h Oligomerisierungszeit verwendet, um eine stärkere Vergleichbarkeit mit den $A\beta_{1-40}$ -Experimenten zu erreichen.

Abb. 15 | Oligomerisierungsverhalten von $A\beta_{1-42}$: Um die geeignete $A\beta$ -Spezies für die folgenden Experimente zu identifizieren, wurde $A\beta_{1-42}$ in verschiedenen Ansätzen oligomerisiert und per Western Blot analysiert. Oberhalb der Blots sind die $A\beta$ -Konzentrationen der Ansätze angegeben, unterhalb der Blots die Zeitdauer der Oligomerisierung. a) nativer Ansatz, nur SDS-stabile Oligomere sind erkennbar. b) gleiche Ansätze nach unmittelbar vor dem Western Blot durchgeführtem BS^3 -Crosslinking.

3.2 Experimente mit dissoziierten Kulturen

Dendritische *Spines* tragen die Postsynapsen vor allem exzitatorischer neuronaler Verbindungen im Hippocampus. Ihre strukturelle Plastizität und sich verändernde Morphologie wird als Korrelat synaptischer Plastizität gesehen. Kurz gesagt bedeutet das, dass eine Stärkung der synaptischen Verbindung im Sinne von LTP mit einem Wachstum v.a. des *Spine*-Kopfes einhergeht; eine Schwächung derselben Verbindung zeigt sich hingegen in einer Schrumpfung der Kopfes bis hin zu einem völligen Verschwinden einzelner *Spines*. Sogenannte *Thin Spines* gelten als unreife postsynaptische Strukturen von Synapsen.

A β kann laut einigen Studien LTP inhibieren (Walsh et al., 2002) und die molekulare Zusammensetzung von Synapsen verändern (Roselli et al., 2005). Damit einhergehend sind ebenfalls Einflüsse von A β auf *Spine*-Morphologie und -Dichte beschrieben. (Hsieh et al., 2006; Shrestha et al., 2006; Shankar et al., 2007; Wei et al., 2010) Der vermittelnde Rezeptor dafür ist jedoch weiterhin unbekannt. Da der p75^{NTR} viele der beschriebenen Effekte auf Neuronen zu vermitteln vermag und A β an ihn bindet (Yaar et al., 2002; Yaar et al., 1997; Kuner et al., 1998; Yaar et al., 2002), sollen im Folgenden die Einflüsse von A β auf die *Spines* von WT- und p75^{NTR}ko-Neuronen beschrieben und verglichen werden.

Die Zellen wurden dafür im Alter von 15 DIV transfiziert und zwei Tage danach für 6h mit 1 μ M A β ₁₋₄₀ oder A β ₁₋₄₂ behandelt. Um die Einflüsse verschiedener Oligomerisierungsstadien des Peptids vergleichen zu können, wurden die Peptidproben jeweils nach einer Oligomerisierungszeit von 0h (bei A β ₁₋₄₀ im Folgenden auf Grundlage der molekularbiologischen Analysen als monomer bezeichnet), 6h oder 12h eingesetzt. Als Kontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen fixiert, aufgenommen und analysiert.

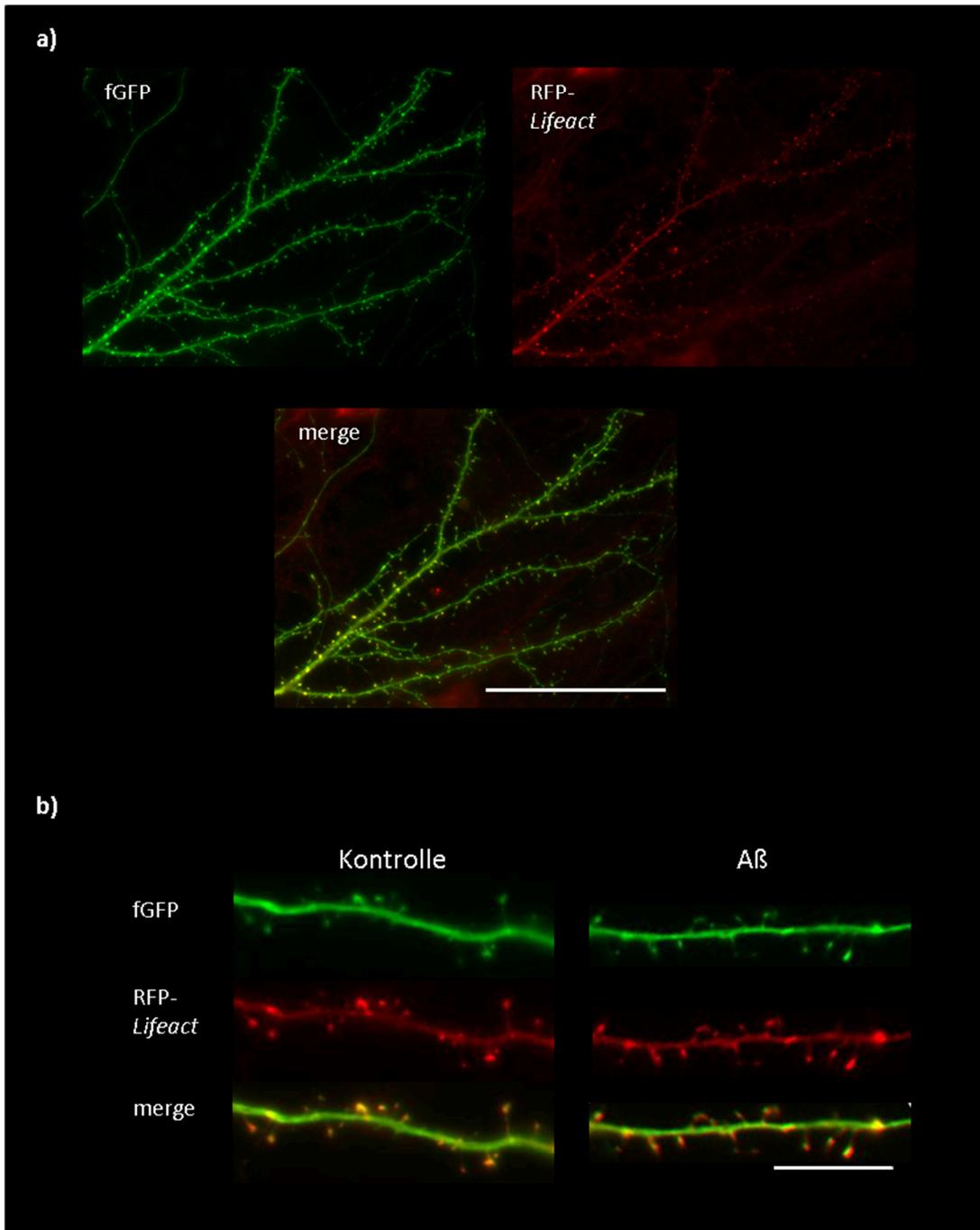
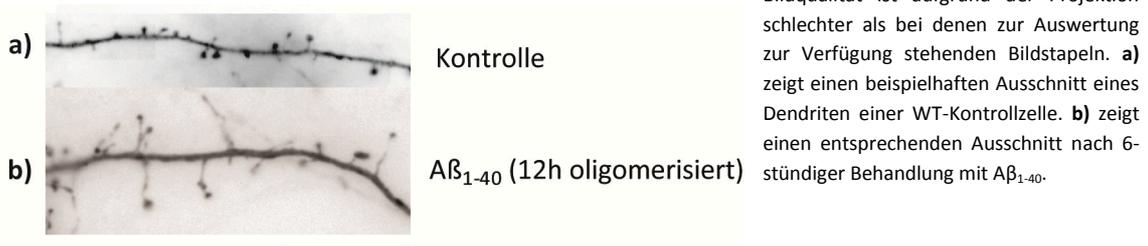


Abb. 16 | Transfektion von Neuronen mit fGFP und RFP-*lifeact*. Die mit „fGFP“ und „RFP-*lifeact*“ beschriebenen Bilder zeigen, wie die transfizierten Zellen in den verschiedenen Kanälen unter dem Mikroskop erscheinen; „merge“ zeigt jeweils eine Bildkomposition, bei der die beiden Kanäle aufeinander projiziert wurden. Die gelbe Färbung der *Spine*-Köpfe zeigt die dortige Ansammlung von F-Aktin. **a)** Gezeigt wird eine Kontrollzelle in 40facher Vergrößerung. Diese Bilder stammen aus einem Versuch Time Lapse mit dissoziierten Zellen durchzuführen. Der Maßstabsbalken entspricht 100µm. **b)** Gegenübergestellt werden eine Kontrollzelle und eine Zelle nach 12h Behandlung mit oligomerisiertem A β_{1-40} . Bei den Bildern handelt es sich um z-Projektionen der originalen, 63fach vergrößernden Bildstapel. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

3.2.1 Effekt von $A\beta_{1-40}$ auf WT-Neuronen

Calabrese et al beobachteten Einflüsse von $A\beta$ aus CHO-Zellen auf *Spine*-Morphologie und -Dichte. Zunächst einmal soll an dieser Stelle überprüft werden, ob diese Veränderungen mit dem als weniger pathologisch geltenden $A\beta_{1-40}$ ebenfalls hervorgerufen werden können. Wir erwarten eine Abnahme der *Spine*-Dichte, die eine Verringerung der Anzahl synaptischer Kontakte mit anderen Neuronen repräsentieren würde. Wir gehen außerdem davon aus, dass $A\beta_{1-40}$ auch weiterhin existierende Synapsen schwächt. Dies würde sich in einer vermehrten Anzahl sog. *Thin Spines* und damit einer Erhöhung der durchschnittlichen *Spine*-Länge zeigen.

Abb.17 | WT-Beispielzellen in 63facher Vergrößerung als z-Projektion der Bildstapel. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. Die



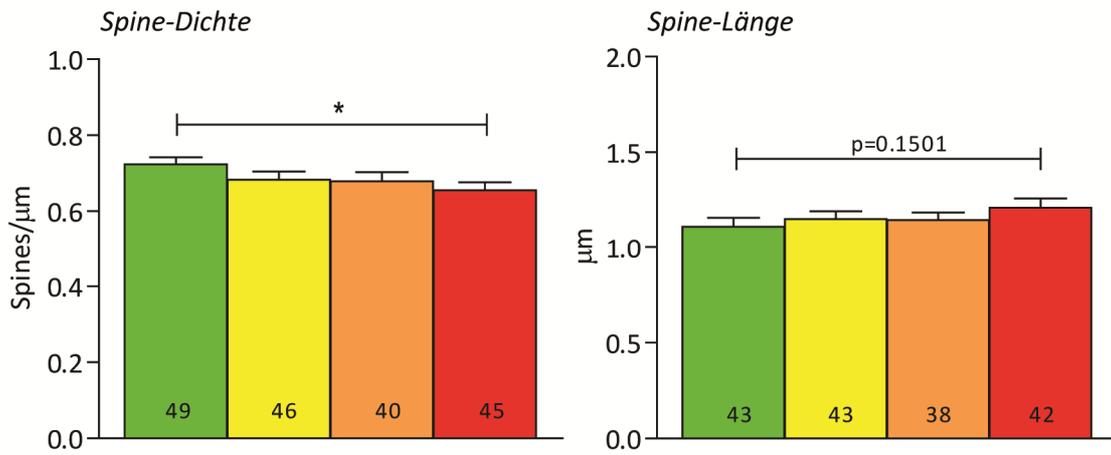
Die Bildqualität ist aufgrund der Projektion schlechter als bei denen zur Auswertung zur Verfügung stehenden Bildstapeln. **a)** zeigt einen beispielhaften Ausschnitt eines Dendriten einer WT-Kontrollzelle. **b)** zeigt einen entsprechenden Ausschnitt nach 6-stündiger Behandlung mit $A\beta_{1-40}$.

WT-Neuronen, die für 6h mit 12h oligomerisiertem $A\beta$ behandelt wurden, erfüllen diese Erwartung. Die in Abb. 17 **a** dargestellte Kontrollzelle trägt hauptsächlich kurze *Spines* mit prominenten Köpfen. Im Vergleich dazu sind die *Spines* nach Behandlung mit $A\beta_{1-40}$ -Oligomeren in Abb. 17 **b** länger und dünner. Ihre Anzahl scheint ebenfalls abgenommen zu haben.

Eine systematische Auswertung der Zellen bestätigt, dass die *Spine*-Dichte in Abhängigkeit vom Oligomerisierungszustand des $A\beta$ kontinuierlich abnimmt (Abb. 18 **a**). Der Unterschied zwischen den Kontrollen und den Zellen, die mit 12 h oligomerisiertem $A\beta$ behandelt wurden, ist statistisch signifikant. Es zeigt sich ebenfalls eine kontinuierliche Tendenz zur Verlängerung der *Spines*, allerdings ohne Signifikanzniveau zu erreichen (p -Wert 0,1501).

Abb. 18 **b** stellt die Ergebnisse eines der in **a** zusammengefassten Einzelerperimente dar. Auch hier zeigt sich eine (nicht signifikante) Verringerung der *Spine*-Dichte. Morphologisch zeigen sich in diesem Experiment die *Spines* auch deutlich verlängert. Diese Verlängerung ist für alle $A\beta$ -Oligomerisierungsansätze statistisch signifikant bzw. hochsignifikant. Auch wenn dieses Bild in den anschließenden Experimenten nicht in einer solchen Deutlichkeit reproduziert werden konnte, lieferte es die Grundlage für die Entscheidung, in welchem Alter und für wie lange die Zellen in den folgenden Experimenten behandelt wurden.

a)



b)

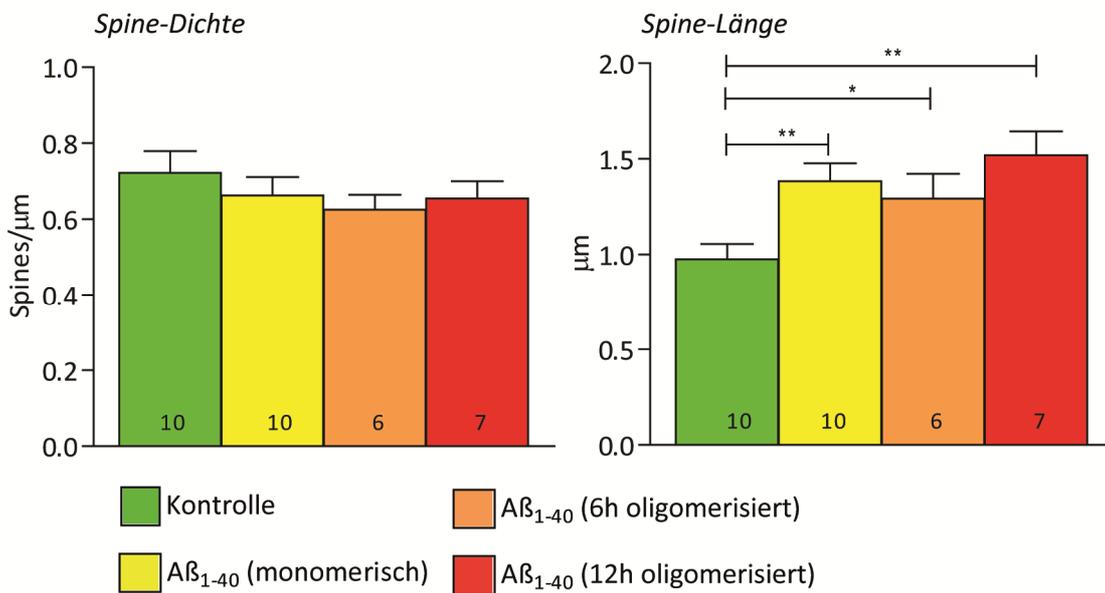


Abb.18 | Effekt von A β_{1-40} auf WT-Neuronen: Dichte (li) und Länge (re) der dendritischen *Spines* nach 6-stündiger Behandlung mit 1 μM A β_{1-40} unterschiedlicher Oligomerisierungszustände bzw. dem Lösungsmittel als Kontrolle. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der ausgewerteten Zellen (n) an. *p<0,05 **p<0,01. **a)** zusammengefasste Daten dreier, voneinander unabhängiger Experimente. **b)** Daten eines der Einzelexperimente.

3.2.2 Effekt von Aβ₁₋₄₀ auf p75^{NTR}ko-Neuronen

Wenn p75^{NTR} tatsächlich der vermittelnde Rezeptor für die von Aβ hervorgerufenen Effekte ist, dann dürfte der Einfluss von Aβ bei der Behandlung von p75^{NTR}ko-Zellen nicht auftreten bzw. müsste sich zumindest deutlich verändert gegenüber den WT-Zellen zeigen.

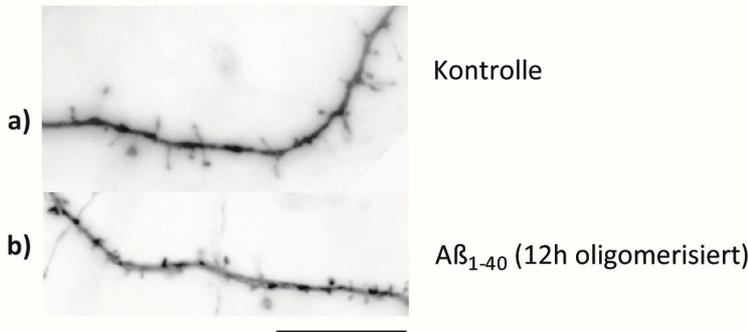


Abb.19| p75^{NTR}ko-Beispielzellen in 63facher Vergrößerung als z-Projektion der Bildstapel. Der Maßstabsbalken entspricht 10µm. Die Bildqualität ist aufgrund der Projektion schlechter als bei denen zur Auswertung zur Verfügung stehenden Bildstapeln. **a)** zeigt einen beispielhaften Ausschnitt eines Dendriten einer p75^{NTR}ko-Kontrollzelle. **b)** zeigt einen entsprechenden Ausschnitt nach 6-stündiger Behandlung mit

Aβ₁₋₄₂.

Tatsächlich zeigt sich ein deutlich anderes Bild, wenn p75^{NTR}ko-Zellen auf die gleiche Art wie die WT-Neuronen behandelt werden. In Abb. 19 unterscheidet sich die Kontrollzelle (**a**) bezüglich der *Spine*-Dichte kaum von der behandelten Zelle (**b**). Gleichzeitig sind die *Spines* in **b** eher kürzer und kräftiger als die der Kontrollzelle – eine dem WT entgegen gesetzte Beobachtung.

Die *Spine*-Dichte zeigt auch in einer systematischen Auswertung nur minimale Schwankungen (Abb. 20); die Länge der *Spines* hingegen nimmt im Gegensatz zum WT ab. Die Abnahme erreicht trotz des niedrigen n Signifikanzniveau. Das niedrige n der p75^{NTR}ko-Experimente erklärt sich durch die schlechte Fortpflanzungsfähigkeit der p75^{NTR}ko-Mäuse; die wünschenswerte Erhöhung des n hätte den zeitlichen Umfang dieser Arbeit deutlich gesprengt.

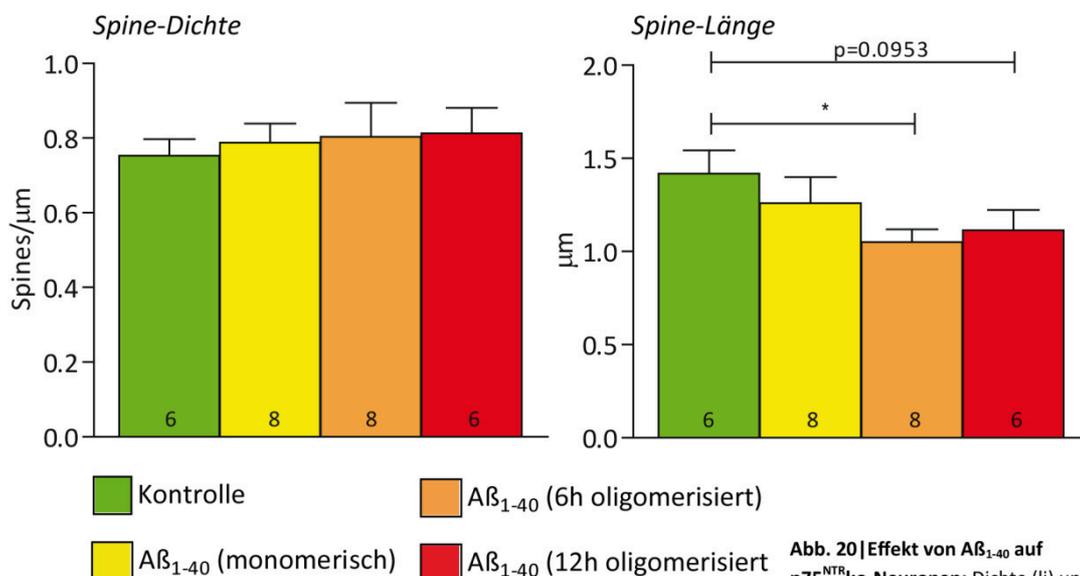


Abb. 20| Effekt von Aβ₁₋₄₀ auf p75^{NTR}ko-Neuronen: Dichte (li) und

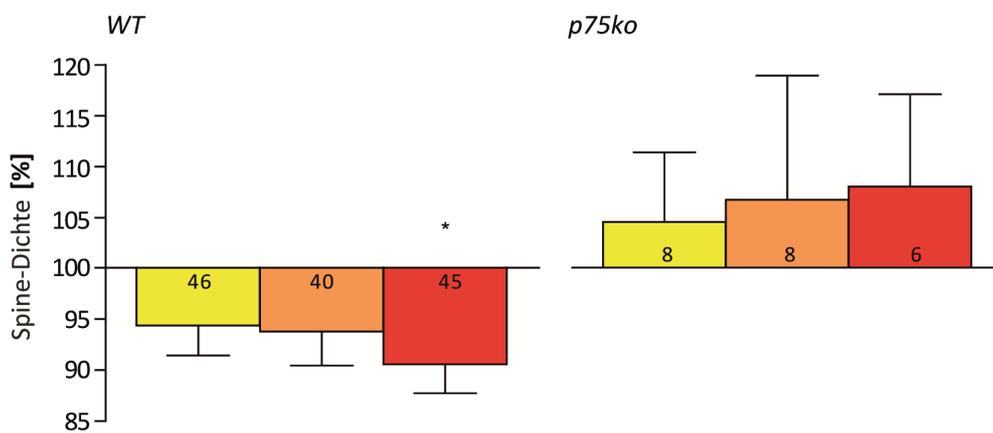
Länge (re) der dendritischen *Spines* nach 6-stündiger Behandlung mit 1µM Aβ₁₋₄₀ unterschiedlicher Oligomerisierungszustände bzw. dem Lösungsmittel als Kontrolle. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der ausgewerteten Zellen (n) an. *p<0,05.

3.2.3 Prozentuale Darstellung der Effekte von A β ₁₋₄₀

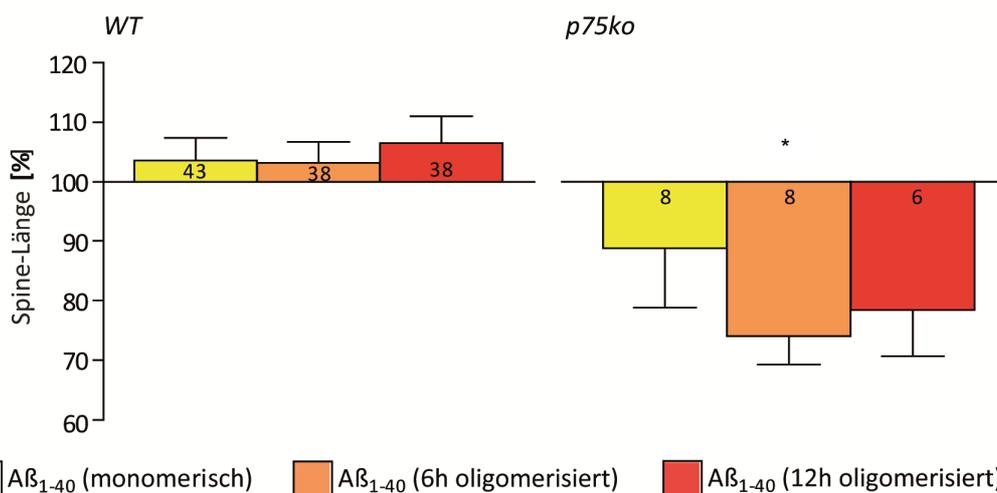
Abb. 21 enthält die gleichen Daten wie Abb. 18 und Abb. 20. Dennoch erscheint eine Darstellung der prozentualen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen angebracht, da das unterschiedliche Verhalten der WT- und p75-Zellen auf diese Weise weitaus deutlicher visualisiert werden kann. Die Darstellung der absoluten Werte war dennoch nötig, um zu starke Variabilitäten zwischen den Kontrollgruppen der einzelnen Experimente ausschließen zu können.

Vor allem die Zunahme der *Spine*-Dichte bei Behandlung von p75^{NTR}ko-Mäusen ist in der prozentualen Darstellung klarer darstellbar (Abb. 21 a); allerdings ist die Aussagekraft aufgrund der hohen experimentellen Variabilität eingeschränkt. Abb. 21 b stellt die Veränderungen in der *Spine*-Länge bei WT- und p75 KO-Zellen gegenüber. Insgesamt sind die jeweils entgegengesetzten Reaktionen der WT- und p75-KO-Zellen deutlich erkennbar.

a)



b)



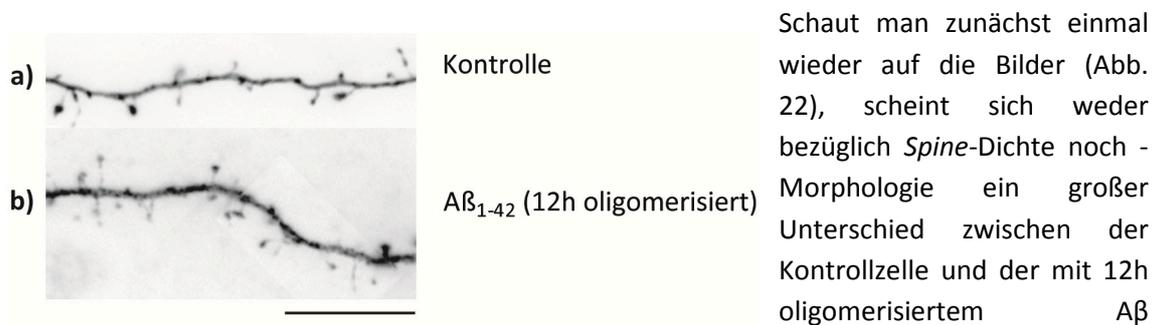
A β ₁₋₄₀ (monomerisch)
 A β ₁₋₄₀ (6h oligomerisiert)
 A β ₁₋₄₀ (12h oligomerisiert)

Abb. 21 | prozentuale Darstellung der Effekte von A β ₁₋₄₀: Einfluss einer 6stündigen Behandlung mit 1 μ M A β ₁₋₄₀ unterschiedlichen Oligomerisierungszustandes bzw. dem Lösungsmittel als Kontrollsubstanz. Der Mittelwert der Kontrollen wurde als 100% definiert. * über einem Balken zeigt signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe an ($p < 0,05$). a) Veränderung der *Spine*-Dichte bei WT (li) und p75^{NTR}ko (re). b) Veränderung der *Spine*-Länge bei WT (li) und p75^{NTR}ko (re).

3.2.4 Effekt von Aβ₁₋₄₂ auf WT-Neuronen

Um die Effekte von Aβ₁₋₄₀ auf *Spine*-Dichte und -Länge noch etwas deutlicher hervorgerufen zu können, wurden die gleichen Experimente mit Aβ₁₋₄₂ wiederholt. Da Aβ₁₋₄₂ als die aggregationsfreudigere und damit pathologische Aβ-Variante gilt, würden wir einen verstärkten Einfluss auf synaptische Strukturen und damit *Spine*-Morphologie erwarten. Gleichzeitig könnten die anderen Eigenschaften von Aβ₁₋₄₂ gegenüber Aβ₁₋₄₀ aber auch andere Bedingungen (bspw. bezüglich Konzentration oder Zeitdauer) für die Beobachtung eines Effektes benötigen.

Abb.22| WT-Beispielzellen in 63facher Vergrößerung als z-Projektion der Bildstapel. Der Maßstabsbalken entspricht 10µm. Die Bildqualität ist aufgrund der Projektion schlechter als bei denen zur Auswertung zur Verfügung stehenden Bildstapeln. **a)** zeigt einen beispielhaften Ausschnitt eines Dendriten einer WT-Kontrollzelle. **b)** zeigt einen entsprechenden Ausschnitt nach 6-stündiger Behandlung mit Aβ₁₋₄₂.



Schaut man zunächst einmal wieder auf die Bilder (Abb. 22), scheint sich weder bezüglich *Spine*-Dichte noch -Morphologie ein großer Unterschied zwischen der Kontrollzelle und der mit 12h oligomerisiertem Aβ

behandelten Zelle zu ergeben.

In der Quantifizierung zeigt sich die *Spine*-Dichte bei der Gruppe, die mit 6h oligomerisiertem Aβ behandelt wurde, statistisch signifikant verringert (Abb. 23 a). Wird das Aβ₁₋₄₂ für 12 h oligomerisiert, scheint der Effekt beinahe wegzufallen. Dies deckt sich mit dem optischen Eindruck aus Abb. 22. Bezüglich der Veränderungen in der *Spine*-Länge zeigte sich in diesen Experimenten kein klares Bild.

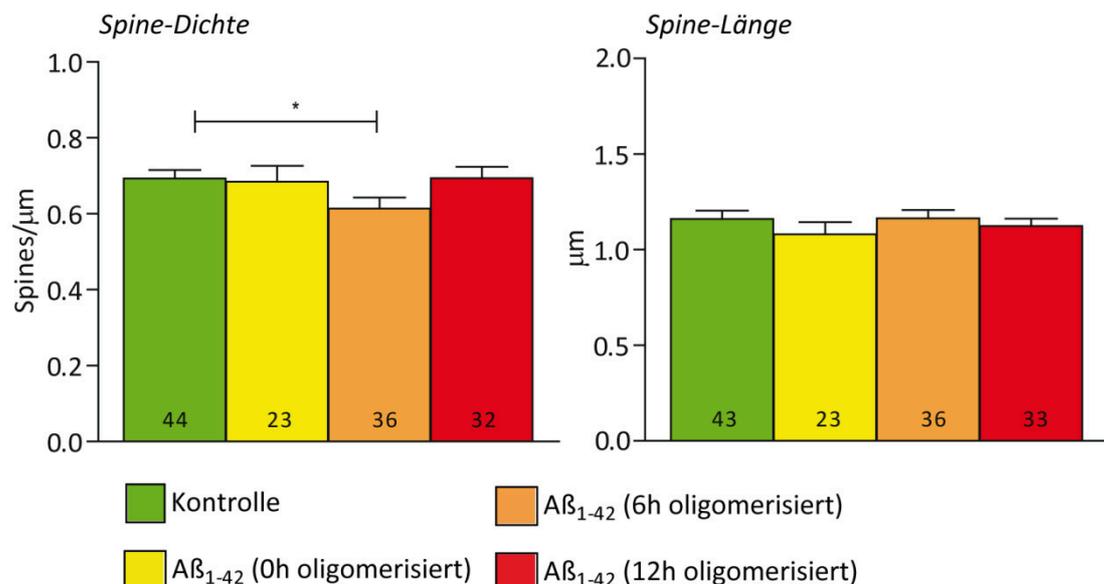
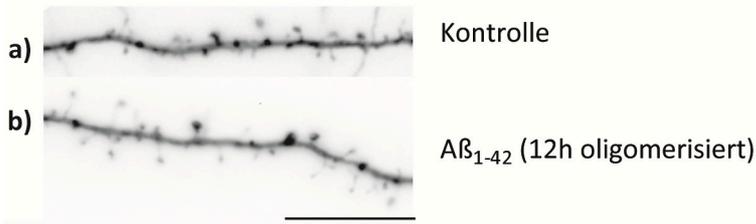


Abb. 23|Effekt von Aβ₁₋₄₂ auf WT-Neuronen: Dichte (li) und Länge (re) der dendritischen *Spines* nach 6-stündiger Behandlung mit 1µM Aβ₁₋₄₂ unterschiedlicher Oligomerisierungszustände bzw. dem Lösungsmittel als Kontrolle. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der ausgewerteten Zellen (n) an. *p<0,05.

3.2.5 Effekt von A β ₁₋₄₂ auf p75^{NTR}ko-Neuronen

Abb. 24 | p75^{NTR}ko-Beispielzellen in 63facher Vergrößerung als z-Projektion der Bildstapel. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m.



Die Bildqualität ist aufgrund der Projektion schlechter als bei denen zur Auswertung zur Verfügung stehenden Bildstapeln. **a)** zeigt einen beispielhaften Ausschnitt eines Dendriten einer p75^{NTR}ko-Kontrollzelle. **b)** zeigt einen entsprechenden Ausschnitt nach 6-stündiger Behandlung mit A β ₁₋₄₂.

Wenn p75^{NTR} der vermittelnde Rezeptor ist, so sollte sich auch hier in der Behandlung von p75^{NTR}ko-Neuronen ein anderes Bild ergeben als bei den WT-Zellen. Tatsächlich ruft A β ₁₋₄₂ bei p75^{NTR}ko-Neuronen keinen Effekt hervor. Die behandelte Zelle in Abb. 24 **b** erscheint beinahe identisch mit der Kontrollzelle (**a**) zu sein; auch die systematische Analyse der Zellen zeigte weder bei *Spine*-Dichte noch *Spine*-Länge eine relevante Veränderung (Abb. 25).

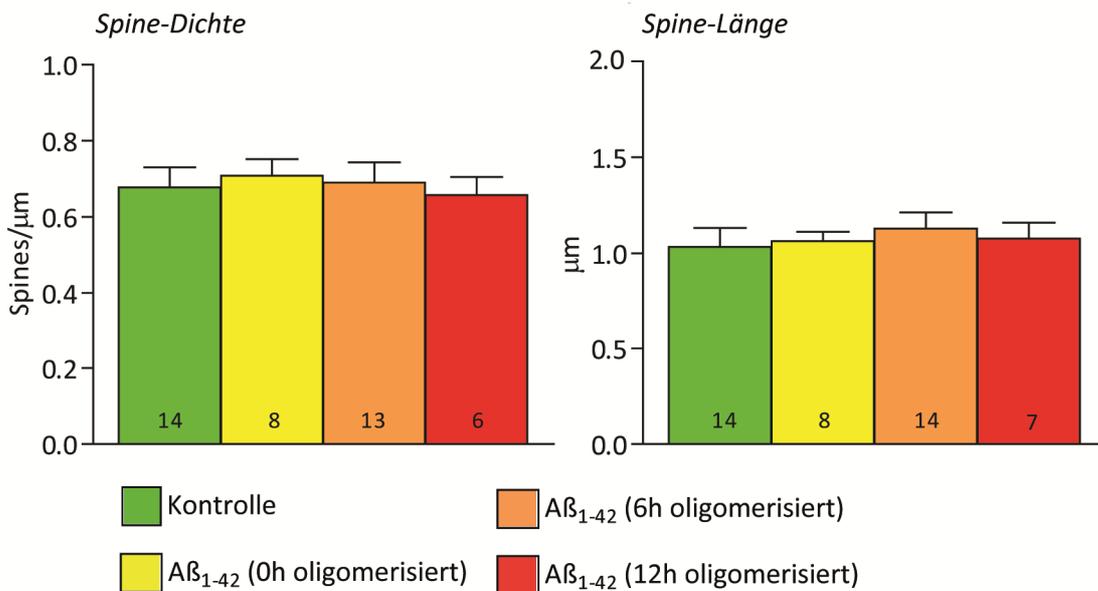


Abb. 25 | Effekt von A β ₁₋₄₂ auf p75^{NTR}ko-Neuronen: Dichte (li) und Länge (re) der dendritischen *Spines* nach 6-stündiger Behandlung mit 1 μ M A β ₁₋₄₂ unterschiedlicher Oligomerisierungszustände bzw. dem Lösungsmittel als Kontrolle. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der ausgewerteten Zellen (n) an.

3.2.6 prozentuale Darstellung der Effekte von A β ₁₋₄₂

Analog zu Kapitel 2.3 werden auch die Effekte von A β ₁₋₄₂ in ihren prozentualen Auswirkungen dargestellt. Abb. 26 **a** vergleicht WT- und p75-Zellen bezüglich ihrer Veränderungen in der Dichte der *Spines*; Abb. 26 **b** stellt die Veränderungen in der *Spine*-Länge einander gegenüber. Auch in dieser Abbildung zeigen sich Tendenzen unterschiedlicher Reaktionen von WT- und p75^{NTR}ko-Zellen, allerdings sind diese weniger klar und konstant ausgeprägt als bei A β ₁₋₄₀.

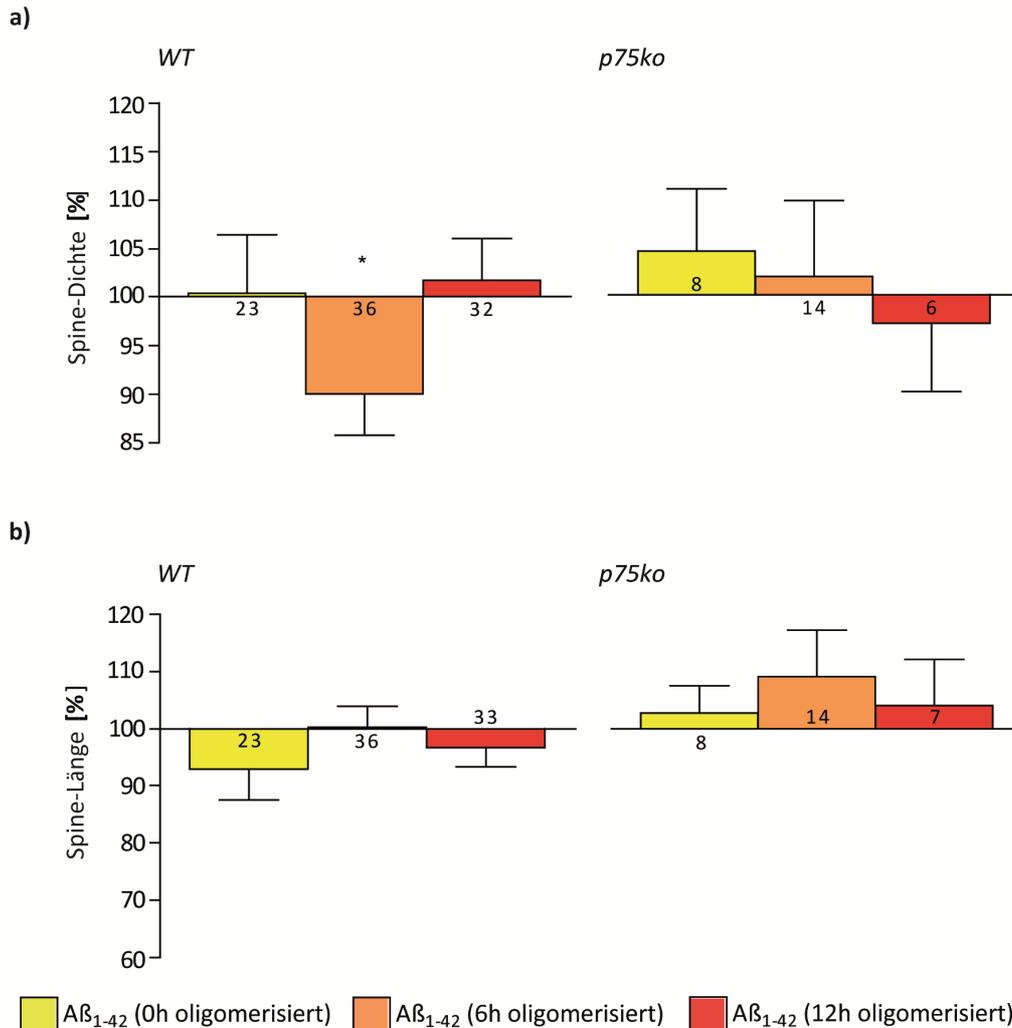


Abb. 26 | prozentuale Darstellung der Effekte von A β ₁₋₄₂: Einfluss einer 6stündigen Behandlung mit 1 μ M A β ₁₋₄₂ unterschiedlichen Oligomerisierungszustandes bzw. dem Lösungsmittel als Kontrollsubstanz. Der Mittelwert der Kontrollen wurde als 100% definiert. * über einem Balken zeigt signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe an ($p < 0,05$). **a)** Veränderung der *Spine*-Dichte bei WT (li) und p75^{NTR}ko (re). **b)** Veränderung der *Spine*-Länge bei WT (li) und p75^{NTR}ko (re).

3.3 Time Lapse Experimente

Bei fixierten Kulturen kann lediglich der Endzustand einer experimentellen Prozedur auf die Morphologie von Neuronen beurteilt werden; ihre Morphologie und Funktionalität zu Beginn des Experimentes bleiben unbekannt. Der deutliche Vorteil der Time Lapse-Experimente liegt daher darin, dass sie die Beobachtung einzelner ausgewählter Zellen und ihrer Veränderungen über die Zeit und unter bestimmten Konditionen erlauben. Dadurch kann die Dynamik eines Prozesses dokumentiert werden.

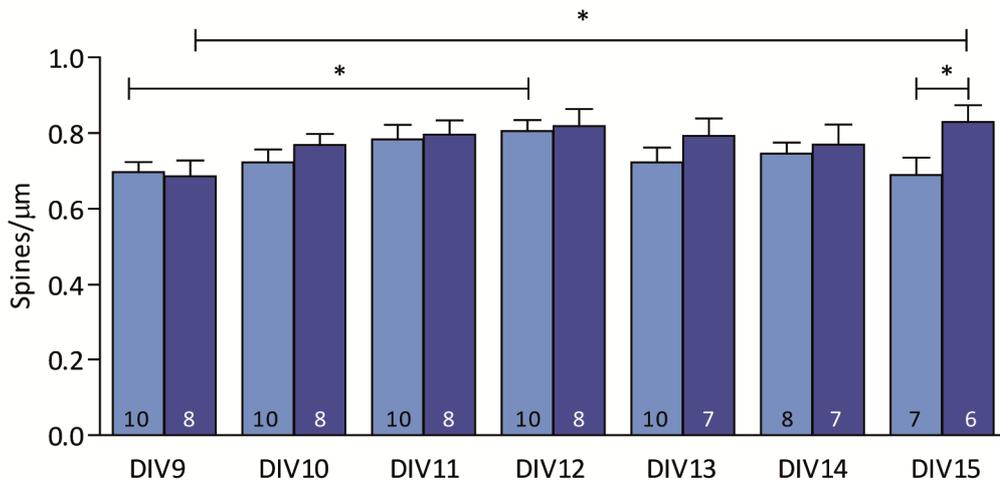
Dass die Time Lapse-Experimente mit organotypischen anstelle der dissoziierten Kulturen durchgeführt wurden, ermöglichte zusätzlich eine Differenzierung der Zellen anhand ihrer Ursprungsregion im Hippocampus. Da in den verschiedenen Bereichen des Hippocampus unterschiedliche Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen und Verknüpfungen vorkommen, ist es durchaus denkbar, dass Unterschiede in ihrem Ansprechen auf A β bestehen.

Die Transfektion der Kulturen erfolgte an DIV 7, die A β -Behandlung und erste Aufnahme der Zellen erfolgte an DIV 9. Zur weiteren Beschreibung des Experimentaufbaus wird auf Kapitel 2.7 verwiesen. Neben den absoluten Werten wird zur besseren Visualisierung die prozentuale Veränderung im Verlauf der einwöchigen A β -Behandlung dargestellt; die *Spine*-Dichte an DIV 9 (vor Beginn der A β -Behandlung) wurde als 100% definiert.

3.3.1 Kein Effekt von A β auf CA1-Neuronen

Die *Spine*-Dichte sowohl der behandelten als auch der Kontrollzellen der CA1-Region des Hippocampus nimmt im Laufe der Zeit zu, was mit einer weiteren Reifung der Zellen erklärbar ist. Diese generelle Zunahme der *Spine*-Dichte ist für die Kontrollen an DIV 12 signifikant, für die behandelten Zellen an DIV 15. Es zeigt sich kein deutlicher Unterschied zwischen Kontrollen und behandelten Zellen, mit Ausnahme von DIV 15, an dem die *Spine*-Dichte der behandelten Zellen signifikant höher ist als die der Kontrollen (Abb. 27).

a)



b)

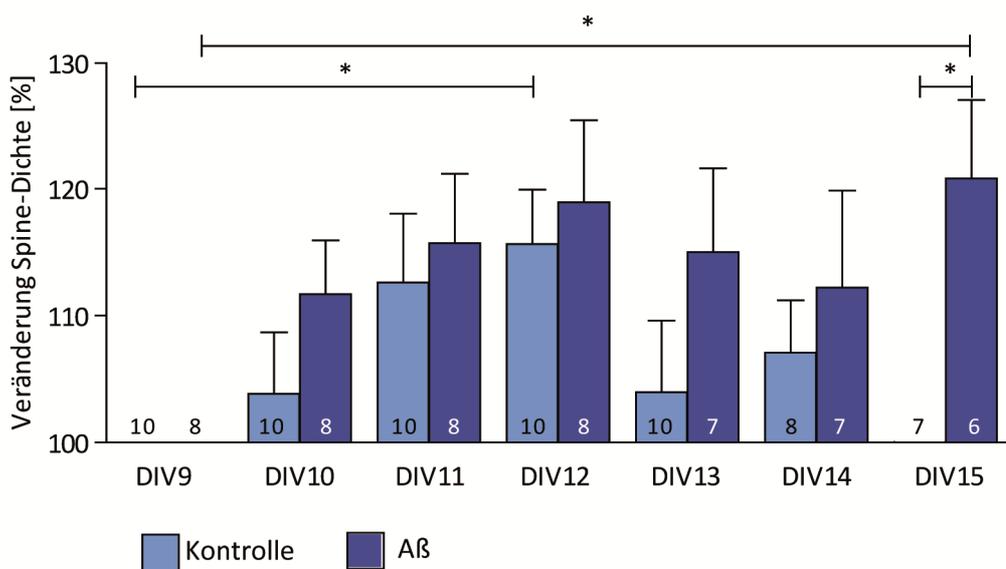
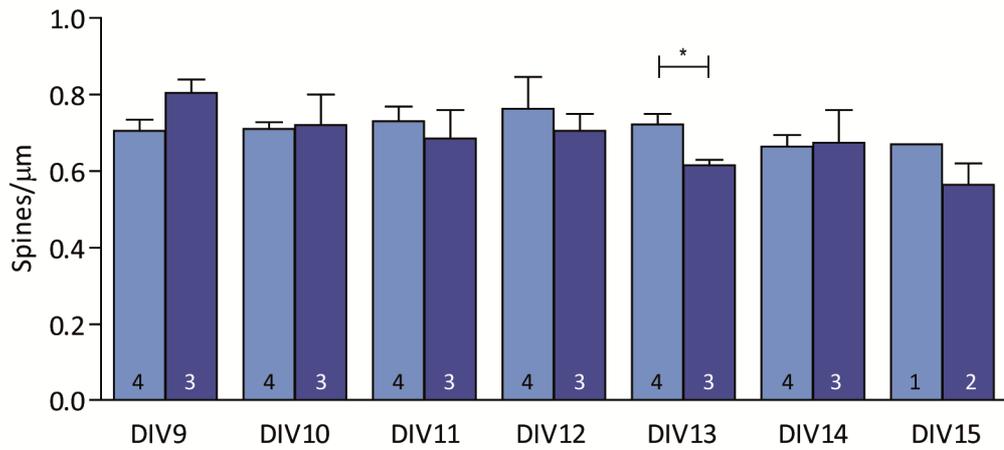


Abb. 27|Effekte von Aβ auf CA1-Neuronen: Organotypische Kulturen wurden eine Woche lang mit 1μM Aβ₁₋₄₀ (ohne vorherige Oligomerisierung) behandelt. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel eingesetzt. * p<0,05 **a)** Darstellung der absoluten *Spine*-Dichte im Verlauf der Behandlung. **b)** prozentuale Veränderung der *Spine*-Dichte im Verlauf der Behandlung.

3.3.2 Aβ senkt die *Spine*-Dichte von CA3-Neuronen

Im Bereich der CA3-Regionen zeigen behandelte und unbehandelte Zellen ebenfalls fast die gleiche *Spine*-Dichte (Abb. 28 **a**). Allerdings zeigt sich für die Kontrollzellen über die Zeit eine leichte Zunahme der Dichte, während die behandelten Zellen in der *Spine*-Dichte eher abnehmen (Abb. 28 **b**). Trotz des sehr niedrigen n wird an DIV 13 Signifikanzniveau erreicht ; eine Erhöhung von n war aufgrund des sehr zeitaufwändigen Versuchsaufbaus ebenfalls nicht mit dem Umfang dieser Arbeit vereinbar.

a)



b)

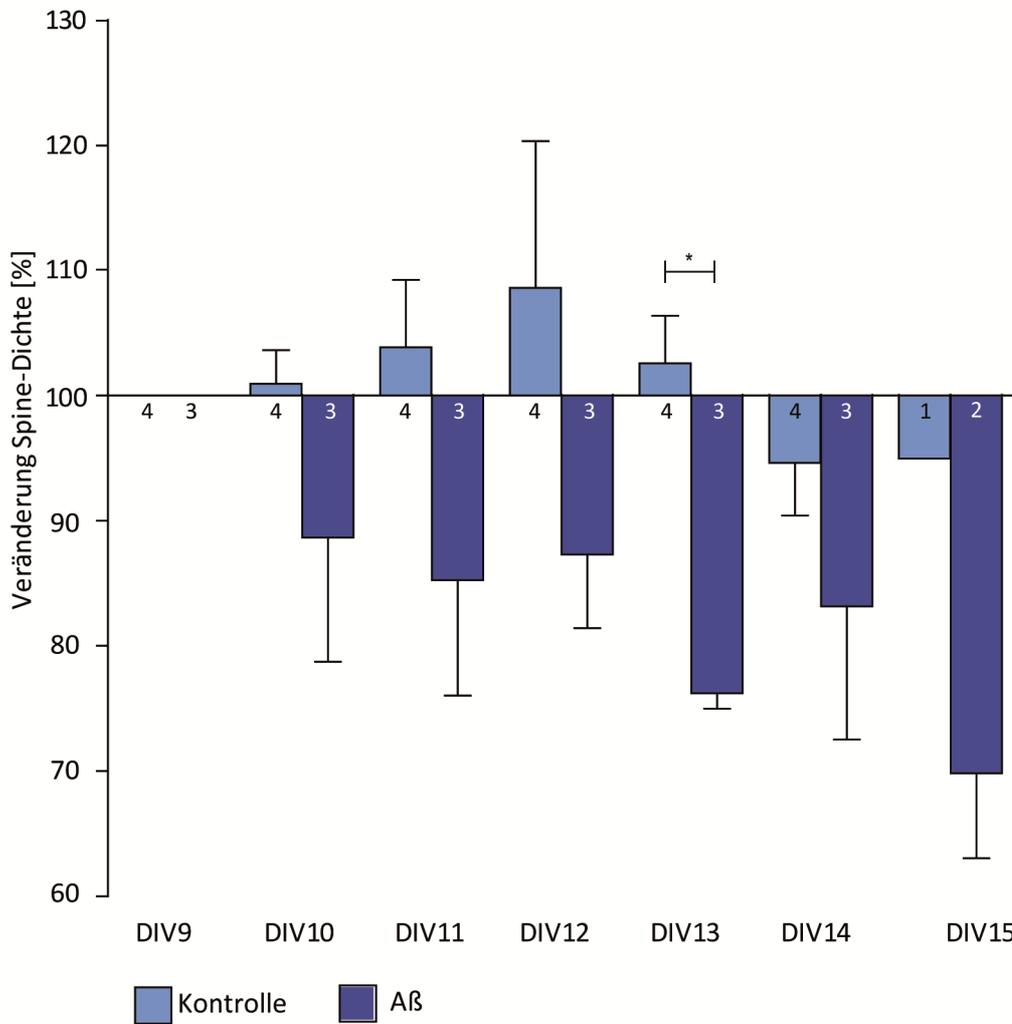


Abb. 28|Effekte von Aβ auf CA3-Neuronen: Organotypische Kulturen wurden eine Woche lang mit 1μM Aβ₁₋₄₀ (ohne vorherige Oligomerisierung) behandelt. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel eingesetzt. **a)** Darstellung der absoluten *Spine*-Dichte im Verlauf der Behandlung. **b)** prozentuale Veränderung der *Spine*-Dichte im Verlauf der Behandlung.

4. Diskussion

Alzheimer ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des ZNS, die mit dem Verlust höherer kognitiver Fähigkeiten einhergeht. Auf zellulärer Ebene wird sie charakterisiert durch Störungen synaptischer Strukturen und Funktionen; die typischen, auch makroskopisch sichtbaren Läsionen sind neuritische Plaques. Hierbei handelt es sich um extrazelluläre Ablagerungen, die hauptsächlich aus β -Amyloid-Peptiden bestehen. Interessanterweise korreliert die Menge löslicher A β -Peptide mit dem Vorliegen und dem Ausmaß kognitiver Störungen, sodass sie als Kandidaten für die Verursachung der neuronalen Dysfunktionen bei Alzheimer gehandelt werden.

Es wäre allerdings ein Trugschluss die Eigenschaften von A β als ausschließlich pathologisch zu betrachten. Sein Vorgängerprotein, APP, ist ein ubiquitär exprimiertes Transmembranprotein. Die Proteolyse des APP, bei dem A β freigesetzt wird, findet regulär statt, sodass bestimmte Formen des A β auch beim Gesunden extrazellulär auftreten. Die physiologischen Funktionen von APP und A β liegen allerdings noch weitgehend im Dunkeln. In letzter Zeit häufen sich Studien, die A β regulierende Einflüsse auf synaptische Plastizität zuschreiben, insbesondere auf Aufbau und Funktion dendritischer *Spines*. Unbekannt ist bisher allerdings, von welchem Rezeptor und über welchen Mechanismus diese A β -Effekte vermittelt werden.

In Frage kommt hierbei der p75^{NTR}, ein Neurotrophin-Rezeptor, der neben allen Neurotrophinen noch mit einer Reihe anderer Liganden interagieren kann und dessen Effekte auf synaptische Plastizität und neuronale Architektur teilweise denen von A β gleichen. Eine Bindung von A β an den p75^{NTR} konnte bereits gezeigt werden.

In meiner Arbeit habe ich mich daher mit der Frage beschäftigt, ob A β spezifische Effekte auf die Morphologie und Funktionalität von Neuronen über das p75^{NTR}-System vermittelt. Eine Beantwortung dieser Frage ist wichtig, um physiologische Funktionen von APP und A β weiter aufdecken zu können und so zu verstehen, welche Mechanismen bei der Alzheimer-Erkrankung disreguliert werden.

Hierzu musste zunächst ein System etabliert werden, dass sowohl die Applikation von A β auf neuronale Kulturen als auch die anschließende morphologische Auswertung ermöglichte. In dem sich anschließenden Vergleich der Effekte von A β auf WT- und p75^{NTR}ko-Neuronen zeigte sich, dass die p75^{NTR}-defizienten Zellen tatsächlich anders auf lösliche A β -Oligomere reagieren als der Wildtyp. Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass der p75^{NTR} eine zentrale Schaltstelle für die Einwirkung von A β auf die Feinjustierung neuronaler Netzwerke darstellt.

4.1 Übertragung von Mauszell-Experimenten auf den Menschen

Im Folgenden möchte ich zunächst einige grundlegende Überlegungen anstellen, bevor ich meine eigenen Daten mit der Literatur vergleiche und methodenkritisch betrachte.

Bei der Erforschung der Alzheimer-Demenz, die den Menschen so sehr in seiner Identität und Gedankenwelt betrifft, stellen sich schnell berechnete Fragen: Kann man eine solche Erkrankung überhaupt an Tieren erforschen? Und darf man gewonnene Ergebnisse so ohne weiteres auf den Menschen übertragen? Darauf soll im Folgenden geantwortet werden.

Eines der Hauptziele der Biomedizin ist es, experimentelle Modelle zu entwickeln, die die Erforschung menschlicher Krankheiten ermöglichen und dabei den menschlichen Verhältnissen so nahe wie möglich kommen. Mäuse bieten für dieses Ziel viele Vorteile: Sie sind klein, leicht zu halten und leicht zu züchten. Ihre Schwangerschaftsdauer ist kurz und ihre Nachkommen zahlreich. Überdies ist ihr gesamtes Genom bekannt und kann genetisch manipuliert werden. Gerade für die Untersuchung kognitiver Fähigkeiten eignen sie sich, da sie gut auf zahlreiche Lern- und Gedächtnisaufgaben ansprechen. Diese beruhen wiederum auf der Aktivierung von Hirnarealen, die für die Alzheimer-Krankheit von zentraler Bedeutung sind.

Alzheimer mit all seinen Charakteristika jedoch ist eine humanspezifische Erkrankung. Es gibt noch kein Tier-Modell, das alle klinischen und pathologischen Merkmale der Alzheimer-Krankheit *in vivo* reproduzieren kann. So kann beispielsweise eine APP-Mutation beim Menschen das Vollbild der Alzheimer-Krankheit (kognitive Defizite, A β -Plaques, neurofibrilläre Bündel und Neuronenverlust) hervorrufen; APP-transgene Mäuse hingegen zeigen lediglich Plaquebildung und Gedächtnisverlust. Auch brauchen Mäuse eine weit stärkere Überexpression von APP, um Krankheitssymptome zu entwickeln (Duff and Suleman, 2004), und zeigen trotz hoher Plaquebildung weniger Neurodegeneration als menschliche Gehirne (Mattson et al., 1993; Kelly et al., 2003; Arendash et al., 2001). Dennoch bleibt festzuhalten, dass Mausmodelle von AD wesentliche Aspekte der Krankheit darstellen können: Beispielsweise können sie extrazelluläre A β -Plaques mit umgebender Aktivierung von Microglia und Astrozyten bilden, einschließlich synaptischer und kognitiver Defizite. (für Übersichtsartikel siehe Ashe and Zahs, 2010; Epis et al., 2010; Balducci and Forloni, 2011) So erscheint es bei aller gebotenen Vorsicht gerechtfertigt Mausmodelle für die spezifische Untersuchung einzelner Krankheitsaspekte zu verwenden. In dieser Arbeit setzen wir tierische Zellen ein, um ein präzises System zur Untersuchung der Einflüsse von A β auf neuronale Strukturen zu entwickeln. Am Menschen kann derartige Grundlagenforschung auf der Ebene einzelner Neurone unmöglich durchgeführt werden; denkbare fMRI-Ansätze scheitern bereits an der Auflösung eines fMRIs von mehreren 10.000 Zellen (für einen Übersichtsartikel siehe Olman and Yacoub, 2011).

4.2 Auf der Suche nach dem richtigen zellkulturellen Setting

In der Vorbereitung dieser Arbeit ist viel Aufwand in die Etablierung der Methode geflossen. Es stellten sich Fragen nach den zu verwendenden Zellkulturen, den zu analysierenden Zelltypen, dem richtigen Zeitpunkt der Behandlung mit A β und der richtigen Zeitdauer. Nicht zuletzt die

Identifikation der geeigneten A β -Spezies, ihrer Aufarbeitung und ihres Oligomerisierungszustandes sowie der korrekten Konzentration war eine zentrale Herausforderung. In diesem Kapitel soll auf die relevantesten zellkulturellen Aspekte eingegangen werden; Kapitel 4.3. beschäftigt sich mit der Suche nach den geeigneten Bedingungen hinsichtlich des Peptides.

4.2.1 Stärken und Schwächen der dissoziierten Kulturen

Bei der Verwendung sowohl dissoziierter als auch organotypischer Kulturen erfolgt die morphologische Analyse der einzelnen Zellen manuell und ist damit sehr abhängig vom Untersucher. Die absoluten Werte betreffend *Spine*-Dichte und -Länge sind daher schlecht objektivierbar. Da alle Auswertung eines Experimentes aber durch dieselbe Person erfolgt, bleiben die relativen Verhältnisse dennoch verlässlich und untereinander vergleichbar.

Ein im Laufe dieser Arbeit immer wieder auftretendes Problem hingegen war die morphologische Variabilität der dissoziierten Kulturen an sich. Auch bei gleichbleibender Zahl der ausgesäten Zellen schwankt die Anzahl der Zellen, die überleben. Dies hat direkte Folgen zum einen für die Menge der von den Zellen selbst produzierten Neurotrophine, zum anderen für die Anzahl möglicher Zell-Zell-Kontakte. Außerdem beeinflusst die Anzahl der Neuronen natürlich auch die in der Kultur stattfindende elektrische Aktivität, sodass alles in allem von einem Einfluss der allgemeinen Neuronenzahl auf die Dichte und Stärke synaptischer Strukturen auszugehen ist. Um die Ergebnisse der einzelnen Experimente dennoch vergleichbar zu halten, wurden neben den absoluten Veränderungen in *Spine*-Dichte und -Länge jeweils auch die prozentualen Schwankungen dargestellt. Dennoch benötigt die verlässlich vergleichbare Ausbildung synaptischer Kontakte und morphologischer Strukturen vermutlich ein komplexeres System, sodass längerfristig der Einsatz organotypischer Kulturen bei einem ansonsten ähnlichen experimentellen Setting wünschenswert wäre. Dennoch liegt in der einfachen Struktur der dissoziierten Kulturen gleichzeitig auch ihre große Stärke für die Fragestellung der Arbeit: sie ermöglicht und vereinfacht es Interaktionen eines einzelnen Rezeptors mit einem einzelnen Liganden erkennen und darstellen zu können, zunächst einmal unabhängig von sonstigen, in komplexeren Systemen ablaufenden Prozessen. Darauf aufbauend sind dann Untersuchungen in komplexeren Systemen bis hin zu *in vivo*-Experimenten denkbar.

4.2.2 Anmerkungen zu den Time Lapse-Experimenten

Für die Time Lapse-Experimente erwiesen sich die dissoziierten Kulturen jedoch als zu empfindlich. Daher wurden hier organotypische Kulturen eingesetzt, die eine deutlich höhere Resilienz und Beständigkeit gegenüber der Durchführung der Experimente und der damit unvermeidlich einhergehenden Schwankungen in Temperatur und pH-Wert aufweisen. Gleichzeitig kann durch die Verwendung der organotypischen Kulturen eine stärkere Aussagekraft über die Verhältnisse *in vivo* erreicht werden ohne gleichzeitig die Möglichkeit der Einzelzell-Untersuchung aufzugeben. Da die organotypischen Kulturen ein komplexeres System darstellen, wurde für die Time Lapse-Experimente eine längere Zeitdauer der A β -Behandlung angesetzt als für die dissoziierten Kulturen. Mit der 7-tägigen Behandlung der Zellen befinden wir uns hier in dem Zeitrahmen, der auch von Shrestha et al für

organotypische Kulturen verwendet (Shrestha et al., 2006) und innerhalb dessen von ihnen Veränderungen der *Spine*-Morphologie und -Motilität beobachtet worden waren (s. Tabelle 5). Da bei diesem langen Behandlungsrahmen von einer weiteren Oligomerisierung von A β ausgegangen werden kann, arbeiteten wir bei den Time Lapse-Experimenten mit primär monomerem A β , um zu starker Fibrillenbildung vorzubeugen.

Eine grundsätzliche Schwierigkeit in der Durchführung der Time Lapse-Experimente liegt in der Ausbleichung der Zellen durch das Fluoreszenz-Licht. Hierdurch wird eine langfristige, kontinuierliche Verfolgung einzelner Zellen deutlich erschwert, sodass das n teilweise im Verlauf des Experimentes durch zu starke Bleichung der Zellen abnimmt. Das Bleichen tritt aber in gleichem Maße bei Kontrollen und behandelten Zellen auf, sodass es für die Interpretation der Ergebnisse vernachlässigbar bleibt.

Die durchgeführten Experimente deuten an, dass langfristige A β -Behandlung bei CA3-Neuronen zu einer Reduktion der *Spine*-Dichte führt, nicht jedoch bei CA1-Zellen (Abb. 27, 28). Letzteres deckt sich mit Beobachtungen von Tardito et al, die in einer ähnlichen Zeitspanne bei gleicher Konzentration ebenfalls keine Reduktion der Synapsenanzahl feststellen konnten. (Tardito et al., 2007) Sehr interessant hingegen ist die während der Time Lapse-Experimente gemachte Beobachtung, dass CA3-Zellen mit einer Reduktion ihrer *Spine*-Dichte reagieren zu scheinen. Dies bietet eine Erklärung für die Schwierigkeit einen Effekt von A β in dissoziierten Kulturen zu zeigen, da CA1- und CA3-Neuronen in diesen nicht voneinander unterschieden werden können. Hier wäre es wichtig zukünftig umfangreichere Experimente mit einer größeren Zahl analysierter Zellen durchzuführen; ebenfalls ein Vergleich mit p75^{NTR}-ko-Zellen wäre wünschenswert. Obwohl sowohl CA1- als auch CA3-Zellen den p75^{NTR} exprimieren (Zagrebelsky et al., 2005), ergibt die Literatur kein eindeutiges Bild, wie stark die p75^{NTR}-Expression in den einzelnen Regionen ausfällt (Mufson et al., 1994; Hu et al., 2002). Dies in weiteren Experimenten per Real-Time-PCR zu quantifizieren und zu vergleichen, könnte die Rolle des p75^{NTR} für die von A β hervorgerufenen Effekten weiter aufklären.

4.3 A β oder: Die Nadel im Heuhaufen

4.3.1 Identifikation der richtigen A β -Spezies

Neben der Suche nach dem geeigneten zellkulturellen Setting war die Identifikation der richtigen A β -Spezies ein zentrales Anliegen dieser Arbeit. Über die verschiedenen A β -Typen existiert umfassende Literatur, die insgesamt jedoch ein verwirrendes, sehr heterogenes Bild ergibt.

Tabelle 4 | Darstellung der verschiedenen synthetischen und natürlichen A β -Oligomere (Haass and Selkoe, 2007)

<i>Oligomer-Typ</i>	<i>Eigenschaften</i>
Protofibrillen (PF)	Zwischenstufen bei der Fibrillenbildung synthetischen A β s; bis zu 150nm lang und ~5nm breit; β -Faltblatt-Struktur: binden Kongorot und Thioflavin T (Harper et al., 1997;Hartley et al., 1999;Walsh et al., 1999)
Kranzförmige Zusammenlagerungen	Doughnut-artige Strukturen synthetischen A β s; äußerer Durchmesser ~8-12nm; innerer Durchmesser ~2,0-2,5nm (Bitan et al., 2003;Lashuel et al., 2002)
A β -derived diffusible ligands (ADDLs)	Synthetische A β -Oligomere, die kleiner als die kranzförmigen Zusammenlagerungen sind; beeinflussen möglicherweise Signal-Transduktionswege (Lambert et al., 2001;Klein, 2002;Lacor et al., 2007;Gong et al., 2003)
A β *56	Scheinbar Dodecamere natürlichen A β s; wurden in den Gehirnen APP-transgener Mauslinien gefunden und korrelieren womöglich mit Gedächtnisverlust (Lesne et al., 2006)
Sezernierte lösliche A β -Dimere und Trimere	Werden von Zellen in Kultur produziert; SDS-resistent; resistent gegen das A β -abbauende Enzym IDE (insulin-degrading enzyme); verändern synaptische Strukturen und Funktionen (Walsh et al., 2002;Calabrese et al., 2007)

Diese Vielfältigkeit der verwendeten A β -Spezies erschwert deutlich den Vergleich verschiedener vorpublizierter Daten sowie die Übertragung auf die Ergebnisse dieser Arbeit.

So nutzten Calabrese et al. in der Publikation, in der sie Veränderungen von *Spine*-Dichte und -Morphologie durch A β -Behandlung beschreiben (Calabrese et al., 2007), A β aus 7PA2-Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen, die die V717 Alzheimer-Mutation in APP₇₅₁ exprimieren. Diese Form des A β soll vornehmlich Monomere und Oligomere enthalten, v.a. im Bereich von Dimeren bis Tetrameren (Walsh et al., 2002).

Lacor et al., die ebenfalls Veränderungen der synaptischen Zusammensetzung und Morphologie zeigen, verwendeten hingegen synthetisches A β ₁₋₄₀ sowie A β ₁₋₄₂, das sie nach einem von Lambert et al. publizierten Protokoll oligomerisierten (Lacor et al., 2007; Lambert et al., 2001; Klein, 2002). Oligomerisiertes, synthetisches A β ₁₋₄₀ wiederum wurde von Roselli et al. in ihrer Publikation über Veränderungen der Postsynaptic Density-95 eingesetzt (Roselli et al., 2005).

So stellte sich in dieser Arbeit zum einen die Frage, ob A β ₁₋₄₀ oder A β ₁₋₄₂ verwendet werden sollte, zum anderen aus welcher Quelle dieses A β zu beziehen und drittens in welchem Oligomerisierungsstadium, welcher Konzentration und für welche Zeitspanne es einzusetzen sei. A β ₁₋₄₂ aggregiert deutlich schneller als A β ₁₋₄₀ und gilt daher als die pathologischere der beiden A β -Varianten. Tatsächlich beeinflusst das Verhältnis A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ die Toxizität eines A β -Gemischs erheblich. (Kuperstein et al., 2010) Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit vornehmlich A β ₁₋₄₀ verwendet, um eher die möglicherweise physiologischen Funktionen von A β beleuchten zu können.

In einem ersten experimentellen Ansatz setzten wir synthetisches A β ₁₋₄₀ ein ohne es vorher zu oligomerisieren. Der Gedanke dahinter war, dass Interaktionen zwischen A β und dem p75^{NTR} vielleicht am einfachsten durch die Bindung von Monomeren zu erklären sei. Die Behandlung der Zellen durch monomeres A β ₁₋₄₀ aus verschiedenen Quellen (American Peptide, PSI, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig), für verschiedene Zeitdauern und in verschiedenen Konzentrationen rief jedoch keine Veränderung der *Spines* hervor (Daten nicht gezeigt). Dies deckt sich mit publizierten Daten, die als die biologisch aktive Form des A β nur die Oligomere beschreiben. (Walsh et al., 2002; Cleary et al., 2005; Townsend et al., 2006) Um auszuschließen, dass das so aggregationsfreudige A β sich lediglich an Zellkulturschalen o.ä. ablagert und gar nicht zu den Zellen vordringt, wurde eine Experimentreihe durchgeführt, in der das Medium der Zellen zusätzlich mit BSA (Bovine Serum Albumine) versetzt wurde. Das Ziel dahinter war, mögliche Bindungsstellen für das A β durch Albumin zu blockieren, sodass das A β im Medium gelöst bleibt und zu den Zellen gelangen kann. Auch hier war keine Veränderung der *Spines* zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Daher wurde in den weiteren Experimenten dann oligomerisiertes A β ohne BSA eingesetzt.

4.3.2 Identifikation der richtigen Konzentration und Zeitdauer

Neben der ausgeprägten Heterogenität, was die Verwendung der einzelnen A β -Spezies betrifft, unterscheiden sich alle vorpublizierten Studien deutlich in der eingesetzten A β -Konzentration. Diese Konzentrationsunterschiede lassen sich zwar zum Teil auf die unterschiedlichen A β -Spezies und ihre unterschiedlichen Pathogenitäten zurückführen; von einem einheitlichen Bild der hervorgerufenen Phänotypen zu sprechen, erscheint bei Konzentrationsunterschieden von bis zu fünf Zehner-Potenzen allerdings kaum gerechtfertigt.

Dies wird umso deutlicher, wenn man bedenkt, was für kleine, subtile Veränderungen die in den Studien beschriebenen Effekte eigentlich darstellen. Hinzu kommt, dass die Inkubationszeiten sich ebenfalls deutlich unterscheiden. Die Vielfältigkeit der verwendeten experimentellen Bedingungen verdeutlicht nicht nur die Schwierigkeiten bei der Gestaltung des experimentellen Settings im Rahmen dieser Arbeit. Sie erschwert auch die Bewertung und Einordnung der verschiedenen publizierten Daten.

Tabelle 5|Eine Übersicht über die für diese Arbeit relevantesten Publikationen, die sich mit den Einflüssen von A β auf dendritische *Spines* befassen (kein Anspruch auf vollständige Darstellung).

Referenz	A β -Spezies	c[A β]	Zeit	Verwendete Kulturen	Beschriebener Effekt auf <i>Spines</i>
Calabrese et al., 2007	CHO-A β	<100pM	1 h	Hippocampus, dissoziiert	a) Reduktion von <i>Spine</i> -Dichte und Kopf-Durchmesser, Verlängerung der <i>Spines</i> b) Abnahme der Amplitude und Frequenz synapt. Potentiale c) Reversibilität und Resistenzentwicklung
Shrestha et al., 2006	A β_{1-42}	200 nM	7-11 Tage	Hippocampus, organotypisch	a) Reduktion von <i>Spine</i> -Dichte und -Motilität, Verlängerung der <i>Spines</i> b) Reversibilität nach Entfernung von A β
Roselli et al., 2005	A β_{1-40}	0,1-10 μ M	15-120 Min.	Kortex, dissoziiert	Reduktion von PSD-95 in Abh. von Zeit, Konzentration und NMDAR-Aktivität
Lacor et al., 2007	ADDL aus A β_{1-42}	500 nM	2 Min – 24 h	Hippocampus, dissoziiert	a) Bindung von ADDL an Postynaptic Density b) Reduktion von NMDA-R und EphB2-R c) Abnahme <i>Spine</i> -Dichte, <i>Spine</i> -Verlängerung

In dieser Arbeit wurde eine A β -Konzentration von 1 μ M verwendet, da die kritische Konzentration, ab der synthetisches A β_{1-40} aggregiert, im hohen nanomolaren Bereich oder sogar darüber liegt. Mit der Wahl dieser Konzentration befinden wir uns im Bereich der Größenordnung der von Roselli et al verwendeten Konzentration (Roselli et al., 2005). Dies erscheint sinnvoll, da Roselli et al ihr A β_{1-40} zum einen aus derselben Quelle bezogen wie wir, zum anderen ebenfalls mit dissoziierten Kulturen arbeiteten. Weiter gestützt wird diese Wahl durch eine kürzlich veröffentlichte *in vivo*-Studie, die bei Ratten Gedächtnisstörungen bei Injektion von 1,3 μ M synthetischen A β s beobachtete. (Reed et al., 2011)

Die Literatur bietet aufgrund ihrer Vielfältigkeit ebenfalls keine klaren Anhaltspunkte für die Inkubationszeit, die sinnvollerweise angesetzt werden sollte. In ersten experimentellen Ansätzen arbeitete ich wie Calabrese et al mit einstündigen A β -Behandlungen (Calabrese et al., 2007), allerdings ohne einen Effekt nachweisen zu können. Diverse Variationen der experimentellen Parameter zeigten erstmals nach einer sechsständigen Behandlung mit A β_{1-40} einen Effekt, sodass A β auch im Weiteren für diese Zeitdauer eingesetzt wurde (s. Abb. 10).

4.4 Anmerkungen zu den Western Blots

In der Literatur taucht eine große Vielfalt verschiedener A β -Typen auf; teilweise werden ihnen auch widersprüchlich erscheinende Auswirkungen auf Neuronen zugeschrieben. So beschreiben beispielsweise Yaar et al sowie Sotthibundhu et al Apoptose-induzierende Wirkungen von A β (Yaar et al., 1997; Sotthibundhu et al., 2008), eine andere Studie zeigte jedoch die Induktion von Neurogenese (Sotthibundhu et al., 2009). Auch die Beobachtung von Susen und Blochl, dass A β die Formation von Neuriten fördern kann, überrascht vor dem Hintergrund einer weiteren Studie, die neuritische Dystrophie beschreibt (Susen and Blochl, 2005; Knowles et al., 2009). Daher ist es in dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung die hier geeignete A β -Spezies und ihre korrekte Aufarbeitung zu identifizieren. Dazu gehört auch zu kontrollieren in welchem Oligomerisierungszustand die Peptide tatsächlich eingesetzt werden.

In den durchgeführten Western Blots ist erkennbar, dass die verwendeten A β_{1-40} -Proben ohne vorherige Oligomerisierung im Wesentlichen Monomere und einen ganz schwachen Anteil Dimere enthalten, sich mit zunehmender Oligomerisierungsdauer aber durchaus Oligomere bilden. (Abb. 14) Dies erklärt, dass die durch A β_{1-40} hervorgerufenen Effekte auf die *Spine*-Morphologie mit zunehmender Oligomerisierungsdauer des Peptids zunehmen (Abb. 18). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Studien. (Walsh et al., 2002; Cleary et al., 2005; Townsend et al., 2006)

Auch ohne angesetzte Oligomerisierung enthalten die A β_{1-42} Proben bereits Oligomere im Größenbereich von Tri- bis Tetrameren, eine Beobachtung, die Ono et al ebenfalls gemacht haben. (Ono et al., 2010) Mit zunehmender Oligomerisierungsdauer zeigt sich eine Oligo- bis Polymerisierung bis hin in den Größenbereich von Protofibrillen ab ca. 100.000 Da. (s. Abb. 15) In der Behandlung der Zellen (Abb. 22 bis 26) wurden außerdem Proben von A β_{1-42} eingesetzt, die für 12 h oligomerisiert wurden. Auch wenn diese nicht molekularbiologisch untersucht

wurden, kann wohl von einer ausgeprägten Bildung von Protofibrillen ausgegangen werden, da diese schon bei der Hälfte der Oligomerisierungszeit auftreten. Dies würde erklären, warum die nach 6h vorhandenen $A\beta_{1-42}$ -Oligomere eine signifikante Reduktion synaptischer *Spines* hervorrufen (Abb. 23); für 12 h oligomerisiertes $A\beta_{1-42}$ jedoch nicht mehr. So liegen einige Studien vor, die Oligomeren einen stärkeren Einfluss auf Neuronen zuschreiben als Protofibrillen und Fibrillen. (Cheng et al., 2007; Walsh et al., 2002)

Bei der Interpretation der Western Blots ist zu bedenken, dass ein Teil der Ansätze mit einem Cross-Linker behandelt wurde. Allerdings wurde der Cross-Linker nach mehrstündigen Oligomerisierungszeiten für lediglich 10 Minuten unmittelbar vor der Durchführung des Western Blots hinzugegeben. Das lässt eine relevante Oligomerisierung von $A\beta$ durch den Cross-Linker sehr unwahrscheinlich erscheinen, vor allem in Hinsicht darauf, wie weit die Oligo- bis Polymerisierung in einigen der Blots fortgeschritten ist.

4.5 Mögliche Reversibilität der Effekte

Die Behandlung von WT-Neuronen mit $A\beta_{1-40}$ (Abb. 17 und 18) zeigt den anhand der publizierten Daten erwarteten Effekt: Eine Verringerung der *Spine*-Dichte sowie eine (nichtsignifikante) Verlängerung der *Spines*. Auch beim Einsatz von $A\beta_{1-42}$ zeigt sich eine signifikante Verringerung der *Spine*-Dichte, ohne allerdings eine merkliche Veränderung der *Spine*-Längen aufzuzeigen (Abb. 22 und 23). Eine Erklärung hierfür liegt in einer zuvor beschriebenen möglichen Reversibilität der $A\beta$ -Effekte auf *Spines* in Abhängigkeit von der Zeit (Calabrese et al., 2007). Auch Tardito et al deuten eine Abhängigkeit der $A\beta$ -Einflüsse von der Zeitdauer der Behandlung an, indem sie zeigen, dass kurz- und längerfristige $A\beta$ -Behandlungen gegensätzliche Einflüsse auf die Aktivität der CamKII ausüben (Tardito et al., 2007).

Da $A\beta_{1-42}$ als die deutlich pathogenere Spezies gilt, wäre es denkbar, dass die durch sie hervorgerufene Wirkung schneller eintritt, und dementsprechend auch die Wiederherstellung der ursprünglichen Verhältnisse schneller eingeleitet wird. Eine Reduktion der *Spine*-Dichte erfordert größere strukturelle Umbauten als dies für eine bloße Formveränderung notwendig wäre. Daher wäre es möglich, dass eine Fixation der Zellen nach 6 h in dieser Arbeit den Zeitpunkt abpasst, an dem sich die *Spine*-Länge bereits wieder normalisiert hat, ihre Dichte aber noch verringert ist.

4.6 Was bedeutet eine Änderung der Morphologie funktionell?

Die *Spines* eines Dendriten tragen die postsynaptischen Elemente der Synapsen.

Da im ausgereiften Nervensystem fast jedem *Spine* auch eine präsynaptische Struktur zugeordnet werden kann, kann davon ausgegangen werden, dass eine Reduktion der *Spine*-Dichte einer Reduktion der Anzahl funktioneller Synapsen entspricht. Die Analyse der *Spine*-Länge und seiner funktionellen Bedeutung bedarf dagegen einer genaueren Betrachtung.

Shrestha et al. haben bereits eine Verlängerung von *Spines* durch A β zeigen können (Shrestha et al., 2006). Calabrese et al. haben des Weiteren auch eine Abnahme ihres Kopfdurchmessers beobachtet (Calabrese et al., 2007). Die Messung von *Spine*-Kopf und -Hals ist zwar für organotypische Kulturen eine etablierte Methode zur Beschreibung der *Spines*, in dissoziierten Kulturen ist dies aber nicht verlässlich genug möglich. Ansonsten wäre es (z.B. in organotypischen Kulturen) wünschenswert die *Spine*-Typen genauer zu differenzieren. Dies ließe klarere Rückschlüsse über den funktionellen Zustand der *Spines* zu, da die sog. *Thin Spines* als unreife Synapsen gelten. Im A β -Forschungsfeld wird diese Interpretation der *Spine*-Morphologie gestützt durch eine Studie, die nach einer einstündigen Behandlung mit A β ₁₋₄₀ eine Reduktion des PSD-95 zeigte – einem Protein, dem eine Schlüsselrolle bei der Regulation synaptischer Plastizität zugeschrieben wird. (Roselli et al., 2005) Lacor et al. beschreiben eine Herunterregulation von NMDA-Rezeptoren mit nachfolgender Reduktion der *Spine*-Dichte und der Entwicklung von *thin spines*. (Lacor et al., 2007) Wir können also zusammenfassend davon ausgehen, dass eine allgemeine Verlängerung der *Spines* einen erhöhten Anteil von *thin spines* und damit unreifer synaptischer Strukturen repräsentiert.

4.7 Lifeact

Veränderungen in der *Spine*-Morphologie müssen mit Veränderungen in der Struktur des Zytoskeletts einhergehen, um entstehen zu können und erhalten zu bleiben. Etwa 85% des Aktins innerhalb eines *Spines* sind als dynamisch beschrieben, mit einer Turnover-Zeit von nur 44 Sekunden. (Star et al., 2002) Es wäre daher hochspannend die modulierenden Effekte von A β auch auf das Zytoskelett zeigen zu können. Als mögliches Werkzeug bietet sich *Lifeact* an, ein 17 Aminosäuren umfassendes Peptid. Es bindet an F-Aktin-Strukturen eukaryotischer Zellen und Gewebe, ohne mit der Aktin-Dynamik zu interferieren (Riedl et al., 2008). Mit fluoreszierenden Proteinen fusioniert erlaubt es daher als *in vivo*-Marker die Beobachtung von Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts.

In dieser Arbeit wurden fGFP sowie RFP-*Lifeact* in allen verwendeten dissoziierten Zellkulturen gemeinsam exprimiert. fGFP diente als grün fluoreszierende Membranmarkierung zur Zählung der *Spines* sowie Analyse ihrer Morphologie. Des Weiteren erhofften wir uns, durch Intensitätsmessungen des rot fluoreszierenden RFP-*Lifeact* Aussagen über Umbauten des Zytoskeletts treffen zu können. Eine Abnahme der Intensität im Bereich des *Spine*-Kopfes wäre bei einer funktionellen Schwächung der Synapse zu erwarten gewesen, die schließlich mit der Bildung der sog. *Thin Spines* einhergehen würde.

RFP-*Lifeact* wurde zwar von allen transfizierten Zellen verlässlich exprimiert. Seine Fluoreszenzstärke war allerdings bei Weitem zu variabel und zu schwach, um Intensitäten verlässlich messen und vergleichen zu können. Die notwendigen Belichtungszeiten für die Aufnahmen der verschiedenen Zellen unterschieden sich so stark, dass Intensitätsmessungen lediglich Belichtungs-Artefakte, nicht aber Veränderungen des Zytoskeletts hätten darstellen können. Verschärft wurde dieses Problem durch die starke Ausbleichung des Signals aufgrund der erforderlichen hohen Belichtungszeiten. Da von jeder Zelle 8-12 Bilder umfassende Bildstapel aufgenommen werden mussten, um die Zelle dreidimensional vollständig abzubilden, waren die unterschiedlichen Bleichungsgrade insbesondere der unteren Bilder nicht kalkulierbar. Eine Normierung der *Lifeact*-Signalstärke des *Spine*-Kopfes in Bezug auf den Dendriten dergleichen Zelle war nicht möglich, da die Signalstärke des Dendriten oft so stark war, dass sie von Bleichvorgängen wenig beeinflusst wurde. Eine statistische Auswertung der *Lifeact*-Aufnahmen kam in dieser Arbeit daher nicht in Frage.

Für weitere Experimente wäre die Verwendung von GFP-*Lifeact* dem RFP-*Lifeact* vorzuziehen, da dieses nach eigener Erfahrung in seiner Signalintensität auch in unterschiedlichen Zellen konstanter und stärker ist. Die damit einhergehende Verkürzung der Belichtungszeiten entschärft auch das Problem der Bleicheffekte. Ein Ausweichen auf GFP-*Lifeact* war in dieser Arbeit allerdings keine Alternative, da hier der Schwerpunkt auf die Analyse der *Spine*-Morphologie anhand des fGFP-Signals gelegt wurde. Um das Zytoskelett zu beobachten, sollte *Lifeact* des Weiteren in zukünftigen Experimenten nicht in fixierten Kulturen verwendet werden, sondern in Time Lapse-Experimenten. Zum einen umgeht die Vorher-Nachher-Betrachtung derselben Zelle das Problem der Vergleichbarkeit der Werte bei verschiedenen stark fluoreszierenden Zellen. Zum anderen kann sich die Signalintensität bei lebenden Zellen auch nach Bleichung durch fortlaufende Exprimierung in gewissem Maße erholen, wie einzelne Time Lapse-Versuche während der Methodenetablierung dieser Arbeit bestätigten. Ohnehin verspricht die *Live*-Beobachtung einzelner Zellen spannendere Einblicke in das dynamische Innenleben dendritischer *Spines* als die Betrachtung fixierter Kulturen.

4.8 A β und p75

Um die Rolle des p75^{NTR} bei der Vermittlung der Effekte von A β auf neuronale Architektur aufklären zu können, wurden in dieser Arbeit die Reaktionen von WT- und p75^{NTR}ko-Neuronen auf verschiedene A β -Spezies miteinander verglichen.

Bei der Behandlung mit A β ₁₋₄₂ zeigen sich allenfalls sehr subtile Unterschiede (Abb. 23 und 25). Teilweise könnte das darauf zurückzuführen sein, dass nach einer sechsständigen Behandlung mit A β ₁₋₄₂ der Zeitraum der Veränderung der *Spine*-Morphologie bereits verpasst sein könnte (s.oben).

Weitaus deutlicher hingegen ruft die Behandlung mit A β ₁₋₄₀ bei WT-Neuronen andere Effekte hervor als bei den p75^{NTR}ko-Tieren. Während der Wildtyp mit einer Reduktion der *Spine*-Dichte und einer Verlängerung der *Spines* reagiert, zeigen die p75^{NTR}ko-Zellen eine gegensätzliche Tendenz (Abb. 21). Die niedrige Zellzahl der p75-Experimente in dieser Arbeit ist auf die

herabgesetzte Fortpflanzungsfähigkeit der p75^{NTR}ko-Tiere zurückzuführen; eine Erhöhung des n in weiteren Experimenten hätte den zeitlichen Umfang der Arbeit gesprengt, wäre zukünftig aber sehr wünschenswert für eine verlässlichere Interpretation der Ergebnisse. Daher lässt das geringe n der p75^{NTR}ko-Experimente zwar keine belastbaren Aussagen zu; als Hinweis auf eine mögliche Rolle des p75^{NTR} für die von A β hervorgerufenen Effekte können die Ergebnisse aber dennoch bewertet werden.

Die Expression des p75^{NTR} findet hauptsächlich in den Hirnregionen statt, die als besonders vulnerabel für die Alzheimer-Krankheit gelten, und wird laut einigen Studien während der Erkrankung weiter erhöht (Mufson and Kordower, 1992;Hu et al., 2002). Interessanterweise konnte für den Nucleus Basalis gezeigt werden, dass die Progression von Alzheimer mit einer Herunterregulierung der Trk-Rezeptoren einhergeht, die p75^{NTR}-Expression allerdings unverändert bleibt (Ginsberg et al., 2006). Nicht nur scheint der p75^{NTR} Zellen anfällig für A β -Toxizität zu machen (Rabizadeh et al., 1994;Sotthibundhu et al., 2008), sondern sind programmiertes Zelltod und negative synaptische Plastizität typische Folgen einer Aktivierung des p75^{NTR}. Mittlerweile liegen mehrere Studien vor, die direkte Interaktionen von A β mit dem p75^{NTR} zeigen. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine spezifische Bindung des p75^{NTR} durch A β nachweisen (Yaar et al., 1997;Kuner et al., 1998;Yaar et al., 2002;Knowles et al., 2009). Auch gibt es Daten, die die Vermittlung des A β ₁₋₄₂-induzierten Zelltodes durch den p75^{NTR} nahelegen (Sotthibundhu et al., 2008). Damit einhergehend konnte die Zytotoxizität und synaptische Dysfunktion durch A β durch Blockade der p75^{NTR}-Bindung reduziert werden. (Yaar et al., 2007;Yaar et al., 2008;Yang et al., 2008a)

Mittlerweile liegen des Weiteren einige Studien vor, die mögliche Signalwege der zytotoxischen Effekte von A β vorschlagen. In Abhängigkeit von der „Death“-Domäne des p75^{NTR} werden die MAP-Kinase p38 und die JNK aktiviert (Morishima et al., 2001;Knowles et al., 2009), die wiederum über die Aktivierung von NF κ B und p53 sowie der NADPH-Oxidase und den Kaspasen-3/9 Apoptose induzieren.(Costantini et al., 2005b;Tsukamoto et al., 2003) Alternativ kann p75^{NTR} den Tod der Zelle auch über Zusammenwirkung mit der p75-like apoptosis-inducing Death Domain (PLAIDD) herbeiführen. (Hashimoto et al., 2004). Frade et al schlagen einen Mechanismus vor, in dem p75^{NTR} bei Alzheimer über Tetraploidisierung der Neuronen zum Zelluntergang führen soll. (Frade and Lopez-Sanchez, 2010)

Auch Interaktionen zwischen p75^{NTR} und dem A β -Vorläuferprotein sind beschrieben. So können p75^{NTR} und TrkA die Prozessierung von APP gegensätzlich steuern: TrkA reduziert, p75^{NTR} steigert die Spaltung an der β -Stelle und dementsprechend die A β -Freisetzung.(Costantini et al., 2005c) In derselben Studie gibt es Hinweise, dass p75^{NTR} die A β -Produktion altersabhängig fördert, indem sich die TrkA/p75^{NTR}-Relation zugunsten von p75^{NTR} verschiebt. Weitere Daten beschreiben direkte Interaktionen von APP und p75^{NTR}, die sich in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen (Fombonne et al., 2009), bzw. die Stimulation der p75^{NTR}-Expression durch A β -Peptide (Chakravarthy et al., 2010).

Allerdings ist die Studienlage zur Interaktion von A β und p75^{NTR} durchaus widersprüchlich. Eine neuere Studie postuliert, dass p75^{NTR} die A β -Produktion zwar steigert, ihre Aggregation und Ablagerung jedoch hemmt (Wang et al., 2011). Sotthibundhu et al, die in oben zitierter Studie

die Vermittlung A β -induzierten Zelltodes durch den p75^{NTR} zeigten, beobachteten in einer anderen Studie eine Neurogenese-Stimulation durch A β via p75^{NTR}. (Sotthibundhu et al., 2009) Außerdem kann die Bindung von A β an p75^{NTR} in Purkinje-Zellen des Kleinhirns scheinbar das Wachstum kurzer axonaler Fortsätze und die Verzweigung existierender Neuriten fördern. (Susen and Blochl, 2005) Auch ob A β tatsächlich über p75^{NTR} Zelltod induziert, ist noch nicht abschließend geklärt, gibt es doch auch Studien, die eine schützende Rolle von p75^{NTR} gegen den Einfluss von A β beschreiben. (Zhang et al., 2003; Costantini et al., 2005a) Es wäre denkbar, dass diese unterschiedlichen Wirkungen u.a. von der A β -Konzentration und der eingesetzten A β -Spezies abhängen könnten. Getragen wird diese Interpretation u.a. von Daten, die A β eine dem Neurotrophin NGF agonistische bzw. antagonistische Wirkung in Abhängigkeit von der Konzentration zuschreiben. (Arevalo et al., 2009) Für das sympathische Nervensystem vermutet eine andere Arbeitsgruppe ebenfalls protektive Wirkungen von p75^{NTR} bei der Alzheimer-Erkrankung. (Bengoechea et al., 2009)

Daher gilt der p75^{NTR} zwar als wahrscheinlicher Interaktionspartner von A β ; seine Bedeutung in der Pathogenese von Alzheimer wirft jedoch nach wie vor Fragen auf. Die bisher veröffentlichten Studien zur Interaktion von A β mit dem p75^{NTR} konzentrieren sich zudem auf die toxischen Effekte von A β . Hier bieten die Ergebnisse dieser Arbeit einen neuen Ansatz für die Rolle des p75^{NTR} in frühesten, präklinischen Stadien der Alzheimer-Erkrankung anhand seines offenbar negativ-regulierenden Einflusses auf neuronale Architektur.

4.9 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise, dass $p75^{NTR}$ einer der vermittelnden Rezeptoren für die negativen Auswirkungen von $A\beta$ auf die Morphologie von Neuronen ist. Experimente in komplexeren *in vivo*-Systemen können diese Annahme weiter stärken. Hierfür müssten $p75^{NTR}$ -ko-Mäuse mit APP-überexprimierenden Linien gekreuzt werden. Anbieten würden sich beispielsweise Thy1-hAPP^{Lond/Swe}-Mäuse, die von Knowles et al. bei der Untersuchung neuritischer Dystrophie mit $p75^{NTR^{-/-}}$ -Mäusen gekreuzt wurden. (Knowles et al., 2009) Von Wang et al wurde als mögliche Alternative die APP^{Swe}/PS1 dE9-Linie eingesetzt, um ein transgenes Alzheimer-Mausmodell mit Deletion des $p75^{NTR}$ zu entwickeln. (Wang et al., 2011) Beide Vorschläge beinhalten die sog. *Swedish Mutation* und produzieren daher inhärent viel $A\beta$, ohne zusätzliche $A\beta$ -Gabe von außen. Zeigt sich auch in einem solchen System die Eliminierung des *Spine*-Phänotyps bei Ausschaltung des $p75^{NTR}$, wären neue Möglichkeiten für medikamentöse Therapieansätze eröffnet.

Die bisher gegen Alzheimer eingesetzten Medikamente wirken lediglich symptomatisch. Aufbauend auf Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurden und werden verschiedene therapeutische Strategien entworfen, die mit dieser Kaskade interferieren sollen. Die Wirksamkeit von Impfungen oder monoklonalen Antikörpern gegen $A\beta$ sowie Sekretaseinhibitoren ist bisher aber eher enttäuschend. Das liegt u.a. an ihren Nebenwirkungen. So interferieren beispielsweise γ -Sekretaseninhibitoren mit Notch-Signalwegen, sodass eine chronische Gabe untragbare toxische Einflüsse auf Zelldifferenzierungsprozesse hat. (für einen Übersichtsartikel siehe Wolfe, 2012) Ein weiterer Grund für die Schwierigkeit wirksame Therapien zu finden liegt in dem bisher mangelhaften Wissen über die physiologischen Funktionen von $A\beta$, seinen Interaktionsmechanismen und möglichen Rezeptoren. Außerdem werden in klinischen Studien die Medikamente für gewöhnlich erst bei Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium eingesetzt – zu spät für eine Krankheit, bei der die Pathogenese lange vor den ersten Symptomen beginnt.

Mittlerweile werden bereits erste neurotrophisch wirksame Medikamente entwickelt, um die kognitiven Fähigkeiten der Erkrankten zu erhalten und zu fördern. (Chen et al., 2011) Sollte sich die Bedeutung des $p75^{NTR}$ im Zusammenhang mit der Alzheimer Erkrankung weiter bestätigen, wäre eine noch präzisere Beeinflussung des Krankheitsverlaufes möglich. Hier käme eine intrathekale Gabe von funktionell blockierenden $p75^{NTR}$ -Antikörpern (wie beispielsweise von Garcia et al verwendet (Garcia et al., 2011)) in Frage oder eine intrazelluläre Blockade von $p75^{NTR}$ -Signalwegen. Alle neu zu entwickelnden therapeutischen Ansätze haben jedoch eine gemeinsame Voraussetzung: ein tiefgreifendes Verständnis der frühen, präklinischen Krankheitsvorgänge. Zu erklären, wie neuronale Rezeptoren synaptische Plastizität und Gedächtnisprozesse beeinflussen, und aufzudecken, auf welchen Wegen $A\beta$ Dysfunktionen dieser Rezeptoren hervorruft, sind daher zentrale Schritte für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien für die Alzheimer-Demenz.

5. Danksagung

Niemals hätte ich diese Arbeit alleine beginnen, durchführen und abschließen können. Ein ganz warmes, herzliches Dankeschön daher an alle, die mir auf die eine oder andere Weise unterstützend zur Seite gestanden haben:

Prof. Martin Korte, der mich zunächst als Mentor von der Anfertigung einer experimentellen Arbeit überzeugte und mir anschließend als Doktorvater in jeder Lebenslage eine helfende Hand bot – sei es mit wissenschaftlichen Impulsen, Ratschlägen in persönlichen Krisenzeiten oder einfach „nur“ seinem Gästezimmer. Danke für das alles! (Auch an Maria und die Jungs!)

Prof. Werner Wittkowski für die schnelle und unkomplizierte Übernahme der Erstkorrektorenschaft

Dr. Marta Zagrebelsky, die meine Arbeit von Anfang an mit unfassbar viel Mühe, Geduld und Herzblut begleitet und betreut hat

Diane Mundil, der Königin der Zellkultur, für die unzähligen von ihr präparierten Kulturen

Carolin Riemer für die Durchführung der Time Lapse-Experimente

Yves Kellner für die Starthilfe am Anfang und viel gemeinsam in dunklen Mikroskopier-Sälen verbrachte Zeit

Sina Schultze für die nette und aufbauende Zusammenarbeit im zweiten Experimentier-Block

Tanja Meßerschmidt für ihre Unterstützung im molekularbiologischen Teil der Experimente und das ansteckendste Lachen in ganz Braunschweig

Dr. Martin Rothkegel für schnellen fachlichen Rat in allen molekularbiologischen Fragen

Dem **HZI Braunschweig** sowie der **AG Henneka** der Uni Bonn für die Überlassung ihrer Aß-Peptide

dem **Rest der AG Korte** für ihre Hilfe und Unterstützung, für's Kuchenbacken und Witzeln, für's Grillen und Singen.

Sowieso immer schon einmal Danke sagen wollte ich...

meinen Eltern für ihre Liebe und weil sie die Sache mit den Wurzeln und den Flügeln so perfektioniert haben

meinen Brüdern für die Lachtränen, die sie mir immer wieder in die Augen treiben

den **Klinikgruppen 8, 12 (!) und 18** des Rosalind Franklin-Semesters für großartige Freundschaften und ganz einfach wundervolle Jahre

sowie **Elmar** für die Liebe auf den zweiten Blick.

7. Literaturverzeichnis

1. Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD (1998) p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol* 143:1691-1703.
2. Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*. 64:146-8.
3. American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th Ed. Washington DC: American Psychiatric Association.
4. Arendash GW, Gordon MN, Diamond DM, Austin LA, Hatcher JM, Jantzen P, DiCarlo G, Wilcock D, Morgan D (2001) Behavioral assessment of Alzheimer's transgenic mice following long-term Abeta vaccination: task specificity and correlations between Abeta deposition and spatial memory. *DNA Cell Biol* 20:737-744.
5. Arevalo MA, Roldan PM, Chacon PJ, Rodriguez-Tebar A (2009) Amyloid beta serves as an NGF-like neurotrophic factor or acts as a NGF antagonist depending on its concentration. *J Neurochem* 111:1425-1433.
6. Arrighi HM, Neumann PJ, Lieberburg IM, Townsend RJ (2010) Lethality of Alzheimer disease and its impact on nursing home placement. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 24:90-95.
7. Ashe KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66:631-645.
8. Balducci C, Forloni G (2011) APP transgenic mice: their use and limitations. *Neuromolecular Med* 13:117-137.
9. Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, Yoon SO (2002) ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36:375-386.
10. Benedetti M, Levi A, Chao MV (1993) Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7859-7863.
11. Bengoechea TG, Chen Z, O'Leary DA, Masliah E, Lee KF (2009) p75 reduces beta-amyloid-induced sympathetic innervation deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7870-7875.
12. Bibel M, Hoppe E, Barde YA (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* 18:616-622.
13. Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB (2003) Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:330-335.

14. Brookmeyer R, Corrada MM, Curriero FC, Kawas C (2002) Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:1764-1767.
15. Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000) Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391-398.
16. Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA (1993) Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2092-2096.
17. Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259:514-516.
18. Calabrese B, Shaked GM, Tabarean IV, Braga J, Koo EH, Halpain S (2007) Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally-secreted amyloid-beta protein. *Mol Cell Neurosci* 35:183-193.
19. Calabrese B, Wilson MS, Halpain S (2006) Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)* 21:38-47.
20. Chakravarthy B, Gaudet C, Menard M, Atkinson T, Brown L, Laferla FM, Armato U, Whitfield J (2010) Amyloid-beta peptides stimulate the expression of the p75(NTR) neurotrophin receptor in SHSY5Y human neuroblastoma cells and AD transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 19:915-925.
21. Chen G, Kolbeck R, Barde YA, Bonhoeffer T, Kossel A (1999) Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 19:7983-7990.
22. Chen Q, Prior M, Dargusch R, Roberts A, Riek R, Eichmann C, Chiruta C, Akaishi T, Abe K, Maher P, Schubert D (2011) A novel neurotrophic drug for cognitive enhancement and Alzheimer's disease. *PLoS One* 6:e27865.
23. Cheng IH, Scearce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, Puolivali J, Lesne S, Ashe KH, Muchowski PJ, Mucke L (2007) Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models. *J Biol Chem* 282:23818-23828.
24. Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9:344-356.
25. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.
26. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8:79-84.

27. Costantini C, Della-Bianca V, Formaggio E, Chiamulera C, Montresor A, Rossi F (2005a) The expression of p75 neurotrophin receptor protects against the neurotoxicity of soluble oligomers of beta-amyloid. *Exp Cell Res* 311:126-134.
28. Costantini C, Rossi F, Formaggio E, Bernardoni R, Cecconi D, Della-Bianca V (2005b) Characterization of the signaling pathway downstream p75 neurotrophin receptor involved in beta-amyloid peptide-dependent cell death. *J Mol Neurosci* 25:141-156.
29. Costantini C, Weindruch R, Della VG, Puglielli L (2005c) A TrkA-to-p75NTR molecular switch activates amyloid beta-peptide generation during aging. *Biochem J* 391:59-67.
30. Coulson EJ, Reid K, Shipham KM, Morley S, Kilpatrick TJ, Bartlett PF (2004) The role of neurotransmission and the Chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res* 146:41-62.
31. Dumas S, Ceccom J, Halley H, Frances B, Lassalle JM (2009) Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 supports the involvement of the hippocampal mossy fiber pathway on contextual fear memory consolidation. *Learn Mem* 16:504-507.
32. Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5:1131-1136.
33. Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P (2003) Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10494-10499.
34. Dobrowsky RT, Carter BD (2000) p75 neurotrophin receptor signaling: mechanisms for neurotrophic modulation of cell stress? *J Neurosci Res* 61:237-243.
35. Dowling P, Ming X, Raval S, Husar W, Casaccia-Bonnel P, Chao M, Cook S, Blumberg B (1999) Up-regulated p75NTR neurotrophin receptor on glial cells in MS plaques. *Neurology* 53:1676-1682.
36. Duff K, Suleman F (2004) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: how useful have they been for therapeutic development? *Brief Funct Genomic Proteomic* 3:47-59.
37. Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5:486-488.
38. Engert F, Bonhoeffer T (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70.
39. Epis R, Gardoni F, Marcello E, Genazzani A, Canonico PL, Di LM (2010) Searching for new animal models of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 626:57-63.
40. Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847-854.

41. Fombonne J, Rabizadeh S, Banwait S, Mehlen P, Bredesen DE (2009) Selective vulnerability in Alzheimer's disease: amyloid precursor protein and p75(NTR) interaction. *Ann Neurol* 65:294-303.
42. Frade JM, Lopez-Sanchez N (2010) A novel hypothesis for Alzheimer disease based on neuronal tetraploidy induced by p75 (NTR). *Cell Cycle* 9:1934-1941.
43. Garcia N, Tomas M, Santafe MM, Lanuza MA, Besalduch N, Tomas J (2011) Blocking p75 (NTR) receptors alters polyinnervation of neuromuscular synapses during development. *J Neurosci Res* 89:1331-1341.
44. Ginsberg SD, Che S, Wu J, Counts SE, Mufson EJ (2006) Down regulation of trk but not p75NTR gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 97:475-487.
45. Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235:877-880.
46. Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10417-10422.
47. Grabowski TJ, Cho HS, Vonsattel JP, Rebeck GW, Greenberg SM (2001) Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 49:697-705.
48. Grundman M, et al. (2004) Mild cognitive impairment can be distinguished from Alzheimer disease and normal aging for clinical trials. *Arch Neurol* 61:59-66.
49. Grutzendler J, Kasthuri N, Gan WB (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420:812-816.
50. Haass C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483-488.
51. Haass C, Hung AY, Selkoe DJ, Teplow DB (1994) Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem* 269:17741-17748.
52. Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.
53. Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT (1997) Observation of metastable A beta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* 4:119-125.
54. Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, Teplow DB, Selkoe DJ (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 19:8876-8884.

55. Hashimoto Y, Kaneko Y, Tsukamoto E, Frankowski H, Kouyama K, Kita Y, Niikura T, Aiso S, Bredesen DE, Matsuoka M, Nishimoto I (2004) Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75NTR/PLAIDD. *J Neurochem* 90:549-558.
56. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003) Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol* 60:1119-1122.
57. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350:678-683.
58. Hofer SB, Mrcic-Flogel TD, Bonhoeffer T, Hubener M (2009) Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature* 457:313-317.
59. Holtmaat A, Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10:647-658.
60. Holtzman DM, Morris JC, Goate AM (2011) Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* 3:77sr1.
61. Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52:831-843.
62. Hu XY, Zhang HY, Qin S, Xu H, Swaab DF, Zhou JN (2002) Increased p75(NTR) expression in hippocampal neurons containing hyperphosphorylated tau in Alzheimer patients. *Exp Neurol* 178:104-111.
63. Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
64. Institute of Medicine (2008) *Retooling for an Aging America: Building the Health Care Workforce*. Washington, D.C.: The National Academies Press.
65. Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE (2006) Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5161-5166.
66. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-937.
67. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.
68. Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, Schlecht HP, Carver K, Maguire E, Abramowski D, Wiederhold KH, Sturchler-Pierrat C, Jucker M, Bergmann R, Staufenbiel M, Sommer B

- (2003) Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 24:365-378.
69. Khursigara G, Orlinick JR, Chao MV (1999) Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J Biol Chem* 274:2597-2600.
 70. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6382-6387.
 71. Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41:345-352.
 72. Klyubin I, Walsh DM, Lemere CA, Cullen WK, Shankar GM, Betts V, Spooner ET, Jiang L, Anwyl R, Selkoe DJ, Rowan MJ (2005) Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo. *Nat Med* 11:556-561.
 73. Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Feraud-Espinosa I, Ferrer I, DeFelipe J (2009) Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 19:586-592.
 74. Knowles JK, Rajadas J, Nguyen TV, Yang T, LeMieux MC, Vander GL, Ishikawa C, Massa SM, Wyss-Coray T, Longo FM (2009) The p75 neurotrophin receptor promotes amyloid-beta(1-42)-induced neuritic dystrophy in vitro and in vivo. *J Neurosci* 29:10627-10637.
 75. Kolb B, Cioe J, Comeau W (2008) Contrasting effects of motor and visual spatial learning tasks on dendritic arborization and spine density in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90:295-300.
 76. Korte M, Kang H, Bonhoeffer T, Schuman E (1998) A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 37:553-559.
 77. Kuner P, Schubel R, Hertel C (1998) Beta-amyloid binds to p57NTR and activates NFkappaB in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 54:798-804.
 78. Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, Vandersteen A, Segers-Nolten I, Van Der Werf K, Subramaniam V, Braeken D, Callewaert G, Bartic C, D'Hooge R, Martins IC, Rousseau F, Schymkowitz J, De SB (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. *EMBO J* 29:3408-3420.
 79. Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, Lambert MP, Velasco PT, Bigio EH, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2004) Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24:10191-10200.
 80. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796-807.

81. Lambert MP, Viola KL, Chromy BA, Chang L, Morgan TE, Yu J, Venton DL, Krafft GA, Finch CE, Klein WL (2001) Vaccination with soluble Abeta oligomers generates toxicity-neutralizing antibodies. *J Neurochem* 79:595-605.
82. Lashuel HA, Hartley D, Petre BM, Walz T, Lansbury PT, Jr. (2002) Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* 418:291.
83. Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440:352-357.
84. Leuner B, Falduto J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23:659-665.
85. Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 16:4999-5005.
86. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.
87. Majdan M, Miller FD (1999) Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int J Dev Neurosci* 17:153-161.
88. Maletic-Savatic M, Malinow R, Svoboda K (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283:1923-1927.
89. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.
90. Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243-254.
91. Mc Donald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG, Walsh DM (2010) The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 133:1328-1341.
92. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
93. Miller M (1981) Maturation of rat visual cortex. I. A quantitative study of Golgi-impregnated pyramidal neurons. *J Neurocytol* 10:859-878.
94. Miniño AM, Xu JQ, Kochanek KD. (2010) Deaths: Preliminary data for 2008. *National Vital Statistics Reports*; vol 59 no 2. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics.

95. Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME (2001) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21:7551-7560.
96. Mufson EJ, Conner JM, Varon S, Kordower JH (1994) Nerve growth factor-like immunoreactive profiles in the primate basal forebrain and hippocampal formation. *J Comp Neurol* 341:507-519.
97. Mufson EJ, Kordower JH (1992) Cortical neurons express nerve growth factor receptors in advanced age and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:569-573.
98. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347.
99. Nagerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* 44:759-767.
100. Naslund J, Haroutunian V, Mohs R, Davis KL, Davies P, Greengard P, Buxbaum JD (2000) Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283:1571-1577.
101. Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron* 46:609-622.
102. Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545-559.
103. Olman CA, Yacoub E (2011) High-field fMRI for human applications: an overview of spatial resolution and signal specificity. *Open Neuroimag J* 5:74-89.
104. Ondrejcek T, Wang Q, Kew JN, Virley DJ, Upton N, Anwyl R, Rowan MJ (2012) Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors persistently enhances hippocampal synaptic transmission and prevents Ass-mediated inhibition of LTP in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 677:63-70.
105. Ono K, Condrón MM, Teplow DB (2010) Effects of the English (H6R) and Tottori (D7N) familial Alzheimer disease mutations on amyloid beta-protein assembly and toxicity. *J Biol Chem* 285:23186-23197.
106. Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11:272-280.
107. Perini G, Della-Bianca V, Politi V, Della VG, Dal-Pra I, Rossi F, Armato U (2002) Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *J Exp Med* 195:907-918.

108. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E (1999) Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Arch Neurol* 56:303-308.
109. Poo MM (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.
110. Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R (2003) Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci* 23:7129-7142.
111. Rabizadeh S, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE (1994) Expression of the low-affinity nerve growth factor receptor enhances beta-amyloid peptide toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10703-10706.
112. Reed MN, Hofmeister JJ, Jungbauer L, Welzel AT, Yu C, Sherman MA, Lesne S, LaDu MJ, Walsh DM, Ashe KH, Cleary JP (2011) Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived A β oligomers. *Neurobiol Aging* 32:1784-1794.
113. Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T (1982) The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry* 139:1136-1139.
114. Reisberg B, Pritchep L, Mosconi L, John ER, Glodzik-Sobanska L, Boksay I, Monteiro I, Torossian C, Vedvyas A, Ashraf N, Jamil IA, de Leon MJ (2008) The pre-mild cognitive impairment, subjective cognitive impairment stage of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 4:S98-S108.
115. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5:605-607.
116. Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Barde YA (1991) Neurotrophins: structural relatedness and receptor interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 331:255-258.
117. Rosch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde YA, Korte M (2005) The neurotrophin receptor p75^{NTR} modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7362-7367.
118. Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M, Almeida OF (2005) Soluble beta-amyloid₁₋₄₀ induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 25:11061-11070.
119. Roux PP, Colicos MA, Barker PA, Kennedy TE (1999) p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J Neurosci* 19:6887-6896.
120. Sastre M, Steiner H, Fuchs K, Capell A, Multhaup G, Condrón MM, Teplow DB, Haass C (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2:835-841.
121. Schikorski T, Stevens CF (1997) Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 17:5858-5867.

122. Sclan SG, Reisberg B (1992) Functional assessment staging (FAST) in Alzheimer's disease: reliability, validity, and ordinality. *Int Psychogeriatr* 4 Suppl 1:55-69.
123. Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, . (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359:325-327.
124. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866-2875.
125. Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, . (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258:126-129.
126. Shrestha BR, Vitolo OV, Joshi P, Lordkipanidze T, Shelanski M, Dunaevsky A (2006) Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 33:274-282.
127. Sotelo C (1990) Cerebellar synaptogenesis: what we can learn from mutant mice. *J Exp Biol* 153:225-249.
128. Sotthibundhu A, Li QX, Thangnipon W, Coulson EJ (2009) Abeta(1-42) stimulates adult SVZ neurogenesis through the p75 neurotrophin receptor. *Neurobiol Aging* 30:1975-1985.
129. Sotthibundhu A, Sykes AM, Fox B, Underwood CK, Thangnipon W, Coulson EJ (2008) Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci* 28:3941-3946.
130. Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5:239-246.
131. Susen K, Blochl A (2005) Low concentrations of aggregated beta-amyloid induce neurite formation via the neurotrophin receptor p75. *J Mol Med (Berl)* 83:720-735.
132. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336-1340.
133. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235:880-884.
134. Tardito D, Gennarelli M, Musazzi L, Gesuete R, Chiarini S, Barbiero VS, Rydel RE, Racagni G, Popoli M (2007) Long-term soluble Abeta1-40 activates CaM kinase II in organotypic hippocampal cultures. *Neurobiol Aging* 28:1388-1395.
135. Thies W, Bleiler L (2011) 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 7:208-244.

136. Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ (2006) Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572:477-492.
137. Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, Feng G, Sanes JR, Welker E, Svoboda K (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420:788-794.
138. Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ (2002) Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J Biol Chem* 277:34295-34302.
139. Tsai J, Grutzendler J, Duff K, Gan WB (2004) Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches. *Nat Neurosci* 7:1181-1183.
140. Tsukamoto E, Hashimoto Y, Kanekura K, Niikura T, Aiso S, Nishimoto I (2003) Characterization of the toxic mechanism triggered by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75 neurotrophin receptor in neuronal hybrid cells. *J Neurosci Res* 73:627-636.
141. Van Nostrand WE, Melchor JP, Cho HS, Greenberg SM, Rebeck GW (2001) Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid beta -protein. *J Biol Chem* 276:32860-32866.
142. Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB (1999) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274:25945-25952.
143. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
144. Wang J, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp Neurol* 158:328-337.
145. Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, Segal R, He Z (2002) P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420:74-78.
146. Wang YJ, Wang X, Lu JJ, Li QX, Gao CY, Liu XH, Sun Y, Yang M, Lim Y, Evin G, Zhong JH, Masters C, Zhou XF (2011) p75NTR regulates A β deposition by increasing A β production but inhibiting A β aggregation with its extracellular domain. *J Neurosci* 31:2292-2304.
147. Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R (2010) Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* 13:190-196.
148. Weihofen A, Martoglio B (2003) Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol* 13:71-78.
149. Wolfe MS (2012) gamma-Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 120 Suppl 1:89-98.

150. Wong ST, Henley JR, Kanning KC, Huang KH, Bothwell M, Poo MM (2002) A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 5:1302-1308.
151. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 8:1069-1077.
152. World Health Organisation (1992) ICD-10 Classifications of Mental and Behavioural Disorder: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. Geneva.
153. Yaar M, Arble BL, Stewart KB, Qureshi NH, Kowall NW, Gilchrest BA (2008) p75NTR antagonistic cyclic peptide decreases the size of beta amyloid-induced brain inflammation. *Cell Mol Neurobiol* 28:1027-1031.
154. Yaar M, Zhai S, Fine RE, Eisenhauer PB, Arble BL, Stewart KB, Gilchrest BA (2002) Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J Biol Chem* 277:7720-7725.
155. Yaar M, Zhai S, Panova I, Fine RE, Eisenhauer PB, Blusztajn JK, Lopez-Coviella I, Gilchrest BA (2007) A cyclic peptide that binds p75(NTR) protects neurones from beta amyloid (1-40)-induced cell death. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:533-543.
156. Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SM, Eisenhauer PB, Fine RE, Gilchrest BA (1997) Binding of beta-amyloid to the p75 neurotrophin receptor induces apoptosis. A possible mechanism for Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 100:2333-2340.
157. Yang T, Knowles JK, Lu Q, Zhang H, Arancio O, Moore LA, Chang T, Wang Q, Andreasson K, Rajadas J, Fuller GG, Xie Y, Massa SM, Longo FM (2008a) Small molecule, non-peptide p75 ligands inhibit Abeta-induced neurodegeneration and synaptic impairment. *PLoS One* 3:e3604.
158. Yang Y, Wang XB, Frerking M, Zhou Q (2008b) Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *J Neurosci* 28:5740-5751.
159. Ye X, Mehlen P, Rabizadeh S, VanArsdale T, Zhang H, Shin H, Wang JJ, Leo E, Zapata J, Hauser CA, Reed JC, Bredesen DE (1999) TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* 274:30202-30208.
160. Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18:3273-3281.
161. Yuste R, Bonhoeffer T (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* 5:24-34.
162. Zagrebelsky M, Holz A, Dechant G, Barde YA, Bonhoeffer T, Korte M (2005) The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. *J Neurosci* 25:9989-9999.

163. Zhang Y, Hong Y, Bounhar Y, Blacker M, Roucou X, Tounekti O, Vereker E, Bowers WJ, Federoff HJ, Goodyer CG, LeBlanc A (2003) p75 neurotrophin receptor protects primary cultures of human neurons against extracellular amyloid beta peptide cytotoxicity. *J Neurosci* 23:7385-7394.
164. Zhou Q, Homma KJ, Poo MM (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44:749-757.
165. Ziv NE, Smith SJ (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.