

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Multifaktorielle Genese des Synapsenuntergangs beim
Morbus Alzheimer: Eine *in vivo* 2-Photonen Untersuchung
an APP-Knockout und transgenen Alzheimer-
Mausmodellen**

Tobias Bittner
aus
München

2009

Erklärung

Diese Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. J. Herms betreut und von Herrn Prof. Dr. R. Uhl vor der Fakultät für Biologie vertreten. Hiermit erkläre ich, dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 27.05.2009

.....
Tobias Bittner

Dissertation eingereicht:	27.05.2009
1. Gutachter	Prof. Dr. Rainer Uhl
2. Gutachter	Prof. Dr. Alexander Borst
Tag der mündlichen Prüfung:	30.11.2009

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	9
1.1	MORBUS ALZHEIMER	9
1.1.1	Krankheitsbild	10
1.1.2	Pathologie der Krankheit	11
1.1.2.1	Amyloid Plaques	11
1.1.2.2	Neurofibrilläre Bündel.....	12
1.1.2.3	Verlust von Nervenzellen und Synapsen.....	12
1.1.3	Genetisch bedingte Alzheimerfälle	13
1.2	AMYLOID PRECURSOR PROTEIN	14
1.2.1	Nicht-amyloidogene APP-Prozessierung	15
1.2.2	Amyloidogene APP-Prozessierung	15
1.2.3	APP homologe Proteine 1 und 2	16
1.2.4	Physiologische Funktion	17
1.2.5	Bekannte Mutationen.....	18
1.3	PRÄSENILINE.....	20
1.3.1	Lokalisation und Prozessierung.....	20
1.3.2	Funktion	20
1.4	AMYLOID-BILDUNG	22
1.4.1	Intrazelluläres Amyloid- β	22
1.4.2	A β -Oligomer-Hypothese	23
1.4.3	Amyloid-Kaskaden-Hypothese	23
1.5	DENDRITISCHE SPINES	25
1.5.1	Struktur und Funktion	25
1.5.2	Klassifizierung.....	26
1.5.3	Strukturelle Veränderungen.....	28
1.6	IN VIVO 2-PHOTONEN MIKROSKOPIE.....	29
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	31
2	MATERIAL UND METHODEN.....	32
2.1	INTRAVITALMIKROSKOPIE	32
2.1.1	Operation zur chronischen Intravitalmikroskopie.....	32
2.1.2	2-Photonen Intravitalmikroskopie	33
2.1.3	Bildbearbeitung und Datenauswertung	35
2.1.4	Statistische Auswertung	37
2.1.5	γ -Sekretase Inhibitor Applikation	38
2.1.6	Material und Lösungen	40
2.2	IMMUNOHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN VON MAUSHIRNSCHNITTEN	41
2.2.1	Transkardiale Perfusion von Maushirnen	42
2.2.2	Anfertigen und Färben von Maushirnschnitten.....	42
2.2.3	Konfokale Mikroskopie.....	43
2.2.4	Material und Lösungen	43
2.3	GENOTYPISIERUNG.....	44
2.3.1	DNS-Isolation aus Mausschwanz-Biopsien.....	44
2.3.2	PCR	45
2.3.3	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNS-Fragmenten	46
2.3.4	Quantitative PCR zur Feststellung der Homozygotie	47
2.3.5	Material und Lösungen	49
2.4	MAUSLINIEN	50
2.4.1	B6.Cf-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J.....	50
2.4.2	3xTg-AD.....	51
2.4.3	APPPS1	52
2.4.4	APP-Knockout.....	53
3	ERGEBNISSE.....	55
3.1	EFFEKTE DER A β -SENKUNG AUF DIE STRUKTURELLE SPINE-PLASTIZITÄT	55
3.2	EFFEKTE DER A β -AKKUMULATION AUF DIE STRUKTURELLE SPINE-PLASTIZITÄT.....	61

4	DISKUSSION	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	85
6	LITERATUR	86
7	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	107
8	ANHANG.....	108
8.1	DANKSAGUNG	108

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: VERSILBERUNG DES VON ALOIS ALZHEIMER 1907 BESCHRIEBENEN ALZHEIMER-FALLS	10
ABB. 2: STRUKTUR VON APP MIT SEKRETASE SCHNITTSTELLEN	14
ABB. 3: NICHT-AMYLOIDOGENE UND AMYLOIDOGENE APP-PROZESSIERUNG.....	15
ABB. 4: BEKANNTE MUTATIONEN DES AMYLOID PRECURSOR PROTEIN	19
ABB. 5: AUFBAU EINER NERVENZELLE UND EINER SYNAPSE	25
ABB. 6: VERÄNDERUNG DER STRUKTURELLEN PLASTIZITÄT BEI ERHÖHTER UND VERRINGERTER AKTIVITÄT ..	26
ABB. 7: KLASSIFIZIERUNG DENDRITISCHER SPINES	27
ABB. 8: VERGLEICH VON KONFOKALER UND 2-PHOTONEN MIKROSKOPIE	30
ABB. 9: IMPLANTIEREN EINES KRANIALEN FENSTERS UND VORBEREITUNG ZUR INTRAVITALMIKROSKOPIE	33
ABB. 10: 2-PHOTONEN INTRAVITALMIKROSKOPIE.....	35
ABB. 11: AUSWERTUNG DENDRITISCHER SPINES UND DENDRITEN.....	37
ABB. 12: γ -SEKRETASE INHIBITOR APPLIKATION	39
ABB. 13: BEISPIELHAFTES ERGEBNIS EINER QUANTITATIVEN PCR FÜR 3xTG-AD MÄUSE.....	47
ABB. 14: AGAROSEGEL ZUR GENOTYPISIERUNG VON MÄUSEN DER LINIE YFP-H.	51
ABB. 15: AGAROSEGEL ZUR GENOTYPISIERUNG VON MÄUSEN DER LINIE 3xTG-AD.	52
ABB. 16: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES THY-1 GENPROMOTORKONSTRUKTS BEI APPPS1 MÄUSEN ...	53
ABB. 17: AGAROSEGEL ZUR GENOTYPISIERUNG VON MÄUSEN DER LINIE APPPS1.....	53
ABB. 18: WILD-TYP APP UND DAS APP-KONSTRUKT BEI APP KO MÄUSE.....	54
ABB. 19: GENOTYPISIERUNG VON MÄUSEN DER LINIE APP KO.....	54
ABB. 20: SPINEDICHTE UND SPINEFORM IN RELATION ZUR APP-EXPRESSION	56
ABB. 21: QUANTIFIZIERTE VERÄNDERUNG DENDRITISCHER SPINES NACH γ -SEKRETASE INHIBITION	57
ABB. 22: VERÄNDERUNG DENDRITISCHER SPINES NACH γ -SEKRETASE INHIBITOR APPLIKATION	59
ABB. 23: VERÄNDERUNGEN DENDRITISCHER SPINES BEI 3xTG-AD MÄUSEN.....	64
ABB. 24: DENDRITISCHE DYSTROPHIE BEI 3xTG-AD MÄUSEN.....	67
ABB. 25: IMMUNOHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN DYSTROPHER DENDRITEN VON 3xTG-AD MÄUSEN	67
ABB. 26: VERLUST VON NERVENZELLEN BEI 3xTG-AD MÄUSEN	69
ABB. 27: IMMUNOHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN VON NERVENZELLEN VON 3xTG-AD MÄUSEN	70
ABB. 28: VERÄNDERUNGEN DENDRITISCHER SPINES, DENDRITEN UND NEURONE BEI APPPS1 MÄUSEN	74
ABB. 29: EFFEKTE DER SENKUNG DES A β -SPIEGELS AUF DIE ANZAHL DENDRITISCHER SPINES	79

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1: OLIGONUKLEOTIDE UND SEQUENZEN	45
TAB. 2: PCR-ANSÄTZE UND PROGRAMME.....	46
TAB. 3: OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE QUANTITATIVE PCR	48
TAB. 4: SEQUENZEN UND FLUORESCENZMARKIERUNGEN DER SONDEN FÜR DIE QUANTITATIVE PCR	48
TAB. 5: PCR-ANSATZ FÜR QUANTITATIVE PCR	48
TAB. 6: PCR-PROGRAMM FÜR QUANTITATIVE PCR	48

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
A β	Engl. amyloid-beta peptide
A β 40	Engl. amyloid-beta peptide mit 40 Aminosäuren Länge
A β 42	Engl. amyloid-beta peptide mit 42 Aminosäuren Länge
α CTF	Engl. alpha C-terminal fragment
AD	Alzheimer-Demenz
ADAM	Engl. A disintegrin and metalloprotease
ADDLs	Engl. A β -derived diffusible ligands
AICD	Engl. amyloid precursor protein intracellular domain
ANOVA	Engl. analysis of variance
Aph-1	Engl. anterior pharynx defective protein-1
APLP1	Engl. amyloid precursor like protein 1
APLP2	Engl. amyloid precursor like protein 2
ApoE4	Apolipoprotein E ϵ 4-Allel
APP	Engl. amyloid precursor protein
APP-/-	Engl. amyloid precursor protein knockout
APP +/-	Engl. amyloid precursor protein heterozygous knockout
APP KO	Engl. amyloid precursor protein knockout
Ar	Argon
BACE1	Engl. beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1
blr-1	Engl. blue light regulator 1
β CTF	Engl. beta C-terminal fragment
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
DAPT	Engl. N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FAD	Familiäre Alzheimer-Demenz
FTDP-17	Frontotemporaler Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt mit Chromosom 17
franz.	Französisch
g	Gramm
GSI	Gamma-Sekretase Inhibitor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.p.	intraperitoneal
IL-2	Interleukin 2
IR	Infrarot
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KO	knockout
Konz.	Konzentration
l	Liter
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LSM	Engl. Laser Scan Mikroskopie

LTP	Engl. long-term potentiation
M	Molar
mAb	Engl. monoclonal antibody
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
µM	mikromolar
mM	millimolar
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
NA	Numerische Apertur
NDD	Engl. non-descanned detector
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMDA	N-methyl-D-aspartat
ORF	Engl. open reading frame
PBS	Engl. phosphate buffered saline
PCR	Engl. polymerase chain reaction
Pen-2	Engl. presenilin enhancer protein
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
PMT	Engl. Photomultiplier
PS1	Präsenilin 1
PS2	Präsenilin 2
PSD	Postsynaptische Dichte
qPCR	quantitative PCR
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sAPPα	Engl. secreted amyloid precursor protein alpha
sAPPβ	Engl. secreted amyloid precursor protein beta
sek	Sekunde
s.c.	Subkutan
SEM	Engl.: standard error of the mean
Temp.	Temperatur
T_m	Schmelztemperatur
TOR	Engl. turnover rate
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
USA	Engl. United States of America
V	Volt
Vol.	Volumen
vs.	versus
w/v	Engl. weight per volume
WT	Wildtyp
YFP	Engl. yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 *Morbus Alzheimer*

Im Jahr 1907 beschrieb der Münchner Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) eine Erkrankung des Gehirns, die hauptsächlich Menschen fortgeschrittenen Alters betrifft und mit einem zunehmenden Verlust der geistigen Fähigkeiten einhergeht (Alzheimer 1907). Im Gehirn dieser Patienten kommt es neben einem Nervenzellverlust zur Bildung von Amyloid- β -Plaques (A β -Plaques) und neurofibrillären Bündeln (Abb. 1). Dieses charakteristische Krankheitsbild wird seit 1910 als Morbus Alzheimer bezeichnet.

Beim Morbus Alzheimer werden präsenile, familiäre Formen von senilen, sporadischen Erkrankungen unterschieden. Bei der sporadischen Form manifestieren sich die ersten klinischen Symptome meist erst nach Erreichen des 65. Lebensjahres, wobei sich das Risiko an der Alzheimer-Demenz (AD) zu erkranken ab einem Alter von 65 Jahren alle 5 Jahre verdoppelt. Im Gegensatz dazu treten die Anzeichen der familiären Form, die für etwa 1 % aller Alzheimer Fälle verantwortlich ist, häufig vor dem 50., in Einzelfällen sogar schon vor dem 30. Lebensjahr auf (Haass und Selkoe 1993; Selkoe 1993).

Die Alzheimer-Demenz stellt mit einem Auftreten von 50-70 % die häufigste Ursache aller Demenzerkrankungen dar (Plassman et al. 2007) und ist in Industrieländern zur vierthäufigsten Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen, Krebs und Schlaganfällen, avanciert. Weder für die sporadische, noch für die familiäre Form der Alzheimer-Erkrankung gibt es heute wirkungsvolle Therapien, die den Ablauf der Krankheit und deren Ausgang aufhalten können (Burns 2009). Neuesten Schätzungen zufolge leiden derzeit weltweit etwa 30 Millionen Patienten an Morbus Alzheimer, davon etwa 800.000 in Deutschland. Sollte die baldige Entwicklung einer wirkungsvollen Therapie ausbleiben, so könnte durch die demographische Entwicklung diese Zahl bis 2040 weltweit auf etwa 80 Millionen ansteigen (Ferri et al. 2005).

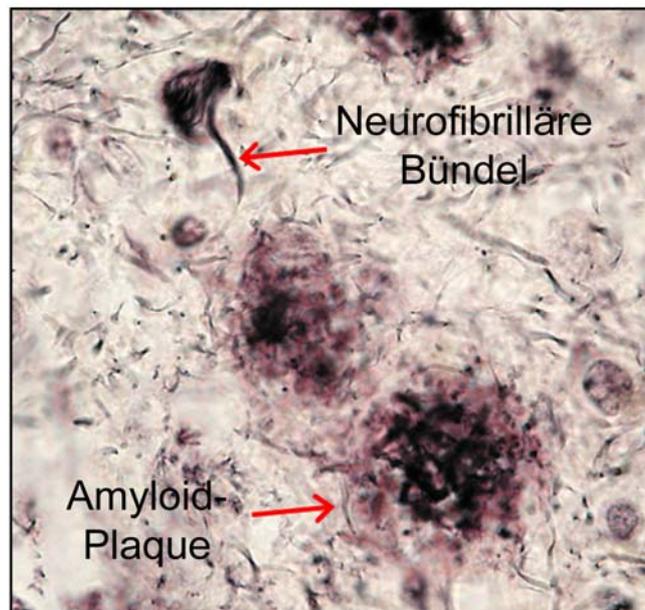


Abb. 1: Versilberung des von Alois Alzheimer 1907 beschriebenen Alzheimer-Falls

Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Bündel sind erkennbar (Archiv des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, München).

1.1.1 Krankheitsbild

Der Verlauf der Alzheimer-Demenz (AD) ist gekennzeichnet durch einen langsamen, unaufhaltsam fortschreitenden Verlust kognitiver Leistung. Die Krankheit beginnt mit uncharakteristischen Symptomen wie Lernschwäche und Kopfschmerzen, sowie besonders im Anfangsstadium mit einer gestörten Merkfähigkeit. Die Patienten vergessen zunächst jüngere Ereignisse, einschließlich der zeitlichen und örtlichen Orientierung. Mit Fortschreiten der Erkrankung wird auch das Langzeitgedächtnis vermehrt beeinträchtigt (Galton und Hodges 1999). Im Zuge der sich langsam entwickelnden Demenz entstehen des Weiteren Störungen der Sprache (zunächst Wortfindungsstörungen), der Kognition (Problemlösungs-, Rechen- und Abstraktionsvermögen), sowie der räumlichen Orientierung. Die Gedächtnisstörungen weiten sich mit der Zeit aus, wobei die Sprache zunehmend verarmt. Hinzu kommen Verhaltens- und Stimmungsveränderungen, die oft mit Depressionen und Angstzuständen einhergehen. Motorisch manifestiert sich die Krankheit in stereotypen Bewegungen. Ab dem Zeitpunkt der Diagnose führt die Krankheit in der Regel nach 5-8 Jahren zum Tod des Patienten (Bracco et al. 1994). Bis heute gibt es keine wirksame Therapie, die in der Lage ist, das Fortschreiten, sowie den tödlichen Ausgang der Krankheit zu verhindern.

1.1.2 Pathologie der Krankheit

Die Neuropathologie der Alzheimer-Demenz manifestiert sich in der extrazellulären Ablagerung von A β -Plaques sowie in der intrazellulären Akkumulation abnormer fibrillärer Strukturen, sogenannter neurofibrillärer Bündel. Das Auftreten beider Phänomene ist charakteristisch für den Morbus Alzheimer, worauf sich auch die neuropathologische Diagnose begründet. Das klinische Erscheinungsbild zeichnet sich durch einen Verlust von Synapsen und Nervenzellen aus, wobei vor allem cholinerge Neurone in Kortex und Hippocampus betroffen sind. Besonders diese cholinergen Nervenbahnen spielen eine zentrale Rolle bei Lern- und Gedächtnisfunktionen sowie bei anderen kognitiven Prozessen (Price et al. 1998).

1.1.2.1 Amyloid Plaques

A β -Plaques, als eines der pathologischen Hauptmerkmale der Alzheimer-Demenz, entstehen im Zwischenzellarraum des Gehirns und bestehen zu 90% aus einem 4 kDa großen Peptid, dem Amyloid- β -Peptid (A β) (Glennner und Wong 1984). A β ist ein proteolytisches Spaltprodukt des 110 bis 130 kDa großen Vorläuferproteins APP (engl. *Amyloid Precursor Protein*) (Kang et al. 1987). A β kann als lösliche Monomere und Oligomere vorliegen, welche zu unlöslichen größeren Amyloidfibrillen, den sogenannten A β -Plaques, aggregieren können. Experimentellen Untersuchungen zufolge können Amyloidfibrillen unter bestimmten Umständen toxisch auf Nervenzellen wirken und somit zum Untergang von Nervenzellen führen (Yankner et al. 1990). Aber auch lösliche A β -Oligomere, als Vorläuferformen der Amyloidfibrillen, können ebenfalls neurotoxisch auf Synapsen wirken (Haass und Selkoe 2007; Shankar et al. 2007; Shankar et al. 2008; Walsh und Selkoe 2007).

Bei der Klassifizierung von A β -Plaques im menschlichen Gehirn unterscheidet man neuritische (senile) von nicht-neuritischen (diffuse) Plaques. Neuritische Plaques kommen im Wesentlichen in der grauen Hirnsubstanz vor (Katzman 1986) und bestehen im Zentrum aus einem Kern aus Amyloidfibrillen. Im Gegensatz dazu enthalten diffuse Plaques keinen Amyloid-Kern (Selkoe 2001). Ferner sind neuritische Plaques von dystroph veränderten Nervenzellfortsätzen (Neuriten) umgeben, während es in der Umgebung von diffusen Plaques zu keinen oder nur wenigen neuritischen Veränderungen kommt (Selkoe 2001). Zudem findet man in der näheren Umgebung neuritischer Plaques reaktive Astrozyten und Mikroglia (Selkoe 1996).

1.1.2.2 Neurofibrilläre Bündel

Neben A β -Plaques kommt es im Gehirn von Alzheimer-Patienten zu intrazellulären Einschlüssen, die aus dem mikrotubuli-assoziierten Protein Tau bestehen. Physiologisch agiert das Tau-Protein als Stabilisator der Mikrotubulstruktur, welche beim axonalen Transport eine entscheidende Rolle spielt. Hierbei kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Tau und Mikrotubuli, welche durch den Phosphorylierungsgrad des Tau-Proteins reguliert werden. Bei der Alzheimer-Erkrankung ist das Tau-Protein stärker phosphoryliert (hyperphosphoryliert), wodurch die Wechselwirkung zwischen Mikrotubuli und Tau-Protein beeinträchtigt wird. Das wiederum führt zur Destabilisierung der axonalen Zytoskelettstruktur und somit zur Behinderung des axonalen Transports. Ungebundenes hyperphosphoryliertes Tau-Protein, das nicht mehr mit Mikrotubuli wechselwirken kann, wird aus dem axonalen in das somatodendritische Kompartiment der Nervenzelle transportiert und aggregiert dort zu neurofibrillären Bündeln (engl. *neurofibrillary tangles*). Diese neurofibrillären Bündel bestehen überwiegend aus paarigen, doppelhelikal gewundenen Filamenten (engl. *paired helical filaments*) und zu einem geringeren Anteil aus geraden Filamenten (engl. *straight filaments*) (Goedert 1993). Das Vorhandensein von hyperphosphoryliertem Tau-Protein und der damit verbundenen Störung des axonalen Transportmechanismus, sowie die Beeinträchtigung des Metabolismus der Nervenzelle durch die Ablagerung von neurofibrillären Bündeln, führen der aktuellen Lehrmeinung zufolge zum Untergang von Nervenzellen (Goedert und Jakes 2005).

Abnormale Aggregate von Tau-Protein sind auch von anderen Krankheiten (sogenannten Tauopathien) bekannt. Bei diesen Tauopathien kommt es jedoch nicht, wie bei der Alzheimer-Demenz, zur Bildung von A β -Plaques. Mutationen des *Tau*-Gens alleine verursachen keine Demenz des Alzheimer-Typs, sondern führen zu Frontotemporaler Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt mit Chromosom 17 (FTDP-17) (Goedert et al. 1998).

1.1.2.3 Verlust von Nervenzellen und Synapsen

Nervenzellen und deren Synapsen bilden die strukturelle und funktionelle Basis der Gehirnaktivität und der Gedächtnisleistung. Bei Patienten mit einer Demenz vom Alzheimer Typ ist die Anzahl an Nervenzellen im *Locus coeruleus* (Hoogendijk et al. 1995), sowie im Kortex und Hippocampus (Coyle et al. 1983; Davies et al. 1987; Gomez-Isla et al. 1996; Hof und Morrison 1990; Terry et al. 1981; Whitehouse et al. 1982) im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Menschen verringert. Insbesondere der kortikale Nervenzellverlust konnte auch in einigen transgenen Alzheimer-Mausmodellen (Capetillo-Zarate et al. 2006; Casas et al. 2004; Oakley et al. 2006; Schmitz et al. 2004), aber auch in Mausmodellen für Tauopathie nachgewiesen werden (SantaCruz et al. 2005; Spires et al. 2006; Yoshiyama et al. 2007).

Der Verlust an Synapsen ließ sich experimentell durch eine Abnahme des präsynaptischen Markers Synaptophysin nachweisen (Blennow et al. 1996; Masliah et al. 1991; Terry et al. 1991). Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Synapsenverlust dem Nervenzellverlust zeitlich weit voraus geht und mit den ersten Anzeichen von Gedächtnisverlust bei Alzheimer-Patienten korreliert (Ball 1977; Hyman et al. 1984). Dies geschieht lange bevor die ersten A β -Plaques und neurofibrillären Bündel entstehen (Blennow et al. 1996; Davies et al. 1987; Dickson et al. 1995; Hsia et al. 1999; Sze et al. 1997; Terry et al. 1991). Der Ablauf der Vorgänge im Gehirn von Alzheimer-Patienten äußert sich somit durch einen frühen Verlust von Synapsen, wobei vorrangig Kortex und Hippocampus betroffen sind (Akram et al. 2008; Davies et al. 1987; DeKosky und Scheff 1990; Lassmann 1996; Small et al. 2001). Daher erscheint es sinnvoll, die Ursachen und Genese des Synapsenverlusts eingehend zu untersuchen.

1.1.3 Genetisch bedingte Alzheimerfälle

Neben den sporadischen Fällen der Alzheimer-Erkrankung (engl. *late onset Alzheimer's Disease*) gibt es auch eine autosomal-dominant vererbte Variante dieser Erkrankung (engl. *familial Alzheimer's Disease*). Wie schon in Kapitel 1.1 erwähnt sind Familiäre Alzheimer-Fälle durch einen frühen Beginn (mit 40-60 Jahren) der Erkrankung charakterisiert. Obwohl die familiäre Alzheimer-Demenz (FAD) nur für etwa 1 % der Alzheimer-Fälle verantwortlich ist (Hardy 1997), sind die Erkenntnisse, die durch diese vererbten Fälle gewonnen wurden, von großer wissenschaftlicher Bedeutung für die Erforschung der sporadischen Alzheimer-Erkrankung. Beispielsweise konnten für einen großen Teil der FAD Fälle die dafür ursächlichen Gene identifiziert werden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um *APP* und die *Präseniline* (*PS1* und *PS2*) (Hardy 1997). Ferner gibt es weitere genetische Risikofaktoren, die das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken erhöhen. Einer dieser Risikofaktoren ist das ϵ 4-Allel des Apolipoproteins E (ApoE4), einem Lipoprotein des Cholesterolfstoffwechsels (Corder et al. 1993; Saunders 2001). ApoE4 bindet an A β und kann in A β -Plaques nachgewiesen werden (Wisniewski und Frangione 1992). Erstaunlicherweise fällt bei der Familienanamnese von Patienten der sporadischen Form der Alzheimer-Erkrankung auf, dass viele Verwandte ersten Grades an Alzheimer-ähnlichen Demenzformen leiden. Daher wird angenommen, dass weitaus mehr sporadische Alzheimerfälle genetisch bedingt sind als bisher angenommen. Viele dieser dafür in Frage kommenden Gene müssen jedoch erst noch lokalisiert werden (Selkoe 2001). Nichtsdestotrotz ist die Identifikation der bisher bekannten Gene *ApoE4*, *APP*, *PS1* und *PS2* von zentraler Bedeutung für die Herstellung von transgenen Alzheimer-Tiermodellen, die ein grundlegendes Werkzeug für die Erforschung der sporadischen Alzheimer-Demenz darstellen. Aus diesem Grund werden im Folgenden die wichtigsten Gene kurz beschrieben.

1.2 Amyloid Precursor Protein

Das *APP*-Gen gehört zur *APP*-Genfamilie, die neben *APP* auch noch die *APP*-homologen Proteine (engl. *amyloid precursor-like proteins*) *APLP1* und *2* einschließt. Die Gene dieser Familie sind hochkonserviert und auch in weiteren Organismen wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* zu finden (Reinhard et al. 2005). *APP* wird durch ein aus 19 Exons bestehendes Gen kodiert, welches beim Menschen eine Länge von 400 kb aufweist und auf Chromosom 21 lokalisiert ist (Goldgaber et al. 1987; Lamb et al. 1993). Hieraus lässt sich das Auftreten von Alzheimer-ähnlicher Pathologie bei Patienten mit Down-Syndrom (Trisomie 21) erklären, bei denen Chromosom 21 in dreifacher Kopie vorliegt (Olson und Shaw 1969).

APP ist ein Typ 1 integrales Membranprotein, das aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne (Ektodomäne), einer singulären Transmembranregion und einem kurzen intrazellulären Bereich besteht (Abb. 2). Die $A\beta$ -Domäne liegt sowohl in der Transmembrandomäne als auch in der Ektodomäne. Während der Translation wird *APP* über das endoplasmatische Retikulum (ER) und die Golgi-Vesikel zur Membran transportiert (Haass und Selkoe 1993). Das membranständige *APP* kann dort auf zwei unterschiedliche Arten proteolytisch prozessiert werden, dem nicht-amyloidogenen (sekretorischen) und dem amyloidogenen Weg.

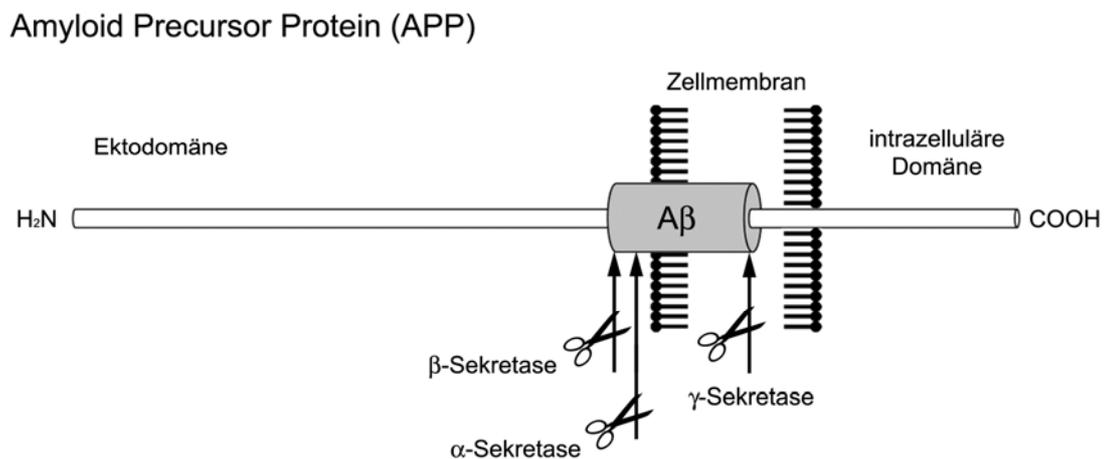


Abb. 2: Struktur von APP mit Sekretase Schnittstellen

APP besteht aus einer großen extrazellulären Ektodomäne, einer Transmembrandomäne, die auch die $A\beta$ -Domäne einschließt und aus einer kleineren intrazellulären Domäne. *APP* wird je nach Prozessierungsweg von α -, β - und γ -Sekretase proteolytisch geschnitten.

1.2.1 Nicht-amyloidogene APP-Prozessierung

Bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung (Abb. 3) wird APP innerhalb der A β -Domäne zwischen Aminosäure 16 und 17 (Anderson et al. 1991) von α -Sekretasen (ADAM 9, 10 und 12) gespalten. Diese Enzyme entstammen der ADAM-Familie (engl. *A disintegrin and metalloprotease*). Als Folge entsteht ein lösliches N-terminales APP-Fragment (sAPP α , 100-120 kDa) und ein weiterhin in der Membran verankertes C-terminales Fragment (α CTF oder C83, 10 kDa) (Weidemann et al. 1989). Nach der intrazellulären α -Sekretase-Spaltung kommt es zur Spaltung des α CTF durch die γ -Sekretase, die in der Transmembranregion schneidet. Hierbei wird das Peptid P3 sezerniert während eine APP-intrazelluläre Domäne (AICD, 6 kDa) intrazellulär zurück bleibt (Haass und Selkoe 1993).

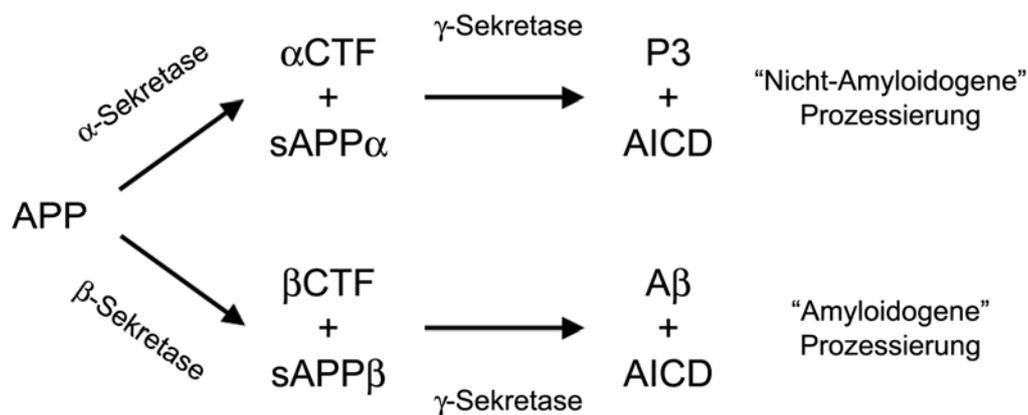


Abb. 3: Nicht-Amyloidogene und Amyloidogene APP-Prozessierung

Bei der nicht-amyloidogenen Spaltung wird APP durch die α -Sekretase zu sAPP α und α CTF gespalten. α CTF wird durch γ -Sekretase zu P3 und AICD prozessiert. Beim amyloidogenen Weg, spaltet die β -Sekretase APP zu sAPP β und β CTF, wobei wiederum β CTF durch γ -Sekretase zu A β und AICD prozessiert wird.

1.2.2 Amyloidogene APP-Prozessierung

Bei der amyloidogenen APP-Spaltung (Abb. 3) kommt es im ersten Schritt zu einer Spaltung des APP durch die β -Sekretase, die auch als BACE1 (engl. *beta-site APP-cleaving enzyme 1*) bezeichnet wird (Vassar et al. 1999). Die β -Sekretase schneidet APP innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus der A β -Domäne. Hierdurch entsteht ein lösliches N-terminales APP-Fragment (sAPP β), sowie ein amyloidogenes C-terminales Fragment (β CTF oder C99, 12 kDa). Durch die folgende γ -Sekretase Spaltung von β CTF in der Transmembranregion entstehen A β -Peptide unterschiedlicher Länge (39-43 Aminosäuren) sowie die APP-intrazelluläre Domäne (AICD, 6 kDa) (LaFerla 2002). Die durch die

Prozessierung von APP gebildeten APP-Spaltprodukte haben verschiedene, teilweise noch ungeklärte, physiologische und pathophysiologische Eigenschaften.

Die generelle Bildung von A β , als Spaltprodukt von APP, stellt keineswegs, wie früher angenommen, ein „abnormales“, krankheitsbedingtes Ereignis dar, das nur im Gehirn von Alzheimer-Patienten abläuft. Auch bei kognitiv unauffälligen Personen ist A β in der Zerebrospinalflüssigkeit (Seubert et al. 1992; Shull et al. 1991) oder im Medium kultivierter Zellen (Haass et al. 1992; Seubert et al. 1992) nachweisbar. Zur Alzheimer-Erkrankung kommt es nach gängiger Lehrmeinung erst, wenn sich aus den A β -Monomeren Oligomere und fibrilläre Aggregate bilden, wobei letztere den Hauptbestandteil der A β -Plaques darstellen (siehe Kapitel 1.1.2.1). Die Aggregation zu Oligomeren und Fibrillen wird hierbei höchstwahrscheinlich durch eine fehlerhafte amyloidogene Prozessierung und die damit verbundene Entstehung von A β mit einer Länge von 42 Aminosäuren, begünstigt. Aus diesem Grund erforschen Pharmaunternehmen zur Zeit, inwiefern eine pharmakologische Manipulation des amyloidogenen Wegs der APP-Prozessierung zur Verminderung der pathologisch relevanten A β -Aggregate führt (Dovey et al. 2001; Gitter et al. 2004; Haass 2004; Ness et al. 2004).

1.2.3 APP homologe Proteine 1 und 2

Neben APP zählen auch die zwei für die APP-homologen Proteine *APLP1* (Wasco et al. 1992) und *APLP2* (Wasco et al. 1993) (engl. *amyloid precursor like protein 1 and 2*) kodierenden Gene zur APP-Genfamilie. Wie der Name schon sagt, ähneln APLP1 und 2 dem APP, besitzen jedoch im Gegensatz dazu keine A β -Domäne. APLP1 und APLP2 werden ebenso wie APP durch die α -, β - und γ -Sekretasen gespalten, jedoch kommt es hierbei durch das Fehlen der A β -Domäne zu keiner Sekretion von A β (Eggert et al. 2004; Scheinfeld et al. 2002). Dessen ungeachtet entsteht durch β -Sekretase Spaltung von APLP2 eine sekretierte Form, analog zum sekretierten sAPP nach β -Sekretase Spaltung von APP (Scheinfeld et al. 2002).

1.2.4 Physiologische Funktion

Im Gegensatz zur pathophysiologischen Rolle von APP in der Alzheimer-Demenz, ist die physiologische Funktion von APP weitestgehend unklar. Bisherige Erkenntnisse basieren hauptsächlich auf Experimenten mit *APP*, *APLP1* und *2* Knockout-Mäusen. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die Gene der *APP*-Familie eine Redundanz in ihrer Funktion aufweisen. Einzel-Knockout Tiere für *APP* (Zheng et al. 1995), *APLP1* (Heber et al. 2000) und *APLP2* (von Koch et al. 1997) zeigen keinen schwerwiegenden Phänotyp. Auch *APP* und *APLP1* Doppel-Knockout Mäuse sind lebensfähig (Heber et al. 2000). Im Gegensatz dazu sind jedoch Doppel-Knockouts von *APLP1* und *APLP2*, sowie *APP* und *APLP2* (von Koch et al. 1997) letal, was darauf schließen lässt, dass *APLP2* eine zentrale Rolle in der Embryonalentwicklung spielt. In weiteren Experimenten konnte APP eine Funktion bei der Entwicklung neuromuskulärer Synapsen nachgewiesen werden (Wang et al. 2005). Durch die Lage von APP als Rezeptor an der Zellmembran (Kang et al. 1987), wird APP sowohl eine Funktion bei der Zell-Zell-Interaktion (Breen et al. 1991) als auch bei der Zell-Motilität zugeschrieben (Leissring et al. 2002; Sabo et al. 2001).

Neben APP wurde auch die physiologische Rolle der APP-Spaltprodukte in einigen Studien bereits eingehend untersucht: So gibt es Arbeiten die zeigen, dass AICD die Transkription im Zellkern moduliert und somit als Regulator der Genexpression fungiert (Cao und Sudhof 2001). Auch für A β wird eine physiologische Funktion bei der Regulation der Cholesterolsynthese (Grimm et al. 2005) sowie eine Rolle als Regulator der Erregungsweiterleitung an der Synapse postuliert (Kamenetz et al. 2003). Gerade die *in vitro* Ergebnisse von KAMENETZ zeigen, dass die Überexpression von A β einen negativen Einfluss auf die Erregungsweiterleitung der Synapsen hat. Dieser negative Effekt konnte in der gleichen Studie durch die pharmakologische Reduktion von A β durch Einsatz des γ -Sekretase Inhibitors DAPT revidiert werden. Weitere *in vitro* Experimente, wie die von HSIEH zeigen einen Verlust von dendritischen Spines bei ansteigendem A β -Level (Hsieh et al. 2006). Aufgrund der Ergebnisse von KAMENETZ und HSIEH wurde postuliert, dass die Bildung von A β Teil eines negativen Rückkopplungs-Mechanismus ist und dadurch die Erregungsweiterleitung an der Synapse reguliert wird. Um diese Hypothese zu verifizieren untersuchte PRILLER die Synapsen kultivierter Neurone von APP-Knockout-Mäusen (APP KO Mäuse), die also kein A β exprimieren, und fand heraus, dass die Erregungsweiterleitung, wie auch die Anzahl der Synapsen in APP KO Mäusen im Vergleich zu wildtyp (WT) Mäusen erhöht sind (Priller et al. 2006). Nicht nur ein vollständiges Fehlen der A β -Expression wie bei APP KO Mäusen, sondern auch die kurzzeitige pharmakologische Blockierung der A β -Produktion durch den Einsatz des γ -Sekretase Inhibitors DAPT in WT Mäusen, führte zu einer erhöhten Erregungsweiterleitung. Eine vermehrte Anzahl an Synapsen wurde bei

diesem Experiment jedoch nicht untersucht. Diese vorangegangenen Arbeiten haben dazu beigetragen, die physiologische Funktion von APP in Ansätzen zu verstehen.

In Anbetracht der aktuell unternommenen Anstrengungen, die pharmakologische Reduktion von A β (siehe Kapitel 1.2.2) zur Therapie von Alzheimer-Patienten einzusetzen, ist es unerlässlich, die physiologische Funktion von APP im lebenden Organismus genau zu kennen. Nachdem sich ein pharmakologischer Eingriff in die APP-Prozessierung immer auch auf die physiologisch notwendige Menge an A β auswirkt, könnte es hierbei zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen.

1.2.5 Bekannte Mutationen

Mutationen des *APP*-Gens, wie sie bei familiären Formen des Morbus Alzheimer auftreten sind selten und wurden bisher nur bei etwa 20 Familien gefunden. Dabei handelt es sich bei allen bisher identifizierten Mutationen um Punktmutationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere ausgetauscht wurde (Abb. 4). Alle bekannten Mutationen liegen entweder innerhalb der A β -Domäne oder in den angrenzenden Schnittstellen der Sekretasen und beeinflussen somit die Prozessierung von APP (Irie et al. 2005). Dies kann sich auf unterschiedliche Art und Weise äußern: Während beispielsweise Doppelmutationen nahe des N-Terminus (z.B. die schwedische *APP*-Doppelmutation, KM670/671NL) zur Erhöhung der Gesamtmenge an sekretiertem A β führen, beeinflussen Mutationen am C-Terminus die Spaltung durch die γ -Sekretase, wodurch es zu einer relativen Erhöhung des A β 42-Levels im Vergleich zum A β 40-Level kommt (Selkoe 1996). Alle aktuell bekannten transgenen Tiermodelle, die eine Alzheimer-assoziierte Pathologie ausbilden, tragen mindestens ein mutiertes *APP*-Transgen, wobei viele dieser Modelle zusätzlich eine mutierte Variante des humanen *PS1*-Gens tragen.

1.3 Präseniline

Neben APP spielen auch Veränderungen der Präseniline (PS) eine wichtige Rolle bei der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung, die sich durch auftretende Punktmutationen innerhalb der *PS*-Gene äußern (Hardy 1997).

1.3.1 Lokalisation und Prozessierung

Die Präseniline sind hochkonservierte integrale Membranproteine, deren Gene aus 10 Exons bestehen und gewebespezifisch gespleißt werden. Während *PS1* auf Chromosom 14 lokalisiert ist und ubiquitär exprimiert wird, befindet sich *PS2* auf Chromosom 1 und wird hauptsächlich im peripheren Gewebe, jedoch nur in geringen Mengen im Gehirn exprimiert (Fraser et al. 2000). *PS*-Proteine sind vor allem im ER lokalisiert (Kim et al. 2000) aber auch an der Plasmamembran zu finden (Ray et al. 1999a). *PS1*-konditionelle-Knockout-Mäuse zeigen eine verringerte Bildung von A β bei gleichzeitiger Akkumulation der nach β -Sekretase-Spaltung von APP entstandener amyloidogener β CTFs (De Strooper et al. 1998). Dieser Befund spricht für eine direkte Verbindung zwischen *PS1* und der proteolytischen Aktivität der γ -Sekretase (Haass und Selkoe 1998). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Substanzen, die die γ -Sekretase Aktivität inhibieren, spezifisch an *PS1* binden (Seiffert et al. 2000). Weiteren Untersuchungen zufolge, besteht die γ -Sekretase aus einem Membranproteinkomplex, der aus den Transmembranproteinen *PS1*, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 gebildet wird. Nur wenn alle vier Proteine in stöchiometrischen Mengen vorhanden sind, ist die γ -Sekretase funktionsfähig (Kimberly et al. 2003b).

1.3.2 Funktion

Der Präsenilinen werden mehrere Funktionen zugeschrieben, unter anderem bei der Regulation der Stabilität von β -Catenin (Zhang et al. 1998), sowie bei der Prozessierung von Membranproteinen (Naruse et al. 1998), insbesondere der γ -Sekretase-Spaltung von Typ I Membranproteinen wie z.B. APP und Notch (Geling et al. 2002; Kopan und Ilagan 2004). Präseniline beeinflussen somit direkt die Bildung des mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierten A β -Peptids (De Strooper et al. 1998). Aus diesem Grund erforschen Pharmakonzerne seit einigen Jahren die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention der A β -Bildung durch Blockierung der γ -Sekretase (Dovey et al. 2001). Hierbei treten jedoch neben der A β -Reduktion häufig auch Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt auf. Es wird vermutet, dass diese Nebenwirkungen eine Folge der Inhibition der γ -Sekretase-Spaltung von Notch sind (Barten et al. 2006; Milano et al. 2004). Für Notch, als eines der über 50 aktuell bekannten Membranproteine vom Typ I, die von der γ -Sekretase gespalten werden

(Kimberly et al. 2003a; Ray et al. 1999b), wird eine essentielle Funktion bei der Zelldifferenzierung sowie bei der Kommunikation zwischen benachbarten Zellen beschrieben (Artavanistsakonas et al. 1995). Somit ist PS1, als Teil des γ -Sekretase Komplexes, ein für die Entwicklung essentielles Protein und es verwundert somit nicht, dass *PS1*-Knockout-Mäuse aufgrund von Defekten im Zentralnervensystem (ZNS) nicht lebensfähig sind (Shen et al. 1997). Durch die große Anzahl der γ -Sekretase Substrate und deren Bedeutung für diverse lebenswichtige Prozesse, kommt es bei dem Versuch der Therapie der Alzheimer-Erkrankung durch substratunspezifische γ -Sekretase Inhibitoren immer wieder zu den bereits beschriebenen Nebenwirkungen. Aus diesem Grund forschen Pharmakonzerne aktuell an der Entwicklung APP-spezifischer γ -Sekretase Inhibitoren, in der Hoffnung Nebenwirkungen durch die Inhibition der Notch-Spaltung auszuschließen (Imbimbo et al. 2007; Mayer et al. 2008).

1.4 Amyloid-Bildung

Mutationen der Gene *APP*, *PS1* und *PS2* sind bei der familiären Form der Alzheimer-Demenz ursächlich für die Akkumulation von A β (siehe Kapitel 1.2). Hierbei führen die meisten Mutationen im *APP*-Gen zu einer Erhöhung des Gesamt-A β -Spiegels und nur manche zu einer Erhöhung des Verhältnisses von A β 42 zu A β 40. Mutationen in den *PS*-Genen hingegen haben ausschließlich eine Erhöhung des A β 42 zu A β 40 Verhältnisses zur Folge (Borchelt et al. 1996; Citron et al. 1997; Duff et al. 1996). Ferner kommt es bei familiären Alzheimer-Patienten mit *PS1*-Mutationen zu einer erhöhten Bildung von A β -Plaques (Lemere et al. 1996).

Die zentrale Rolle von A β bei der Alzheimer-Erkrankung ist laut gängiger Lehrmeinung unbestritten. Jedoch gibt es unterschiedliche Ansichten darüber, welche A β -Erscheinungsform (oligomeres oder fibrilläres A β) und welcher Ort des Auftretens (intrazellulär oder extrazellulär) primär für die Pathogenese ursächlich sind. Aus diesem Grund werden in den folgenden Kapiteln die damit verbundenen Hypothesen vorgestellt.

1.4.1 Intrazelluläres Amyloid- β

Mehrere Untersuchungen, die sich mit der Bildung von A β beschäftigten, konnten zeigen, dass die APP-Prozessierung bereits intrazellulär in Nervenzellen erfolgen kann und nicht, wie ursprünglich angenommen, ausschließlich an der Zelloberfläche stattfindet. Genauer gesagt findet im ER die γ -Sekretase-Spaltung für die Bildung von A β 42 statt, wobei A β 40 hauptsächlich im *trans*-Golgi-Netzwerk gebildet wird (Cook et al. 1997; Hartmann 1999). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass der Hauptteil des intrazellulären A β sich aus oligomerem A β 42 zusammensetzt (Gouras et al. 2000). Auch die Präseniline, als Teil des γ -Sekretase Komplexes, sind neben der Zellmembran hauptsächlich in den Membranen des ER und des Golgi-Apparates lokalisiert (Kim et al. 2000) und befinden sich somit genau in den an der APP-Prozessierung beteiligten Kompartimenten. Somit wurde gezeigt, dass A β nicht nur extrazellulär in Form von unlöslichen A β -Plaques, sondern auch intrazellulär als lösliche A β -Oligomere, auftreten kann. Es wird postuliert, dass A β intrazellulär akkumuliert und daraufhin in den extrazellulären Raum sekretiert, wo es zu A β -Plaques aggregiert (LaFerla et al. 2007). Als Folge dieser Kaskade wird dem frühen Auftreten von intrazellulärem A β eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung zugeschrieben, da die ersten kognitive Störungen bei Alzheimer-Patienten (McLean et al. 1999) wie auch im Mausmodell (Oddo et al. 2003) weit besser mit dem Auftreten von intrazellulärem A β als mit extrazellulären A β -Plaques korrelieren.

1.4.2 A β -Oligomer-Hypothese

Die „A β -Oligomer-Hypothese“ besagt, dass nicht fibrilläres A β , sondern lösliche, A β 42-Oligomere, sogenannte ADDLs (engl. *A β -derived diffusible ligands*) primär ursächlich für die Pathologie der Alzheimer-Erkrankung sind (Lambert et al. 1998). Die Grundlage hierfür wurde gelegt, nachdem bekannt wurde, dass die A β -Toxizität nicht von der Bildung fibrillärer A β -Plaques abhängt. Es wurde beobachtet, dass das Protein ApoJ die Bildung von fibrillären A β -Aggregaten verhindert, jedoch wurde dadurch die Neurotoxizität von A β nicht vermindert, sondern noch erhöht. Dies wurde auf eine Verschiebung des A β -Gleichgewichts zu Gunsten der A β -Oligomere zurückgeführt (Oda et al. 1995).

Die Oligomer-Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass sich auch aus sehr geringen Mengen an monomerem A β schon A β -Oligomere bilden können und diese somit schon lange vor der Bildung von A β -Plaques auftreten können (Klein 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass speziell A β -Oligomere die kognitiven Funktionen des Gehirns beeinträchtigen können (Cleary et al. 2005; Shankar et al. 2007; Shankar et al. 2008; Walsh et al. 2002). Diese Befunde und die Tatsache, dass intrazelluläres A β hauptsächlich aus A β -Oligomeren bestehen (Gouras et al. 2000; Walsh et al. 2000), könnte erklären, warum die ersten kognitiven Defizite in Alzheimer-Patienten (McLean et al. 1999) wie auch im Tiermodell (Oddo et al. 2003) unabhängig von der Bildung von fibrillären A β -Plaques auftreten.

1.4.3 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ postuliert, dass die A β -Akkumulation das zentrale Ereignis und die Ursache für die Neurodegeneration im Gehirn von Alzheimer-Patienten darstellt. Alle anderen mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierten pathologischen Phänomene, wie die Bildung von neurofibrillären Bündeln und der Untergang von Nervenzellen und Synapsen sind demnach Folgeerscheinungen eines Ungleichgewichts zwischen A β -Produktion und A β -Abbau (Hardy und Selkoe 2002).

Gründe, die für die Amyloid-Kaskaden-Hypothese sprechen sind: Erstens, Mutationen im *Tau*-Gen alleine induzieren keine Alzheimer-Pathologie. Somit ist die Tau-Pathologie beim Morbus Alzheimer ein sekundäres Ereignis und zeitlich nach der A β -Akkumulation einzuordnen (Hardy et al. 1998). Zweitens, transgene Mäuse, die humanes APP und humanes Tau exprimieren zeigen im Vergleich zu nur APP-transgenen Mäusen eine erhöhte Anzahl neurofibrillärer Bündel, aber nicht mehr A β -Plaques (Lewis et al. 2001). Das lässt darauf schließen, dass die Veränderung der APP-Prozessierung zeitlich vor der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins stattfindet.

Trotz dieser positiven Aspekte ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese unter Forschern umstritten. Die Hauptkritikpunkte sind: Erstens, die Anzahl an extrazellulären A β -Plaques im Gehirn korreliert schlecht mit der Ausprägung des frühen kognitiven Verlusts bei Alzheimer-Patienten (McLean et al. 1999; Terry et al. 1991). Zweitens, bei älteren Menschen ohne Alzheimer-Demenz kann man A β -Plaques der diffusen Form nachweisen (Wang et al. 1999) (siehe Kapitel 1.1.2.1). Drittens, diese diffusen A β -Plaques sind nicht von dystroph veränderten Nervenzellfortsätzen umgeben und scheinen somit nicht neurotoxisch zu sein (Selkoe 1996). Folglich scheinen A β -Plaques als alleinige Ursache für die kognitiven Störungen bei Alzheimer-Patienten nicht in Frage zu kommen.

1.5 Dendritische Spines

1.5.1 Struktur und Funktion

Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte der spanische Arzt und spätere Nobelpreisträger (1906) Ramon y Cajal kleine Ausstülpungen aus der Membran von Dendriten einer Nervenzelle (Ramon y Cajal 1888; Ramon y Cajal 1891). Diese 1-3 μm großen dornenartigen Fortsätze bestehen aus einem Hals und einem Kopf und werden heute als dendritische Spines (engl. für Dorn) bezeichnet. Die Dendriten einer Nervenzelle sind in der Lage mehrere tausend Spines auszubilden (Lippman und Dunaevsky 2005; Nimchinsky et al. 2002). Spines repräsentieren den postsynaptischen Teil einer erregenden Synapse. Zusammen mit dem präsynaptischen *Bouton* (franz. Knopf) eines Axons bildet der Spine eine funktionelle Synapse aus (Abb. 5). Am Kopf eines dendritischen Spines befindet sich die postsynaptische Dichte (PSD). Die Kommunikation zwischen Prä- und Postsynapse erfolgt über den synaptischen Spalt durch Ausschütten von Neurotransmittern (Abb. 5B).

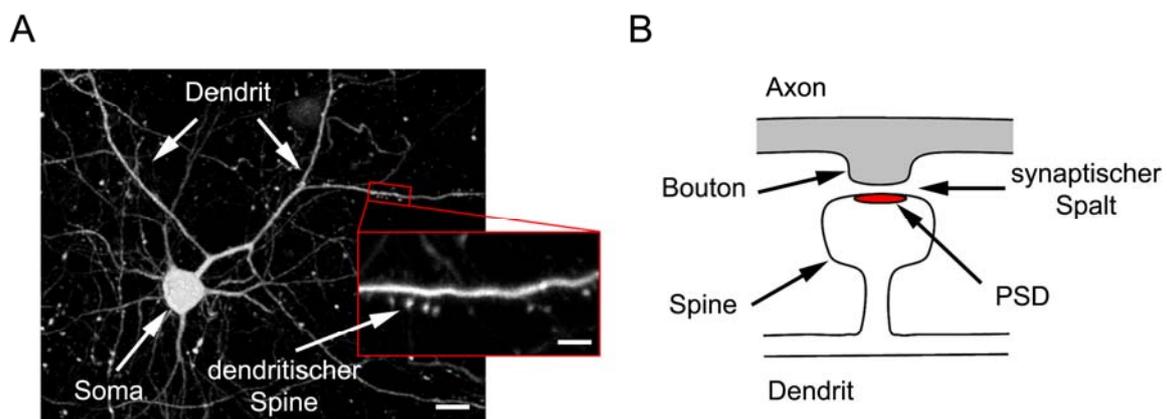


Abb. 5: Aufbau einer Nervenzelle und einer Synapse

(A) Intravitalmikroskopischer Ausschnitt aus dem Kortex einer YFP-H Maus. Erkennbar sind das Soma der Nervenzelle, sowie die davon abgehenden Dendriten an denen sich dendritische Spines ausbilden. Größenstandard: Übersicht 10 μm , Ausschnitt 3 μm **(B)** Schematische Darstellung einer Synapse. Der präsynaptische Teil (grau) mit Bouton steht in Verbindung mit dem Axon. Auf der postsynaptischen Seite (weiß) des synaptischen Spalts liegt der Spine, inklusive postsynaptischer Dichte (PSD) (rot), als Ausstülpung eines Dendriten.

Die Funktion eines dendritischen Spines liegt in der Aufnahme eines von der Präsynapse ankommenden elektrischen Signals und dessen Weiterleitung zum Soma der Nervenzelle (Gray 1959). Generell gilt: je größer der dendritische Spine, umso höher ist die Übertragungsleistung der Synapse (Harris und Stevens 1989). Ferner gilt, je mehr Spines und damit funktionelle Synapsen eine Nervenzelle besitzt, desto mehr Kommunikation findet zwischen vernetzten Nervenzellen statt. Wird die Verbindung zwischen zwei Nervenzellen

nur noch wenig oder gar nicht mehr benutzt, werden die Synapse und damit der dendritische Spine verkleinert oder vollständig abgebaut (Abb. 6) (Engert und Bonhoeffer 1999; Tada und Sheng 2006). Die Größe und Anzahl an dendritischen Spines stellt somit das strukturelle Korrelat für die Lern- und Gedächtnisleistung (engl. *learning and memory*) des Gehirns dar (Horn et al. 1985; Lippman und Dunaevsky 2005; Moser et al. 1994; Segal 2002). Die strukturelle Veränderung dendritischer Spines in Größe, aber auch das Entstehen und Verschwinden ganzer Spines über die Zeit wird auch als strukturelle Plastizität (engl. *structural plasticity*) bezeichnet (Stepanyants et al. 2002).

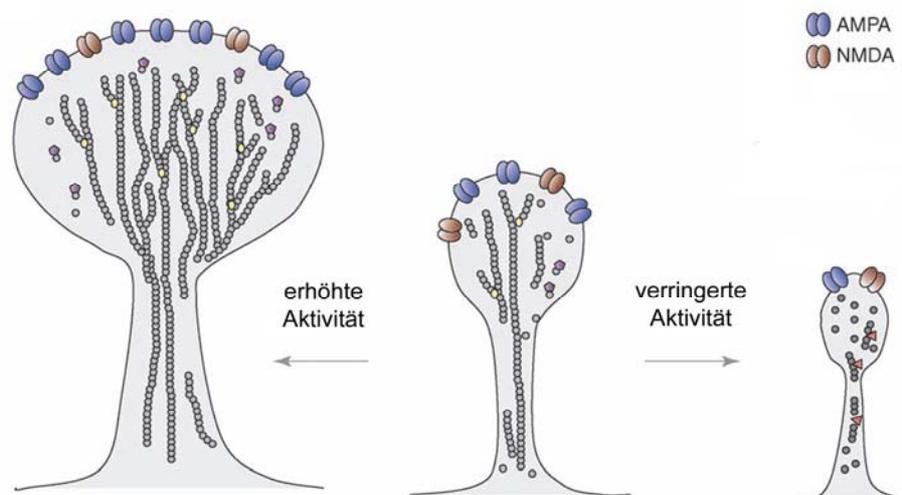


Abb. 6: Veränderung der strukturellen Plastizität bei erhöhter und verringerter Aktivität

Bei erhöhter Aktivität der Synapse vergrößert sich der dendritische Spine, wogegen bei verringerter Aktivität die Größe abnimmt. AMPA- und NMDA-Rezeptoren markieren die postsynaptische Dichte (Tada und Sheng 2006).

1.5.2 Klassifizierung

Dendritische Spines werden in der Literatur auf zwei verschiedene Arten klassifiziert: Zum einen nach der Lebensdauer (Holtmaat et al. 2005) und zum anderen nach der Form (Harris et al. 1992). Bei der Lebensdauer unterscheidet man persistente von transienten Spines (Abb. 7A). Wie der Name schon sagt, sind die persistenten Spines die langlebigen, also stabilen Spines, wogegen die transienten Spines eine kurze Lebensdauer haben. Diese beiden Begriffe wurden von der 2-Photonen Mikroskopie geprägt. Durch wiederholtes Mikroskopieren der gleichen dendritischen Strukturen und Spines über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten ist es möglich die Präsenz einzelner Spines zu bestimmen. Als Konvention unterscheidet man nach HOLTMAAT persistente Spines mit einem Vorhandensein von 8 Tagen oder mehr von transienten Spines mit einer Präsenz von

weniger als 8 Tagen (Holtmaat et al. 2005). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von persistenten und transienten Spines haben gezeigt, dass die überwiegende Mehrheit der persistenten Spines mit präsynaptischen Boutons eines Axons verbunden ist, und somit funktionelle und stabile Synapsen bildet. Die Mehrzahl der transienten Spines hingegen hat keine Verbindung zur Präsynapse und bilden nur in wenigen Fällen funktionelle Synapsen aus (Knott et al. 2006). Es wird postuliert, dass diese transienten Spines nach präsynaptischen Boutons „suchen“, um neue funktionelle und stabile Verbindungen aufzubauen. Ist dies geschehen, werden die transienten zu persistenten Spines. Ist diese „Suche“ erfolglos, ziehen sie sich zurück und verschwinden nach weniger als 8 Tagen (Holtmaat et al. 2005).

Bei der Klassifizierung dendritischer Spines nach Form (Abb. 7B) unterscheidet man zwischen pilzartigen (engl. *mushroom*), stumpffartigen (engl. *stubby*) und dünnen (engl. *thin*) Spines (Harris et al. 1992). Die Lebensdauer von Spines unterschiedlicher Form wurde untersucht. Hierbei kam man zu dem Ergebnis, dass persistente Spines hauptsächlich die Form *mushroom* und *stubby* ausbilden (Majewska et al. 2006). Transiente Spines sind hingegen vornehmlich *thin* Spines. Ein möglicher Grund hierfür liegt in der Größe der PSD, die bei *mushroom* und *stubby* Spines durch ihren voluminöseren Kopf größer ist als bei *thin* Spines. Demnach haben größere Spines mit einer größeren PSD eine erhöhte synaptische Übertragungsleistung als Spines mit kleiner PSD. Diese höhere synaptische Leistung kann jedoch nur ausgeschöpft werden, wenn auch eine Verbindung zum präsynaptischen Teil der Synapse besteht, also folglich nur bei persistenten Spines.

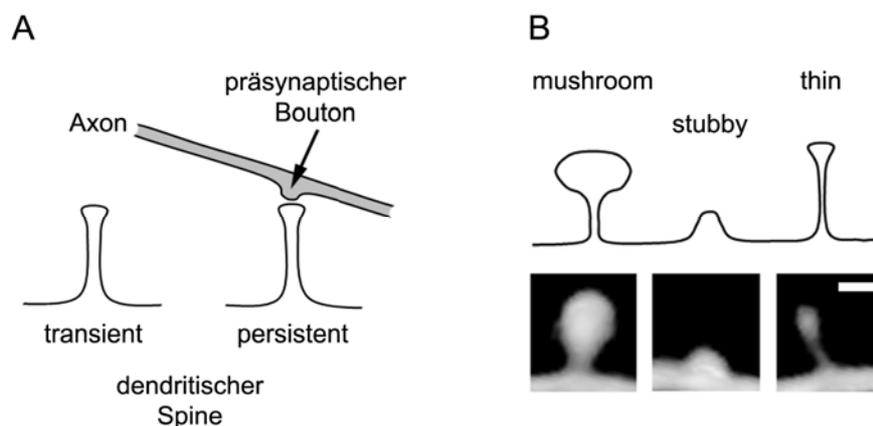


Abb. 7: Klassifizierung dendritischer Spines

(A) Spineklassifizierung nach Lebensdauer in persistent (≥ 8 Tage) und transient (< 8 Tage). Persistente Spines haben im Gegensatz zu transienten Spines meist eine funktionelle stabile Verbindung mit einem präsynaptischen Bouton und bilden somit funktionelle Synapsen. **(B)** Schematische Spineklassifizierung nach Spineform in *mushroom* (engl. für pilzartige), *stubby* (engl. für stumpffartige) und *thin* (engl. für dünne) Spines. Intravitalmikroskopische Aufnahmen aller drei Spineformen. Größenstandard: $0,5 \mu\text{m}$.

1.5.3 Strukturelle Veränderungen

Durch intravitalmikroskopische Untersuchungen individueller dendritischer Spines über Wochen an adulten WT Mäusen (älter als 4 Wochen) konnte gezeigt werden, dass 96 % der dendritischen Spines im Kortex stabil (persistent) sind und über Monate unverändert bleiben. Bei juvenilen WT Mäusen (jünger als 4 Wochen) hingegen, sind dazu nur etwa 73 % stabil, wobei von den 27 % instabilen (transienten) Spines die meisten in den ersten vier Wochen eliminiert werden (Grutzendler et al. 2002). Das bestätigt zum einen die Vermutung, dass dendritische Spines bei der Langzeit Speicherung von Informationen im Gehirn eine bedeutende Rolle spielen. Zum anderen legt es den Schluss nahe, dass die große Anzahl an transienten Spines in jungem Alter den Versuch des juvenilen Gehirns darstellt, stabile Verbindungen zu etablieren. Ist dieser Prozess erfolgreich, wird aus dem transienten Spine eine funktionelle Synapse und somit ein persistenter Spine der lange bestehen bleibt, wogegen sich der Spine bei einer erfolglosen Etablierung einer Verbindung zurückbildet. Dieser Effekt schlägt sich in der Eliminierung von transienten Spines beim Übergang vom juvenilen in das adulte Stadium nieder (Grutzendler et al. 2002; Zuo et al. 2005a; Zuo et al. 2005b).

Neben den physiologischen Umbauprozessen am dendritischen Spine, kommt es bei neurodegenerativen Erkrankungen ebenfalls zu Veränderungen an dendritischen Spines im Laufe der Zeit. Mehrere Studien konnten im Verlauf einer Alzheimer-assoziierten Pathologie in der Nähe von A β -Plaques (Brendza et al. 2005; Spires et al. 2005; Tsai et al. 2004) sowie bei Prionen-Erkrankungen (Fuhrmann et al. 2007) den Verlust von dendritischen Spines im Tiermodell nachweisen. Hierbei kommt es neben dem Verlust von dendritischen Spines oft auch zu dystrophen Veränderungen der Dendriten. Diese abnormen Dendriten zeigen Anschwellungen (Brendza et al. 2005; Fuhrmann et al. 2007; Tsai et al. 2004) aber auch unnatürliche Krümmungen (Spires et al. 2005), sowie Strangbrüche (Tsai et al. 2004).

1.6 *In vivo* 2-Photonen Mikroskopie

Für die Untersuchung der langsam ablaufenden Prozesse bei neurodegenerativen Erkrankungen des Gehirns anhand von lebenden Tieren bedarf es einer Technik, die eine nicht-invasive, aber dennoch hochauflösende und wiederholte Betrachtung der dendritischen Spines und Nervenzellen über lange Zeiträume ermöglicht. Dies war 1990 durch die Entwicklung der 2-Photonen Intravitalmikroskopie gegeben (Denk et al. 1990). Der Hauptunterschied der 2-Photonen Mikroskopie im Vergleich zur konventionellen konfokalen Laser-Rastermikroskopie liegt in der Anwendung nichtlinearer Anregung. Bei der Absorption eines Photons durch einen Fluoreszenzfarbstoff wird ein Elektron in einen angeregten höher-energetischen Zustand gebracht. Der Energiesprung des Elektrons entspricht genau der Energie des absorbierten Photons. Wenn das Elektron in den Grundzustand „zurückfällt“, wird wiederum ein Photon emittiert. Aufgrund intramolekularer Relaxationen wird Energie hauptsächlich in Form von Wärme für den optischen Übergang abgegeben, so dass das emittierte Photon eine geringere Energie und somit eine größere Wellenlänge als das absorbierte Photon besitzt. Dieser Unterschied wird nach seinem Entdecker als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Die 2-Photonen-Anregung beruht auf der Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluoreszenzfarbstoff mit Lichtquanten geringerer Energie als seine Anregungsenergie angeregt werden kann, sofern die Summe der Energien gleich der Anregungsenergie ist. Für einen optischen Übergang müssen die Lichtquanten simultan auftreffen (Abb. 8A) (Esposito et al. 2004). Die Wahrscheinlichkeit für eine 2-Photonen-Anregung ist proportional zum Quadrat der Intensität des Lichtes. Je höher die Intensität, desto mehr Photonen pro Zeiteinheit passieren eine Fläche und desto öfter treffen mehrere Photonen simultan auf einen Fluoreszenzfarbstoff. Ausreichend hohe Intensitäten werden im Fokus eines Femtosekunden-Laserstrahls erreicht. Dabei bleibt die Anregung auf den Fokus beschränkt, da die Anregungswahrscheinlichkeit aufgrund des nichtlinearen Zusammenhangs außerhalb des Fokus rasch absinkt. Diese Besonderheit der 2-Photonen Anregung hat mehrere entscheidende Vorteile gegenüber der konfokalen Mikroskopie: Erstens kommt es zu keinem Ausbleichen der Probe außerhalb des Fokus (Abb. 8B). Dadurch wird eine phototoxische Schädigung des umliegenden Gewebes minimiert. Der zweite Vorteil liegt darin, dass die Benutzung einer Lochblende zum Ausblenden von Photonen außerhalb der Fokusebene bei der 2-Photonen Anregung nicht nötig ist, so dass sämtliche Photonen, die von Fluoreszenzmolekülen emittiert werden, auch theoretisch für die Detektion genutzt werden können. Das wiederum führt zu einer erhöhten Sensitivität. Ein weiterer Vorteil der 2-Photonen Anregung besteht darin, dass das langwellige infrarote Laserlicht eine erhöhte Eindringtiefe in intaktes Gewebe besitzt, da es aufgrund der höheren Wellenlänge weniger absorbiert und gestreut wird.

Diese Vorzüge der 2-Photonen Anregung ermöglichen erst die Anregung und Detektion fluoreszierender Nervenzellen in Tiefen bis zu 700 μm im Gehirn lebender Tiere (Theer et al. 2003). Die Entwicklung der 2-Photonen Intravitalmikroskopie stellt somit einen technischen Fortschritt dar, der es erstmals erlaubt einzelne Nervenzellen und Synapsen wiederholt im Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen im Gehirn lebender Tiere zu untersuchen.

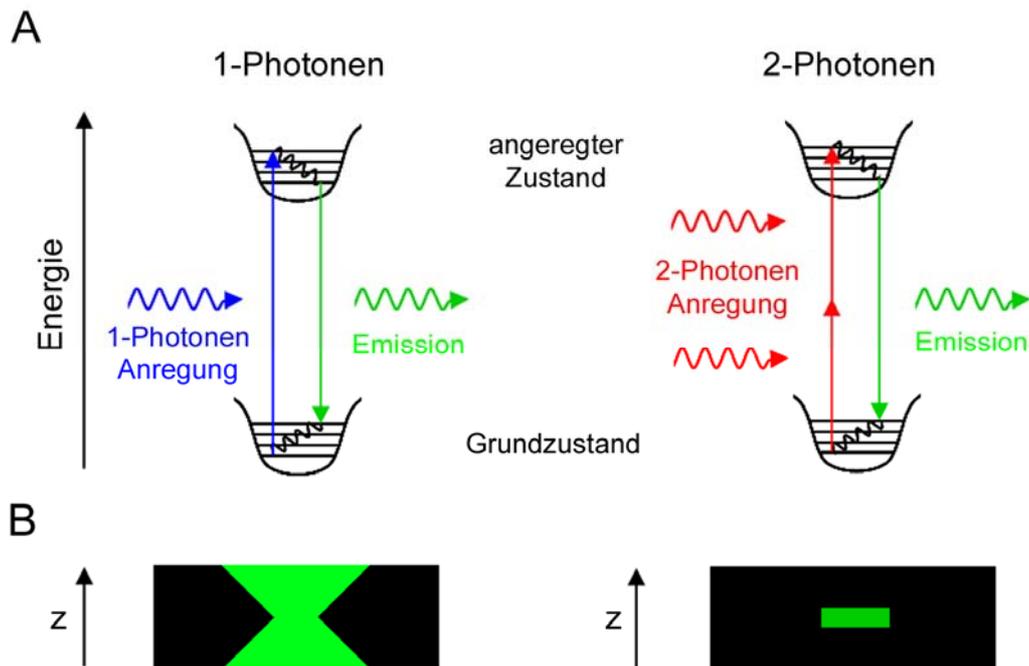


Abb. 8: Vergleich von konfokaler und 2-Photonen Mikroskopie

(A) Jablonski-Diagramme für 1-Photonen und 2-Photonen Anregung. Blaue Wellen symbolisieren kurzwelliges und rote Wellen langwelliges Licht. **(B)** Anregungsverteilung in z-Richtung. Die 2-Photonen Anregung findet nur im Fokus statt, wogegen bei der konfokalen Anregung auch oberhalb und unterhalb des Fokus Fluoreszenzmodule angeregt werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, einerseits die Hintergründe und Mechanismen des Synapsenuntergangs beim Morbus Alzheimer besser zu verstehen. Andererseits sollte konkret ein Therapieansatz gegen den Synapsenverlust beim Morbus Alzheimer, im lebenden Mausmodell evaluiert werden. Im Fokus bisheriger Studien auf dem Gebiet des Synapsenuntergangs beim Morbus Alzheimer stand das A β -Peptid, das einerseits eine physiologische Funktion an der Synapse hat und andererseits eine zentrale pathophysiologische Rolle bei der Bildung von A β -Aggregaten spielt. Somit ist der Einfluss eines veränderten A β -Spiegels auf die strukturelle Plastizität von Synapsen nicht nur aus physiologischer Sicht für die Grundlagenforschung von Interesse, sondern hat darüber hinaus auch Bedeutung für die Entwicklung von Therapieansätzen beim Morbus Alzheimer. Unter diesem Aspekt erforschen derzeit Pharmakonzerne die therapeutische Möglichkeit, den Synapsenverlust beim Morbus Alzheimer durch pharmakologische Senkung des A β -Spiegels aufzuhalten. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der therapeutische Nutzen dieser A β -Senkung auf die Synapsen lebender Mäuse untersucht werden. Der zweite Teil der Arbeit sollte sich mit der pathophysiologischen Rolle von A β befassen. Hierbei sollte anhand von transgenen Alzheimer-Mausmodellen, deren A β -Spiegel progressiv ansteigt, die Umstände und Mechanismen des Synapsenuntergangs identifiziert werden. Insbesondere der Einfluss von Tau sowie die zeitliche Abfolge der pathologischen Ereignisse, die dem Synapsenverlust zugrunde liegen, sollte hierbei untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Intravitalmikroskopie

2.1.1 Operation zur chronischen Intravitalmikroskopie

Experimente, die über einen Zeitraum von Tagen bis Monaten wiederholt an lebenden Organismen durchgeführt werden, bezeichnet man als chronisch intravitalmikroskopische Untersuchungen. Der große Vorteil der chronischen Intravitalmikroskopie liegt in der wiederholten Beobachtung derselben Nervenzellen, Dendriten und dendritische Spines und der sich daraus ergebenden Möglichkeit, strukturelle Veränderungen über Tage bis Monate analysieren können. Den Mäusen wird hierzu in einer Operation ein kraniales Fenster implantiert. Nach einer Ruhephase von 21 Tagen kann die narkotisierte Maus über ein bis zwei Stunden mit Hilfe der 2-Photonen Intravitalmikroskopie wiederholt untersucht werden.

Vor der Operation wird der Maus Dexamethason injiziert (4 mg/kg Körpergewicht; intraperitoneal), um Folgen einer Inflammation zu minimieren. Nach Einleitung der Narkose mit mit Isofluran (0,8-1,5 % Isofluran in reinem Sauerstoff) oder Ketamin/Xylazin (0,13 mg/kg Ketamin und 0,01 mg/kg Xylazin Körpergewicht; intraperitoneal) wird die Maus zur Fixierung des Kopfs in einen Stereotakt gespannt. Nun wird die Haut am Kopf mit 70 % Ethanol desinfiziert (Abb. 9A) und anschließend mit einer Schere entfernt. Mit einem Skalpell wird die Knochenhaut gründlich abgeschabt (Abb. 9B). Anschließend wird der trockene Schädelknochen mit einer Schicht „Cyano-Veneer fast“ abgedeckt. Dabei lässt man über dem rechten Schädelknochen den Bereich frei, in dem das Fenster implantiert werden soll. Mit Hilfe eines Zahnarzt-Bohrers wird nun ein kreisrundes Loch mit einem Durchmesser von 4 mm in die Schädeldecke gebohrt. Dabei wird mit großer Vorsicht gebohrt, ohne den Knochen komplett zu durchstoßen (Abb. 9C). Die Bohrstelle wird mit PBS (engl. *phosphate buffered saline*) bedeckt und das Schädelstück mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig herausgehoben. Dabei gilt es Blutungen zu vermeiden. Treten diese dennoch auf, so wartet man 1-2 Minuten, bis das Blut geronnen ist. Danach werden die Bohrspäne und das geronnene Blut mit PBS abgespült. Nun wird sofort ein steriles rundes Deckglas mit 5 mm Durchmesser auf das Loch gelegt, sodass die Schicht zwischen Hirnoberfläche und Deckglas luftblasenfrei mit PBS gefüllt ist. Anschließend mischt man „Cyano-Veneer fast“-Kleber mit Zement an und verklebt die Ränder der Schädeldecke mit dem Deckglas. Hierbei sollte nur wenig Druck auf das Gehirn ausgeübt werden, da sonst die Durchblutung der Gefäße auf der Hirnoberfläche beeinträchtigt wird. Nachdem der Kleber ausgehärtet ist, wird eine Ankerplatte mit Schraube plan neben das Deckglas geklebt (Abb. 9D). Zur Schmerzlinderung wird nach der Operation 1-3 Tage Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht; subkutan) verabreicht.

Zur wiederholten Intravitalmikroskopie schraubt man die Lochplatte an die Ankerplatte (Abb. 9F). Die Lochplatte wird wiederum auf die Adapterplatte montiert (Abb. 9G), wobei Öffnungen zwischen Lochplatte und Deckglas mit Vaseline abgedichtet werden (Abb. 9H). Die an der Lochplatte fixierte Maus wird auf die Adapterplatte montiert und auf den Mikroskoptisch unter das Mikroskop gelegt (Abb. 9I). Ein Tropfen steriles Wasser zwischen Deckglas und Objektiv dient als Immersionsflüssigkeit.

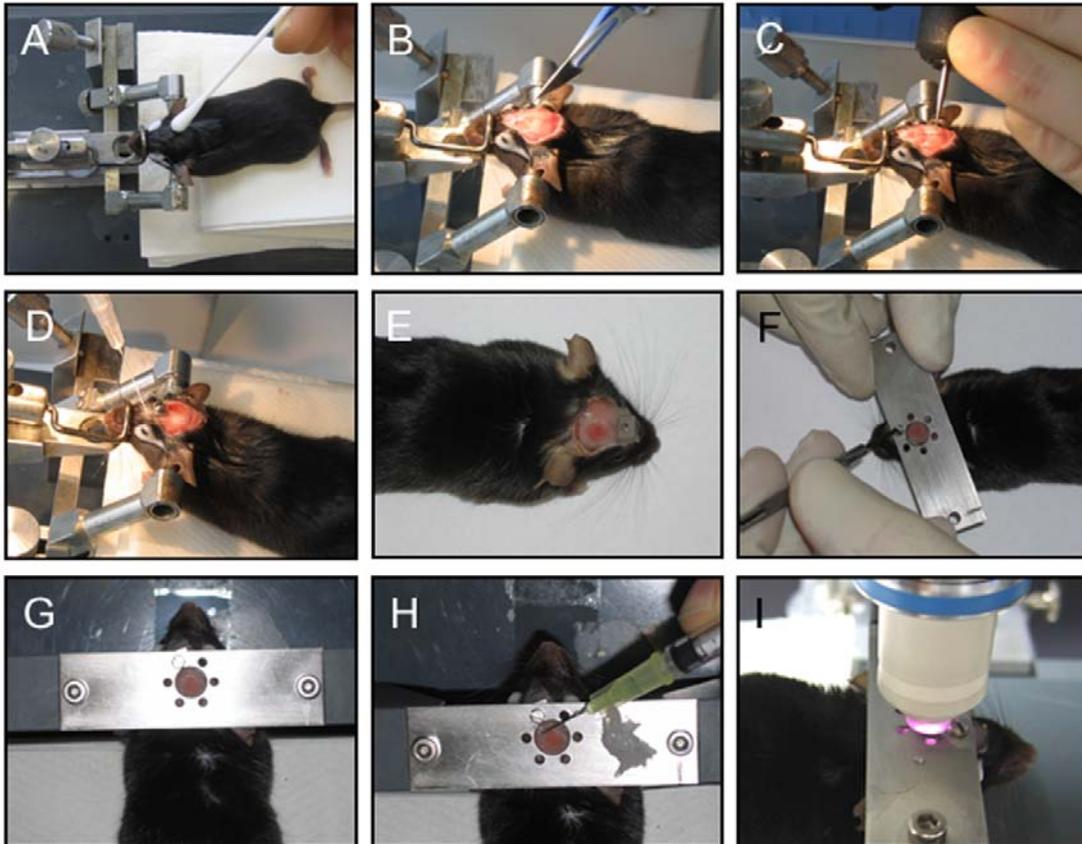


Abb. 9: Implantieren eines kranialen Fensters und Vorbereitung zur Intravitalmikroskopie

(A) Desinfektion der Kopfhaut während die Maus narkotisiert und im Stereotakt eingespannt ist (B) Abschaben des Schädelknochens (C) Bohren des kranialen Fensters (D) Verkleben des Deckgläschens und des Ankerplättchens (E) Maus nach der Operation (F) Die Lochplatte wird an die Ankerplatte geschraubt (G) Die Lochplatte ist auf der Adapterplatte montiert (H) Abdichten mit Vaseline (I) Maus unter dem Objektiv.

2.1.2 2-Photonen Intravitalmikroskopie

Das Mikroskopie-Setup bestand aus dem spektral abstimmbaren Titan:Saphir-Laser (710-920 nm) „MaiTai XF-W1S“ der Firma Spectra Physics (heute Newport, Darmstadt), der in das Mikroskop „Axioskop 2FS“ der Firma Zeiss eingekoppelt wurde (Abb. 10E). Am Mikroskop-Stativ befanden sich zwei Aufricht-NDDs (engl. *non-descanned detectors*) in Form von Photomultiplier-Tubes. Im Emissions-Strahlengang konnten je nach zu detektierendem

Farbstoff verschiedene Filter ausgewählt werden. Für die Detektion von YFP (engl. *yellow fluorescent protein*) wurde der Hauptstrahlteiler HFT/KP650 benutzt, der Licht des Femtosekunden-Lasers mit 880 nm Wellenlänge auf die Hirnoberfläche leitet und das von den YFP-exprimierenden Neuronen emittierte Licht, das kurzwelliger als 650 nm ist, zu den NDDs durchlässt. Das emittierte Licht wurde durch den Bandpass-Filter BP500-550 (ließ Licht der Wellenlänge 500-550 nm passieren) gefiltert. Zur Detektion von MethoxyX04 markierten A β -Plaques wurde der Hauptstrahlteiler KP700/488 in Kombination mit einer Anregungs-Wellenlänge von 750 nm verwendet. Dem NDD war der Bandpass-Filter BP435-485 vorgeschaltet. Folgende Objektive wurden benutzt: Achroplan IR 40x/0,80, Achroplan 10x/0,3 W Ph1 und W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC W (alle Zeiss AG, Jena).

Für die 2-Photonen Intravitalmikroskopie wurde die Maus wie unter 2.1.1 beschrieben vorbereitet und unter das Mikroskop gelegt. Daraufhin wurden 2-4 zur Intravitalmikroskopie geeignete Positionen auf der Hirnoberfläche mit Hilfe der zum Mikroskop gehörenden Epifluoreszenz-Lampe mittels Sicht durchs Okular ausgewählt. Die Koordinaten dieser Positionen wurden auf dem Verschiebetisch gespeichert, um sie später automatisch anfahren zu können. Um diese Positionen zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt aufzufinden, wurden mit einer am Kamera-Adapter des Mikroskop-Stativs angebrachten Digitalkamera Bilder von den Blutgefäßen auf der Hirnoberfläche aufgenommen. Diese Aufnahmen mit dem 10x (Abb. 10A) und 40x (Abb. 10B) Objektiv waren so charakteristisch, dass ein wiederholtes Auffinden der einzelnen Positionen auch nach Monaten kein Problem darstellte.

An den zuvor ausgewählten Positionen wurden zuerst 150-700 μm tiefe Übersichtsaufnahmen mit dem 40x Objektiv (1x Zoom; 230 x 230 x 2 μm^3 ; 1024 x 1024 Pixel; 0,22 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$) oder mit dem 20x Objektiv (1x Zoom; 430 x 430 x 3 μm^3 ; 1024 x 1024 Pixel; 0,41 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$) aufgenommen (Abb. 10C). Diese Übersichtsaufnahmen dienten der exakten Positionierung sowie dem wiederholten Auffinden Mikrometer großer Strukturen. Hochauflösende z-Stapel von dendritischen Spines wurden mit dem 40x Objektiv (4x Zoom; 58 x 58 x 1 μm^3 ; 512 x 512 Pixel; 0,11 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$) aufgenommen (Abb. 10D). Dabei wurde mit Hilfe der Funktion „Auto-z-Korrektur“ der LSM510 Software dafür gesorgt, dass die Fluoreszenzintensität über den gesamten z-Stapel konstant blieb. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Fluoreszenz-Intensität einer Position zu verschiedenen Zeitpunkten vergleichbar war.

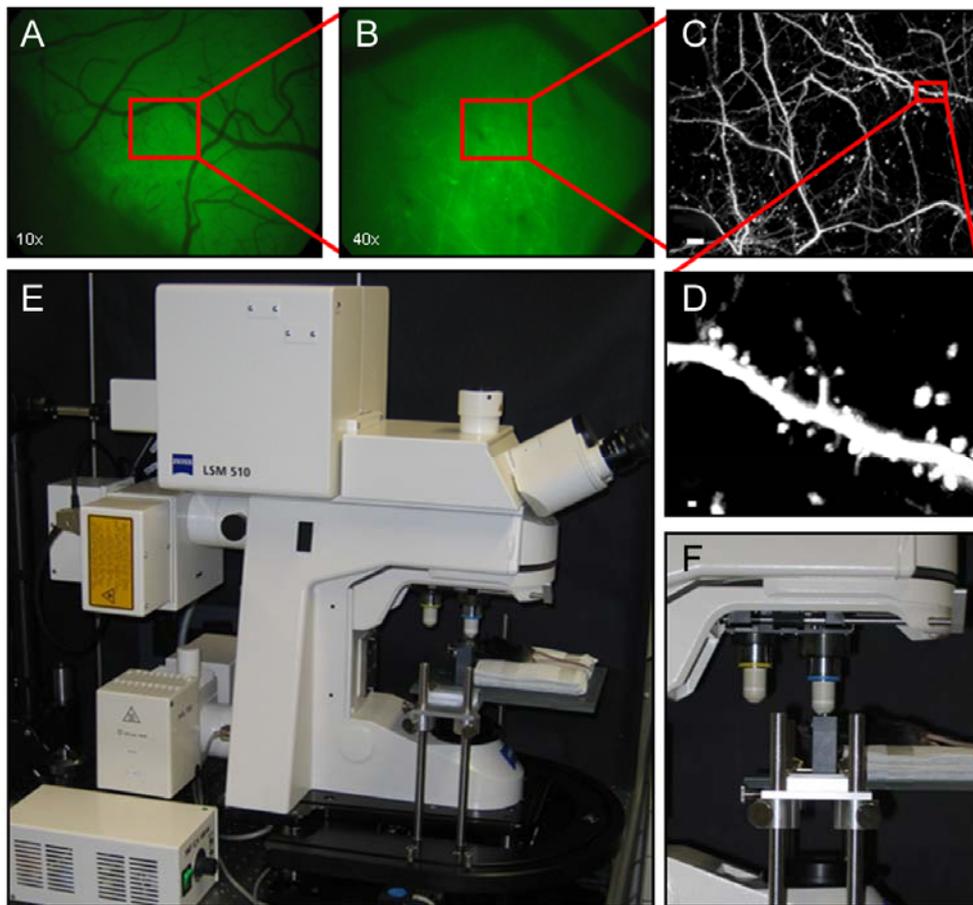


Abb. 10: 2-Photonen Intravitalmikroskopie

(A) Epifluoreszenz-Aufnahme mit einer Digitalkamera durch das 10x Objektiv; Hirnoberfläche fluoresziert grün und Blutgefäße erscheinen schwarz (B) Epifluoreszenz Aufnahme der gleichen Position (rote Markierung) mit dem 40x Objektiv (C) 2-Photonen Intravitalmikroskopische Aufnahme der gleichen Position (rote Markierung) mit dem 40x Objektiv bei 1x Zoom. Größenstandard: 10 μm (D) 2-Photonen Intravitalmikroskopische Aufnahme der gleichen Position (rote Markierung) mit dem 40x Objektiv bei 4x Zoom. Größenstandard: 1 μm (E) 2-Photonen Mikroskop Aufbau (F) Die Maus ist auf der Adapterplatte fixiert, die wiederum an den Mikroskoptisch montiert wurde.

2.1.3 Bildbearbeitung und Datenauswertung

Alle in dieser Arbeit abgebildeten mikroskopischen Aufnahmen wurden wie folgt bearbeitet: Die Rohdaten wurden mit 10 Wiederholungen dekonvuliert (AutoQuant Version X2; Media Cybernetics, Bethesda, USA). Die Analyse der Spineform wurde mit Hilfe der Software 3DMA (Koh et al. 2002) automatisiert durchgeführt. Dabei wurden Dendriten und Spines als computergenerierte dreidimensionale Objekte dargestellt. In dieser Darstellung kann das Programm die einzelnen Spines nach einem internen Algorithmus automatisch klassifizieren (Koh et al. 2002). Die Analyse der Volumenberechnung von dystrophen Dendriten wurde mit Hilfe der Software Imaris (6.1, Bitplane, Zürich, Schweiz) durchgeführt. Hierzu legt das Programm automatisch eine Oberfläche um die Objekte (Abb. 11) und überführt das berechnete Volumen zur weiteren Auswertung und Darstellung in eine Tabelle. Alle hier

beschriebenen Berechnungen und Graphen wurden mit Excel (Version 2003; Microsoft, Seattle, USA) erstellt.

Um die Veränderung der strukturellen Spine Plastizität von YFP-exprimierenden Neuronen im Kortex lebender Mäuse bestimmen zu können, wurden die z-Stapel einer Position zu verschiedenen Zeitpunkten manuell miteinander verglichen. Dazu wurde die LSM510 Software (Version 3.2) der Firma Zeiss verwendet, womit einzelne Spines durch farblich unterschiedliche Pfeile als hinzugewonnene (grün), konstante (blau) sowie verlorengegangene Spines (rot) markiert werden können (Abb. 11A). Pro Maus wurden Zugewinn und Verlust von Spines an 5 bis 10 verschiedenen Dendriten in 2-3 verschiedenen Regionen im somatosensorischen Kortex über bis zu 18 Zeitpunkte verfolgt. Dabei wurden insgesamt mehrere zehntausend Spines gezählt und ausgewertet. Im Zuge der Auswertung wurde die Spinedichte als Spineanzahl pro Dendritenlänge in μm berechnet. Auch die Spinedichte der persistenten Spines (Präsenz von mindestens 8 Tagen) als Anzahl persistenter Spines pro Dendritenlänge in μm wurde auf diese Art berechnet. Analog hierzu wurde für die Dichte transienter Spines (Präsenz von weniger als 8 Tagen) verfahren. Der Anteil an hinzugewonnenen und verlorengegangenen Spines wurde bestimmt, indem die Anzahl hinzugewonnener beziehungsweise verlorengegangener Spines durch die Gesamtanzahl der Spines vom vorherigen Beobachtungszeitpunkt geteilt wurde. Ferner wurde der Anteil der Spine-Umsatzrate (engl. *spine turnover rate*) berechnet, indem die Summe an hinzugewonnenen und verlorengegangenen Spines durch die zweifache Gesamtanzahl an Spines vom vorherigen Beobachtungszeitpunkt geteilt wurde. Der Anteil an überlebenden Spines wurde als Anzahl der noch existierenden Spines zu einem Zeitpunkt pro Gesamtanzahl an Spines zum ersten Beobachtungszeitpunkt bestimmt.

Bei der Auswertung des Nervenzellverlusts wurden die Übersichtsaufnahmen manuell verglichen. Eine Nervenzelle wurde als „verloren“ klassifiziert, wenn sie zum folgenden Beobachtungszeitpunkt im Umkreis von $5 \mu\text{m}$ um die bekannte Position nicht mehr auffindbar war. Hierbei wurde der Nervenzellverlust als verlorene Nervenzellen pro Gesamtanzahl an Nervenzellen zum vorherigen Beobachtungszeitpunkt angegeben.

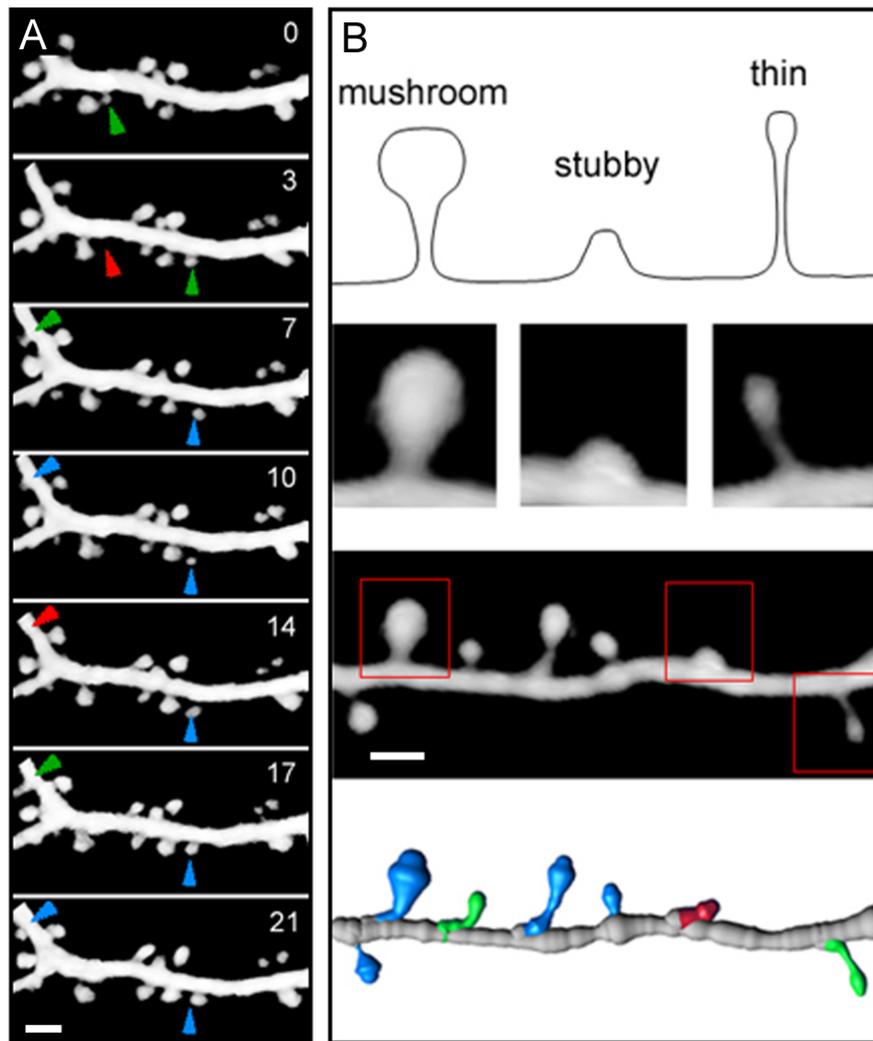


Abb. 11: Auswertung dendritischer Spines und Dendriten

(A) Auswertung von dendritischen Spines in einem Zeitraum von 0-21 Tagen. Grüne Pfeile repräsentieren neu hinzugekommene Spines, rote verschwundene und blaue Pfeile markieren stabile Spines; Größenstandard: 2 μm **(B)** Schematische Darstellung der verschiedenen Spine Formen (*mushroom* (blau), *stubby* (rot) und *thin* (grün)); Mit der Software Imaris generierte Darstellung des Dendriten mit Spines (unten); Größenstandard: 2 μm .

2.1.4 Statistische Auswertung

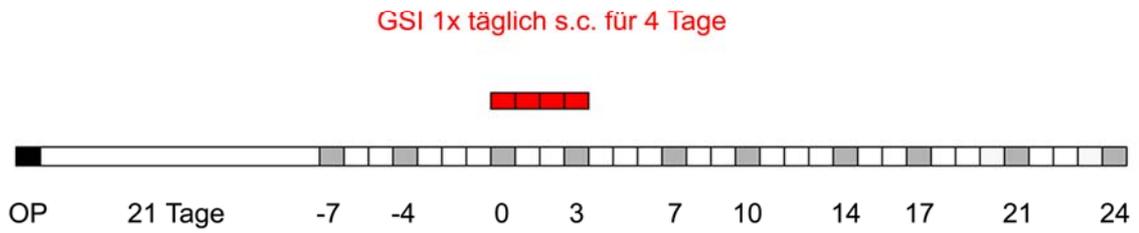
Die Fehlerbalken in allen Abbildungen repräsentieren SEM (engl. *standard error of the mean*). Statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Statistische Unterschiede bei Messungen über die Zeit wurden mit Hilfe der Varianzanalyse mit Messwiederholungen getestet (engl. *repeated measures analysis of variance*). Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen zu einem Zeitpunkt zu ermitteln (z.B. transgen versus nicht-transgen oder behandelt versus unbehandelt), wurden der Wilcoxon-Rangsummentest oder der studentische t-Test verwendet. Für die statistische Berechnung der Signifikanz von mehr als 2 Gruppen (z.B. homozygot APP KO vs. heterozygot APP KO

vs. WT) wurde die einfache Varianzanalyse verwendet. Alle Signifikanztests wurden mit Hilfe der Software SigmaStat (Version 3.5; Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) durchgeführt.

2.1.5 γ -Sekretase Inhibitor Applikation

Für die Experimente mit γ -Sekretase Inhibitor (GSI) Applikation wurden kraniale Fenster, wie unter 2.1.1 beschrieben, implantiert und 21 Tage nach der Operation mit der Intravitalmikroskopie begonnen. Hierbei wurden zuerst drei Zeitpunkte im Abstand von 3-4 Tagen aufgenommen, um transiente von persistenten Spines unterscheiden zu können (Abb. 12A). Sofort nach dem dritten Zeitpunkt wurde erstmals GSI beziehungsweise nur Vehikel als Kontrolle verabreicht. Folgende GSI wurden in den Experimenten verwendet: DAPT (N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycin t-butyl Ester) und LY450139 (N2-((2S)-2-(3,5-Difluorphenyl)-2-hydroxyethanoyl)-N1-((7S)-5-methyl-6-oxo-6,7-dihydro-5H-dibenzo(b,d)azepin-7-yl)-L-ianinamid) (Abb. 12B). 100 mg/kg DAPT wurde subkutan 1x täglich für 4 Tage gegeben. LY450139 hingegen wurde subkutan 1x täglich in einer Dosis von 30 mg/kg für 4 Tage verabreicht. Beide Inhibitoren blockierten nachweislich die Spaltung von APP und Notch und führten zu einer Verringerung des A β -Levels nach einmaliger Gabe der angegebenen Dosis um 40 % beziehungsweise 60 % bei gleichzeitigem Anstieg der APP-CTF-Level (Dovey et al. 2001; Ness et al. 2004). Nach finaler Gabe wurden weitere Aufnahmen der gleichen Dendriten über 21 Tage im Abstand von 3-4 Tagen gemacht.

A



B

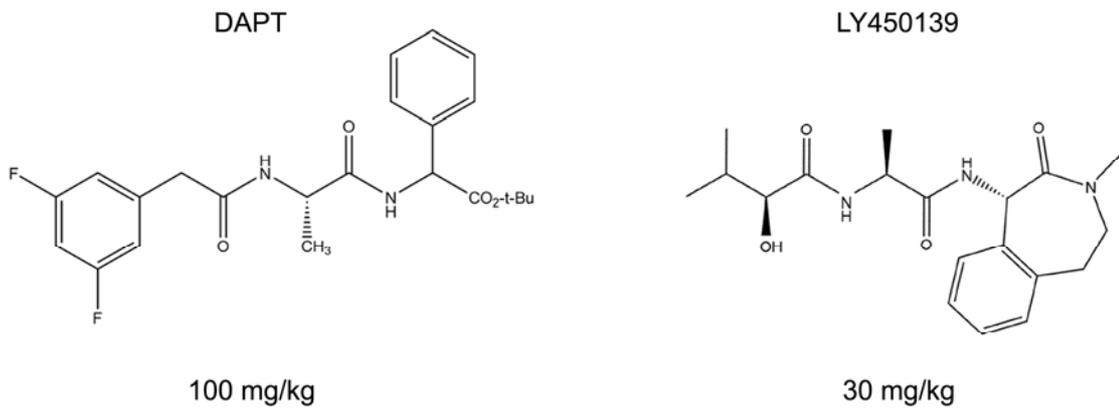


Abb. 12: γ -Sekretase Inhibitor Applikation

(A) Experimentschema mit 21 Tagen Erholungsphase nach der Operation. Es folgten drei Mikroskopie-Zeitpunkte vor subkutaner Applikation der GSI (rote Kästchen) und sieben Mikroskopie-Zeitpunkte (graue Kästchen) nach letzter Gabe. (B) Strukturformeln und verabreichte Dosen der γ -Sekretase Inhibitoren DAPT und LY450139.

2.1.6 Material und Lösungen

Material

1,2-Propanediol	Sigma; 398039
Adapter-Platte (Maße, Material)	Eigenbau
Ankerplättchen	Eigenbau
Bead Sterilizer	FST; 18000-45
Bohrer	Pluradent; Schick-Technikmaster C1
Bohrgestänge	Gebr. Brasseler GmbH; H71 104004
Carprofen	Pfizer
Cremophor EL	Fluka; 27963
Cyano-Veneer Starter Kit	Heinrich Schein Dental; 152251
DAPT (Gamma Secretase Inhibitor IX)	Calbiochem; 565770
Deckglas	VWR; CB00050RA1
Dexamethason	Sigma; D1159-599MG
Digitalkamera	Canon; Powershot A95
Digitalkamera-Adapter für Zeiss Stativ	Zeiss; 426126; 426106-9120; 456006
DMSO	Sigma; D2650
Epifluoreszenz-Lampe HBO 103 W/2	Zeiss; 380301-9350
Ethanol	Sigma
Filtersets Reflektor Modul NDD KP685	Zeiss; 1327-835
Forene	Abbott; B506
Isofluran-Narkose-Gerät	Eigenbau
Kanülen	VWR; 612-0138
Keimöl	Mazola
Ketamin 10 %	WDT; 98047
Laser MaiTai	Spectra Physics; 10 W, 710-920 nm
Lochplatte	Eigenbau
LY450139	Lundbeck (ursprünglich von Eli Lilly)
MethoxyX04	Klunk (Klunk et al. 2002)
Mikroskop Axioskop 2 FS mot; LSM510	Zeiss
Mikroskoptisch	Eigenbau
NaCl	Braun; 6697366.00.00
NaOH	Merck; 1.09137.1000
NDD Filtersets	
1. FT560/BP500-550/BP575/640	Zeiss; 446437/1031-349/447748
2. FT510/BP435-485/LP515	Zeiss; 446434/1031-337/447743

Objektive

Achroplan IR 40x/0,80 W	Zeiss; 440095
Achroplan 10x/0,3 W Ph1	Zeiss; 420947
W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC W	Zeiss; 421452
PBS pH 7,4	Invitrogen; 14190-094
Pinzetten: Gebogene und Adson	FST; 11274-20; 00632-11
Schere	FST; 14028-10
Schrauben	Eigenbau
Software LSM510	Zeiss; Rel3.2
Spritzen	VWR; 6120106
Steriles Wasser	Aqua bidest autoklaviert
Sterile Wattestäbchen	Paul Böttger oHG; 09.113.9105
Texas Red Dextran 70 kDa	MoBiTec; D1830
Vaseline	ABO Pharma
x,y-Verschiebetisch	Luigs und Neumann; 380 FM
Xylazin	WDT; Sedaxylan 20081

Lösungen

Ketamin/Xylazin	6 ml NaCl zur Injektion, 1 ml Ketamin 10 %, 0,25 ml Sedaxylan.
DAPT	5 mg DAPT in 50 μ l EtOH (100 %) lösen und 950 μ l Keimöl zugeben.
LY450139	3 mg/ml in 10 % Cremophor EL Lösung in isotonischem Wasser (5,5 g Glukose in 100 ml Wasser).
MethoxyX04	5 mg MethoxyX04 in 100 μ l DMSO lösen. 450 μ l 1,2-Propanediol sowie 450 μ l PBS pH 7,4 zugeben und tropfenweise 1 N NaOH zugeben.

2.2 Immunohistochemische Färbungen von Maushirnschnitten

Die 2-Photonen intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden durch post mortem durchgeführte Immunohistochemische Färbungen ergänzt, um die beobachteten pathologischen Veränderungen, wie z.B. dystrophe Dendriten oder Nervenzellverlust, mit löslichen A β - und Tau-Ablagerungen zu korrelieren.

2.2.1 Transkardiale Perfusion von Maushirnen

Um Gewebe für die immunohistochemischen Färbungen zu gewinnen, musste das Gehirn fixiert werden. Das geschah durch die transkardiale Perfusion mit 4 % Paraformaldehyd Lösung (PFA) in PBS. Hierbei wurde die Maus zuerst mit Ketamin/Xylazin (0,13 mg/kg Ketamin und 0,01 mg/kg Xylazin Körpergewicht; intraperitoneal) narkotisiert. Durch einen Medianschnitt wurde die Bauchdecke bis zum Sternum geöffnet und der Thoraxraum durch Durchtrennen der Rippen von unten nach oben auf beiden Seiten freigelegt. Daraufhin konnte das Herz freigelegt werden und die linke Hauptkammer (Draufsicht) mit einer Perfusionskanüle injiziert werden. Durch diese Kanüle wurde das Herz zuerst mit 1x PBS gespült. Zum Abfließen des Blutes wurden die dorsalen Blutgefäße durchtrennt. Nach etwa 1-2 min spülen waren die Blutgefäße und Organe weitestgehend blutleer. Daraufhin wurde für weitere 5-10 min mit 4 % PFA gespült. Das Gehirn wurde nun vorsichtig entnommen und über Nacht bei 4° C in 4 % PFA nachfixiert.

2.2.2 Anfertigen und Färben von Maushirnschnitten

Die fixierten Gehirne wurden mit Hilfe eines Vibratoms in 100 µm dicke Schnitte frontal geschnitten. Diese Schnitte wurden mit 2 % Triton X-100 (w/v) in 1x PBS pH 7,4 permeabilisiert und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt. Am folgenden Tag wurde das endogene Biotin geblockt (Biotin Blocking Kit, E-21390, Invitrogen, Karlsruhe). Streptavidin wurde zugegeben und für 4 h bei RT inkubiert. Nach 3 x 15 min waschen in PBS wurden die Schnitte in Biotin für weitere 4 h bei RT inkubiert und wieder für 3 x 15 min in PBS gewaschen. Der Primärantikörper wurde mit 10 % Normal Goat Serum in 1 % BSA (Bovines Serum Albumin) (w/v) 0,1 % Triton X-100 (w/v) durch Inkubation über Nacht bei RT geblockt. Nachdem die Block-Lösung abpipettiert wurde, wurde der Primärantikörper verdünnt in 5 % BSA 0,1 % Triton X-100 hinzugegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Als Primärantikörper wurden die folgenden mit Biotin konjugierten Antikörper in 1:100 Verdünnung verwendet: Anti-β-Amyloid 6E10 mAb, Anti-β-Amyloid Oligomerspezifischer A11 mAb, Anti-human Tau HT7 mAb und Anti-human PHF-Tau AT8 mAb. Daraufhin wurden die Schnitte 3 x 15 min mit PBS gewaschen und mit Streptavidin-HRP in 1 % BSA (TSA-Kit T-20916, Invitrogen, Karlsruhe) über Nacht bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurde wieder 3 x 15 min mit PBS gewaschen. Nun wurde der Sekundärantikörper als Tyramide-Alexa647-Konjugat 1:200 verdünnt in Amplifikationspuffer / 0,0015 % H₂O₂ (TSA-Kit #26 T-20936, Invitrogen, Karlsruhe) für 3 h bei RT inkubiert. Nach 5 x 10 min Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 30 min in einer 145 µM MethoxyX04 Lösung bei RT inkubiert, um fibrilläre Aβ-Plaques anzufärben. Nach 3 x 15 min Waschen in PBS wurden die Schnitte mit „Fluorescent Mounting Medium“ auf Objektträgern eingedeckelt.

2.2.3 Konfokale Mikroskopie

Die so hergestellten immunfluoreszenzmarkierten Schnitte wurden mit Hilfe eines konfokalen „Laser Scan Mikroskops“ aufgenommen (LSM 510 und AxioVert 200). Drei verschiedene Laser wurden zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: Ein Ar ion Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm zur YFP Anregung, ein HeNe Laser bei 633 nm für die AlexaFluor647 Anregung und ein Ti-Saphir Laser bei 750 nm für die MethoxyX04 Anregung. Zwei verschiedene Ölimmersions-Objektive wurden benutzt: 25x (LD LCI Plan-Apochromat NA 0,8) und 40x (Plan-Apochromat NA 1,3). Die xyz-Abstände betragen hierfür 0,18 x 0,18 x 1 μm^3 beziehungsweise 0,11 x 0,11 x 1 μm^3 je nach Objektiv.

2.2.4 Material und Lösungen

Material

Antikörper	6E10; Covance Research Products A11; Invitrogen HT7; Thermo Scientific AT8; Thermo Scientific
Biotin Blocking Kit	Invitrogen; E-21390
BSA	Fluka
Deckglas	VWR; CB00050RA1
DMSO	Sigma; D2650
Fluorescent Mounting Medium	DAKO; S3023
Goat Serum (normal)	DAKO; X0907
Kanülen	VWR; 612-0138
Ketamin 10 %	WDT; 98047
Laser	
MaiTai DeepSee (710-920 nm)	Spectra Physics
Ar ion (488 nm)	Zeiss
HeNe (633 nm)	Zeiss
MethoxyX04	Klunk (Klunk et al. 2002)
Mikroskop AxioVert 200; LSM510	Zeiss
NaCl	Braun; 6697366.00.00
Objektive	
LD LCI Plan-Apochromat 25x/0,8	Zeiss; 440842
Plan-Apochromat 40x/1,3 Oil	Zeiss; 440752
Objekträger	Menzel-Glaser; J31800AMNZ
PBS pH 7,4	Invitrogen; 14190-094

Perfusionskanülen	Hospira Venisystems; P296 A05
PFA	Sigma; 158127
Pinzetten: Gebogene und Adson	FST; 11274-20; 00632-11
Schere	FST; 14028-10
Schüttler	Heidolph; Titramax 1000
Software LSM510	Zeiss; Rel3.2
Spritzen	VWR; 6120106
Triton X-100	Sigma; 103H0421
TSA-Kit #26	Invitrogen; T-20936
Xylazin	WDT; Sedaxylan 20081

Lösungen

Ketamin/Xylazin	6 ml NaCl zur Injektion, 1 ml Ketamin 10 %, 0,25 ml Sedaxylan.
MethoxyX04	5 mg MethoxyX04 in 100 µl DMSO lösen. 450 µl 1,2-Propanediol sowie 450 µl PBS pH 7,4 zugeben und tröpfchenweise 1 N NaOH zugeben.

2.3 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der verwendeten Mauslinien wurden Schwanzbiopsien von mindestens 3 Wochen alten Tieren verwendet. Aus diesen Gewebeproben wurde genomische DNS isoliert (Kapitel 2.3.1) und mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (kurz: PCR; engl. *polymerase chain reaction*) (Kapitel 2.3.2) die, für die eindeutige Bestimmung des Genotyps wichtigen Gene amplifiziert. Hierzu wurden gen-spezifische Oligonukleotide als Primer ausgewählt und verwendet (Tab. 1). Die PCR-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese (Kapitel 2.3.3) aufgetrennt, und der Genotyp der Mäuse anhand des Bandenmusters bestimmt.

2.3.1 DNS-Isolation aus Mausschwanz-Biopsien

Die Isolation genomischer DNS aus Mausschwanzbiopsien wurde mit dem „E.Z.N.A Tissue DNA Mini Kit“ durchgeführt, der alle aufgeführten Lösungen enthält. Dabei wurde nach der beiliegenden Gebrauchsanweisung für Mäuseschwänze verfahren. Zuerst wurde den Mäusen mit einem Skalpell etwa 0,5 cm der Schwanzspitze entfernt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Unter Zugabe von 180 µl Lysispuffer und 25 µl OB Protease wurden die Schwanzproben für 12 h bei 55° C in einem Schüttel-Thermoblock inkubiert. Verbliebene feste Bestandteile wurden abzentrifugiert (10.000 U/min, 5 min) und der

Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNS-Fällung erfolgte durch die Zugabe von 200 µl BL-Puffer und 210 µl Ethanol und anschließendem Vortexen. Dieses Gemisch wurde auf eine HiBind-DNS-Säule gegeben und für 1 min bei 8000 U/min und RT zentrifugiert. Die Säule mit der isolierten DNS wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit je 600 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend für 1 min bei 8000 U/min und RT zentrifugiert. Danach erfolgte die Elution durch Zugabe von zweimal je 200 µl Elutionspuffer und anschließender Zentrifugation bei 8000 U/min für 1 min. Die isolierte DNS wurde bei 4° C gelagert.

2.3.2 PCR

Zur Amplifizierung von DNS wurde die PCR durchgeführt (Saiki et al. 1988). Dazu wurde der HotMasterMix x 2,5 zusammen mit verschiedenen Oligonukleotiden verwendet. Als PCR-Maschine diente der „MasterCycler *epgradient*“ von Eppendorf.

Tab. 1: Oligonukleotide und Sequenzen

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	Tm (°C)
P42	cta ggc cac aga att gaa aga tct	24	59,3
P43	gta ggt gga aat tct agc atc atc c	25	61,3
P872	aag ttc atc tgc acc acc g	19	56,7
P1416	tcc ttg aag aag atg gtg cg	20	57,3
TAU_1	gag gta ttc agt cat gtg ct	20	55,3
TAU_2	ttc aaa gtt cac ctg ata gt	20	51,2
APP%_1	cga gat cag cag cct ctg ttc cac a	25	66,3
APP%_2	atc acc tgg ttc taa tca gag gcc c	25	64,6
APP%_3	gag acg agg acg ctc agt cct agg g	25	69,5
APPswe_1	atg cca tct ttg acc gaa ac	20	55,2
APPswe_3	ctc cac cac acc atg atg aa	20	57,3

Tab. 2: PCR-Ansätze und Programme**PCR-Ansatz und PCR-Programm für YFP-H**

Vol. (µl)	Produkt	Konz.
10	HotMasterMix (x 2,5)	
1	P42	10 µM
1	P43	10 µM
1	P872	10 µM
1	P1416	10 µM
1	Template DNS	
10	H ₂ O	

Schritt	Temp. (°C)	Dauer	Wiederholungen
1	94	1,5 min	x 1
2	94	30 sek	x 35
3	55	1 min	
4	68	1 min	
5	68	10 min	x 1
6	4	∞	

PCR-Ansatz und PCR-Programm für 3TG-AD

Vol. (µl)	Produkt	Konz.
10	HotMasterMix (x 2,5)	
1	TAU_1	10 µM
1	TAU_2	10 µM
1	Template DNS	
12	H ₂ O	

Schritt	Temp. (°C)	Dauer	Wiederholungen
1	94	5 min	x 1
2	94	30 sek	x 35
3	52	30 sek	
4	68	1 min	
5	68	3 min	x 1
6	4	∞	

PCR-Ansatz und PCR-Programm für APPS1

Vol. (µl)	Produkt	Konz.
10	HotMasterMix (x 2,5)	
0,25	PPswAe_1	25 pmol/µl
0,25	APPswe_3	25 pmol/µl
1	Template DNS	
13,5	H ₂ O	

Schritt	Temp. (°C)	Dauer	Wiederholungen
1	96	2 min	x 1
2	94	1 min	x 35
3	54	1 min	
4	72	1 min	
5	72	10 min	x 1
6	4	∞	

PCR-Ansatz und PCR-Programm für APP KO

Vol. (µl)	Produkt	Konz.
10	HotMasterMix (x 2,5)	
0,25	APP%_1	25 mol/µl
0,25	APP%_2	25 mol/µl
0,25	APP%_3	25 mol/µl
1	Template DNS	
13,25	H ₂ O	

Schritt	Temp. (°C)	Dauer	Wiederholungen
1	96	2 min	x 1
2	94	1 min	x 35
3	60	1 min	
4	72	1 min	
5	72	10 min	x 1
6	4	∞	

2.3.3 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNS-Fragmenten

Zur analytischen Auftrennung von DNS-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese benutzt. Hierbei wurde Agarose (1 % w/v) in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 0,1 µg/ml Sybr-Gold versetzt. Die Lösung wurde in eine Schale gegossen und mit einem Geltaschenkamm bestückt. Die erstarrte Agarose wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer überführt. Die DNS-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit 6x Gel Loading Solution versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde ein 100 bp- beziehungsweise 1 kb-DNS-Marker mit auf das

Agarosegel aufgetragen. Die DNS-Fragmente wurden bei einer Spannung von 40 mV für 4 h aufgetrennt. Nach der Auftrennung konnten die DNS-Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

2.3.4 Quantitative PCR zur Feststellung der Homozygotie

Bei der Zucht der 3xTg-AD Mäuse wurden zur Bestimmung der Homozygotie für die Transgene eine quantitative PCR (qPCR) am Lightcycler 2.0 mit Hilfe der „Lightcycler Hybridization Probes“ durchgeführt. Die Bedienung des Lightcyclers 2.0, sowie die Aufbereitung der Daten wurde analog zur Gebrauchsanweisung durchgeführt (Technical note LC13/01, Roche, Penzberg).

Bei der quantitativen PCR wird ein mit herkömmlichen Oligonukleotiden amplifiziertes DNS Segment zusätzlich mit einer fluoreszierenden Sonde markiert. Die Messung der Fluoreszenz spiegelt die Menge an Sonde und somit die Menge an amplifizierter DNS wieder. Daraus lässt sich beim Vergleich der Fluoreszenz von homozygoten und heterozygoten Tieren auf die relative Kopienanzahl des amplifizierten Gens im Vergleich zu den Kontrollen schließen. Als Referenz-Gen diente *blr1* (engl. *blue light regulator 1*).

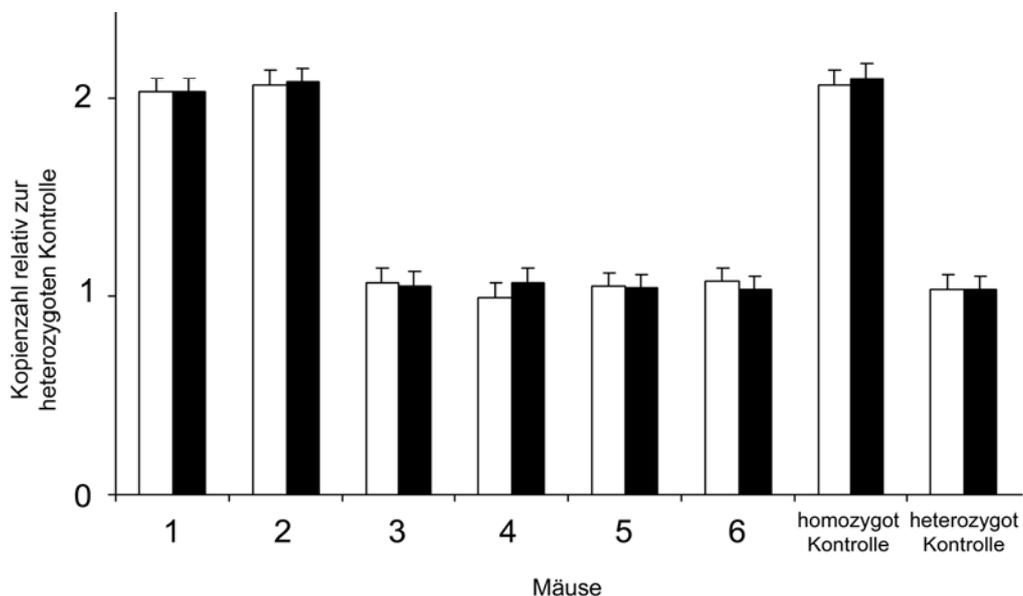


Abb. 13: Beispielhaftes Ergebnis einer quantitativen PCR für 3xTg-AD Mäuse.

Die relative Kopienanzahl des *PS1*-Knockin-Gens (schwarz) sowie des *APP*-Transgens (weiß) der Mäuse 1-6 im Vergleich zu homozygoten und heterozygoten Kontrollmäusen. Somit sind die Mäuse 1 und 2 homozygot und die Mäuse 3-6 heterozygot für die untersuchten Gene.

Tab. 3: Oligonukleotide für die quantitative PCR

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
APP_for	gaa ccc cag att gcc atg ttc tgt gg	26
APP_rev	caa tgc agg ttt tgg tcc ctg atg g	25
PS1_for	tft ccc tct gta gaa tct ac	20
PS1_rev	tga tgg ccg cat tca gga tc	20
BLR1_for	cgg agc tca acc gag acc t	19
BLR1_rev	tgc aaa agg cag gat gaa ga	20

Tab. 4: Sequenzen und Fluoreszenzmarkierungen der Sonden für die quantitative PCR

Name	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)
APP3tg	tga aca tgc aca tga atg tcc aga atg gg	26
PS1	ctg aga ctg tag gcc aaa gag ccc tgc a	25
BLR1YD	ctg ttc cac ctc gca gta gcc gac	21

Name	5' Ende	3' Ende
APP3tg	6-FAM (530nm)	Eclipse Darkquencher
PS1	ROX (610nm)	Eclipse Darkquencher
BLR1YD	Yakima Yellow (560nm)	Eclipse Darkquencher

Tab. 5: PCR-Ansatz für quantitative PCR

Vol. (µl)	Produkt	Konz. (µM)	Hersteller
1	APP_for	2	MWG
1	APP_rev	2	MWG
1	PS1_for	2	MWG
1	PS1_rev	2	MWG
1	BLR1_for	2	MWG
1	BLR1_rev	2	MWG
2,5	APP3tg-Sonde	2	Eurogentec
2,5	PS1-Sonde	2	Eurogentec
2,5	BLR1YD-Sonde	2	Eurogentec
4	FastStart DNA Master ^{PLUS} Hybridization Probes MasterMix (10 µl 1a zu 1b)		Roche
2	DNS Aufgereinigt nach E.Z.N.A Tissue DNA Mini Kit von Peqlab		

Tab. 6: PCR-Programm für quantitative PCR

Schritt	Temp. (C°)	Zeit	Wiederholungen
1	50	2 min	1x
2	95	10 min	1x
3	95	15 sek	40x
4	60	1 min	
5	40	30 sek	1x

2.3.5 Material und Lösungen

Material

Agarose	Sigma; A9793
DNS-Marker	New England Biolabs
Essigsäure	Sigma
E.Z.N.A Tissue DNA Mini Kit	Peqlab; 12-3396-02
Gel Loading Solution 6x	Fermentas; R0611
Mikrowelle	Moulinex; Quickchef 650
Gelkammer	Elchrom Scientific; Origins
HotMasterMix 2,5x	Eppendorf; 0032 002.722
Lightcycler Fast DNA Hybridization Probes	Roche; 03 515 546 001
NaEDTA	Sigma
OB Protease	Peqlab; 12-OB-02
Oligonukleotide	MWG
PCR-Maschine	Eppendorf; MasterCycler <i>ep</i> gradient
qPCR-Sonden	Eurogentec
Quantitative PCR-Maschine	Roche; Lightcycler 2.0
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Schüttel-Thermoblock	Eppendorf; Thermomixer comfort
Spannungsregler	AAHoefer; PS200HC
Steriles Wasser	Aqua bidest autoklaviert
Sybr-Gold	Invitrogen; 417851
Tris	Sigma
UV-Lampe	UVP; 3UV Transilluminator
Vortexer	Scientific Industries; Vortex Genie 2
Zentrifuge	Eppendorf; 5415R

Lösungen

TAE-Puffer 5x	242 g Tris 18,62 g NaEDTA 57 ml Essigsäure auf 1 l mit sterilem H ₂ O auffüllen.
---------------	---

2.4 Mauslinien

Zur Intravitalmikroskopischen Analyse wurden verschiedene transgene Mauslinien verwendet. Die 3xTg-AD Mäuse wurden von Prof. F. LaFerla (University of California, Irvine, USA) bezogen. Die APPPS1 Mäuse wurden von Prof. M. Jucker (Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen) bereitgestellt, während die APP KO Mäuse von Prof. U. Müller (Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie, Heidelberg) stammen. Um Nervenzellen, Dendriten und dendritische Spines in diesen Mauslinien für die 2-Photonen Intravitalmikroskopie sichtbar zu machen, mussten alle oben genannten Mauslinien mit der Linie B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J verkreuzt werden. Diese Linie wurde von FENG (Feng et al. 2000) hergestellt und über „Jackson Laboratories“ (Maine; USA) bezogen. Alle Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltungseinrichtung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der LMU in München unter Standardbedingungen verpaart und gehalten.

2.4.1 B6.Cf-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J

Die Mauslinie B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J (kurz: YFP-H) wurde auf dem genetischen Hintergrund der Linie C57Bl6 gezüchtet. Diese Mäuse tragen ein Transgen für *YFP* aus der Alge *Aequorea victoria* (Ormo et al. 1996). Die Expression dieses Transgens wird durch den Thy1.2-Promotor reguliert (Feng et al. 2000), der aus einem modifizierten Thy1-Promotor hervorgeht (Caroni 1997; Kelley et al. 1994; Vidal et al. 1990). Thy-1 ist ein GPI-verankertes Zelloberflächen-Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen exprimiert wird, z.B. im Thymus und im Nervensystem (Caroni 1997). Das Konstrukt besteht aus 6,5 kb des murinen *thy1.2*-Gens und erstreckt sich vom Promotor bis zum Intron hinter Exon4, wobei Exon3 und dessen flankierende Introns nicht vorhanden sind. Die gelöschten Sequenzen werden für die Expression in nicht-neuronalen Zellen benötigt, während die upstream liegenden Intron-Sequenzen für die Expression in Nervenzellen notwendig sind (Vidal et al. 1990). Somit können die YFP-exprimierenden Nervenzellen dieser Mauslinie durch Laserlicht angeregt und dadurch mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Neben dem Soma der Nervenzellen wird YFP auch in den Dendriten und dendritischen Spines exprimiert. Mäuse der YFP-H Linie wurden wie unter 2.3 beschrieben genotypisiert. In allen Experimenten wurden ausschließlich Tiere verwendet, die heterozygot für das *YFP*-Transgen waren.

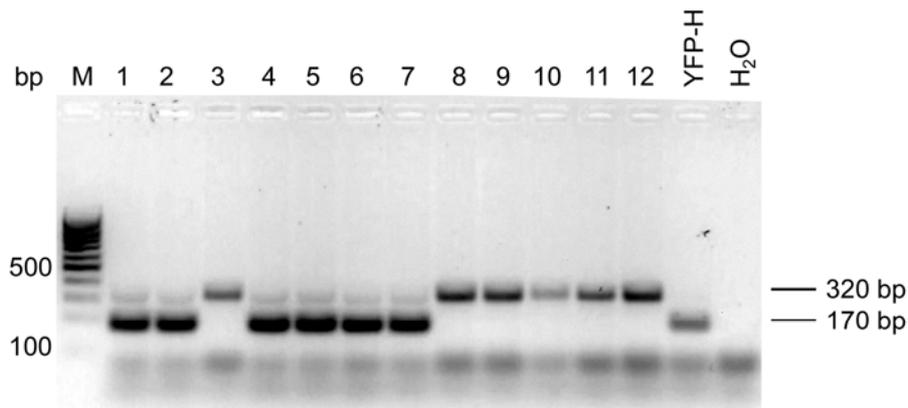


Abb. 14: Agarosegel zur Genotypisierung von Mäusen der Linie YFP-H.

Die Bande bei 320 bp ist das PCR-Produkt des Interleukin 2 (IL-2), wobei die Bande bei 170 bp spezifisch für das PCR-Produkt des YFP. IL-2 wurde als Kontrolle eingesetzt um eine erfolgreiche PCR nachzuweisen. In der kompetitiven PCR wurden insgesamt vier Primer verwendet (P42, P43 für IL-2, P872, P1416 für YFP), so dass bei YFP-transgenen Mäusen nur die Bande bei 170 bp und bei nicht-vorhandenem YFP-Transgen hingegen nur die Bande bei 320 bp erscheint. Die Mäuse 1, 2, 4, 5, 6 und 7 sind positiv für das YFP-Transgen. Als Positivkontrolle wurde eine YFP-H Maus und H₂O als Negativkontrolle verwendet. M: Marker, 100 bp Leiter; bp: Basenpaare;

2.4.2 3xTg-AD

Die Tiere der Linie 3xTg-AD tragen die zwei Alzheimer-Transgene *APP* (Schwedische Doppelmutation KM670/671NL) und *Tau* (P301L Mutation) sowie eine Knockin-Mutation des *PS1*-Gens (M146V Mutation) auf einem C57Bl6 x 129sv Hintergrund (Oddo et al. 2003). Die *APP*- und *Tau*-Transgene wurden in Exon 3 des Thy1.2-Promotors (siehe Kapitel 2.4.1) kloniert und werden somit ebenfalls unter dem Thy1.2-Promotor exprimiert. Beide Konstrukte wurden gleichzeitig per Pronucleus-Injektion in Einzelzell-Embryonen der homozygoten PS1 (M146V) Knockin-Linie injiziert. Alle drei Gene liegen auf ein und demselben Locus und werden somit gemeinsam vererbt. Aus diesem Grund ist der Nachweis von nur einem der Gene bei der Genotypisierung notwendig, um Rückschlüsse auf das Vorhandensein der beiden anderen Gene zu ziehen. Für alle hier beschriebenen Experimente wurden ausschließlich Tiere verwendet, die homozygot für die drei Alzheimer-Gene waren.

Bei 3xTg-AD Mäuse kommt es ab einem Alter von 4 Monaten zu ersten Ablagerungen von intrazellulärem A β im Kortex, gefolgt von extrazellulärem A β ab 6 Monaten. Jedoch wurden, bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, in Layer 1-5 des somatosensorischen Kortex zu keinem Zeitpunkt A β -Plaques gefunden, wohl aber in anderen Hirnregionen, wie z.B. dem Frontalen Kortex und dem Hippocampus. Ab einem Alter von 12 Monaten sind hyperphosphoryliertes Tau und neurofibrilläre Bündel im Kortex immunohistochemisch nachweisbar. Neben diesen Befunden zeigen die Mäuse der 3xTg-AD Linie kognitive Beeinträchtigungen ab 4 Monaten, sowie Defizite im LTP (engl. *long-term potentiation*) ab 6

Monaten. Aufgrund der Kombination aus A β - und Tau-Pathologie und der Tatsache, dass kognitive Beeinträchtigungen lange vor Bildung von A β -Plaques und neurofibrillären Bündeln auftreten, stellt das 3xTG-AD Modell ein sehr interessantes Modell zur Untersuchung des Synapsenuntergangs in Abwesenheit von A β -Plaques an transgenen Alzheimer-Mausmodellen dar.

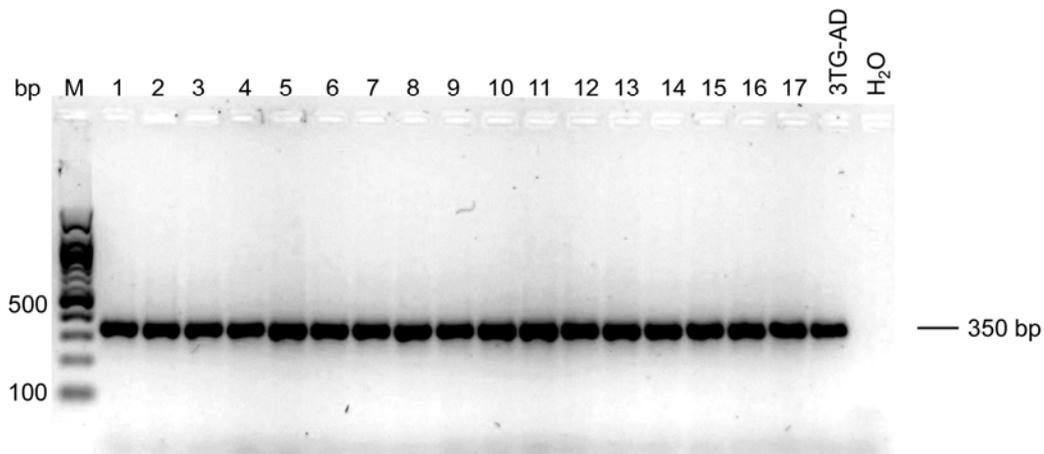


Abb. 15: Agarosegel zur Genotypisierung von Mäusen der Linie 3xTg-AD.

Die Bande bei 350 bp repräsentiert das *Tau*-Transgen. Positiv für das Transgen sind alle Mäuse von 1-17. Als Positivkontrolle wurde eine 3xTg-AD Maus aus der Gründer-Generation verwendet, sowie H₂O als Negativkontrolle. M: Marker, 100 bp Leiter; bp: Basenpaare;

2.4.3 APPPS1

APPPS1 Mäuse tragen Transgene für *PS1* (L166P Mutation) und *APP* (Schwedische Doppelmutation KM670/671NL) auf einem reinen C57Bl6 Hintergrund (Radde et al. 2006). Die Herstellung der Mäuse erfolgte durch Injektion der beiden Konstrukte in Oozyten des C57Bl6 Stammes. Beide Transgene werden über den neuronenspezifischen Thy1.2-Promotor (siehe 2.4.1) exprimiert und liegen auf einem Locus, sodass beide Transgene gemeinsam vererbt werden. Dadurch ist der Nachweis von nur einem Transgen bei der Genotypisierung ausreichend. Für alle hier beschriebenen Experimente wurden ausschließlich Tiere verwendet, die heterozygot für beide Transgene waren.

APPPS1 Mäuse zeigen in Western Blot Analysen eine zweifache Überexpression des transgenen humanen APP gegenüber dem endogenen Maus APP. Ab einem Alter von 6-8 Wochen bildet sich eine Amyloidose im Kortex aus, wobei viel parenchymales A β , jedoch wenig A β -Ablagerung in den Blutgefäßen (Angiopathie) vorhanden ist. Nach 4 Monaten sind A β -Plaques in allen Schichten des Kortex zu sehen, wobei kognitive Beeinträchtigungen, sowie ein Verlust an Nervenzellen im Neokortex erst ab einem Alter von 8 Monaten zu beobachten sind (Radde et al. 2006).

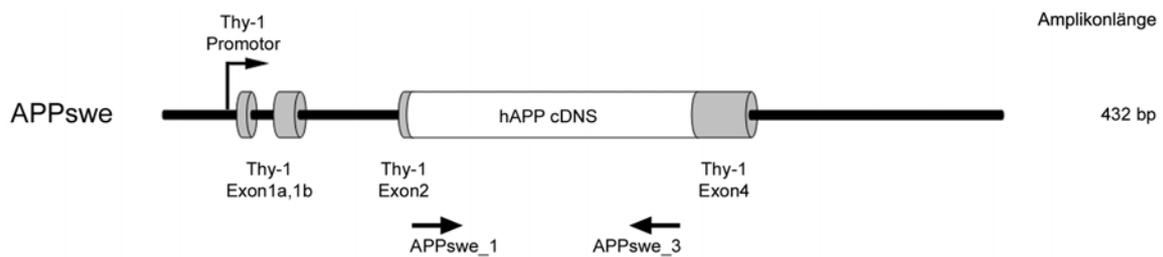


Abb. 16: Schematische Darstellung des Thy-1 Genpromotorkonstrukts bei APPS1 Mäusen

Das *APPswe* Konstrukt wurde hinter den Thy-1.2 Promotor zwischen Exon2 und Exon4 kloniert. Rechts ist die resultierende Amplikonlänge 432 bp dargestellt, die durch die PCR mit den Oligonukleotiden *APPswe_1* und *APPswe_3* amplifiziert wurde. bp: Basenpaare;

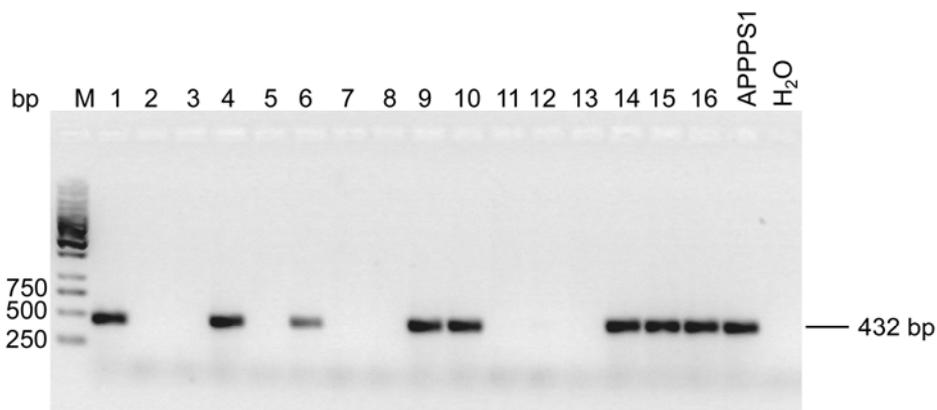


Abb. 17: Agarosegel zur Genotypisierung von Mäusen der Linie APPS1.

Die Bande bei 432 bp repräsentiert das *APPswe*-Transgen. Positiv für *APPswe* sind die Mäuse 1, 4, 6, 9, 10 und 14-16. Als Positivkontrolle wurde eine transgene APPS1 Maus aus der Gründer-Generation verwendet sowie H₂O als Negativkontrolle. M: Marker, 1 kb Leiter; bp: Basenpaare;

2.4.4 APP-Knockout

Bei der Herstellung der APP-Knockout-Mauslinie (APP KO) wurde ein 200 kb großer, die Exons 3 bis 17 umfassender Abschnitt des *APP*-Gens deletiert (Abb. 18). Das Konstrukt wurde daraufhin durch eine Blastozysteninjektion in embryonale Stammzellen auf einem C57Bl6 x 129Ola Hintergrund eingebracht (Li et al. 1996). Homozygote APP KO Mäuse sind lebensfähig und fertil, wiegen allerdings 15-20 % weniger als WT Mäuse (Magara et al. 1999). Ebenso ist das Gewicht des Gehirns bei APP KO Mäusen verringert (Müller 1994). Neben einer Beeinträchtigung der Langzeit-Gedächtnisfunktion zeigen diese Tiere unter anderem Defizite im LTP (Dawson et al. 1999). Die in dieser Arbeit untersuchten Mäuse waren entweder homozygot APP KO (*APP*^{-/-}) oder hatten noch ein wildtyp *APP*-Allel und waren somit heterozygot APP KO (*APP*^{+/-}).

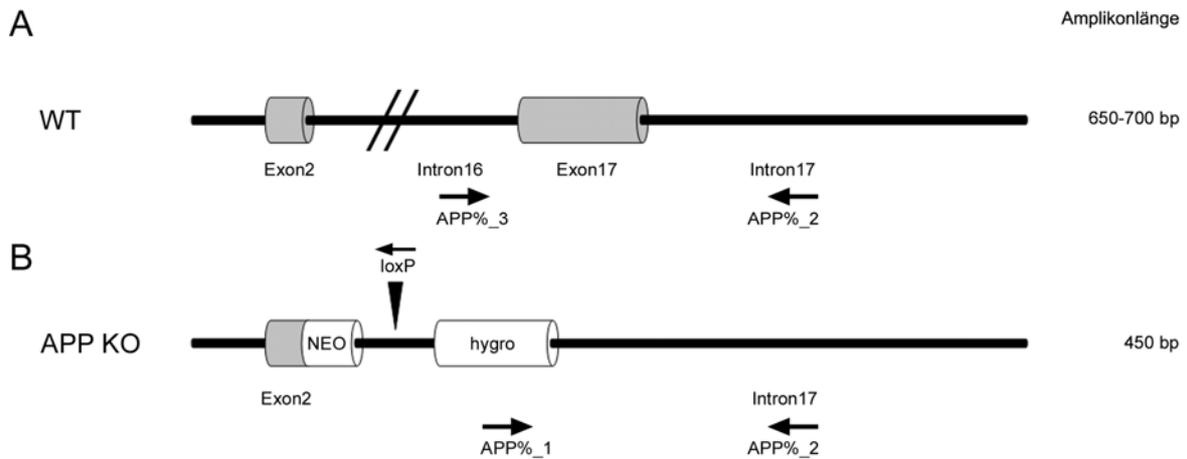


Abb. 18: Wildtyp APP und das APP-Konstrukt bei APP KO Mäuse

(A) Wildtyp *APP*-Gen. (B) Unterbrechung des murinen *APP*-Allels bei der APP KO Maus durch cre/lox vermittelte Rekombination. Rechts sind die resultierenden Amplikonlängen dargestellt, die durch die PCR mit den Oligonukleotiden APP%_1 und APP%_2 beziehungsweise APP%_3 und APP%_2 amplifiziert wurden. bp: Basenpaare;

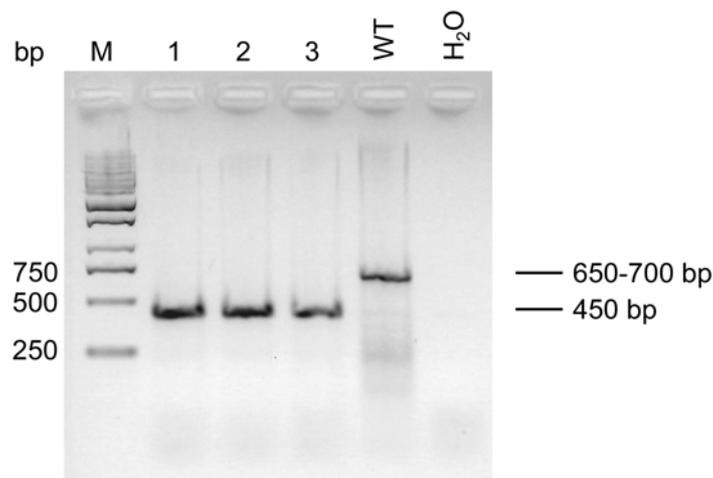


Abb. 19: Genotypisierung von Mäusen der Linie APP KO.

Die Bande bei 650-700 bp repräsentiert das wildtyp *APP*-Gen. APP KO, und damit ohne wildtyp *APP*-Gen sind die Mäuse 1-3. Als Positivkontrolle wurde eine wildtyp C57Bl6 Maus (WT) verwendet sowie H₂O als Negativkontrolle. M: Marker, 1 kb Leiter; bp: Basenpaare;

3 Ergebnisse

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der therapeutische Nutzen einer A β -Senkung auf die Synapsen lebender Mäuse untersucht. Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der pathophysiologischen Rolle von A β . Hierbei wurden anhand von transgenen Alzheimer-Mausmodellen, deren A β -Spiegel progressiv ansteigt, die Umstände und Mechanismen des Synapsenuntergangs identifiziert. Insbesondere der Einfluss von Tau sowie die zeitliche Abfolge der pathologischen Ereignisse, die dem Synapsenverlust zugrunde liegen, wurden hierbei untersucht.

3.1 Effekte der A β -Senkung auf die strukturelle Spine-Plastizität

Um die Auswirkungen einer verringerten A β -Menge auf die strukturelle Plastizität von Synapsen *in vivo* zu untersuchen, wurden Anzahl und Form dendritischer Spines von APP KO und WT Mäusen mit Hilfe der 2-Photonen Intravitalmikroskopie miteinander verglichen. 4-6 Monate alte homozygote APP KO Mäuse (APP $^{-/-}$) zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen heterozygoten APP KO (APP $+/-$) Wurfgeschwistern und WT Mäusen eine signifikante Erhöhung der basalen Spinedichte (Abb. 20A und B; $0,61 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,46 \pm 0,2 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,35 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Wilcoxon-Rangsummentest; $n=70$ vs. $n=33$ vs. $n=66$ dendritische Elemente in insgesamt $n=29$ Mäusen). Die erhöhte Anzahl an dendritischen Spines in APP KO Mäusen resultierte aus einer erhöhten Dichte an persistenten Spines im Vergleich zu WT Mäusen (Abb. 21C; $0,62 \pm 0,05 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,31 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Wilcoxon-Rangsummentest; $n=5$ Mäuse pro Gruppe). Im Gegensatz hierzu war die Dichte der transienten Spines nicht erhöht und bleibt auf einem mit WT Mäusen vergleichbaren Niveau von $0,03 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ (Abb. 21D). Die allgemeine Spinedichte, sowie die Dichte der transienten und persistenten Spines blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum von 31 Tagen unverändert (Abb. 21A, C und D).

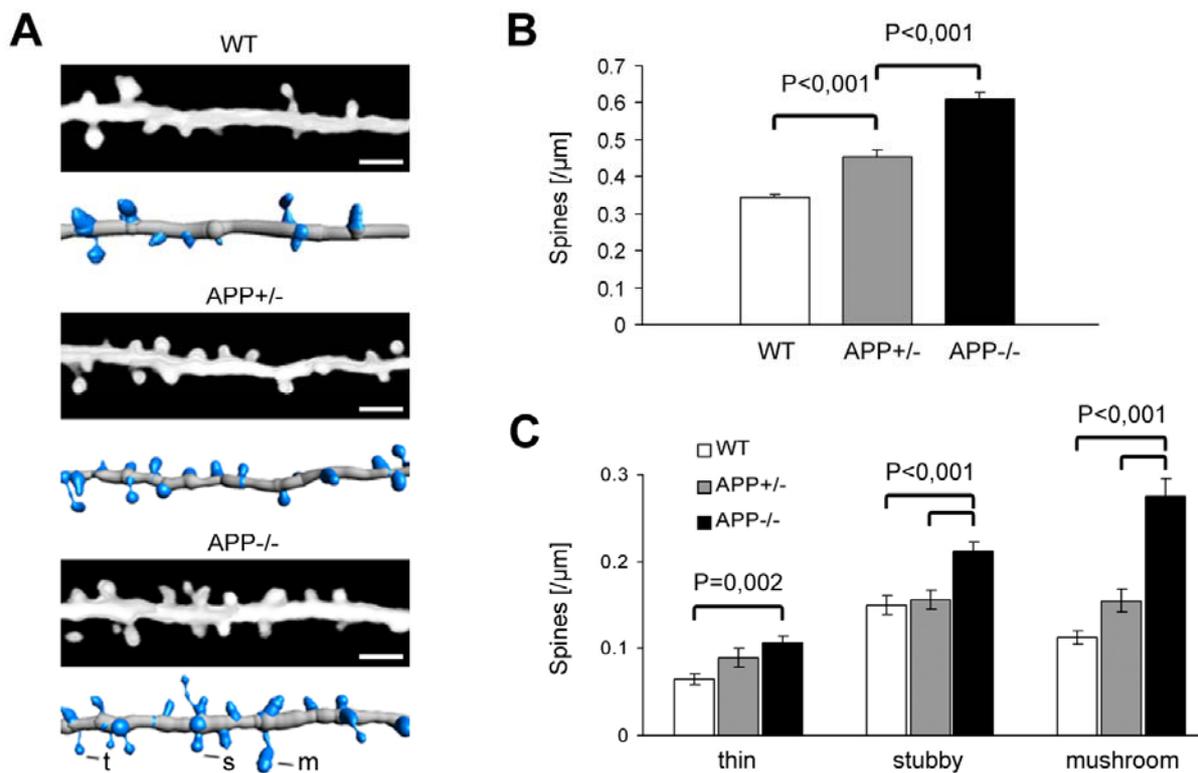


Abb. 20: Spinedichte und Spineform in Relation zur APP-Expression

(A) 2-Photonen intravitalmikroskopische Aufnahmen sowie die mit der Software Imaris generierten Abbilder von Dendriten (grau) und Spines (blau) in 4-6 Monate alten APP^{-/-}, APP^{+/-} und WT Mäusen. Exemplarisch sind *thin* (t), *stubby* (s) und *mushroom* (m) Spines gekennzeichnet. Größenstandard: 3 μm ; (B) Dendritische Spinedichten von APP^{-/-}, APP^{+/-} und WT Mäusen. Fehlerbalken als SEM (C) Dendritische Spinedichten von APP^{-/-}, APP^{+/-} und WT Mäusen klassifiziert nach Spineform *thin*, *stubby* und *mushroom*. Fehlerbalken als SEM.

Neben der Klassifizierung der Spines nach Lebensdauer in persistente und transiente Spines, besteht die Möglichkeit der Unterscheidung nach Spineform in „*mushroom*“, „*stubby*“ und „*thin*“ (siehe Kapitel 1.5.2). Hierzu wurde die Form der dendritischen Spines zwischen homozygoten APP KO, heterozygoten APP KO und WT Mäusen mit Hilfe des Computerprogramms 3DMA (Koh et al. 2002) automatisiert verglichen. Hierbei zeigten homozygote APP KO Mäuse einen signifikant erhöhten Anteil aller drei Spineformen im Vergleich zu heterozygoten APP KO Wurfgeschwistern und WT Mäusen (Abb. 20C; *thin* $0,11 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,09 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,07 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; $P = 0,002$; *stubby* $0,21 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,16 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; *mushroom* $0,28 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,16 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,11 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; einfache Varianzanalyse; $n=49$ vs. $n=30$ dendritische Elemente in $n=12$ Mäusen). Die um das 2,4-fache vermehrte Anzahl an *mushroom* Spines in homozygoten APP KO Mäusen stellte den proportional am stärksten erhöhten Anteil dar. *Mushroom* Spines gehören zur Klasse der persistenten Spines und somit zu den Spines, die meistens funktionelle Synapsen ausbilden (siehe Kapitel 1.5.2). Dies ließ darauf schließen, dass APP KO im Vergleich zu WT Mäusen eine erhöhte Anzahl funktioneller Synapsen

ausbildeten. Ferner konnte gezeigt werden, dass nicht nur die vollständige Abwesenheit von A β in homozygoten APP KO Mäusen, sondern auch eine reduzierte A β -Menge bei heterozygoten APP KO Mäusen, zu einer erhöhten Anzahl an Synapsen führte. Es konnte somit eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der vorhandenen Menge an A β und der Anzahl an Synapsen nachgewiesen werden.

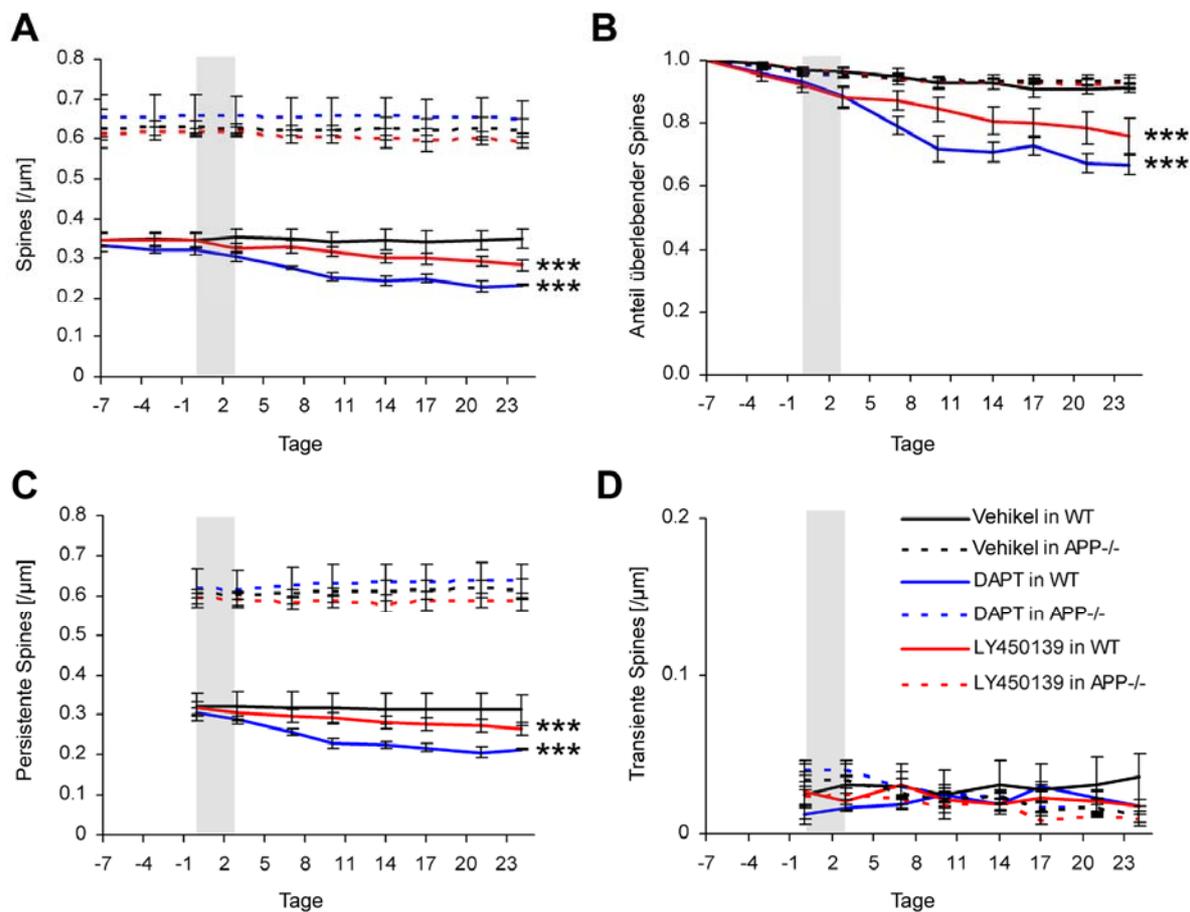


Abb. 21: Quantifizierte Veränderung dendritischer Spines nach γ -Sekretase Inhibition

(A-D) Zeitverläufe von WT und APP-/- Mäusen nach Gabe von DAPT, LY450139, und nur Vehikel ohne GSI relativ zu Tag 0. Tag 0 ist der erste Tag der insgesamt 4-tägigen GSI-Applikation (graue Säule). Alle Daten sind Mittelwerte über Mäuse mit Fehlerbalken als SEM; *** entspricht $P < 0,001$; **(A)** Veränderung der Spinedichte über die Zeit **(B)** Veränderung des Anteils überlebender Spines **(C)** Veränderung der persistenten Spinedichte **(D)** Veränderung der transienten Spinedichte.

Nachdem hier gezeigt werden konnte, dass die vollständige beziehungsweise teilweise Reduktion der A β -Menge sich positiv auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines im lebenden Mausmodell auswirkt, stellte sich die Frage, ob der gleiche Effekt auch nach einer kurzzeitigen Senkung des A β -Spiegels in WT Mäusen beobachtet werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden γ -Sekretase Inhibitoren (GSI) eingesetzt, die temporär die Spaltung von β CTF zu A β und AICD beziehungsweise α CTF zu p3 und AICD pharmakologisch blockieren (Dovey et al. 2001). Als Folge kam es zu einer Reduktion der Menge an A β , p3 und AICD im Gehirn, wobei gleichzeitig erhöhte Mengen der γ -Sekretase Substrate APP-CTFs akkumulierten (Dovey et al. 2001). Die Veränderung der dendritischen Spinedichte mit und ohne beziehungsweise vor und nach GSI-Gabe wurde mit Hilfe der 2-Photonen Intravitalmikroskopie untersucht.

Die verabreichte tägliche Dosis an GSI entsprach den wirksamen Mengen, die in vorhergehenden Experimenten kurzzeitig den A β -Spiegel um 40 % beziehungsweise 60% gesenkt haben (Dovey et al. 2001; Ness et al. 2004). In WT Mäusen kam es nach täglicher Gabe von 100 mg/kg DAPT an 4 aufeinanderfolgenden Tagen zu einer kontinuierlichen Verringerung der Spinedichte über 21 Tage nach der letzten Applikation des GSI (Abb. 21A und Abb. 22A; $0,33 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,23 \pm 0,00 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; $n=5$ Mäuse pro Gruppe). Ein analoger Effekt konnte nach täglicher Gabe von 30 mg/kg LY450139 an 4 aufeinanderfolgenden Tagen beobachtet werden (Abb. 21A und Abb. 22A; $0,35 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,28 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; $n=5$ Mäuse). Im Gegensatz hierzu blieb die Spinedichte von Kontrollmäusen, die nur mit Vehikel, also ohne GSI behandelt wurden, unverändert bei $0,34 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ (Abb. 21A und Abb. 22B; $n=5$ Mäuse). Der kontinuierliche Spineverlust nach GSI-Gabe war zusätzlich am verringerten Anteil an überlebenden Spines 21 Tage nach der letzten Applikation erkennbar (Abb. 21B; DAPT $0,67 \pm 0,03$ vs. LY450139 $0,76 \pm 0,06$ vs. nur mit Vehikel behandelte $0,91 \pm 0,02$; $P < 0,001$; Wilcoxon-Rangsummentest; $n=5$ Mäuse pro Gruppe). Hierbei war ein kontinuierlicher Verlust von persistenten Spines der Grund für die Verringerung der Spinedichte nach GSI-Applikation (Abb. 21C; DAPT: $0,31 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,21 \pm 0,00 \mu\text{m}^{-1}$; LY450139: $0,32 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,27 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; $n=5$ Mäuse). Die Dichte der transienten Spines blieb hingegen unverändert bei $0,02 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ (Abb. 21D). Zusammenfassend konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass die temporäre Senkung des A β -Spiegels durch pharmakologische Blockierung der γ -Sekretase Aktivität in lebenden WT Tieren nicht zu einer Erhöhung der Spinedichte führte. Es kam vielmehr zum gegenteiligen Effekt, nämlich zu einer Verminderung der Anzahl an dendritischen Spines.

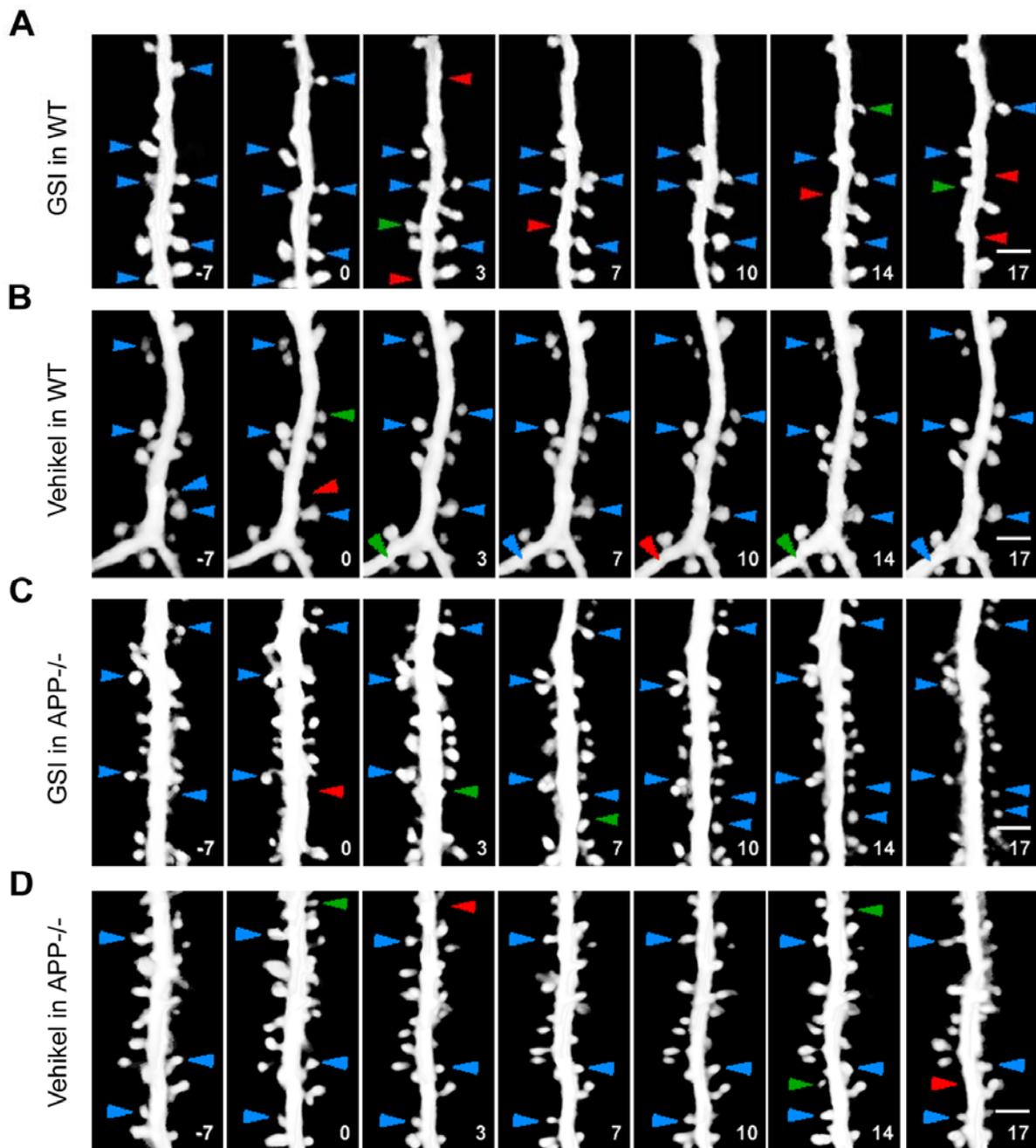


Abb. 22: Veränderung dendritischer Spines nach γ -Sekretase Inhibitor Applikation

(A-D) 2-Photonen intravitalmikroskopische Aufnahmen von Dendriten in 4-6 Monate alten Mäusen im Zeitverlauf relativ zu Tag 0. Tag 0 ist der erste Tag der insgesamt 4-tägigen GSI-Applikation. Exemplarisch sind stabile Spines (blau), verlorengegangene Spines (rot) und neu entstandene Spines (grün) markiert. Größenstandards: 3 μm ; **(A)** WT Mäuse mit Gabe von GSI. **(B)** WT Mäuse mit Gabe von Vehikel ohne GSI **(C)** APP^{-/-} Mäuse mit Gabe von GSI **(D)** APP^{-/-} Mäuse mit Gabe von Vehikel ohne GSI.

Basierend auf den bisherigen Befunden, stellte sich die Frage nach der Ursache des Synapsenverlusts nach GSI-Applikation bei WT Mäusen. Hierbei galt zu berücksichtigen, dass die hier verwendeten GSI neben der APP-Prozessierung auch die Prozessierung von über 50 weiteren γ -Sekretase Substraten blockierten. Somit kam es neben der Reduktion des A β -Spiegels auch zu einer Verminderung von nicht-APP-verwandten γ -Sekretase Produkten. Die entscheidende Frage war nun, ob explizit die Blockierung der APP-Prozessierung und damit die Reduktion des A β -Spiegels ursächlich für den Synapsenverlust war, oder ob die Blockierung der Prozessierung eines anderen γ -Sekretase Substrats dafür verantwortlich war. Zur Beantwortung dieser Frage, wurden die bereits bei WT Mäusen verwendeten γ -Sekretase Inhibitoren in einem weiteren Experiment auch bei APP KO Mäusen verabreicht.

Im Gegensatz zu WT Mäusen, zeigten APP KO Mäuse weder nach Gabe von DAPT noch von LY450139 eine Verringerung der Spinedichte. Diese blieb unverändert auf einem Niveau von $0,65 \pm 0,05 \mu\text{m}^{-1}$ (Abb. 21A und Abb. 22C). Auch der Anteil an überlebenden Spines war vergleichbar mit Kontrollen und lag 21 Tage nach der letzten Applikation bei $0,93 \pm 0,02$ (Abb. 21B). Des Weiteren blieb die Dichte der persistenten (Abb. 21C) und transienten Spines (Abb. 21D) über die gesamte Beobachtungszeit unverändert bei $0,62 \pm 0,05 \mu\text{m}^{-1}$ beziehungsweise $0,03 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$. Dies entsprach Werten ähnlich denen vor GSI-Applikation beziehungsweise denen bei Verabreichung von nur Vehikel ohne GSI. Dieser Befund beweist, dass der negative Effekt der GSI auf die Spinedichte in WT Mäusen auf den selektiven Eingriff in die APP-Prozessierung zurückzuführen war und nicht durch die Inhibition der Prozessierung eines anderen γ -Sekretase Substrates hervorgerufen wurde.

3.2 Effekte der A β -Akkumulation auf die strukturelle Spine-Plastizität

Der folgende Teil der Arbeit befasste sich mit der pathophysiologischen Rolle von A β . Hierbei wurden anhand von zwei transgenen Alzheimer-Mausmodellen, deren A β -Spiegel progressiv ansteigt, die Umstände und Mechanismen des Synapsenuntergangs identifiziert. Beim 3xTg-AD Mausmodell kommt es zu einer kombinierten A β - und Tau-Pathologie, wogegen das zweite Modell (APPPS1) ausschließlich eine A β -Pathologie ohne die Transgen-induzierte Expression von Tau ausbildet. In beiden Mausmodellen wurden Regionen in Abwesenheit beziehungsweise abseits von A β -Plaques analysiert. Insbesondere der Einfluss von Tau sowie die zeitliche Abfolge der pathologischen Ereignisse, die dem Synapsenverlust zugrunde liegen, wurden hierbei untersucht.

Mittels 2-Photonen Intravitalmikroskopie wurden ein und dieselben dendritische Spines (insgesamt 100.642 analysierte Spines in 32 Mäusen) in 4 verschiedenen Altersgruppen (4-6, 8-10, 13-15 und 18-20 Monate) im somatosensorischen Kortex von 3xTg-AD Mäusen und gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen (n=4 Mäuse pro Altersgruppe und Mauslinie) über Zeiträume von 55-60 Tagen im Abstand von 3-4 Tagen untersucht. Zusätzlich wurden Nervenzellen in Layer 3 und Layer 5 des somatosensorischen Kortex beobachtet.

Bei 4-6 Monate alten 3xTg-AD Mäusen blieb die dendritische Spinedichte über einen Beobachtungszeitraum von 55 Tagen unverändert bei $0,43 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$. Dieser Wert war mit der dendritischen Spinedichte von gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen vergleichbar (Abb. 23A und B). Des Weiteren zeigten diese Mäuse weder signifikante Veränderungen in der Dichte der transienten, noch der persistenten Spines über 55 Tage (Abb. 23C und D). Ebenso war bei 4-6 Monate alten 3xTg-AD Mäusen kein Unterschied im Anteil entstandener und verlorengangener Spines zu beobachten (Abb. 23E und F). Bei 8-10 Monate alten 3xTg-AD Mäusen lag die Spinedichte über 60 Tage weiterhin unverändert bei $0,44 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ und war auch in diesem Alter vergleichbar mit nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen (Abb. 23A und B). Auch in diesem Alter blieb die Dichte an transienten und persistenten Spines unverändert (Abb. 23C und D). Analog verhielt es sich mit dem Anteil entstandener und verlorengangener Spines (Abb. 23E und F). Ab einem Alter von 13-15 Monaten zeigten 3xTg-AD Mäusen einen signifikanten Rückgang dendritischer Spines über 60 Tage (Abb. 23B; $0,42 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,36 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; n=4 Mäuse pro Gruppe), wogegen bei gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen kein signifikanter Unterschied zu beobachten war (Abb. 23B). Der Rückgang der Spinedichte bei 3xTg-AD Mäusen war ausschließlich auf eine Verringerung der persistenten Spinedichte zurückzuführen (Abb. 23C;

$0,38 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,34 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; $n=4$ Mäuse pro Gruppe). Interessanterweise blieb die Dichte der transienten Spines über 60 Tage unverändert, war jedoch im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen signifikant erhöht (Abb. 23D; $0,028 \pm 0,008 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,012 \pm 0,004 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$, Wilcoxon-Rangsummentest; $n=4$ Mäuse pro Gruppe). Diese gegenläufigen Beobachtungen bezüglich der Dichte von transienten und persistenten Spines resultierten zum einen aus einem signifikant erhöhten Anteil verlorengangener Spines (Abb. 26D; $4,9 \pm 0,3 \%$ zu $2,6 \pm 0,2 \%$; $P < 0,001$, Wilcoxon-Rangsummentest; $n=4$ Mäuse pro Gruppe) und zum anderen aus einem signifikant erhöhten Anteil entstandener Spines im Vergleich zu Kontrollmäusen (Abb. 23E; $5,1 \pm 0,4 \%$ zu $2,1 \pm 0,2 \%$; $P < 0,001$, Wilcoxon-Rangsummentest; $n=4$ Mäuse pro Gruppe). Im Bezug auf die entstandenen Spines konnte gezeigt werden, dass sowohl neue Spines entstanden, als auch zuvor verlorengangene Spines an gleicher Stelle wieder auftraten. Der Anstieg an entstandenen Spines spiegelte vermutlich einen kompensatorischen Mechanismus für den Verlust von Spines wider. Dieser Mechanismus konnte jedoch den Verlust an Spines nicht vollständig ausgleichen, was zu einer Verringerung der allgemeinen Spinedichte bei 13-15 Monate alten 3xTg-AD Mäusen führte.

Der erstmals bei 13-15 Monate alten 3xTg-AD Mäusen beobachtete Untergang von dendritischen Spines nahm in 18-20 Monate alten 3xTg-AD Mäusen zu (Abb. 23B; $0,44 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,33 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; $n=4$ Mäuse pro Gruppe). Im Vergleich dazu blieb auch in diesem Alter die Spinedichte von nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen unverändert (Abb. 23B). Bei 18-20 Monate alten 3xTg-AD Mäusen war die verringerte Spinedichte ebenso wie bei 13-15 Monate alten Mäusen in einem Verlust von persistenten Spines begründet (Abb. 23C; $0,40 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,33 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen). Jedoch war im Vergleich zu 13-15 Monate alten 3xTg-AD Mäusen die Dichte an transienten Spines nicht erhöht und blieb unverändert auf einem Niveau vergleichbar mit dem von Kontrollmäusen (Abb. 23D). Der Anteil an verlorengangenen Spines war im Gegensatz zu Kontrollmäusen signifikant erhöht (Abb. 23E; $4,0 \pm 0,4 \%$ zu $1,7 \pm 0,2 \%$; $P < 0,001$, Wilcoxon-Rangsummentest), jedoch wurde kein Unterschied bezüglich des Anteils an entstandenen Spines zwischen gleichaltrigen 3xTg-AD und Kontrollmäusen beobachtet (Abb. 23F). Hieraus ließ sich ableiten, dass der bei 13-15 Monate alten 3xTg-AD Mäusen beobachtete kompensatorische Mechanismus in 18-20 Monate alten Tieren nicht mehr aktiv war. Als Folge zeigten 18-20 Monate alte 3xTg-AD Mäuse einen erhöhten Verlust dendritischer Spines im Vergleich zu 13-15 Monate alten Tieren (13-15 Monate: $1,84 \pm 0,84 \text{ Spines Tag}^{-1} \text{ mm}^{-1}$ zu 18-20 Monate: $4,25 \pm 0,79 \text{ Spines Tag}^{-1} \text{ mm}^{-1}$; $P = 0,042$; studentischer t-Test).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 3xTg-AD Mäuse erst ab einem Alter von 13 Monaten einen Verlust von dendritischen Spines zeigten. Die Reduktion der Spinedichte war bei 18-20 Monate alten Mäusen verstärkt zu beobachten. Des Weiteren war die Verringerung der Spinedichte durch einen Verlust persistenter Spines bedingt. Zu Anfang des degenerativen Prozesses (13-15 Monate) kompensierte ein erhöhter Anteil entstandener Spines teilweise für den Verlust an dendritischen Spines. Dieser kompensatorische Effekt war bei 18-20 Monate alten Mäusen nicht mehr zu beobachten, was zu einem verstärkten Spineverlust in diesem Alter führte.

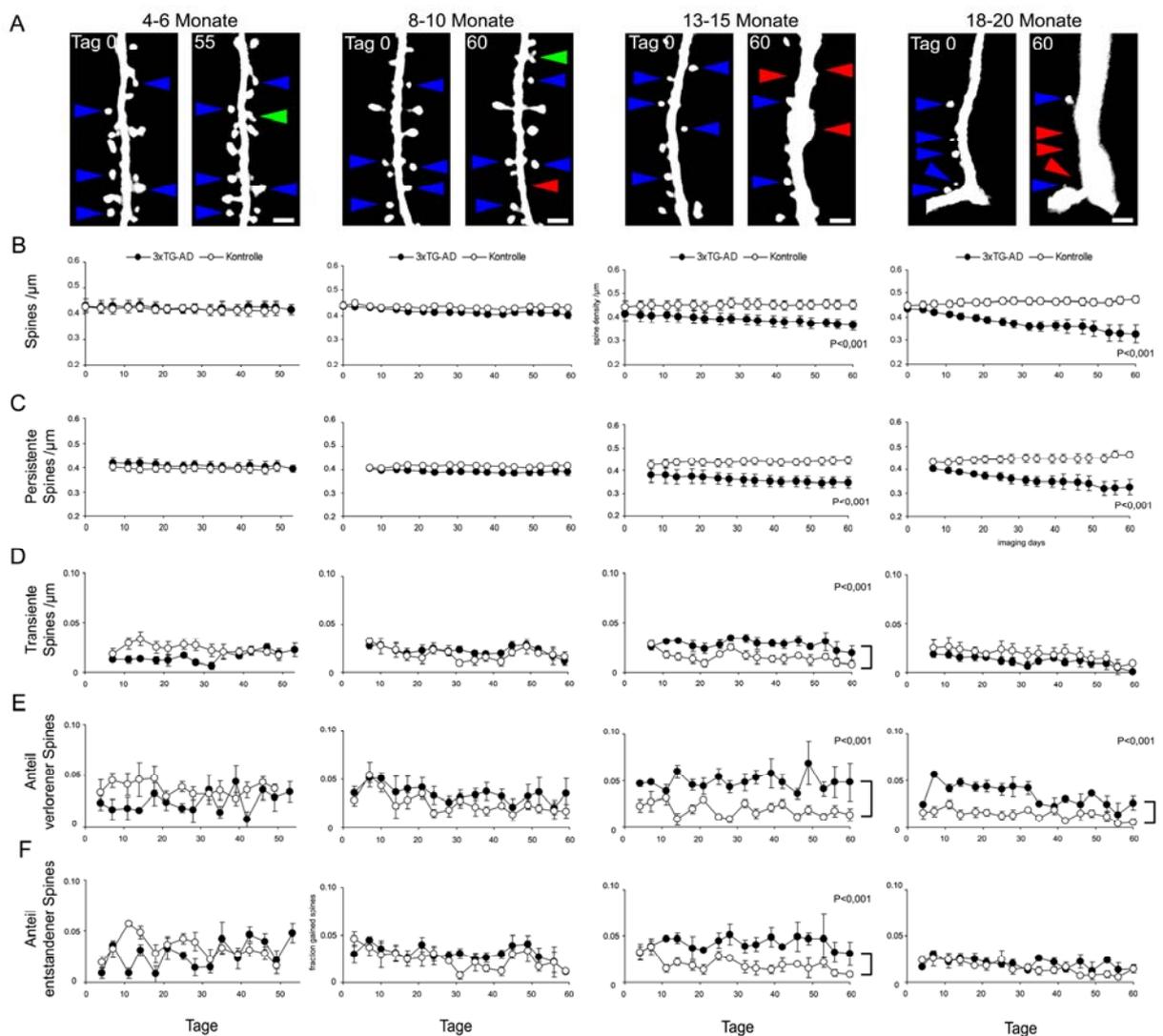


Abb. 23: Veränderungen dendritischer Spines bei 3xTg-AD Mäusen

(A) 2-Photonen intravitalmikroskopische Aufnahmen von Dendriten in 4-6, 8-10, 13-15 und 18-20 Monate alten 3xTg-AD Mäusen. Exemplarisch sind stabile Spines (blau), verlorengegangene Spines (rot) und entstandene Spines (grün) markiert. Größenstandard: 2 μm ; **(B-F)** Verlauf über 55-60 Tage in 4-6, 8-10, 13-15 und 18-20 Monate alten 3xTg-AD Mäusen (schwarz) und gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen (weiß). Alle Daten sind Mittelwerte über 4 Mäuse mit Fehlerbalken als SEM **(B)** dendritische Spinedichte **(C)** Dichte der persistenten Spines **(D)** Dichte der transienten Spines **(E)** Anteil verlorener Spines **(F)** Anteil entstandener Spines.

Bei 13 Monate alten 3xTg-AD Mäusen, also bei Tieren, die zum ersten Mal einen Spineverlust zeigten, wurden zeitgleich dystrophe Anschwellungen an Dendriten beobachtet (Abb. 24A). Diese dystrophen Anschwellungen (insgesamt 2.335 einzelne Anschwellungen bei 10 Mäusen) entstanden über einen Zeitraum von Wochen und blieben für mehrere Monate sichtbar, wogegen benachbarte Dendriten ($< 5 \mu\text{m}$ entfernt) meist unverändert blieben (Abb. 24A und B).

Nachdem der Verlust dendritischer Spines sowie das Auftreten dystropher Dendriten erstmals ab einem Alter von 13 Monate beobachtet werden konnten, stellte sich die Frage, ob beide Phänomene miteinander in Verbindung stehen. Um dies zu klären, wurde die dendritische Spinedichte von dystrophen und benachbarten nicht-dystrophen Dendriten der gleichen Mäuse mit Dendriten von gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen verglichen (Abb. 24B und C). Dendriten wurden als dystroph klassifiziert, wenn sich deren Volumen über 60 Tage mindestens verdoppelte. Diese Untersuchung konnte zeigen, dass ausschließlich dystrophe Dendriten einen signifikanten Spineverlust aufwiesen (Abb. 24B und C; $0,40 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,26 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; $n=5$ Dendriten pro Gruppe), wogegen die Spinedichte von nicht-dystrophen Dendriten der gleichen 3xTg-AD Mäuse und nicht-dystrophen Dendriten von Kontrollmäusen unverändert blieb (Abb. 24B und C). Bei der Betrachtung des Dendritenvolumens fiel auf, dass nur das Volumen dystropher Dendriten über einen Beobachtungszeitraum von 60 Tagen erhöht war (Abb. 24B und D; $2,17 \pm 0,41 \mu\text{m}^3$ pro μm Dendritenlänge zu $12,45 \pm 0,71 \mu\text{m}^3$ pro μm Dendritenlänge; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; $n=5$ Dendriten pro Gruppe), nicht aber das Volumen nicht-dystropher Dendriten der gleichen 3xTg-AD Mäuse wie auch das Volumen von nicht-dystrophen Dendriten von Kontrollmäusen (Abb. 24B und D; $n=5$ Dendriten pro Gruppe). Dieser Befund zeigt zum einen, dass ein Spineverlust ausschließlich an dystrophen Dendriten stattfand und zum anderen, dass der Spineverlust mit zunehmendem Dendritenvolumen anstieg.

Die Häufigkeit mit der Dendriten dystroph verändert waren nahm mit zunehmendem Alter zu (Abb. 24E; 13-15 Monate: $47,9 \pm 15,2$ vs. 18-20 Monate: $166,1 \pm 35,1$; $P = 0,004$, studentischer t-Test; $n=8$ Mäuse pro Altersgruppe). Bei nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen wurden im Gegensatz dazu zu keinem Alter dystrophe Dendriten beobachtet.

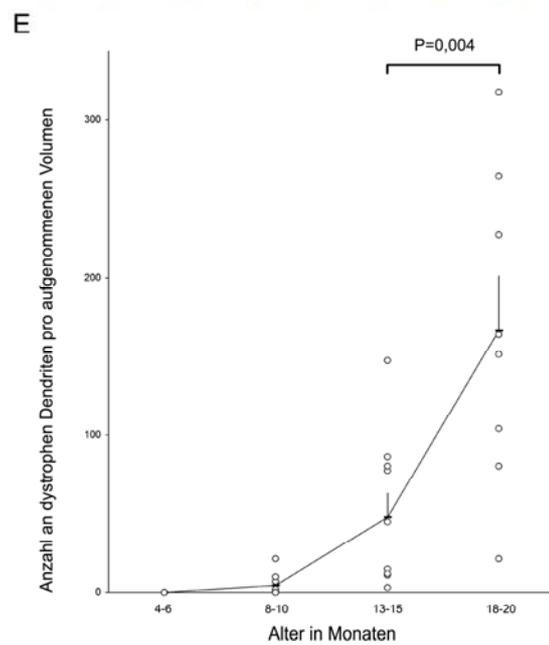
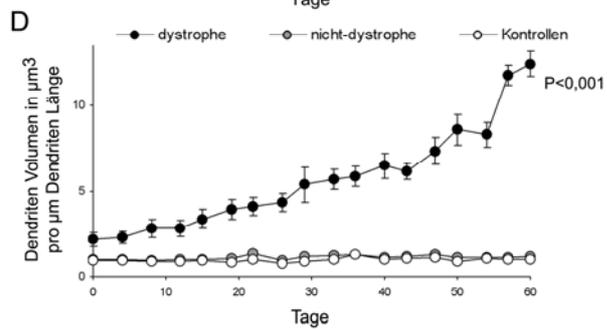
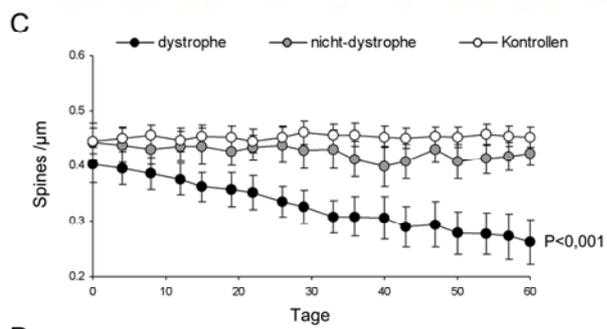
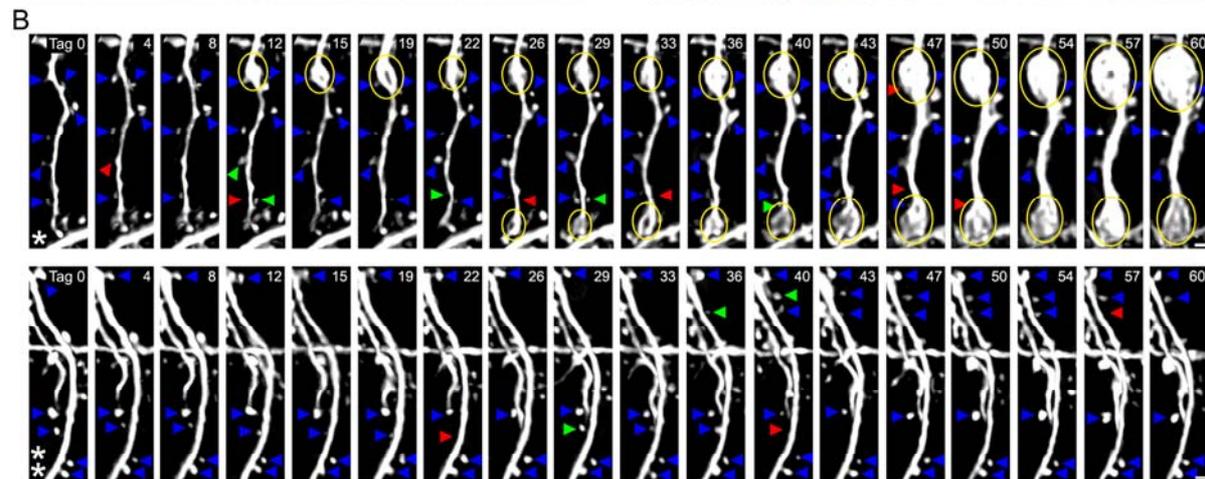
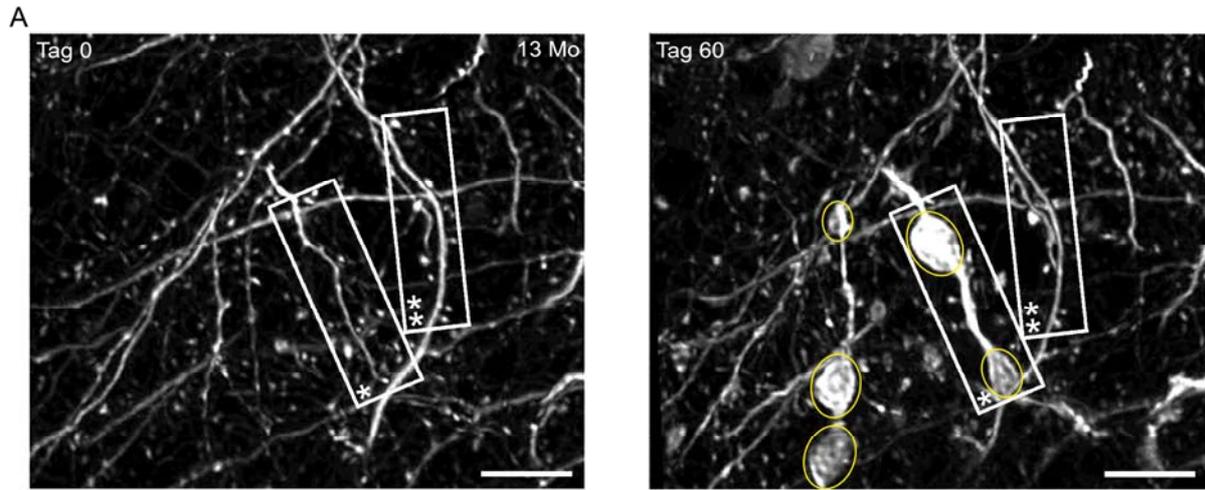
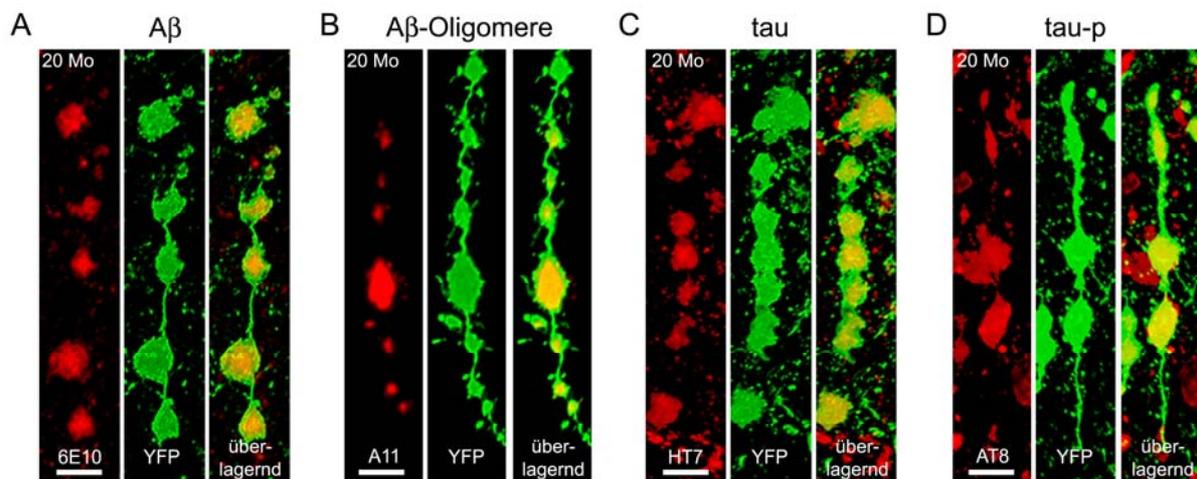


Abb. 24: Dendritische Dystrophie bei 3xTg-AD Mäusen

(A) 2-Photonen intravitalmikroskopische Aufnahmen von Dendriten in 13 Monate alten 3xTg-AD Mäusen, die über einen Zeitraum von 60 Tagen dystrophe Anschwellungen ausbilden (gelbe Kreise). Größenstandard: 10 μm ; **(B)** Die gleichen dystrophen (*) und benachbarten nicht-dystrophen Dendriten (**) aus Abbildung A im zeitlichen Verlauf über 60 Tage von 13-15 Monaten. Exemplarisch sind stabile Spines (blau), verlorengegangene Spines (rot) und entstandene Spines (grün), sowie dystrophe Dendriten (gelbe Kreise) markiert. Größenstandard: 2 μm ; **(C-D)** Daten sind Mittelwerte über Dendriten. Vergleich von dystrophen Dendriten (schwarz), nicht-dystrophen Dendriten der gleichen 3xTg-AD Mäuse (grau) und nicht-dystrophen Dendriten von Kontrollmäusen über 60 Tage bezüglich **(C)** der mittleren Spinedichte **(D)** und des mittleren Volumens der Dendriten. **(E)** Anzahl dystropher Dendriten in 4-6, 8-10, 13-15 und 18-20 Monate alten 3xTg-AD Mäusen pro aufgenommenem Volumen **(C-E)** Fehlerbalken als SEM.

Bei den hier durchgeführten intravitalmikroskopischen Untersuchungen an 3xTg-AD Mäusen wurden zu keinem Zeitpunkt MethoxyX04-anfärbbare, fibrilläre A β -Plaques im somatosensorischen Kortex gefunden. Somit wurden alle hier beschriebenen *in vivo* Befunde in Abwesenheit von A β -Plaques erhoben. Um festzustellen, ob lösliches A β , Tau und hyperphosphoryliertes Tau in den untersuchten Regionen des Kortex vorhanden war, wurden immunohistochemische Färbungen von Maushirnschnitten untersucht. Hierbei konnte intrazelluläres A β , A β -Oligomere, Tau und hyperphosphoryliertes Tau in dystrophen Dendriten nachgewiesen werden (Abb. 25).

**Abb. 25: Immunohistochemische Färbungen dystropher Dendriten von 3xTg-AD Mäusen**

(A-D) Immunohistochemische Färbungen von dystrophen Dendriten in 20 Monate alten 3xTg-AD Mäusen. Größenstandards: 20 μm ; **(A)** 6E10 Färbung spezifisch für humanes A β **(B)** A11 Färbung spezifisch für A β -Oligomere **(C)** HT7 Färbung spezifisch für humanes Tau **(D)** AT8 Färbung markiert phosphoryliertes humanes Tau an Serin 202 und Threonin 205.

Neben dem beobachteten Spineverlust an dystrophen Dendriten, kam es im Laufe der intravitalmikroskopischen Untersuchungen von Zeit zu Zeit vor, dass ganze Dendriten von einem auf den nächsten Beobachtungszeitpunkt nicht mehr auffindbar waren (Abb. 26A). Bei genauer Analyse der zuvor aufgenommenen Bilder konnte festgestellt werden, dass die korrespondierenden Nervenzellen ebenfalls nicht mehr auffindbar waren. Die so verlorengegangenen Dendriten und Nervenzellen blieben verschwunden und tauchten zu folgenden Beobachtungszeitpunkten nicht wieder auf (Abb. 26A). Bemerkenswert war, dass selektiv nur manche Nervenzellen verschwanden, während benachbarte Nervenzellen über den gesamten Beobachtungszeitraum sichtbar waren (Abb. 26A).

Alle Nervenzellen, bei denen dieses Phänomen beobachtet wurde, befanden sich in Layer 3 des somatosensorischen Kortex. Interessanterweise konnte dieser Nervenzellverlust ausschließlich in 4-6 Monate alten 3xTg-AD Mäusen beobachtet werden, wogegen ältere Tieren (8-20 Monate) keinen Nervenzellverlust zeigten (Abb. 26B; $4,6 \pm 0,8 \%$ zu $0,0 \pm 0,0 \%$; $P = 0,009$, studentischer t-Test; insgesamt 1.860 Nervenzellen in einem Gesamtvolumen von $3,19 \text{ mm}^3$ in $n=5-13$ Mäusen pro Altersgruppe). Zusätzlich wurde Nervenzellverlust nicht ein einziges Mal in nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen im Alter von 4-20 Monaten beobachtet (Insgesamt 583 Nervenzellen in einem Gesamtvolumen von $1,15 \text{ mm}^3$ in $n=5$ Mäusen pro Altersgruppe).

Als Folge dieser Befunde stellte sich die Frage, ob ein Verlust an Synapsen dem Nervenzellverlust vorausging und für diesen ursächlich war. Zur Klärung dieser Frage wurde die Spinedichte von Dendriten die zu einem späteren Zeitpunkt aufgrund eines Nervenzellverlusts verschwanden mit der Spinedichte von Dendriten die über den gesamten Beobachtungszeitraum präsent waren, verglichen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 26C; $0,40 \pm 0,01 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,43 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$; 10 Dendriten pro Gruppe). Dieser Befund zeigt, dass der Nervenzellverlust nicht durch einen vorangegangenen Verlust an dendritischen Spines ausgelöst wurde.

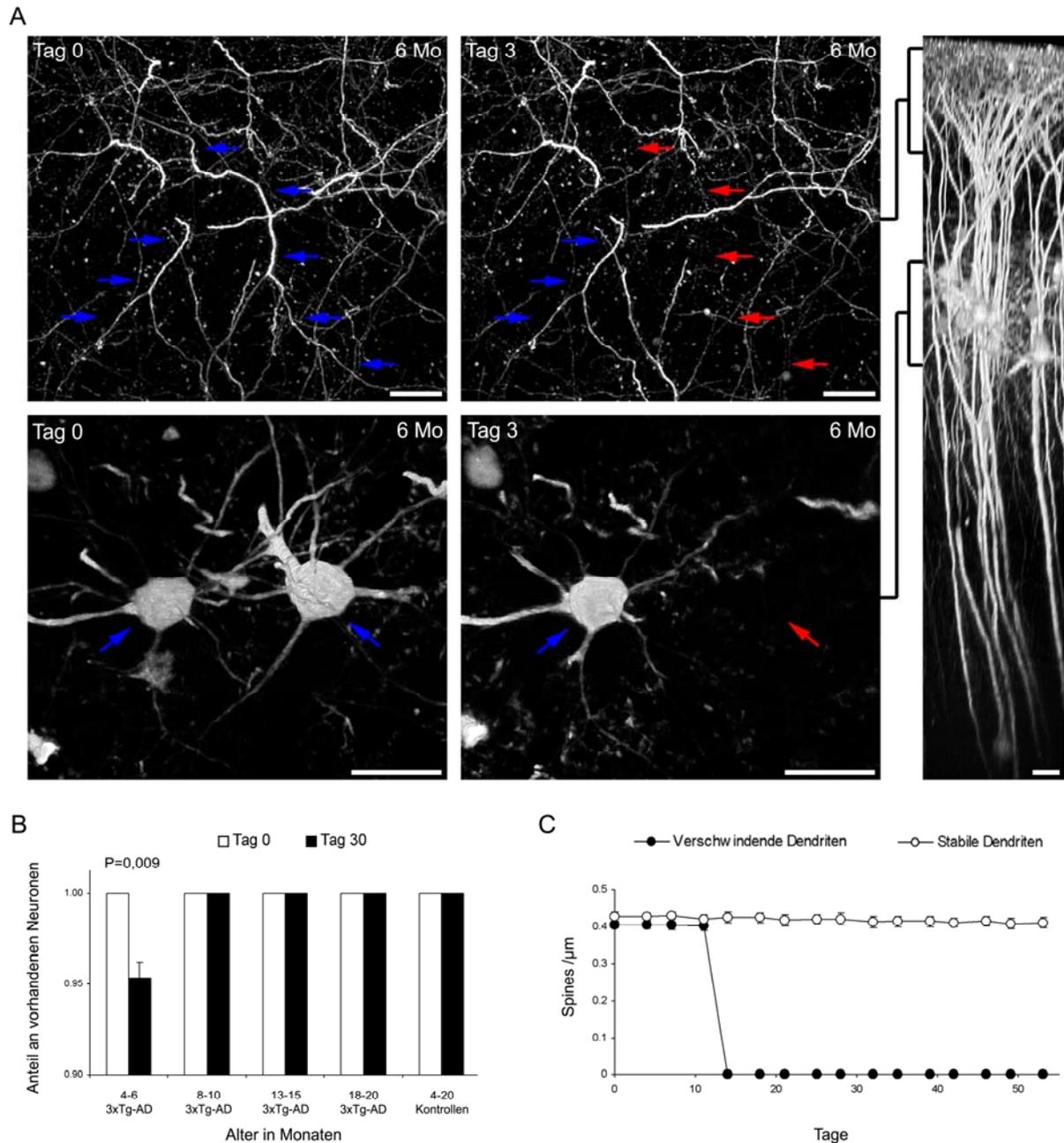


Abb. 26: Verlust von Nervenzellen bei 3xTg-AD Mäusen

(A) 2-Photonen Intravitalmikroskopische Aufnahmen von Dendriten und Layer 3 Nervenzellen in 6 Monate alten 3xTg-AD Mäusen. Rechts ist eine x-Projektion dargestellt, die Layer 1-5 umfasst. Dendriten und die korrespondierende Nervenzelle sind nach 3 Tagen nicht mehr zu sehen (rote Pfeile), wogegen benachbarte Dendriten und Nervenzellen noch vorhanden sind (blaue Pfeile). 40x Objektiv; Größenstandard: 20 μm ; **(B)** Vergleich des mittlerer Anteils an verlorenen Nervenzellen pro Maus über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen in 4-6, 8-10, 13-15 und 18-20 Monate alten 3xTg-AD und 4-20 Monate alten Kontroll-Mäusen. **(C)** Vergleich der mittleren Spinedichte von Dendriten, die durch Nervenzellverlust verlorengegangen sind mit Dendriten, die über den gesamten Beobachtungszeitraum von 55 Tagen stabil waren. **(B und C)** Fehlerbalken als SEM.

Analog zur dendritischen Dystrophie stellte sich auch im Fall des Nervenzellverlusts die Frage, inwiefern die Anwesenheit von A β damit in Verbindung gebracht werden konnte. Hierzu wurden immunohistochemische Färbungen von 6 Monate alten 3xTg-AD Mäusen durchgeführt, also genau indem Alter, indem Nervenzellverlust beobachtet wurde. Mehrere Nervenzellen in Layer 3 und Layer 5 zeigten intrazelluläre Ablagerungen von A β und Tau, jedoch kein hyperphosphoryliertes Tau (Abb. 27).

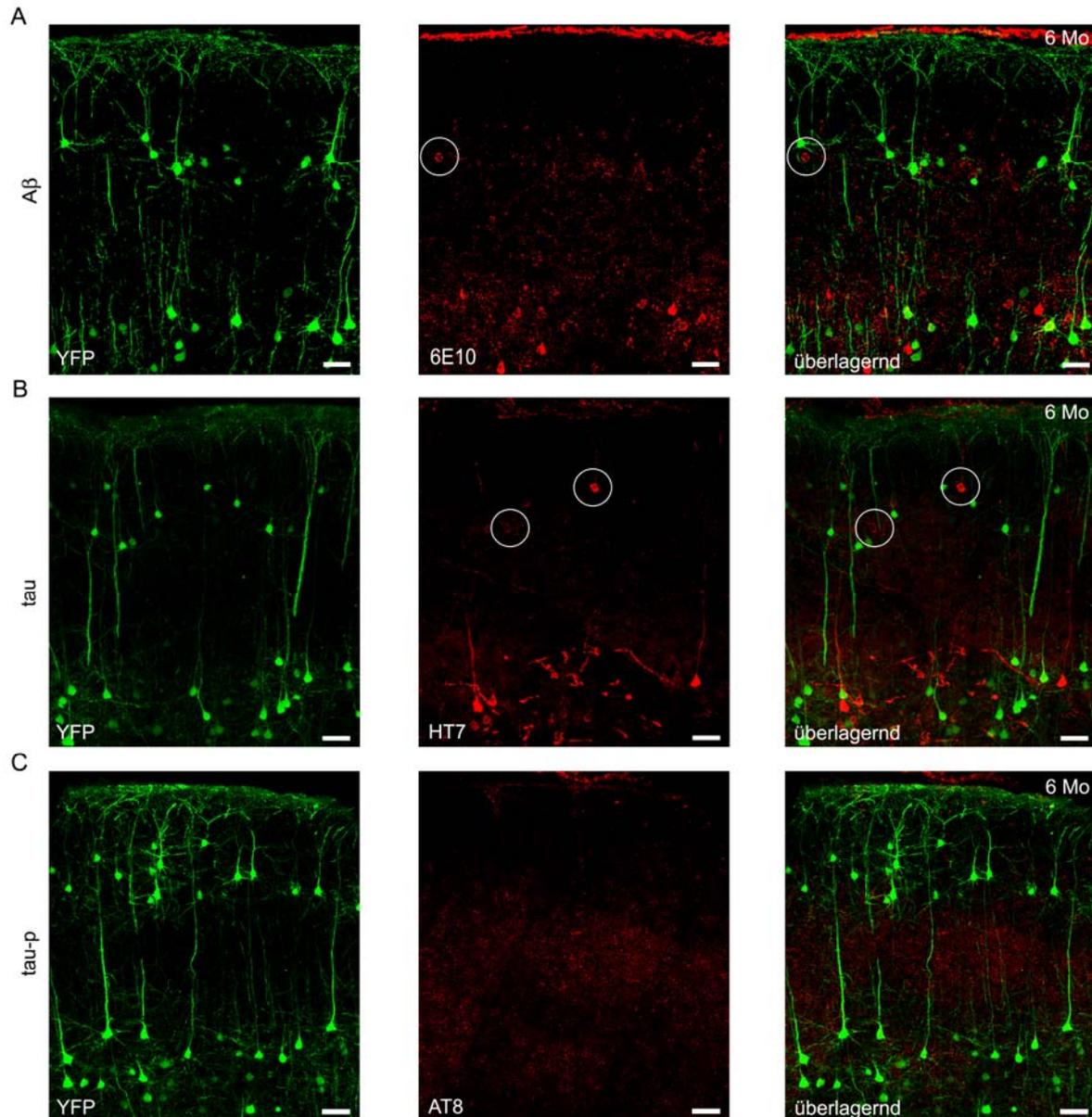


Abb. 27: Immunohistochemische Färbungen von Nervenzellen von 3xTg-AD Mäusen

(A-C) Immunohistochemische Färbungen von Layer 3 und Layer 5 Nervenzellen bei 6 Monate alten 3xTg-AD Mäusen. Weiße Kreise markieren immunohistochemisch positiv gefärbte Nervenzellen. Größenstandards: 30 μ m; **(A)** 6E10 Färbung spezifisch für humanes A β **(B)** HT7 Färbung spezifische für humanes Tau **(C)** AT8 Färbung markiert phosphoryliertes humanes Tau an Serin 202 und Threonin 205.

Die Analyse transgener Alzheimer-Mausmodelle wurde durchgeführt, um die Auswirkungen der A β -Akkumulation auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines in Abwesenheit von A β -Plaques zu untersuchen. Das hierbei primär verwendete 3xTg-AD Mausmodell bildet sowohl eine A β -, als auch eine Tau-Pathologie aus. Der Effekt dieser kombinierten Pathologie äußerte sich in dendritischer Dystrophie einerseits, sowie Nervenzellverlust andererseits. Nachdem in dystrophen Dendriten immunohistochemisch die Anwesenheit von intrazellulärem A β , Tau und hyperphosphoryliertem Tau nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, inwiefern die Anwesenheit von intrazellulärem A β alleine ursächlich für den Befund der dendritischen Dystrophie und den damit verbundenen Spineverlust war. Des Weiteren galt es zu klären, ob der Nervenzellverlust in Layer 3, der in Anwesenheit von intrazellulärem A β und Tau auftrat, auch durch das alleinige Vorhandensein von A β induziert werden konnte. Zur Klärung dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit ein weiteres Mausmodell (APPPS1) untersucht, welches zwar eine A β -Pathologie ausbildet, jedoch keine Transgen-induzierte Überexpression von Tau zeigt.

In diesem Modell wurde die Veränderung der Spinedichte in 18-20 Monate alten Mäusen und gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen über 38 Tage miteinander verglichen (Insgesamt wurden 39.609 Spines in 5 Mäusen pro Gruppe analysiert). Die Vorgehensweise war analog zu den Experimenten an 3xTg-AD Mäusen. Es wurden explizit 18-20 Monate alte APPPS1 Mäuse untersucht, da insbesondere in diesem Alter eine hohe Anzahl an dystrophen Dendriten bei 3xTg-AD Mäusen vorhanden war (Abb. 24E). Im Vergleich zu Mäusen der 3xTg-AD Linie entstehen bei APPPS1 Mäusen fibrilläre A β -Plaques im somatosensorischen Kortex (Radde et al. 2006). Nachdem es bei 3xTg-AD Mäusen zur Ausbildung dendritischer Dystrophie und Spineverlust sowie zum Verlust von Layer 3 Neuronen in Abwesenheit von A β -Plaques kam und sich die Fragestellung dieser Arbeit auf Synapsenverlust in Abwesenheit von A β -Plaques fokussiert, wurden dendritische Spines, Dendriten und Neurone bei APPPS1 Mäusen abseits von A β -Plaques (> 50 μm entfernt) untersucht (Abb. 28A). Überraschenderweise konnte hierbei kein Spineverlust beobachtet werden (Abb. 28B). Die Spinedichte blieb konstant auf einem mit nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen vergleichbaren Niveau (Abb. 28C; $0,46 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$ zu $0,47 \pm 0,04 \mu\text{m}^{-1}$; n=5 Mäuse pro Gruppe). Darüber hinaus konnte kein Unterschied im Anteil verlorener und entstandener Spines beobachtet werden, was sich folglich in einer unveränderten Spine-Umsatzrate zeigte (Abb. 28D; $2,1 \pm 0,1 \%$ zu $2,2 \pm 0,5 \%$; n=5 Mäuse pro Gruppe). Auch die Dichte der persistenten (Abb. 28E; $0,45 \pm 0,03 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,43 \pm 0,02 \mu\text{m}^{-1}$; n=5 Mäuse pro Gruppe) und transienten Spines (Abb. 28F; $0,022 \pm 0,004 \mu\text{m}^{-1}$ vs. $0,018 \pm 0,006 \mu\text{m}^{-1}$; n=5 Mäuse pro Gruppe) blieb konstant auf einem Level vergleichbar mit nicht-Alzheimer-transgenen Mäusen.

Zusätzlich wurden auch keine dystrophen Dendriten im Alter von 18-20 Monaten beobachtet, was sich in einem vergleichbaren Dendritenvolumen bei APPPS1 und gleichaltrigen Kontrollmäusen widerspiegelte (Abb. 28G und H; $1,17 \pm 0,11 \mu\text{m}^3$ pro μm Dendritenlänge zu $1,02 \pm 0,13 \mu\text{m}^3$ pro μm Dendritenlänge; $P < 0,001$; Varianzanalyse mit Messwiederholungen; $n=5$ Dendriten pro Gruppe).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es bei APPPS1 Mäusen in einem Alter von 4-6 Monaten zu keinem Nervenzellverlust kommt (Abb. 28I und J; insgesamt 402 Nervenzellen in einem Gesamtvolumen von $1,12 \text{ mm}^3$ bei $n=6$ Mäusen analysiert). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie, wonach Nervenzellverlust bei APPPS1 Mäusen erst ab einem Alter von 8 Monaten auftrat (Radde et al. 2006).

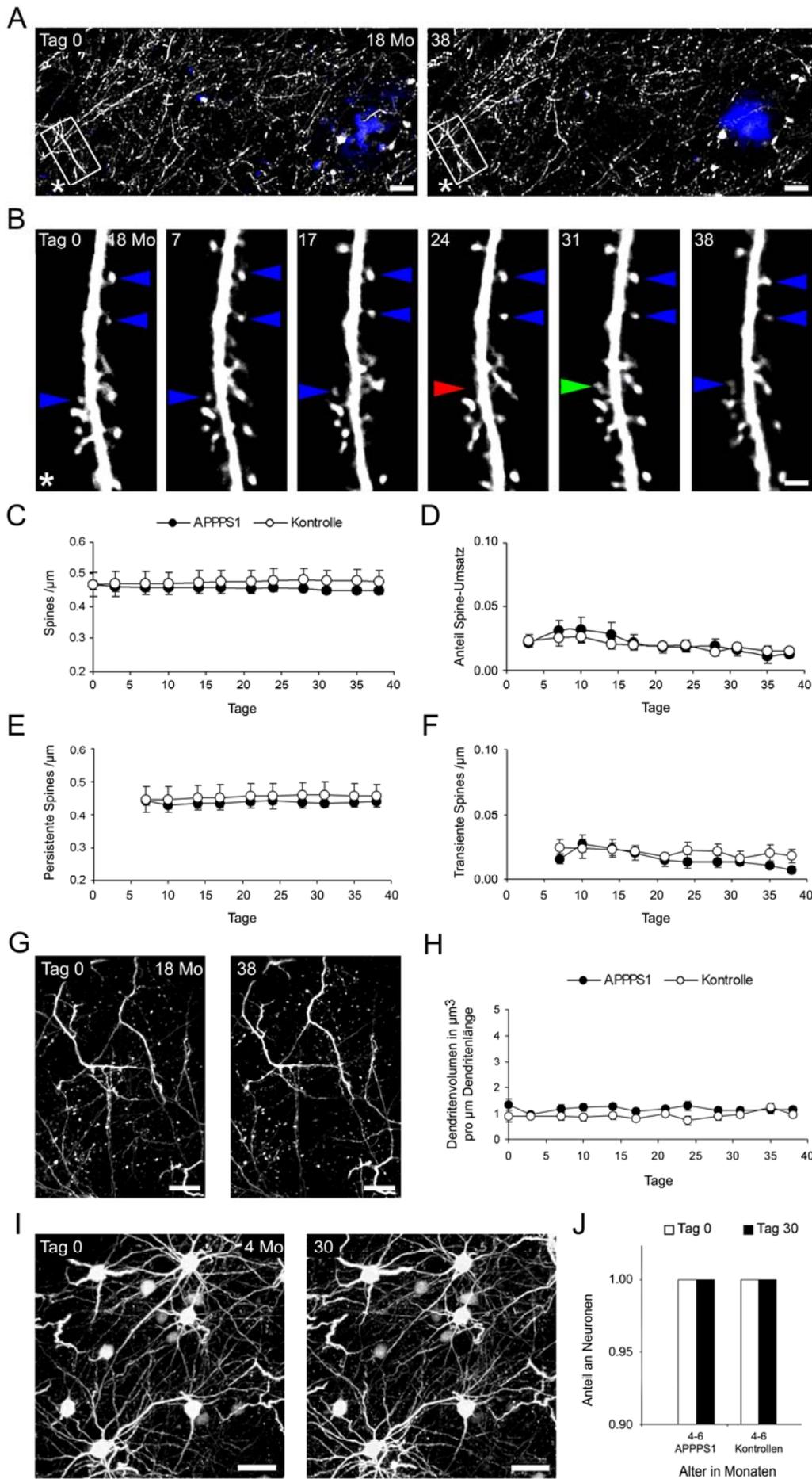


Abb. 28: Veränderungen dendritischer Spines, Dendriten und Neurone bei APPPS1 Mäusen

(A) 2-Photonen intravitalmikroskopische Aufnahmen aus dem somatosensorischen Kortex einer 18 Monate alten APPPS1 Maus im Verlauf von 38 Tagen wobei YFP in Dendriten weiss und fibrilläre A β -Plaques mit Methoxy-X04 blau gefärbt sind. **(B)** Veränderung eines Dendriten aus A (markiert mit *) und dendritischer Spines > 50 μ m abseits von A β -Plaques über 38 Tage. Exemplarisch sind stabile Spines (blau), verlorengegangene Spines (rot) und entstandene Spines (grün) markiert. Größenstandard: 2 μ m; **(C-F)** Alle Daten sind Mittelwerte über Mäuse mit Fehlerbalken als SEM. Verlauf in APPPS1 Mäusen (schwarz) und gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen (weiss) über 38 Tage. **(C)** Spinedichte über einen Zeitverlauf von 38 Tagen. **(D)** Spine-Umsatzrate **(E)** Dichte der persistenten **(F)** Dichte der transienten Spines. **(G)** In 2-Photonen intravitalmikroskopischen Aufnahmen von Dendriten einer 18 Monate alten APPPS1 Maus sind keine dystrophen Dendriten abseits von A β -Plaques zu beobachten. Größenstandard: 10 μ m; **(H)** Dies zeigt sich ebenfalls in einem vergleichbaren Dendritenvolumen zwischen APPPS1 und gleichaltrigen Kontrollmäusen. Alle Daten sind Mittelwerte über Mäuse mit Fehlerbalken als SEM. Verlauf in APPPS1 Mäusen (schwarz) und gleichaltrigen nicht-Alzheimer-transgenen Kontrollmäusen (weiss) über 38 Tage. **(I)** 2-Photonen intravitalmikroskopische Aufnahmen von Nervenzellen in Layer 3 einer 4 Monate alten APPPS1 Maus zeigen keinen Nervenzellverlust nach 30 Tagen. Größenstandard: 20 μ m; **(J)** Der Anteil an vorhandenen Nervenzellen ist unverändert bei APPPS1 und Kontrollen im Verlauf von 30 Tagen.

4 Diskussion

Der Morbus Alzheimer ist die am häufigsten vorkommende altersbedingte neurodegenerative Erkrankung. Die Krankheit ist pathologisch durch die Akkumulation des Amyloid- β -Peptids ($A\beta$) und die Bildung von neurofibrillären Bündeln charakterisiert (Terry et al. 1991). Ferner kommt es zum Untergang von Synapsen und Nervenzellen (Selkoe 2002). Es wird angenommen, dass der Untergang von Synapsen ein sehr frühes pathologisches Ereignis darstellt und der Bildung von $A\beta$ -Plaques und neurofibrillären Bündeln sowie dem Nervenzelltod zeitlich vorausgeht (Ball 1977; Blennow et al. 1996; Davies et al. 1987; Dickson et al. 1995; Hsia et al. 1999; Hyman et al. 1984; Sze et al. 1997; Terry et al. 1991). Generell stellt der Verlust von Synapsen im Gehirn von Säugetieren, im Gegensatz zum Nervenzelltod, kein irreversibles Ereignis dar. Vielmehr wurde gezeigt, dass der Verlust einzelner Synapsen durch den Umbau bestehender Verbindungen und durch die Ausbildung neuer Synapsen kompensiert werden kann (Dariansmith und Gilbert 1994; Florence et al. 1998; Gilbert und Wiesel 1992; Kaas et al. 1990; Keck et al. 2008; Merzenich et al. 1983; Robertson und Irvine 1989). Die Reversibilität des Synapsenuntergangs, sowie die Erkenntnis, dass der Verlust von Synapsen eines der frühesten pathologischen Ereignisse beim Morbus Alzheimer darstellt, machen ihn zu einem viel versprechenden Ansatzpunkt auf der Suche nach Therapieansätzen. Deshalb befasste sich die vorliegende Arbeit mit den Umständen und Mechanismen, die zum Synapsenuntergang beim Morbus Alzheimer führen. Im Fokus bisheriger Studien auf diesem Gebiet stand das $A\beta$ -Peptid, dem neben der pathophysiologischen Rolle beim Morbus Alzheimer, auch eine physiologische Funktion an der Synapse zugeschrieben wird (Selkoe 2002). So wurde gezeigt, dass bei vollständiger Abwesenheit von $A\beta$ in APP KO Mäusen die Anzahl exzitatorischer Synapsen erhöht ist (Priller et al. 2006). Darüber hinaus wurde in einer weiteren Studie beschrieben, dass ein Anstieg des $A\beta$ -Spiegels zu einer verminderten exzitatorischen synaptischen Übertragung (Kamenetz et al. 2003), sowie zu einem Verlust dendritischer Spines führte (Hsieh et al. 2006). Der Effekt einer erhöhten Menge an $A\beta$ auf die synaptische Übertragung konnte durch ein kurzzeitiges Senken des $A\beta$ -Spiegels, induziert durch die pharmakologische Blockierung der γ -Sekretase Aktivität, rückgängig gemacht werden (Kamenetz et al. 2003). Basierend auf diesen Arbeiten erforschen Pharmakonzerne derzeit therapeutische Strategien zur Senkung des $A\beta$ -Spiegels, in der Hoffnung, den Synapsenuntergang beim Morbus Alzheimer aufzuhalten. Eine therapeutische Senkung des $A\beta$ -Spiegels kann zum einen durch Gabe von Anti- $A\beta$ Antikörpern (Gilman et al. 2005; Kokjohn und Roher 2009) und zum anderen durch die pharmakologische Blockierung der $A\beta$ -Bildung (Fleisher et al. 2008) erreicht werden. Bei beiden Therapieansätzen besteht die Möglichkeit, dass neben der

Senkung des pathophysiologischen A β gleichermaßen auch die Menge an physiologischem und damit notwendigem A β verringert wird, was unter Umständen zu Nebenwirkungen führen könnte. Aus diesem Grund sollte im ersten Teil dieser Arbeit überprüft werden, ob eine therapeutische Senkung des A β -Spiegels sich positiv auf die Synapsen lebender Mäuse auswirkt.

Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der 2-Photonen Intravitalmikroskopie bearbeitet (Denk et al. 1990). Diese Technik bietet derzeit die einzige Möglichkeit, wiederholt einzelne Synapsen über Zeiträume von Monaten im lebenden Tier zu beobachten und somit strukturelle Veränderungen (die strukturelle Plastizität) von Synapsen zu untersuchen. Als Messparameter diente der postsynaptische Teil der Synapsen, die dendritischen Spines. Um die Auswirkungen eines verringerten A β -Spiegels auf die Synapsen lebender Mäuse zu analysieren, wurde die Anzahl und Form dendritischer Spines in homozygoten APP KO Mäusen mit denen in heterozygoten APP KO und WT Mäusen verglichen. Hierbei kam es in homozygoten APP KO Mäusen zu einem vollständigen Verlust von A β . Bei heterozygoten APP KO Mäusen war, aufgrund des Fehlens eines *APP*-Allels im Vergleich zu WT Mäusen, der A β -Spiegel verringert. Im Ergebnis bildeten homozygote APP KO Mäuse eine um den Faktor 2 erhöhte Anzahl dendritischer Spines im Kortex im Vergleich zu WT Tieren aus. Ferner konnte gezeigt werden, dass die dendritische Spinedichte bei heterozygoten APP KO Mäusen zwischen der von homozygoten APP KO und WT Mäusen liegt. Basierend auf der Analyse der Lebensdauer und der Form dendritischer Spines konnte festgestellt werden, dass die erhöhte dendritische Spinedichte bei Verlust eines oder beider *APP*-Allele gleichbedeutend mit einer erhöhten Anzahl persistenter Spines war. Die persistenten, also langlebigen Spines bilden nach KNOTT mit großer Wahrscheinlichkeit funktionelle Synapsen aus (Knott et al. 2006).

Diese Befunde zeigen somit erstmals eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der A β -Expression und der Synapsenanzahl in der Hirnrinde lebender Mäuse. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Befunden vorangegangener *in vitro* Studien, die zeigen konnten, dass hippocampale Neurone in Zellkultur sowie Hirnschnitte von APP KO Mäusen eine erhöhte Anzahl Synapsen aufweisen (Priller et al. 2006). Des Weiteren untermauert dieses Ergebnis die Befunde vorangegangener *in vitro* Studien, wonach sich eine Senkung des A β -Spiegels positiv auf die exzitatorische synaptische Übertragung und die dendritische Spinedichte auswirkt (Hsieh et al. 2006; Kamenetz et al. 2003). Für die Therapie des Morbus Alzheimer bedeutet dieses Ergebnis, dass der therapeutische Ansatz einer Senkung des A β -Spiegels und der damit verbundene Anstieg der Anzahl an Synapsen in der Hirnrinde, erstmals *in vivo* bestätigt werden konnte.

Des Weiteren sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwiefern sich auch die therapeutische Senkung des A β -Spiegels, durch pharmakologische Blockierung der A β -

Bildung, positiv auf die Anzahl an Synapsen auswirkt. Bei diesen Experimenten an WT Mäusen wurde die γ -Sekretase Aktivität für 4 Tage durch Gabe eines Inhibitors gehemmt, wobei es zu einer kurzzeitigen Absenkung des A β -Spiegels um 40-60 % kam. Zeitgleich stieg die Menge der γ -Sekretase Substrate, genauer gesagt der APP-CTFs, an (Dovey et al. 2001; Gitter et al. 2004; Ness et al. 2004). Es wurden in diesen Experimenten zwei verschiedene γ -Sekretase Inhibitoren getestet, DAPT und LY450139, wobei sich letzterer aktuell in klinischen Studien befindet (Fleisher et al. 2008).

Überraschenderweise zeigte die pharmakologische Art der A β -Senkung nicht den erwarteten positiven Effekt auf die dendritische Spinedichte. Es kam vielmehr zu dem gegenteiligen Resultat, nämlich zu einem irreversiblen Verlust von dendritischen Spines. Unter den pharmakologisch veränderten Bedingungen waren 21 Tage nach γ -Sekretase Blockierung 15-30 % der dendritischen Spines untergegangen. Eine Klassifizierung nach Lebensdauer ergab, dass vorrangig persistente Spines und damit funktionelle Synapsen verloren gingen. Dieser Befund zeigt erstmals, dass die Senkung des A β -Spiegels, durch die pharmakologische Blockierung der γ -Sekretase, zu einem Synapsenverlust führt.

Die hier verwendeten γ -Sekretase Inhibitoren blockieren neben der Prozessierung von APP auch die Spaltung von über 50 weiteren Transmembranproteinen (siehe Kapitel 1.3.2). Manche dieser Proteine, wie z.B. Notch, werden ebenso wie APP von Nervenzellen exprimiert (Artavanistsakonias et al. 1995) und könnten somit analog zu APP die Funktion von Synapsen beeinflussen. Deshalb konnte die Blockierung der Prozessierung eines anderen γ -Sekretase Substrates, wie z.B. Notch, ursächlich für den Verlust dendritischer Spines nach γ -Sekretase Blockierung sein. Anders gesagt bestand die Möglichkeit, dass der Untergang dendritischer Spines nicht mit APP in Zusammenhang stand.

Um dies auszuschließen, wurden in einem folgenden Experiment nicht WT Mäuse, wie in den bisherigen Versuchen, sondern APP KO Mäuse mit γ -Sekretase Inhibitoren behandelt. Bei diesen Tieren kam es nach γ -Sekretase Inhibition zu keiner Blockierung der APP-Prozessierung, da diese Mäuse kein APP exprimieren. Überraschenderweise zeigten APP KO Mäuse keinen Verlust dendritischer Spines nach γ -Sekretase Blockierung. Dieser Befund beweist, dass in WT Mäusen der Untergang dendritischer Spines nach γ -Sekretase Inhibition speziell auf die Blockierung der APP-Prozessierung zurückzuführen war. Somit war die Ursache für den Verlust dendritischer Spines nach γ -Sekretase Inhibition bei WT Mäusen bei der APP-Prozessierung zu suchen. Jedoch welches Protein war hierfür ursächlich?

Um diese Frage zu beantworten war es hilfreich, sich die Befunde aus APP KO Mäusen einerseits und der γ -Sekretase Blockierung in WT Mäusen andererseits, vor Augen zu führen: Eine verringerte Menge an A β in heterozygoten APP KO Mäusen führte zu einer erhöhten Anzahl dendritischer Spines, wogegen die Senkung des A β -Spiegels in WT Mäusen durch γ -

Sekretase Blockierung in einem Verlust dendritischer Spines resultierte. In beiden Fällen war die Menge an vorhandenem A β im Gehirn verringert. Diese Diskrepanz legte nahe, dass A β nicht die Ursache für den Verlust dendritischer Spines nach γ -Sekretase Blockierung sein konnte. Gleiches galt für die γ -Sekretase Spaltprodukte AICD und p3, die in beiden Fällen analog zu A β nur in verringerter Menge vorhanden waren. Somit konnten die γ -Sekretase Produkte A β , AICD und p3 als Ursache ausgeschlossen werden. Auch die N-terminalen sAPP Fragmente kamen dafür nicht in Frage, da sie von der γ -Sekretase nicht gespalten wurden und demzufolge nach γ -Sekretase Blockierung in unveränderten Mengen vorlagen (Dovey et al. 2001). Ferner waren sAPP Fragmente auch bei APP KO Mäusen als Spaltprodukte von APLP1 und 2 vorhanden und schieden somit gleich aus zwei Gründen als Ursache für die erhöhte Anzahl an Synapsen in diesen Tieren aus (Scheinfeld et al. 2002). Es blieb folglich nur noch die Erklärung, dass die Akkumulation der APP-CTFs nach γ -Sekretase Inhibition für den Verlust dendritischer Spines ursächlich war. Im Detail bedeutet das, dass eine verringerte A β -Menge bei APP KO Mäusen zu einer erhöhten Anzahl dendritischer Spines führte. Im Gegensatz hierzu wurde der positive Effekt einer A β -Reduktion auf die dendritische Spinedichte nach γ -Sekretase Blockierung wahrscheinlich durch die gleichzeitige Akkumulation von APP-CTFs überlagert, was letztlich einen Verlust dendritischer Spines zur Folge hatte. APP-CTFs besitzen somit *in vivo* eine synaptotoxische Wirkung, die in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden konnte.

Die Auswirkungen einer Senkung des A β -Spiegels auf die strukturelle Plastizität von Synapsen *in vivo* lassen sich wie folgt zusammenfassen: Erstens konnte erstmals eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der APP-Expression und somit der vorhandenen A β -Menge und der Anzahl an Synapsen in der Hirnrinde lebender Mäuse nachgewiesen werden. Zweitens führte die therapeutische Senkung des A β -Spiegels durch pharmakologische γ -Sekretase Blockierung aufgrund der Akkumulation von APP-CTFs zu keinem Anstieg, sondern zu einem Verlust von Synapsen. Somit konnte neben der Bestätigung der modulatorischen Funktion von A β erstmals auch eine modulatorische Wirkung der APP-CTFs an Synapsen *in vivo* nachgewiesen werden.

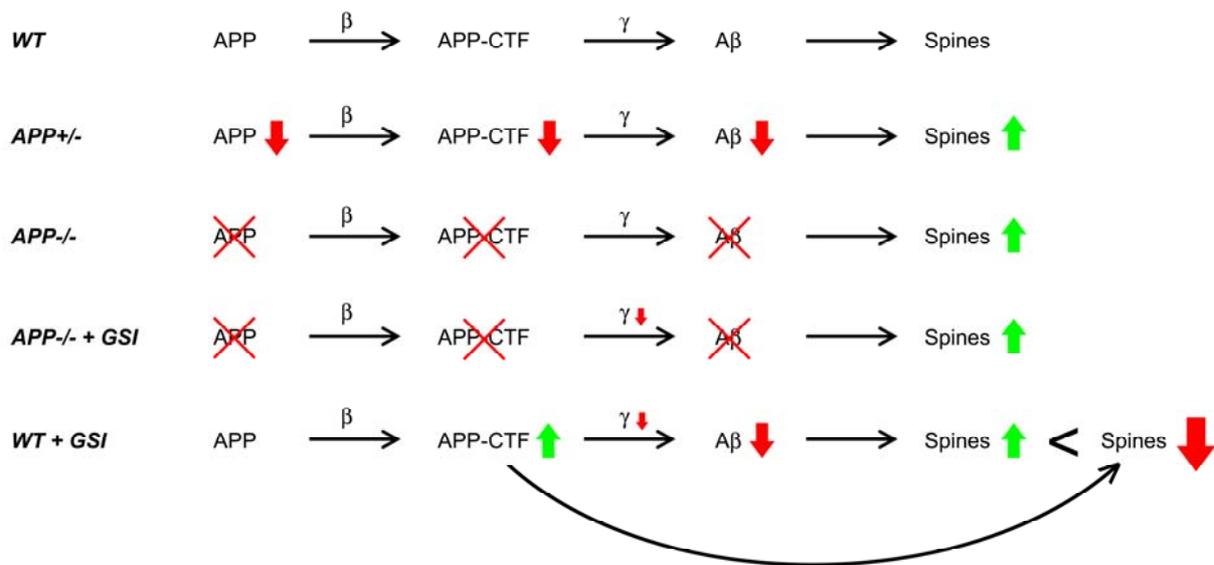


Abb. 29: Effekte der Senkung des $A\beta$ -Spiegels auf die Anzahl dendritischer Spines

Die APP-Prozessierung durch β - und γ -Sekretasen, wie sie in WT Mäusen abläuft, wurde in den hier vorgestellten Experimenten wie folgt verändert: APP^{+/-} Mäuse exprimieren weniger APP, was zu einer Reduktion der APP-CTFs und der $A\beta$ -Menge führt. Des Weiteren steigt die Anzahl an dendritischen Spines an. In APP^{-/-} Mäusen kommt es zu keiner Expression von APP und damit zu einem vollständigen Verlust von APP-CTFs und $A\beta$, was sich in einer erhöhten Anzahl an dendritischen Spines äußert. Gleiches gilt nach Gabe eines γ -Sekretase Inhibitors (GSI) in APP^{-/-} Mäusen. Bei GSI-Gabe in WT Mäusen hingegen kommt es zu einer Reduktion der $A\beta$ -Menge bei gleichzeitiger Akkumulation von APP-CTFs. Hierbei überwiegt der synaptotoxische Effekt der APP-CTF-Akkumulation den positiven Effekt der $A\beta$ -Reduktion und führt letztlich zu einem Verlust dendritischer Spines.

Diese Befunde haben gravierende Auswirkungen auf die aktuell von Pharmakonzernen intensiv untersuchten Therapieansätze des Morbus Alzheimer: Der generelle therapeutische Ansatz einer Senkung des $A\beta$ -Spiegels kann weiterhin als vorteilhaft für die Anzahl an Synapsen im Gehirn angesehen werden, jedoch kann es je nach verwendeter Methode auch zu Nebenwirkungen in Form eines Verlusts funktioneller Synapsen kommen. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Befunde sprechen hierbei gegen den Einsatz von γ -Sekretase Inhibitoren, da dieser zur Akkumulation von APP-CTFs führt und es somit zu den hier gezeigten synaptotoxischen Effekten kommt. Diese hier erstmals beschriebenen schwerwiegenden Nebenwirkungen an den Synapsen können den positiven Effekt einer Senkung des $A\beta$ -Spiegels offensichtlich überwiegen. Insbesondere die Tatsache, dass ein γ -Sekretase Inhibitor, der sich aktuell in klinischen Studien befindet (Fleisher et al. 2008), im Tiermodell diese gravierenden Nebenwirkungen zeigte, ist alarmierend. Folglich ist der Nutzen von γ -Sekretase Inhibitoren für die Behandlung des Synapsenuntergangs bei Alzheimer-Demenz Patienten kritisch zu überdenken.

A β wird neben der physiologischen Funktion an der Synapse auch noch eine pathophysiologische Funktion im Verlauf des Morbus Alzheimer zugeschrieben (Selkoe 2002). In bisherigen Untersuchungen zu diesem Thema wurden insbesondere die Auswirkungen von unlöslichen, fibrillären A β -Plaques auf die Synapsen analysiert. Mehrere Studien zeigten bei transgenen Alzheimer-Mausmodellen einen Verlust dendritischer Spines in unmittelbarer Nähe von A β -Plaques (Brendza et al. 2005; Spires et al. 2005; Tsai et al. 2004). Jedoch blieb die Frage unbeantwortet, ob auch bei Abwesenheit von A β -Plaques, also wenn nur lösliches A β vorhanden ist, die synaptische Übertragung gestört ist. Bisherige Arbeiten, die sich mit dieser Frage beschäftigten, zeigten, dass es bei Alzheimer-Patienten schon lange vor und somit unabhängig von der Bildung von A β -Plaques zu Synapsenverlust kommt (Akram et al. 2008; Ball 1977; Blennow et al. 1996; Davies et al. 1987; DeKosky und Scheff 1990; Dickson et al. 1995; Hsia et al. 1999; Hyman et al. 1984; Sze et al. 1997; Terry et al. 1991). Ferner führte die Zugabe von A β -Oligomeren auf organotypische hippocampale Hirnschnitte von Mäusen zu Synapsenverlust in Abwesenheit von A β -Plaques (Shankar et al. 2007; Shankar et al. 2008). Somit deutet vieles darauf hin, dass nicht nur fibrilläre A β -Plaques, sondern auch die alleinige Akkumulation von löslichem A β zu Synapsenuntergang führen kann. Dies konnte bisher jedoch nicht in lebenden transgenen Alzheimer-Mausmodellen nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen sollten in der vorliegenden Arbeit primär Synapsen abseits des Einflussbereichs von A β -Plaques analysiert werden. Auch die Rolle der Tau-Akkumulation, als weiteres Hauptmerkmal der Alzheimerschen Erkrankung, ist noch nicht vollständig geklärt. Insbesondere die Frage, inwiefern Tau alleine oder in Abhängigkeit von A β zum Synapsenuntergang im Verlauf des Morbus Alzheimer beiträgt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem 3xTg-AD Modell ein transgenes Alzheimer-Mausmodell untersucht, das eine kombinierte A β - und Tau-Pathologie ausbildet. Eine weitere ungeklärte Frage beim Morbus Alzheimer ist die nach dem chronologischen Ablauf und den Mechanismen, die zum Synapsenuntergang führen. Stellt der Verlust von Synapsen ein primäres Ereignis dar, oder ist es die Konsequenz anderer pathologischer Aspekte wie z.B. Nervenzellverlust oder dendritischer Schäden?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei transgene Mausmodelle untersucht, die beide eine Alzheimer-assoziierte Pathologie ausbilden: Bei dem 3xTg-AD Modell kommt es ab einem Alter von 4 Monaten zu ersten kognitiven Störungen, sowie zu intrazellulären A β -Ablagerungen im Kortex. Im weiteren Verlauf bilden sich ab 6 Monaten extrazelluläre A β -Plaques im frontalen, nicht aber im somatosensorischen Kortex aus. Ferner zeigen 12 Monate alte Tiere intrazelluläre Tau-Ablagerungen in Kortex und Hippocampus (siehe Kapitel 2.4.2). Aufgrund der Kombination aus A β - und Tau-Pathologie bildet dieses Mausmodell den Ablauf der menschlichen Alzheimer-Pathologie

besser ab, als vergleichbare Modelle, die ausschließlich eine A β -Pathologie entwickeln. Insbesondere das frühe Auftreten der ersten kognitiven Defizite, lange vor Bildung von A β -Plaques und neurofibrillären Bündeln (Oddo et al. 2003), sowie die generelle Abwesenheit von fibrillären A β -Plaques bei gleichzeitig hoher Akkumulation von löslichem A β (Oddo et al. 2006) war ausschlaggebend dafür, den Synapsenuntergang im 3xTg-AD Modell zu untersuchen.

Bei den hierzu durchgeführten Experimenten wurden dieselben Nervenzellen, Dendriten und dendritischen Spines im Kortex lebender Mäuse in vier Altersgruppen über jeweils zwei Monate mit Hilfe der 2-Photonen Intravitalmikroskopie untersucht. Diese langen Beobachtungszeiträume machten es möglich, den sehr langsam fortschreitenden Synapsenuntergang über den gesamten Krankheitsverlauf von 16 Monaten zu charakterisieren.

Die Befunde dieser Untersuchung zeigten erstmals an lebenden Alzheimer-Tiermodellen, dass es tatsächlich zu einem Verlust dendritischer Spines in Abwesenheit von A β -Plaques kommt. Dieser Verlust konnte, durch den Untergang von hauptsächlich persistenten Spines, mit dem Verlust funktioneller Synapsen gleichgesetzt werden, da nach KNOTT persistente Spines mit großer Wahrscheinlichkeit funktionelle Synapsen ausbilden (Knott et al. 2006). Damit wurde erstmalig *in vivo* die Hypothese bestätigt, dass es auch in Abwesenheit von A β -Plaques zu Synapsenverlust kommt (Blennow et al. 1996; Hsia et al. 1999; Terry et al. 1991). Der Untergang dendritischer Spines war bei 3xTg-AD Mäusen ab einem Alter von 13 Monaten zu beobachten und nahm mit steigendem Alter zu. Ferner gab es Hinweise auf mögliche kompensatorische Mechanismen. So wurde der dendritische Spineverlust bei 13-15 Monate alten 3xTg-AD Mäusen durch eine vermehrte Neubildung dendritischer Spines annähernd ausgeglichen. Dieser kompensatorische Anstieg von neu gebildeten Spines war bei 18-20 Monate alten Mäusen nicht mehr zu beobachten, mit der Folge eines noch höheren Verlusts dendritischer Spines. Die vorliegende Arbeit beschreibt somit erstmals das Auftreten eines kompensatorischen Mechanismus an Synapsen im Verlauf einer neurodegenerativen Erkrankung.

Der Untergang dendritischer Spines in der Hirnrinde fiel zeitlich mit dem erstmaligen Auftreten dystropher Veränderungen an Dendriten (dendritische Pathologie) zusammen. Die zeitliche Korrelation dieser Phänomene ließ darauf schließen, dass beide Prozesse miteinander in Verbindung standen. Tatsächlich zeigten 3xTg-AD Mäuse dendritischen Spineverlust ausschließlich an dystrophen Dendriten. Hierbei trat der Verlust dendritischer Spines sekundär nach dem Auftreten dystropher Anschwellungen an Dendriten auf. Bisherige Studien konnten dystrophe Veränderungen von Neuriten, sowie Strangbrüche mit Spineverlust in Verbindung bringen, jedoch ausschließlich in der Nähe von A β -Plaques (Brendza et al. 2005; Spires et al. 2005; Tsai et al. 2004). Die Befunde der vorliegenden

Arbeit zeigen somit erstmals, dass dendritische Pathologie auch abseits von A β -Plaques auftreten kann. Die dendritische Dystrophie in Abwesenheit von A β -Plaques ist ein pathologisches Phänomen, das auch bei Alzheimer-Patienten zu beobachten ist (Alafuzoff et al. 2008; Alzheimer 1907; Braak et al. 1986). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen somit erstmals, dass das 3xTg-AD Mausmodell als derzeit einziges Modell diesen Aspekt des Morbus Alzheimer abbildet. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit eine Ursache für den Untergang von Synapsen im 3xTg-AD Modell identifiziert werden, nämlich die dendritische Dystrophie abseits von A β -Plaques.

Neben dem Synapsenuntergang an dystrophen Dendriten konnte im 3xTg-AD Modell zusätzlich ein Verlust von Nervenzellen in Layer 3 des Kortex beobachtet werden. Hierbei kam es ausschließlich in einem Alter von 4-6 Monaten zu Nervenzellverlust. Dieser enge Zeitrahmen ist ungewöhnlich, da für den Morbus Alzheimer (Gomez-Isla et al. 1996; West et al. 1994) und für einige Mausmodelle (Calhoun et al. 1998; Capetillo-Zarate et al. 2006; Schmitz et al. 2004) ein progressiver Nervenzellverlust beschrieben ist. Möglicherweise war bei 3xTg-AD Mäusen eine kleine Untergruppe von Nervenzellen in Layer 3 des Kortex im Alter von 4-6 Monaten besonders anfällig für Nervenzellverlust. Interessanterweise fiel der Nervenzelluntergang zeitlich mit einer temporären Erhöhung der A β -Spiegel zusammen (Oddo et al. 2006). Dies könnte die Ursache für den Nervenzellverlust in Layer 3 sein. Der wichtigste Befund war jedoch, dass die dendritische Spinedichte von Nervenzellen bis zu ihrem Untergang unverändert blieb. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der Nervenzelluntergang nicht durch einen primär auftretenden Verlust dendritischer Spines ausgelöst wurde. Der Verlust von Synapsen steht somit nicht am Anfang der pathologischen Kaskade, die zu einem Verlust von Nervenzellen führt.

Dendritische Dystrophie und Nervenzellverlust traten im 3xTg-AD Modell in Anwesenheit von intrazellulärem A β und Tau auf. Somit stellte sich die Frage, ob beide Phänomene alleinig auf eine Erhöhung des A β -Spiegels zurückzuführen sind, oder ob es zusätzlich der Akkumulation von Tau bedarf. Um dies zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit ein zweites transgenes Mausmodell (APPPS1) untersucht. APPPS1 Mäuse zeigen ab einem Alter von 6 Wochen eine Akkumulation von A β im Kortex. Diese Mäuse tragen jedoch kein humanes *Tau*-Transgen und akkumulieren somit kein humanes Tau-Protein (Radde et al. 2006). An diesem Modell wurde untersucht, ob Nervenzellverlust und dendritische Dystrophie auch ohne Expression von humanem Tau zu beobachten sind. APPPS1 Mäuse wurden hierfür im Alter von 4-6 Monaten auf Nervenzellverlust und im Alter von 18-20 Monaten auf dendritische Dystrophie und Spineverlust untersucht, da genau in diesem Alter die Pathologie im 3xTg-AD Modell auftrat. Bemerkenswerterweise zeigten 4-6 Monate alte APPPS1 im Vergleich zu 3xTg-AD Mäusen keine Anzeichen von Nervenzellverlust. Dieser Befund untermauert die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie, die Nervenzellverlust bei

APPPS1 Mäusen erst ab einem Alter von 8 Monaten beschreibt (Radde et al. 2006). Des Weiteren kam es bei 18-20 Monate alten APPPS1 Mäusen zu keiner Ausbildung dendritischer Pathologie abseits von A β -Plaques und auch zu keinem Untergang dendritischer Spines. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die alleinige Erhöhung des A β -Spiegels im APPPS1 Modell nicht ausreichte, um einen Untergang dendritischer Spines auszulösen. Neben dem ausbleibenden Verlust dendritischer Spines im APPPS1 Modell abseits von A β -Plaques, kam es auch in jungen 3xTg-AD Mäusen bis zu einem Alter von 12 Monaten zu keinem Synapsenverlust, also genau zu der Zeit, wenn die A β -Oligomerspiegel im Gehirn dieser Mäuse erhöht sind (Oddo et al. 2006). Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den *in vitro* Arbeiten von SHANKAR und Kollegen, die gezeigt haben, dass die alleinige Applikation von A β -Oligomeren auf organotypische Hirnschnitte von WT Mäusen zu Synapsenverlust an hippocampalen Neuronen führt (Shankar et al. 2007; Shankar et al. 2008). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, dass im 3xTg-AD Modell zusätzlich die Akkumulation von Tau notwendig ist, um Nervenzellverlust und dendritischer Pathologie auszulösen.

Die Untersuchung der Effekte einer Erhöhung des A β -Spiegels auf die strukturelle Plastizität von Synapsen in transgenen Alzheimer-Mausmodellen abseits von A β -Plaques kam zu folgenden Ergebnissen: Es konnte ein progressiver Verlust dendritischer Spines im Kortex und damit Synapsenverlust im 3xTg-AD Tiermodell beobachtet werden. Der Untergang von Synapsen zeigte sich erst ab einem Alter von 13 Monaten. Dieser Verlust wurde nicht durch Ablagerung von A β -Plaques bedingt, sondern korrelierte mit dem Auftreten dystropher Anschwellungen an Dendriten. Dieser Befund spiegelt einen Teilaspekt der Alzheimer-Pathologie beim Menschen wider (Alafuzoff et al. 2008; Alzheimer 1907; Braak et al. 1986). Daneben kam es früh zu einem Verlust an Nervenzellen in Layer 3 des Kortex. Ein primärer Verlust dendritischer Spines war hierbei weder für die dendritische Dystrophie noch für den Nervenzellverlust ursächlich. Genau das Gegenteil war der Fall: dendritische Dystrophie und Nervenzellverlust führten zu einem sekundären Untergang dendritischer Spines. Durch vergleichende Untersuchungen mit einem weiteren transgenen Alzheimer-Mausmodell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die für die Alzheimersche Erkrankung typische A β -Plaque-unabhängige dendritische Pathologie, beim 3xTg-AD Modell abhängig von der Tau-Expression ist. In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein Zusammenhang zwischen dem Synapsenuntergang und der Akkumulation von Tau in einem Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung mit kombinierter A β - und Tau-Pathologie gezeigt werden.

Die sich hieraus ergebenden Implikationen für das Verständnis des Morbus Alzheimer, sind folgende: Erstens, A β -Plaques sind nicht der alleinige Auslöser des Synapsenuntergangs beim Morbus Alzheimer. Auch die Akkumulation von löslichem A β alleine reicht nicht aus, um

Synapsenverlust *in vivo* zu induzieren, es bedarf vielmehr der zusätzlichen Akkumulation von Tau. Dies spricht dafür, die bisher vernachlässigte Rolle von Tau zukünftig stärker bei der Entwicklung von Therapieansätzen mit einzubeziehen. Zweitens konnten erstmals dendritische Pathologie abseits von A β -Plaques und Nervenzellverlust als zwei neue Mechanismen identifiziert werden, die Synapsenverlust auslösen. Beiden pathologischen Phänomenen ging kein primärer Synapsenverlust voraus. Somit scheint der postulierte primäre Synapsenverlust zumindest im 3xTg-AD Modell nicht stattzufinden. Vielmehr liegt dem Untergang von Synapsen ein primärer dendritischer Schaden beziehungsweise ein Verlust von Nervenzellen zugrunde. Dieser Befund legt nahe, sich bei zukünftigen Therapien des Morbus Alzheimer nicht ausschließlich auf den Verlust von Synapsen als primäres pathologisches Ereignis zu konzentrieren, sondern in Betracht zu ziehen, dass auch ein dendritischer Schaden beziehungsweise ein früher Nervenzellverlust ursächlich für den frühen Verlust kognitiver Fähigkeiten sein könnte.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel den Synapsenuntergang beim Morbus Alzheimer zu untersuchen. Hierbei waren einerseits die Auswirkungen einer therapeutischen Senkung des A β -Spiegels und andererseits die Effekte der A β -Akkumulation in transgenen Alzheimer-Mausmodellen, auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines von primärem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand der Untersuchung von homo- und heterozygoten APP KO Mäusen erstmals eine enge Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der APP- respektive A β -Menge und der Anzahl dendritischer Spines in der Hirnrinde nachgewiesen werden. Eine pharmakologische Senkung des A β -Spiegels durch Blockierung der APP-spaltenden γ -Sekretase in WT Mäusen, führte jedoch nicht wie erwartet zu einem Anstieg, sondern zum irreversiblen Verlust dendritischer Spines. Mit γ -Sekretase Inhibitoren behandelte APP KO Mäuse waren jedoch gegen Spineverlust geschützt, so dass dieser direkt auf die Blockierung der APP-Prozessierung zurückgeführt werden konnte. Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass APP-Substrate, die bei Blockierung der γ -Sekretase akkumulieren, einen synaptotoxischen Effekt haben. Deshalb ist der Einsatz von γ -Sekretase Inhibitoren zur Alzheimer Therapie - einer der in der vorliegenden Arbeit getesteten γ -Sekretase Inhibitoren befindet sich aktuell in klinischen Studien - zu überdenken, da schwerwiegende Nebenwirkungen an der Synapse auftreten können, die den positiven Effekt einer Senkung des A β -Spiegels möglicherweise überwiegen.

Die Analyse der strukturellen Spine-Plastizität im 3xTg-AD Mausmodell des Morbus Alzheimer, welches die humane A β - und Tau-Pathologie besonders gut abbildet, zeigte erst ab einem Alter von 13 Monaten einen progressiven Verlust dendritischer Spines. Dieser wurde erstmals in Abwesenheit von A β -Plaques detektiert. Außerdem traten dystrophe Anschwellungen an Dendriten auf, die offensichtlich die primäre Ursache für den späteren Spineuntergang darstellten. Der detektierte Layer 3 Nervenzellverlust war nicht, wie von anderen Autoren vermutet, bedingt durch einen vorherigen Untergang dendritischer Spines, sondern führte selbst erst zur Unterbrechung aller synaptischen Verbindungen der Nervenzelle. Durch vergleichende Untersuchung eines zweiten Alzheimer-Mausmodell konnte belegt werden, dass die für die Alzheimersche Erkrankung typische A β -Plaque-unabhängige dendritische Pathologie beim 3xTg-AD Modell in Abhängigkeit der Tau-Expression auftritt. Somit zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass der Untergang dendritischer Spines bei transgenen Mausmodellen der Alzheimerschen Erkrankung, nicht wie allgemein angenommen ein primäres Ereignis darstellt, sondern sekundär als Folge eines Nervenzelluntergangs bzw. einer dendritischen Pathologie verstanden werden muss und darüber hinaus tau-abhängig ist. Diese Befunde legen nahe, sich bei zukünftigen Therapien des Morbus Alzheimer nicht ausschließlich auf den Verlust von Synapsen als primäres pathologisches Ereignis zu konzentrieren, sondern in Betracht zu ziehen, dass auch ein Tau-induzierter dendritischer Schaden beziehungsweise ein früher Nervenzellverlust ursächlich für den frühen Verlust kognitiver Fähigkeiten sein könnte.

6 Literatur

Akram, A., Christoffel, D., Rocher, A. B., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Herrmann, F. R., Haroutunian, V., Giannakopoulos, P., und Hof, P. R. (2008) Stereologic estimates of total spinophilin-immunoreactive spine number in area 9 and the CA1 field: Relationship with the progression of Alzheimer's disease; *Neurobiol. Aging* 29, 1296-1307.

Alafuzoff, I., Arzberger, T., Al Sarraj, S., Bodi, I., Bogdanovic, N., Braak, H., Bugiani, O., Del Tredici, K., Ferrer, I., Gelpi, E., Giaccone, G., Graeber, M. B., Ince, P., Kamphorst, W., King, A., Korkolopoulou, P., Kovacs, G. G., Larionov, S., Meyronet, D., Monoranu, C., Parchi, P., Patsouris, E., Roggendorf, W., Seilhean, D., Tagliavini, F., Stadelmann, C., Streichenberger, N., Thal, D. R., Wharton, S. B., und Kretzschmar, H. (2008) Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: A study of the BrainNet Europe consortium; *Brain Pathol.* 18, 484-496.

Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde; *Allgemeine Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 64, 146-148.

Anderson, J. P., Esch, F. S., Keim, P. S., Sambamurti, K., Lieberburg, I., und Robakis, N. K. (1991) Exact Cleavage Site of Alzheimer Amyloid Precursor in Neuronal Pc-12 Cells; *Neurosci. Lett.* 128, 126-128.

Artavanistsakonias, S., Matsuno, K., und Fortini, M. E. (1995) Notch Signaling; *Science* 268, 225-232.

Ball, M. J. (1977) Neuronal Loss, Neurofibrillary Tangles and Granulovacuolar Degeneration in Hippocampus with Aging and Dementia - Quantitative Study; *Acta Neuropathologica* 37, 111-118.

Barten, D. M., Meredith, J. E., Jr., Zaczek, R., Houston, J. G., und Albright, C. F. (2006) Gamma-secretase inhibitors for Alzheimer's disease: balancing efficacy and toxicity; *Drugs R. D.* 7, 87-97.

Blennow, K., Bogdanovic, N., Alafuzoff, I., Ekman, R., und Davidsson, P. (1996) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: Relation to severity of dementia, but not to senile plaques, neurofibrillary tangles, or the ApoE4 allele; *Journal of Neural Transmission* 103, 603-618.

Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C. B., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C. M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L., und Younkin, S. G. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A beta 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo; *Neuron* 17, 1005-1013.

Braak, H., Braak, E., Grundkeiqbal, I., und Iqbal, K. (1986) Occurrence of Neuropil Threads in the Senile Human-Brain and in Alzheimers-Disease - A 3Rd Location of Paired Helical Filaments Outside of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques; *Neurosci. Lett.* 65, 351-355.

Bracco, L., Gallato, R., Grigoletto, F., Lippi, A., Lepore, V., Bino, G., Lazzaro, M. P., Carella, F., Piccolo, T., Pozzilli, C., Giometto, B., und Amaducci, L. (1994) Factors Affecting Course and Survival in Alzheimers-Disease - A 9-Year Longitudinal-Study; *Arch. Neurol.* 51, 1213-1219.

Breen, K. C., Bruce, M., und Anderton, B. H. (1991) Beta-Amyloid Precursor Protein Mediates Neuronal Cell-Cell and Cell-Surface Adhesion; *Journal of Neuroscience Research* 28, 90-100.

Brendza, R. P., Bacskai, B. J., Cirrito, J. R., Simmons, K. A., Skoch, J. M., Klunk, W. E., Mathis, C. A., Bales, K. R., Paul, S. M., Hyman, B. T., und Holtzman, D. M. (2005) Anti-Abeta antibody treatment promotes the rapid recovery of amyloid-associated neuritic dystrophy in PDAPP transgenic mice; *J Clin. Invest* 115, 428-433.

Burns, A. (2009) Alzheimer's disease: on the verges of treatment and prevention; *Lancet Neurology* 8, 4-5.

Calhoun, M. E., Wiederhold, K.-H., Abramowski, D., Phinney, A. L., Probst, A., und Sturchler-Pierrat, C. (1998) Neuron loss in APP transgenic mice; *Nature* 395, 755-756.

Cao, X. und Sudhof, T. C. (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60; *Science* 293, 115-120.

Capetillo-Zarate, E., Staufenbiel, M., Abramowski, D., Haass, C., Escher, A., Stadelmann, C., Yamaguchi, H., Wiestler, O. D., und Thal, D. R. (2006) Selective vulnerability of different types of commissural neurons for amyloid beta-protein-induced neurodegeneration in APP23 mice correlates with dendritic tree morphology; *Brain* 129, 2992-3005.

Caroni, P. (1997) Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice; *J. Neurosci. Meth.* 71, 3-9.

Casas, C., Sergeant, N., Itier, J. M., Blanchard, V., Wirths, O., van der, K. N., Vingtdoux, V., van de, S. E., Ret, G., Canton, T., Drobecq, H., Clark, A., Bonici, B., Delacourte, A., Benavides, J., Schmitz, C., Tremp, G., Bayer, T. A., Benoit, P., und Pradier, L. (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model; *Am. J Pathol.* 165, 1289-1300.

Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., Kholodenko, D., Motter, R., Sherrington, R., Perry, B., Yao, H., Strome, R., Lieberburg, I., Rommens, J., Kim, S., Schenk, D., Fraser, P., St George, H. P., und Selkoe, D. J. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice; *Nat. Med.* 3, 67-72.

Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., und Ashe, K. H. (2005) Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function; *Nat. Neurosci.* 8, 79-84.

Cook, D. G., Forman, M. S., Sung, J. C., Leight, S., Kolson, D. L., Iwatsubo, T., Lee, V. M. Y., und Doms, R. W. (1997) Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells; *Nature Medicine* 3, 1021-1023.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., und Pericak-Vance, M. A. (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families; *Science* 261, 921-923.

Coyle, J. T., Price, D. L., und Delong, M. R. (1983) Alzheimers-Disease - A Disorder of Cortical Cholinergic Innervation; *Science* 219, 1184-1190.

Dariansmith, C. und Gilbert, C. D. (1994) Axonal Sprouting Accompanies Functional Reorganization in Adult Cat Striate Cortex; *Nature* 368, 737-740.

Davies, C. A., Mann, D. M. A., Sumpter, P. Q., und Yates, P. O. (1987) A Quantitative Morphometric Analysis of the Neuronal and Synaptic Content of the Frontal and Temporal Cortex in Patients with Alzheimers-Disease; *Journal of the Neurological Sciences* 78, 151-164.

Dawson, G. R., Seabrook, G. R., Zheng, H., Smith, D. W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B. J., Boyce, S., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Van der Ploeg, L. H., und Sirinathsinghji, D. J. (1999) Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein; *Neuroscience* 90, 1-13.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., von Figura, K., und Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein; *Nature* 391, 387-390.

DeKosky, S. T. und Scheff, S. W. (1990) Synapse Loss in Frontal-Cortex Biopsies in Alzheimers-Disease - Correlation with Cognitive Severity; *Ann. Neurol.* 27, 457-464.

Denk, W., Strickler, J. H., und Webb, W. W. (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy; *Science* 248, 73-76.

Dickson, D. W., Crystal, H. A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I., und Davies, P. (1995) Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly; *Neurobiol. Aging* 16, 285-298.

Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint, A. P., Fang, L. Y., Freedman, S. B., Folmer, B., Goldbach, E., Holsztynska, E. J., Hu, K. L., Johnson-Wood, K. L., Kennedy, S. L., Kholodenko, D., Knops, J. E., Latimer, L. H., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I. M., Motter, R. N., Mutter, L. C., Nietz, J., Quinn, K. P., Sacchi, K. L., Seubert, P. A., Shopp, G. M.,

- Thorsett, E. D., Tung, J. S., Wu, J., Yang, S., Yin, C. T., Schenk, D. B., May, P. C., Altstiel, L. D., Bender, M. H., Boggs, L. N., Britton, T. C., Clemens, J. C., Czilli, D. L., Dieckman-McGinty, D. K., Droste, J. J., Fuson, K. S., Gitter, B. D., Hyslop, P. A., Johnstone, E. M., Li, W. Y., Little, S. P., Mabry, T. E., Miller, F. D., und Audia, J. E. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain; *J Neurochem* 76, 173-181.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J., und Younkin, S. (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1; *Nature* 383, 710-713.
- Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., und Beyreuther, K. (2004) The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages - Modulation of APLP-1 processing by N-glycosylation; *J. Biol. Chem.* 279, 18146-18156.
- Engert, F. und Bonhoeffer, T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity; *Nature* 399, 66-70.
- Esposito, A., Federici, F., Usai, C., Cannone, F., Chirico, G., Collini, M., und Diaspro, A. (2004) Notes on theory and experimental conditions behind two-photon excitation microscopy; *Microscopy Research and Technique* 63, 12-17.
- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., Nerbonne, J. M., Lichtman, J. W., und Sanes, J. R. (2000) Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP; *Neuron* 28, 41-51.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y. Q., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E., und Sczufca, M. (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study; *Lancet* 366, 2112-2117.
- Fleisher, A. S., Raman, R., Siemers, E. R., Becerra, L., Clark, C. M., Dean, R. A., Farlow, M. R., Galvin, J. E., Peskind, E. R., Quinn, J. F., Sherzai, A., Sowell, B., Aisen, P. S., und Thal, L. J. (2008) Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease; *Arch. Neurol.* 65, 1031-1038.

Florence, S. L., Taub, H. B., und Kaas, J. H. (1998) Large-scale sprouting of cortical connections after peripheral injury in adult macaque monkeys; *Science* 282, 1117-1121.

Fraser, P. E., Yang, D. S., Yu, G., Levesque, L., Nishimura, M., Arawaka, S., Serpell, L. C., Rogaeva, E., und George-Hyslop, P. (2000) Presenilin structure, function and role in Alzheimer disease; *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1502, 1-15.

Fuhrmann, M., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., und Herms, J. (2007) Dendritic pathology in prion disease starts at the synaptic spine; *J Neurosci.* 27, 6224-6233.

Galton, C. J. und Hodges, J. R. (1999) The spectrum of dementia and its treatment; *Journal of the Royal College of Physicians of London* 33, 234-239.

Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., und Haass, C. (2002) A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish; *EMBO Rep.* 3, 688-694.

Gilbert, C. D. und Wiesel, T. N. (1992) Receptive-Field Dynamics in Adult Primary Visual-Cortex; *Nature* 356, 150-152.

Gilman, S., Koller, M., Black, R. S., Jenkins, L., Griffith, S. G., Fox, N. C., Eisner, L., Kirby, L., Rovira, M. B., Forette, F., und Orgogozo, J. M. (2005) Clinical effects of A beta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial; *Neurology* 64, 1553-1562.

Gitter, B. D., Czilli, D. L., Dieckman, D. K., Bender, M. H., und Nissen, J. S. (2004) Stereoselective inhibition of amyloid beta peptide secretion by LY450139, a novel functional gamma secretase inhibitor.; *Neurobiol Aging* 25, 571-571.

Glennner, G. G. und Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1131-1135.

Goedert, M. (1993) Tau-Protein and the Neurofibrillary Pathology of Alzheimers-Disease; *Trends in Neurosciences* 16, 460-465.

Goedert, M., Crowther, R. A., und Spillantini, M. G. (1998) Tau mutations cause frontotemporal dementias; *Neuron* 21, 955-958.

Goedert, M. und Jakes, R. (2005) Mutations causing neurodegenerative tauopathies; *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1739, 240-250.

Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, O. W., Saffiotti, U., und Gajdusek, D. C. (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease.; *Science* 235, 877-880.

Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Jr., Morris, J. C., Growdon, J. H., und Hyman, B. T. (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease; *J. Neurosci.* 16, 4491-4500.

Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J. P., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Xu, H., Greengard, P., und Relkin, N. R. (2000) Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain; *Am. J Pathol.* 156, 15-20.

Gray, E. G. (1959) Electron Microscopy of Synaptic Contacts on Dendrite Spines of the Cerebral Cortex; *Nature* 183, 1592-1593.

Grimm, M. O., Grimm, H. S., Patzold, A. J., Zinser, E. G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J. A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J., und Hartmann, T. (2005) Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin; *Nat. Cell Biol.* 7, 1118-1123.

Grutzendler, J., Kasthuri, N., und Gan, W. B. (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex; *Nature* 420, 812-816.

Haass, C. (2004) Take five - BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation; *EMBO J.* 23, 483-488.

Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., und . (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism; *Nature* 359, 322-325.

Haass, C. und Selkoe, D. J. (1993) Cellular Processing of Beta-Amyloid Precursor Protein and the Genesis of Amyloid Beta-Peptide; *Cell* 75, 1039-1042.

Haass, C. und Selkoe, D. J. (1998) Alzheimer's disease - A technical KO of amyloid-beta peptide; *Nature* 391, 339-340.

Haass, C. und Selkoe, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide; *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 101-112.

Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease; *Trends in Neurosciences* 20, 154-159.

Hardy, J., Duff, K., Hardy, K. G., Perez-tur, J., und Hutton, M. (1998) Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: Amyloid and its relationship to tau; *Nature Neuroscience* 1, 355-358.

Hardy, J. und Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics; *Science* 297, 353-356.

Harris, K. M., Jensen, F. E., und Tsao, B. (1992) 3-Dimensional Structure of Dendritic Spines and Synapses in Rat Hippocampus (Ca1) at Postnatal Day-15 and Adult Ages - Implications for the Maturation of Synaptic Physiology and Long-Term Potentiation; *J. Neurosci.* 12, 2685-2705.

Harris, K. M. und Stevens, J. K. (1989) Dendritic Spines of Ca-1 Pyramidal Cells in the Rat Hippocampus - Serial Electron-Microscopy with Reference to Their Biophysical Characteristics; *J. Neurosci.* 9, 2982-2997.

Hartmann, T. (1999) Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide; *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 249, 291-298.

Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfner, D. P., und Muller, U. (2000) Mice

with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members; *J. Neurosci.* 20, 7951-7963.

Hof, P. R. und Morrison, J. H. (1990) Quantitative-Analysis of A Vulnerable Subset of Pyramidal Neurons in Alzheimers-Disease .2. Primary and Secondary Visual-Cortex; *J. Comp. Neurol.* 301, 55-64.

Holtmaat, A. J., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., und Svoboda, K. (2005) Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo; *Neuron* 45, 279-291.

Hoogendijk, W. J. G., Pool, C. W., Troost, D., Vanzwieten, E., und Swaab, D. F. (1995) Image Analyzer-Assisted Morphometry of the Locus-Coeruleus in Alzheimers-Disease, Parkinsons-Disease and Amyotrophic-Lateral-Sclerosis; *Brain* 118, 131-143.

Horn, G., Bradley, P., und McCabe, B. J. (1985) Changes in the Structure of Synapses Associated with Learning; *J. Neurosci.* 5, 3161-3168.

Hsia, A. Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G. Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R. C., Nicoll, R. A., und Mucke, L. (1999) Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3228-3233.

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

Hyman, B. T., Vanhoesen, G. W., Damasio, A. R., und Barnes, C. L. (1984) Alzheimers-Disease - Cell-Specific Pathology Isolates the Hippocampal-Formation; *Science* 225, 1168-1170.

Imbimbo, B. P., Del Giudice, E., Colavito, D., D'Arrigo, A., Carbonare, M. D., Villetti, G., Facchinetti, F., Volta, R., Pietrini, V., Baroc, M. F., Serneels, L., De Strooper, B., und Leon, A. (2007) 1-(3',4'-dichloro-2-fluoro[1,1'-biphenyl]-4-yl)-cyclopropanecarboxylic acid (CHF5074), a novel gamma-secretase modulator, reduces brain beta-amyloid pathology in a Transgenic

mouse model of Alzheimer's disease without causing peripheral toxicity; *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 323, 822-830.

Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., Takegoshi, K., Nagao, M., Shimizu, T., und Shirasawa, T. (2005) Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease; *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99, 437-447.

Kaas, J. H., Krubitzer, L. A., Chino, Y. M., Langston, A. L., Polley, E. H., und Blair, N. (1990) Reorganization of Retinotopic Cortical Maps in Adult Mammals After Lesions of the Retina; *Science* 248, 229-231.

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

Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbech, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., und Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor.; *Nature* 325, 733-736.

Katzman, R. (1986) Alzheimers-Disease; *N. Engl. J. Med.* 314, 964-973.

Keck, T., Mrcic-Flogel, T. D., Afonso, M. V., Eysel, U. T., Bonhoeffer, T., und Hubener, M. (2008) Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex; *Nature Neuroscience* 11, 1162-1167.

Kelley, K. A., Friedrich, V. L., Sonshine, A., Hu, Y. L., Lax, J., Li, J., Drinkwater, D., Dressler, H., und Herrup, K. (1994) Expression of Thy-1 Lacz Fusion Genes in the Cns of Transgenic Mice; *Mol. Brain Res.* 24, 261-274.

Kim, S. H., Lah, J. J., Thinakaran, G., Levey, A., und Sisodia, S. S. (2000) Subcellular localization of presenilins: Association with a unique membrane pool in cultured cells; *Neurobiol. Disease* 7, 99-117.

Kimberly, W. T., Esler, W. P., Ye, W. J., Ostaszewski, B. L., Gao, J., Diehl, T., Selkoe, D. J., und Wolfe, M. S. (2003a) Notch and the amyloid precursor protein are cleaved by similar gamma-secretase(s); *Biochemistry* 42, 137-144.

Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W. J., Wolfe, M. S., und Selkoe, D. J. (2003b) gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6382-6387.

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

Klunk, W. E., Bacsikai, B. J., Mathis, C. A., Kajdasz, S. T., McLellan, M. E., Frosch, M. P., Debnath, M. L., Holt, D. P., Wang, Y., und Hyman, B. T. (2002) Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative; *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 797-805.

Knott, G. W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., und Svoboda, K. (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo; *Nature Neuroscience* 9, 1117-1124.

Koh, I. Y., Lindquist, W. B., Zito, K., Nimchinsky, E. A., und Svoboda, K. (2002) An image analysis algorithm for dendritic spines; *Neural Comput.* 14, 1283-1310.

Kokjohn, T. A. und Roher, A. E. (2009) Antibody Responses, Amyloid-beta Peptide Remnants and Clinical Effects of AN-1792 Immunization in Patients with AD in an Interrupted Trial; *Cns & Neurological Disorders-Drug Targets* 8, 88-97.

Kopan, R. und Ilagan, M. X. G. (2004) gamma-secretase: proteasome of the membrane?; *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 499-504.

LaFerla, F. M. (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease; *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 862-872.

LaFerla, F. M., Green, K. N., und Oddo, S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease; *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499-509.

Lamb, B. T., Sisodia, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Kearns, W. G., Pearson, P. L., Price, D. L., und Gearhart, J. D. (1993) Introduction and Expression of the 400 Kilobase Amyloid Precursor Protein Gene in Transgenic Mice (Vol 5, Pg 22, 1993); *Nature Genet.* 5, 312-312.

Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., und Klein, W. L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 6448-6453.

Lassmann, H. (1996) Patterns of synaptic and nerve cell pathology in Alzheimer's disease; *Behavioural Brain Research* 78, 9-14.

Leissring, M. A., Murphy, M. P., Mead, T. R., Akbari, Y., Sugarman, M. C., Jannatipour, M., Anliker, B., Muller, U., Saftig, P., De Strooper, B., Wolfe, M. S., Golde, T. E., und LaFerla, F. M. (2002) A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4697-4702.

Lemere, C. A., Lopera, F., Kosik, K. S., Lendon, C. L., Ossa, J., Saido, T. C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J. C. L., Anthony, D. C., Koo, E. H., Goate, A. M., Selkoe, D. J., und Arango, J. C. V. (1996) The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology; *Nature Medicine* 2, 1146-1150.

Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., und McGowan, E. (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP; *Science* 293, 1487-1491.

Li, Z. W., Stark, G., Gotz, J., Rulicke, T., Gschwind, M., Huber, G., Muller, U., und Weissmann, C. (1996) Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6158-6162.

Lippman, J. und Dunaevsky, A. (2005) Dendritic spine morphogenesis and plasticity; *J. Neurobiol.* 64, 47-57.

Magara, F., Muller, U., Li, Z. W., Lipp, H. P., Weissmann, C., Stagljar, M., und Wolfer, D. P. (1999) Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4656-4661.

Majewska, A. K., Newton, J. R., und Sur, M. (2006) Remodeling of synaptic structure in sensory cortical areas in vivo; *J. Neurosci.* 26, 3021-3029.

Masliah, E., Terry, R. D., Alford, M., DeTeresa, R., und Hansen, L. A. (1991) Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease; *Am. J. Pathol.* 138, 235-246.

Mayer, S. C., Kreft, A. F., Harrison, B., Abou-Gharbia, M., Antane, M., Aschmies, S., Atchison, K., Chlenov, M., Cole, D. C., Comery, T., Diamantidis, G., Ellingboe, J., Fan, K., Galante, R., Gonzales, C., Ho, D. M., Hoke, M. E., Hu, Y., Huryn, D., Jain, U., Jin, M., Kremer, K., Kubrak, D., Lin, M., Lu, P. M., Magolda, R., Martone, R., Moore, W., Oganessian, A., Pangalos, M. N., Porte, A., Reinhart, P., Resnick, L., Riddell, D. R., Sonnenberg-Reines, J., Stock, J. R., Sun, S. C., Wagner, E., Wang, T., Woller, K., Xu, Z., Zaleska, M. M., Zeldis, J., Zhang, M. S., Zhou, H., und Jacobsen, J. S. (2008) Discovery of Begacestat, a Notch-1-Sparing gamma-Secretase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease; *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 7348-7351.

McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I., und Masters, C. L. (1999) Soluble pool of A beta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease; *Ann. Neurol.* 46, 860-866.

Merzenich, M. M., Kaas, J. H., Wall, J., Nelson, R. J., Sur, M., und Felleman, D. (1983) Topographic Reorganization of Somatosensory Cortical Areas 3B and 1 in Adult Monkeys Following Restricted Deafferentation; *Neuroscience* 8, 33-55.

Milano, J., McKay, J., Dagenais, C., Foster-Brown, L., Pognan, F., Gadiant, R., Jacobs, R. T., Zacco, A., Greenberg, B., und Ciaccio, P. J. (2004) Modulation of notch processing by

gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation; *Toxicological Sciences* 82, 341-358.

Moser, M. B., Trommald, M., und Andersen, P. (1994) An Increase in Dendritic Spine Density on Hippocampal Ca1 Pyramidal Cells Following Spatial-Learning in Adult-Rats Suggests the Formation of New Synapses; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12673-12675.

Müller, U. (1994) Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified β -amyloid precursor protein gene; *Cell* 79, 755-765.

Naruse, S., Thinakaran, G., Luo, J. J., Kusiak, J. W., Tomita, T., Iwatsubo, T., Qian, X. Z., Ginty, D. D., Price, D. L., Borchelt, D. R., Wong, P. C., und Sisodia, S. S. (1998) Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons; *Neuron* 21, 1213-1221.

Ness, D. K., Boggs, L. N., Hepburn, D. L., Gitter, B., Long, G. G., May, P. C., Piroozi, K. S., Schafer, K. A., und Yang, Z. (2004) Reduced amyloid burden, increased C-99 concentrations and evaluation of neuropathology in the brains of PDAPP mice given LY450139 dihydrate daily by gavage for 5 months; *Neurobiol Aging* 25 (suppl 2), 238-238.

Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., und Svoboda, K. (2002) Structure and function of dendritic spines; *Annu. Rev. Physiol* 64, 313-353.

Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., und Vassar, R. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation; *J. Neurosci.* 26, 10129-10140.

Oda, T., Wals, P., Osterburg, H. H., Johnson, S. A., Pasinetti, G. M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Stine, W. B., Snyder, S. W., Holzman, T. F., Krafft, G. A., und Finch, C. E. (1995) Clusterin (ApoJ) Alters the Aggregation of Amyloid Beta-Peptide (A-Beta(1-42)) and Forms Slowly Sedimenting A-Beta Complexes That Cause Oxidative Stress; *Exp. Neurol.* 136, 22-31.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., und LaFerla, F. M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction; *Neuron* 39, 409-421.

Oddo, S., Caccamo, A., Tran, L., Lambert, M. P., Glabe, C. G., Klein, W. L., und LaFerla, F. M. (2006) Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology; *J Biol. Chem.* 281, 1599-1604.

Olson, M. I. und Shaw, C. M. (1969) Presenile Dementia and Alzheimers Disease in Mongolism; *Brain* 92, 147-&.

Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., und Remington, S. J. (1996) Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein; *Science* 273, 1392-1395.

Plassman, B. L., Langa, K. M., Fisher, G. G., Heeringa, S. G., Weir, D. R., Ofstedal, M. B., Burke, J. R., Hurd, M. D., Potter, G. G., Rodgers, W. L., Steffens, D. C., Willis, R. J., und Wallace, R. B. (2007) Prevalence of dementia in the united states: The aging, demographics, and memory study; *Neuroepidemiology* 29, 125-132.

Price, D. L., Tanzi, R. E., Borchelt, D. R., und Sisodia, S. S. (1998) Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models; *Annu Rev Genet.* 32, 461-493.

Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A., und Herms, J. (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein; *J Neurosci.* 26, 7212-7221.

Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M. E., Jaggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Holscher, C., Mathews, P. M., und Jucker, M. (2006) Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology; *EMBO Rep.* 7, 940-946.

Radde, R., Duma, C., Goedert, M., und Jucker, M. (2008) The value of incomplete mouse models of Alzheimer's disease; *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 (Suppl 1), 70-74.

Ramon y Cajal, S. (1888) Estructura de los centros nervioso de las aves; *Rev Trim Hitol norm Pat* 1, 1-10.

Ramon y Cajal, S. (1891) Sur la structure de l'ecorce cerebrale de quelques mammiferes; *Cellule* 7, 123-176.

Ray, W. J., Yao, M., Mumm, J., Schroeter, E. H., Saftig, P., Wolfe, M., Selkoe, D. J., Kopan, R., und Goate, A. M. (1999a) Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of notch; *J. Biol. Chem.* 274, 36801-36807.

Ray, W. J., Yao, M., Nowotny, P., Mumm, J., Zhang, W. J., Wu, J. Y., Kopan, R., und Goate, A. M. (1999b) Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3263-3268.

Reinhard, C., Hebert, S. S., und De Strooper, B. (2005) The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function; *EMBO J*

Robertson, D. und Irvine, D. R. F. (1989) Plasticity of Frequency Organization in Auditory-Cortex of Guinea-Pigs with Partial Unilateral Deafness; *J. Comp. Neurol.* 282, 456-471.

Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., und Greengard, P. (2001) The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement; *J. Cell Biol.* 153, 1403-1414.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of Dna with A Thermostable Dna-Polymerase; *Science* 239, 487-491.

SantaCruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., Forster, C., Yue, M., Orne, J., Janus, C., Mariash, A., Kuskowski, M., Hyman, B., Hutton, M., und Ashe, K. H. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function; *Science* 309, 476-481.

Saunders, A. M. (2001) Gene identification in Alzheimer's disease; *Pharmacogenomics* 2, 239-249.

Scheinfeld, M. H., Ghersi, E., Laky, K., Fowlkes, B. J., und D'Adamio, L. (2002) Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and-2 by gamma-secretase regulates transcription; *J. Biol. Chem.* 277, 44195-44201.

Schmitz, C., Rutten, B. P., Pielen, A., Schafer, S., Wirths, O., Tremp, G., Czech, C., Blanchard, V., Multhaup, G., Rezaie, P., Korr, H., Steinbusch, H. W., Pradier, L., und Bayer, T. A. (2004) Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease; *Am. J Pathol.* 164, 1495-1502.

Segal, M. (2002) Dendritic spines: elementary structural units of neuronal plasticity; *Plasticity in the Adult Brain: from Genes to Neurotherapy* 138, 53-59.

Seiffert, D., Bradley, J. D., Rominger, C. M., Rominger, D. H., Yang, F. D., Meredith, J. E., Tang, Q., Roach, A. H., Thompson, L. A., Spitz, S. M., Higaki, J. N., Prakash, S. R., Combs, A. P., Copeland, R. A., Arneric, S. P., Hartig, P. R., Robertson, D. W., Cordell, B., Stern, A. M., Olson, R. E., und Zaczek, R. (2000) Presenilin-1 and-2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors; *J. Biol. Chem.* 275, 34086-34091.

Selkoe, D. J. (1993) Physiological Production of the Beta-Amyloid Protein and the Mechanism of Alzheimers-Disease; *Trends in Neurosciences* 16, 403-409.

Selkoe, D. J. (1996) Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease; *J. Biol. Chem.* 271, 18295-18298.

Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy; *Physiological Reviews* 81, 741-766.

Selkoe, D. J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure; *Science* 298, 789-791.

Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I., und Schenk, D. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids; *Nature* 359, 325-327.

Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., und Sabatini, B. L. (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway; *J Neurosci.* 27, 2866-2875.

Shankar, G. M., Li, S. M., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., und Selkoe, D. J. (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory; *Nature Medicine* 14, 837-842.

Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W. M., Selkoe, D. J., und Tonegawa, S. (1997) Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice; *Cell* 89, 629-639.

Shull, S., Heintz, N. H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y. M. W., Marsh, J. P., und Mossman, B. T. (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants; *J. Biol. Chem.* 266, 24398-24403.

Small, D. H., Mok, S. S., und Bornstein, J. C. (2001) Alzheimer's disease and AP toxicity: from top to bottom; *Nature Reviews Neuroscience* 2, 595-598.

Spires, T. L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E. A., McLean, P. J., Skoch, J., Nguyen, P. T., Bacskai, B. J., und Hyman, B. T. (2005) Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy; *J. Neurosci.* 25, 7278-7287.

Spires, T. L., Orne, J. D., SantaCruz, K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Ashe, K. H., und Hyman, B. T. (2006) Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy; *Am. J. Pathol.* 168, 1598-1607.

Stepanyants, A., Hof, P. R., und Chklovskii, D. B. (2002) Geometry and structural plasticity of synaptic connectivity; *Neuron* 34, 275-288.

Sze, C. I., Troncoso, J. C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D. L., und Martin, L. J. (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease; *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 933-944.

Tada, T. und Sheng, M. (2006) Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis; *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 95-101.

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

Terry, R. D., Peck, A., DeTeresa, R., Schechter, R., und Horoupian, D. S. (1981) Some Morphometric Aspects of the Brain in Senile Dementia of the Alzheimer Type; *Ann. Neurol.* 10, 184-192.

Theer, P., Hasan, M. T., und Denk, W. (2003) Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier; *Opt. Lett.* 28, 1022-1024.

Tsai, J., Grutzendler, J., Duff, K., und Gan, W. B. (2004) Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches; *Nat. Neurosci.* 7, 1181-1183.

Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, L., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., und Citron, M. (1999) beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE; *Science* 286, 735-741.

Vidal, M., Morris, R., Grosveld, F., und Spanopoulou, E. (1990) Tissue-Specific Control Elements of the Thy-1 Gene; *EMBO J.* 9, 833-840.

von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H. T., Price, D. L., und Sisodia, S. S. (1997) Generation of APLP2 KO Mice and Early Postnatal Lethality in APLP2/APP Double KO Mice; *Neurobiol. Aging* 18, 661-669.

Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., und Selkoe, D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo; *Nature* 416, 535-539.

Walsh, D. M. und Selkoe, D. J. (2007) A beta Oligomers - a decade of discovery; *J. Neurochem.* 101, 1172-1184.

Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., und Selkoe, D. J. (2000) The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain; *Biochemistry* 39, 10831-10839.

Wang, J., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., und Lee, V. M. Y. (1999) The levels of soluble versus insoluble brain A beta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging; *Exp. Neurol.* 158, 328-337.

Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y. D., Zhao, N. M., Dominguez, B., Lee, K. F., Gan, W. B., und Zheng, H. (2005) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2; *J Neurosci.* 25, 1219-1225.

Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., und Solomon, F. (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 89, 10758-10762.

Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L., und Tanzi, R. E. (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor; *Nat. Genet.* 5, 95-100.

Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., und Beyreuther, K. (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein; *Cell* 57, 115-126.

West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., und Troncoso, J. C. (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease; *Lancet* 344, 769-772.

Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., und Delong, M. R. (1982) Alzheimers-Disease and Senile Dementia - Loss of Neurons in the Basal Forebrain; *Science* 215, 1237-1239.

Wilcock, G. K., Black, S. E., Hendrix, S. B., Zavitz, K. H., Swabb, E. A., und Laughlin, M. A. (2008) Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial; *Lancet Neurology* 7, 483-493.

Wisniewski, T. und Frangione, B. (1992) Apolipoprotein-e - A Pathological Chaperone Protein in Patients with Cerebral and Systemic Amyloid; *Neurosci. Lett.* 135, 235-238.

Yankner, B. A., Duffy, L. K., und Kirschner, D. A. (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid β protein: reversal by tachykinin neuropeptides; *Science* 250, 279-282.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., und Lee, V. M. Y. (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model; *Neuron* 53, 337-351.

Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V. M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., van de, W. M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., und Yankner, B. A. (1998) Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis; *Nature* 395, 698-702.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S., Conner, M. W., Stevens, K. A., Slunt, H. H., Sisoda, S. S., Chen, H. Y., und Van der Ploeg, L. H. (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity; *Cell* 81, 525-531.

Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., und Gan, W. B. (2005a) Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex; *Neuron* 46, 181-189.

Zuo, Y., Yang, G., Kwon, E., und Gan, W. B. (2005b) Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex; *Nature* 436, 261-265.

7 Eigene Veröffentlichungen

Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Jung, C. K. E., Volbracht, C., Steiner, H., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., Haass, C., Herms, J. (2009) γ -Secretase Inhibition Reduces Spine Density *In Vivo* via an Amyloid Precursor Protein-Dependent Pathway; *J. Neurosci.* 29, 10405-10409.

Gronstal A., Cockell C. S., Perino M. A., **Bittner T.**, Clacey E., Clark O., Ingold O., Alves de Oliveira C., Wathiong S. (2007) Lunar Astrobiology: A Review and Suggested Laboratory Equipment; *Astrobiology* 7, 767-782.

Fuhrmann, M., **Bittner, T.**, Mitteregger, G., Haider, N., Moosmang, S., Kretzschmar, H., Herms, J. (2006) Loss of the cellular prion protein affects the Ca^{2+} homeostasis in hippocampal CA1 neurons; *J Neurochem.* 98, 1876-1885.

Lengler, J., **Bittner, T.**, Münster, D., Gawad, A. E. A., Graw, J. (2005) Agonistic and Antagonistic Action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 and Six3 in the Regulation of Sox2 Expression; *Ophthalmic Res.* 37, 301-309.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Herzlichen Dank Prof. Dr. Jochen Herms, für das Thema, die Betreuung, die Diskussionen, die Rückendeckung und das Vertrauen, das mir von Anfang an entgegengebracht wurde.

Vielen Dank an Prof. Dr. Rainer Uhl für die gute Zusammenarbeit und die Bereitschaft diese externe Arbeit zu betreuen.

Danke auch an Prof. Dr. Hans Kretzschmar für die Bereitstellung von Räumen und Mitteln ohne die die Experimente nicht durchführbar gewesen wären.

Vielen Dank Dr. Martin Fuhrmann für die Einführung in die 2-Photonen Intravitalmikroskopie und für viele intensive wissenschaftliche Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie und Prionforschung, insbesondere Steffen Burgold für die Unterstützung bei den immunohistochemischen Untersuchungen und der computergestützten Datenverarbeitung, Carola Eggert für die Aufreinigung unzähliger Mausschwanzbiopsien, Gerda Mitteregger für die Organisation der Tierzucht und natürlich den „Jungs“ für anregende Arbeitsbesprechungen und Mittagsdiskussionen.

Außerdem möchte ich allen Korrekturlesern danken: Prof. Dr. Jochen Herms, Dr. Martin Fuhrmann, Dr. Christine Fuhrmann, Jürgen Bittner und Steffen Burgold.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Heidi, für ihre Liebe und Unterstützung mir insbesondere in schwierigen Momenten den Rücken frei zu halten.