



# **Exzitatorische Insuffizienz als Auslöser von Morbus Alzheimer**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Selina Sohre**

Mainz, 2020

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit selbstständig verfasst habe und die direkt oder indirekt aus Quellen zitierten Daten als solche gekennzeichnet habe. Teile dieser Arbeit wurden bereits als Vorpublikation veröffentlicht (siehe Abschnitt 1). Die Abbildungen wurden teilweise als veränderte Version aus dieser Publikation (Sohre und Moosmann, The pathological hallmarks of Alzheimer's disease derive from compensatory responses to NMDA receptor insufficiency, biorxiv 2018) übernommen.

Mainz, 07.07.2020

Selina Sohre

---

Ort, Datum

# Inhaltsverzeichnis

<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>II</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Morbus Alzheimer.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Neurofibrilläre Bündel .....	3
Proteinaufbau und physiologische Funktion des Tau-Proteins.....	3
Posttranslationale Phosphorylierung von Tau.....	6
Tauopathie bei Morbus Alzheimer .....	9
1.1.2 Senile Plaques.....	11
Proteinaufbau des Amyloid-Precursor-Proteins.....	11
Proteolytische Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins.....	13
Physiologische Relevanz von APP und dessen Schnittfragmenten .....	15
Senile Plaques bei Morbus Alzheimer .....	19
1.1.3 Das Zusammenspiel von Tau und Amyloid $\beta$ .....	22
1.1.4 Potenzielle Risikofaktoren zur Erkrankung an Morbus Alzheimer .....	23
<b>1.2 Neuronale Transmission .....</b>	<b>25</b>
1.2.1 Erregende und Hemmende Neurotransmission .....	25
1.2.2 Aufbau und Funktion von NMDA-Rezeptoren.....	27
1.2.3 Die physiologische Relevanz von NMDARs.....	31
Langzeit-Potenzierung (LTP).....	31
Langzeit-Depression (LTD).....	32
NMDAR-Insuffizienz: Auswirkungen auf synaptische Plastizität und Kognition .....	33
<b>1.3 Fragestellung .....</b>	<b>37</b>
<b>2 MATERIAL.....</b>	<b>40</b>
<b>2.1 Spezielle Chemikalien.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2 Antikörper .....</b>	<b>40</b>
<b>2.3 Weitere Verbrauchsmaterialien und Kits .....</b>	<b>41</b>
<b>2.4 Embryonale Zellen.....</b>	<b>42</b>

<b>2.5 Mäuse</b> .....	<b>42</b>
<b>2.6 Tierethik</b> .....	<b>42</b>
<b>2.7 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>43</b>
2.7.1 Lösungen und Medien für die primäre Zellkultur.....	43
2.7.2 Lösungen und Puffer für die Gewebepräparation.....	44
2.7.3 Lösungen und Puffer für die Proteinanalytik.....	44
<b>3 METHODEN</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1 <i>In vitro</i> AP5-Behandlung primärer kortikaler Zellen</b> .....	<b>48</b>
3.1.1 Zellzahlbestimmung.....	48
3.1.2 Zellexperimente .....	49
3.1.3 Viabilitäts-Bestimmung .....	51
MTT-Test.....	51
Immunfluoreszenz .....	52
<b>3.2 <i>In vivo</i> MK-801-Behandlung von C57BL/6J-Mäusen</b> .....	<b>53</b>
3.2.1 MK-801-Einmalbehandlung von Wildtyp-Mäusen.....	53
Gewebepräparation der einmalig mit MK-801 behandelten Mäuse.....	54
3.2.2 MK-801-Mehrfachbehandlung von Wildtyp-Mäusen.....	56
Gewebepräparation der mehrfach mit MK-801 behandelten Mäuse.....	56
3.2.3 Proteinanalytik .....	58
Protein-Quantifizierung.....	58
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	58
Tricin-Gradientengel.....	60
Immunologischer Proteinnachweis auf Westernblot-Ebene.....	60
Immunologischer Proteinnachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ....	61
<b>3.3 Statistische Auswertung</b> .....	<b>63</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>64</b>
<b>4.1 Auswirkung inhibierter NMDA-Rezeptoraktivität auf Alzheimer-assoziierte Proteine in primärer neuronaler Zellkultur</b> .....	<b>64</b>
4.1.1 Untersuchung der Tau-Phosphorylierung nach Modulation der exzitatorischen Neurotransmission <i>in vitro</i> .....	65
4.1.2 Detektion der APP-Expression und Amyloid $\beta$ -Bildung als Reaktion auf veränderte NMDA-Rezeptoraktivität.....	67
4.1.3 Analyse der Zellmorphologie und Metabolismus-Rate <i>in vitro</i> .....	70

<b>4.2</b>	<b>Auswirkung kurzzeitiger <i>in vivo</i> NMDA-Rezeptor Inhibition in männlichen Wildtyp-Mäusen.....</b>	<b>75</b>
4.2.1	Untersuchung der Epitop-spezifischen <i>in vivo</i> Tau-Phosphorylierung 4 h und 24 h nach einmaliger MK-801-Behandlung.....	75
4.2.2	<i>In vivo</i> Expressions-Analysen von APP und APP-assoziierten Proteinen in männlichen Mäusen nach einmaliger MK-801-Injektion.....	79
4.2.3	Messung der Amyloid $\beta$ -Bildung als Reaktion auf NMDA-Rezeptor-Insuffizienz <i>in vivo</i> .....	81
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung biochemischer Veränderungen durch subchronische NMDA-Rezeptor-Inhibition <i>in vivo</i>.....</b>	<b>83</b>
4.3.1	Auswirkungen subchronischer Inhibition der NMDA-Rezeptoren auf die Expression Alzheimer-assoziiertes Proteine in männlichen Mäusen.....	83
4.3.2	Analyse Alzheimer-assoziiertes Proteine nach subchronischer NMDA-Rezeptor-Inhibition in weiblichen Mäusen.....	88
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
5.1	Tau-Phosphorylierung als physiologische Kompensation exzitatorischer Hypofunktion... 94	94
5.2	Amyloid $\beta$ als Stimulator exzitatorischer Transmission.....	96
5.3	Diskussion des Modells der exzitatorischen Insuffizienz als Ursache für die Alzheimersche Demenz .....	102
5.3.1	Traumatische Kopfverletzungen als Ursache für exzitatorische Insuffizienz .....	105
5.3.2	Prädisposition zur Unterentwicklung des exzitatorischer Systems bei Down Syndrom .....	107
5.3.3	Exzitatorische Hemmung durch Apolipoprotein E4-Polymorphismus.....	108
5.3.4	Weitere Alzheimer-assoziierte Faktoren im Ätiologie-Modell der NMDAR-Insuffizienz.....	110
5.3.5	Anti-NMDA-Antikörper als mögliche Quelle der NMDAR-Insuffizienz bei sporadischen Formen Alzheimerscher Demenz.....	112
5.4	Fazit.....	114
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>118</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>158</b>
9.1	Statistische Auswertung .....	158

<b>9.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>167</b>
<b>9.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>170</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>VI</b>
<b>11</b>	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>VII</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Alzheimer

Derzeit sind laut World Alzheimer Report 2018 ungefähr 50 Millionen Menschen weltweit von Demenz betroffen. Morbus Alzheimer ist dabei mit 50-70% die am häufigsten auftretende Form der Demenz (Bekris et al., 2010; World Alzheimer Report, 2018). Statistisch gesehen erkrankt alle 3 Sekunden ein Mensch an Demenz. Es wird geschätzt, dass sich die Häufigkeit von Demenz bis 2050 verdreifachen wird. Schon im Jahr 2018 kostete die Behandlung von Demenzkranken eine Trilliarde Dollar pro Jahr. Derzeit werden 132 unterschiedliche Substanzen gegen Morbus Alzheimer klinisch getestet (Cummings et al., 2019). Zwischen 2002 und 2012 wurden insgesamt 244 unterschiedliche Medikamente in klinischen Studien gegen Alzheimer getestet und lediglich fünf davon wurden zur Prüfung durch die FDA (Federal Drug Administration) zugelassen, darunter vier Cholinesterase- und ein NMDA-Rezeptor-Inhibitor (Cummings et al., 2014). Bisherige Medikamente mildern zwar manche Symptome der Krankheit, führen jedoch nicht zur Heilung. Trotz intensiver Forschung ist es bis heute nicht gelungen, die Ursache der Alzheimerschen Demenz aufzuklären. Häufig wird Alzheimer mit der natürlichen Alterung des Menschen assoziiert, doch ist Demenz keinesfalls eine zwingende Begleiterscheinung des Alterns wie sogenannte Super Ager beweisen (Cook Maher et al., 2017). Im Jahre 1907 wurde die Krankheit erstmals vom namensgebenden deutschen Psychologen Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907). Er beschrieb bereits damals typische Symptome, die bei Alzheimer-diagnostizierten Patienten auftreten. Im frühen Verlauf wird die Krankheit vor allem durch den Verlust des Kurzzeitgedächtnisses charakterisiert. Den Patienten fällt es zunehmend schwerer neue Dinge zu erlernen, da ihre kognitiven Fähigkeiten immer weiter abnehmen. Die betroffenen Personen leiden zudem oft unter Orientierungsschwierigkeiten, Sprach- und Schreibproblemen sowie einem verminderten Urteilsvermögen, da sie Situationen oft realitätsfern wahrnehmen. Sehr häufig wird die Alzheimer-Erkrankung auch von nicht kognitiven Wesensveränderungen begleitet. Ein weit verbreitetes Symptom bei Demenz ist eine begleitende Depression. Wie eine Studie von Lyketsos et al., 2002 beschrieb, ist emotionale und kognitive Apathie mit ~28% bei Alzheimer-Patienten das am häufigsten auftretende psychiatrische Symptom. Es können auch weitere Psychosen auftreten, beispielsweise Wahnvorstellungen, Paranoia oder Halluzinationen. Ein

gesteigertes Aggressionsverhalten, Unruhe und Hyperaktivität sind bei Alzheimer Patienten ebenfalls ein häufiges Symptom (Burns und Iliffe, 2009; Victoroff et al., 2018). Neben einem gestörten Schlafverhalten kommt es im späteren Stadium der Krankheit oft zu zusätzlichen körperlichen Beschwerden, die die Patienten einschränken (Rothman und Mattson, 2012). Um die Alzheimersche Krankheit als spezifische Form der Demenz zu diagnostizieren, gibt es festgelegte Kriterien (Dubois et al., 2007). Neben speziellen neurophysiologischen Tests können bildgebende Verfahren wie Computertomographie, Magnetresonanztomographie oder die Positronen-Emissions-Tomographie durchgeführt werden, die eine klinische Diagnose stellen (Jagust, 2018). Eine eindeutige pathologische Diagnose kann jedoch erst mit der postmortalen Untersuchung des Gehirngewebes gestellt werden.



**Abbildung 1 Vergleich der post mortem-Gehirnschnitte eines gesunden Menschen und eines Alzheimer-Patienten.**

Zu sehen sind zwei coronale post mortem Gehirnschnitte. Die obere Abbildung zeigt das Gehirn eines gesunden Patienten. Der untere Schnitt gehört zu einem an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten. Die Atrophie des Alzheimer-Gehirns ist im Vergleich deutlich zu erkennen. Das Alzheimer-Gehirn zeigt einen Rückgang der Gehirnmasse und weist daher breite Furchen und stark vergrößerte Ventrikel auf (Bird, 2008).

Die Alzheimersche Krankheit wurde von Braak et al. mit einem typischen Verlauf von betroffenen Gehirnregionen beschrieben (Braak et al., 1993). In frühen Stadien der Krankheit ist vor allem der entorhinale Cortex von Atrophie betroffen. Mit fortschreitendem Schweregrad der Krankheit breiten sich die Atrophien in anderen Gehirnregionen weiter aus. Neuronale Degeneration führt dabei zu einer Verringerung der Gehirnmasse, die sich sehr deutlich durch verbreiterte Furchen und stark vergrößerte Ventrikel bemerkbar macht (Abbildung 1). Einhergehend mit der gut erkennbaren Atrophie treten charakteristische pathobiologische Phänomene auf. Diese pathologischen Veränderungen wurden ebenfalls erstmals von Alois Alzheimer Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben. Nachdem seine Patientin, die erste beschriebene mit Alzheimer erkrankte Person, verstarb untersuchte er ihr Gehirn und konnte mit Hilfe damaliger Färbemethoden unbekannte Fibrillen innerhalb der Neurone sichtbar machen. Zusätzlich konnte er zeigen, dass im zerebralen Cortex sogenannte Plaques auftreten (Alzheimer, 1911). Diese pathologischen Erscheinungen definieren heute die pathobiochemischen Marker der Alzheimerschen Krankheit (Dahm, 2006). Heute weiß man, dass die neurofibrillären Bündel (NFT) innerhalb der Neurone aus einer Aggregation des Tau-Proteins entstehen. Die extrazellulären senilen Plaques bestehen aus dem Amyloid-Precursor-Protein-Fragment Amyloid  $\beta$ . Beide Pathologien können jedoch auch in anderen Krankheitsbildern wie der Niemann-Pick-Krankheit oder chronisch traumatischer Enzephalopathie (CTE) auftreten. Die ausgeprägte Präsenz beider Pathologien einhergehend mit den typischen symptomatischen Kriterien definieren schließlich die Alzheimersche Krankheit.

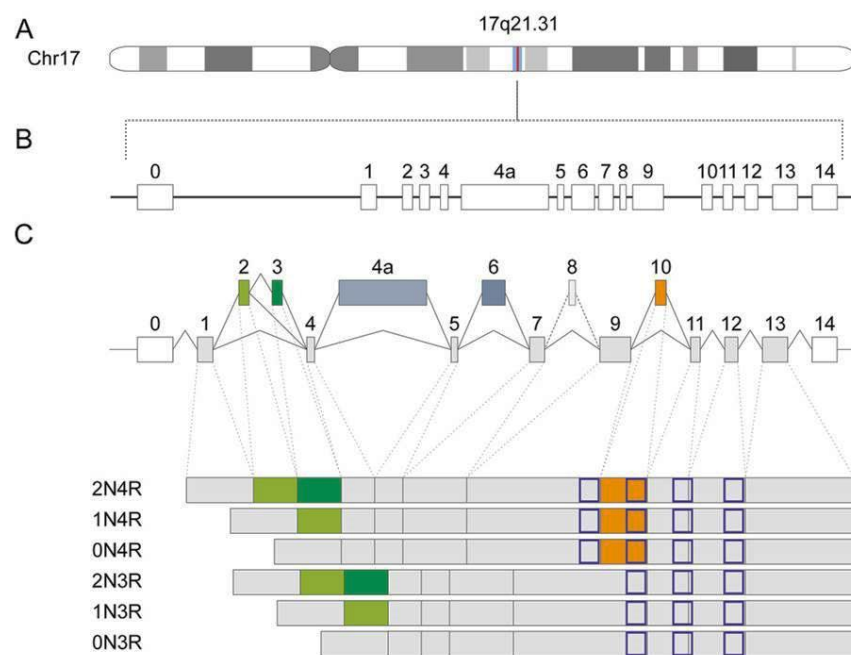
### **1.1.1 Neurofibrilläre Bündel**

#### *Proteinaufbau und physiologische Funktion des Tau-Proteins*

Tau gehört zur Gruppe der Mikrotubulus-assoziierten-Proteine (MAP). Das Tau-Protein wird in unterschiedlichen Geweben wie Herz oder der Lunge exprimiert (Arendt et al., 2016). Im zentralen Nervensystem ist Tau vor allem in Neuronen, aber auch in Oligodendrozyten (LoPresti et al., 1995; Kempf et al., 1996) und Astrozyten exprimiert (Papasozomenos und Binder, 1987). Das codierende Gen *MAPT* (Mikrotubulus-assoziiertes-Protein Tau) ist auf Chromosom 17 lokalisiert und besitzt 16 Exons, die durch alternatives Spleißen in sechs bekannte Isoformen des Proteins übersetzt werden können (Abbildung 2) (Neve et al., 1986; Goedert et al., 1989). Je nach Isoform

besitzt das fertige Protein drei oder vier repetitive Mikrotubuli-Bindedomänen im C-Terminus (Abbildung 2C), die von den Exons 9-12 codiert werden. Diese Domänen werden auch als „Repeats“ (R) bezeichnet und können je nach Spleißung des Exons 10 dreimal (3R) oder viermal (4R) im Protein existieren. Die N-terminalen Exons 2 und 3 sind ebenfalls von alternativem Spleißen betroffen. Die Kombination der Repeat-Variante mit den N-terminalen Inserts von Exon 2 und 3 ergeben schließlich die sechs Isoformen des Proteins (Arendt et al., 2016). Die Repeat-Variante scheint auch einen Einfluss auf die Bindeeigenschaft und Funktion des Taus zu haben. Während der menschlichen Entwicklung findet eine Verlagerung in der Expression der 3R- und 4R-Isoformen statt. In der fötalen Entwicklung dominiert die 3R-Isoform, welche im Vergleich zu 4R eine geringere Bindeaffinität an Mikrotubuli aufweist (Goedert und Jakes, 1990; Arendt et al., 2016). Die Lokalisation von Tau innerhalb der Neurone ist überwiegend im Bereich des Axons (Binder et al., 1995; Klein et al., 2002). Es wurde jedoch auch im Zellsoma und im dendritischen Teil nachgewiesen (Tashiro et al., 1997; Ittner et al., 2010). Eine bekannte physiologische Funktion im Bereich des Axons ist die Interaktion mit Tubulin. Tau bindet Tubulin und reguliert die Polymerisation der Mikrotubuli (Weingarten et al., 1975). Durch seine dynamische Bindungseigenschaft an Tubulin beeinflusst Tau nicht nur die Polymerisierung, sondern auch die Depolymerisierung der Mikrotubuli und beeinflusst deren Stabilitätszustand (Panda et al., 1995). Studien zeigen, dass Tau durch seinen Einfluss auf die Elongation der Mikrotubuli auch in den Auswuchs der Axone involviert ist (Esmaeli-Azad et al., 1994; Takei et al., 2000). Lange vermutete man, dass Tau nur im Bereich des Axons eine physiologische Funktion übernimmt. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass es auch in den Dendriten beziehungsweise den dendritischen Fortsätzen, der postsynaptischen Neurone funktionell ist (Ittner et al., 2010). Es wird vermutet, dass Tau dort indirekt oder direkt an der Regulation von synaptischen Rezeptoren wie NMDA- und AMPA-Rezeptoren beteiligt und damit in hohem Maße in den Prozess der neuronalen Plastizität involviert ist (Ittner et al., 2010; Regan et al., 2017). Tau hat neben Tubulin diverse weitere Interaktions- und Bindungspartner. Es hat sich gezeigt, dass Tau im N-terminalen Bereich eine Bindedomäne für Tyrosinkinasen der Src-Familie wie beispielsweise Fyn besitzt (Lee et al., 1998). Studien deuten darauf hin, dass die Bindung von Tau an Fyn die NMDA-Rezeptor-Signalübertragung reguliert. Hierbei scheint auch das „Postsynaptic Density Protein 95“ (PSD-95), das zur Familie der Membran-assoziierten Guanylat-Kinasen gehört, eine Rolle zu spielen (Ittner et al.,

2011). Kinasen wie GSK3 $\beta$  und Phosphatasen wie PP2A sind ebenfalls als Interaktionspartner von Tau beschrieben (Sontag et al., 1999; Sun et al., 2002). Die Alzheimer-assoziierten Proteine ApoE und Presenilin 1 (PS1) scheinen ebenfalls mit Tau zu interagieren (Strittmatter et al., 1998; Takashima et al., 1998). Auch das zu Aggregation neigende, mit Morbus Parkinson assoziierte Protein  $\alpha$ -Synuclein ist als Tau-Interakteur beschrieben (Giasson et al., 2003). Wechselwirkungen von Tau mit der Zellmembran scheinen vom Membranprotein Annexin A2 abhängig zu sein und eine Rolle bei frontotemporaler Demenz zu spielen (Gauthier-Kemper et al., 2011). Die Effizienz des axonalen Transports scheint durch die Interaktion von Tau mit den Motorproteinen Dynein und Kinesin an Mikrotubuli ebenfalls beeinflusst zu sein (Dixit et al., 2008). Es ist bekannt, dass Tau posttranslational modifiziert werden kann beispielsweise durch Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung oder O-Glycosylierung (Morris et al., 2015). Möglicherweise haben diese Modifikationen einen Einfluss auf die Interaktion von Tau mit verschiedenen andern Proteinen.

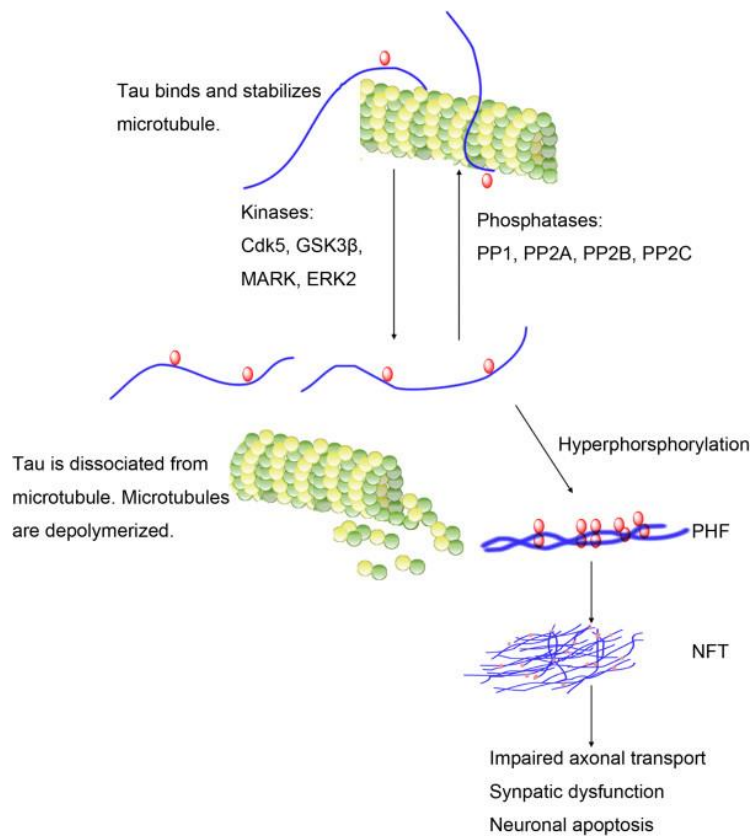


**Abbildung 2 Überblick über das *MAPT*-Gen und die exprimierten Isoformen des Proteins Tau.**

**A.** Das für Tau codierende Gen *MAPT* ist auf Chromosom 17 lokalisiert. **B.** *MAPT* besitzt 16 Exons, die durch alternatives Spleißen in sechs unterschiedliche Isoformen des Tau-Proteins übersetzt werden. **C.** Die Isoformen werden über zwei alternativ existierende Merkmale definiert. Zum einen entscheidet die Existenz der Exone 2 und 3 über die Kodierung 2N (Exon 2 und 3), 1N (Exon 2) oder 0N (kein Exon 2 und 3). Zum anderen bestimmt die Ab- oder Anwesenheit des Exons 10 über drei (3R) oder vier (4R) Tubulin-Bindedomänen (auch Repeats „R“ genannt) im Protein. Die Kombination dieser zwei Merkmale ergibt sechs existierende Isoformen des Tau-Proteins (Abbildung verändert nach Arendt et al., 2016).

*Posttranslationale Phosphorylierung von Tau*

Die humane Tau-Sequenz besitzt mehr als 80 potenzielle Phosphorylierungssepitope an Serin-, Tyrosin oder Threonin-Resten (Arendt et al., 2016). Der Phosphorylierungsstatus wird durch verschiedene Kinasen-Typen wie „prolin-directed protein kinases“ (PDPK), „non-PDPK“-Protein-Kinasen oder Tyrosin-Protein-Kinasen (TPK I+II) reguliert. Durch diese posttranslationalen Modifikationen kann der Aktivitätszustand und die Funktion des Proteins beeinflusst werden. Der Phosphorylierungsstatus von Tau reguliert unter anderem dessen Bindeeigenschaften an Tubulin (Abbildung 3). Ist die Phospho-Regulation durch Kinasen und Phosphatasen nicht im Gleichgewicht, kann eine Hyperphosphorylierung des Proteins hervorgerufen werden. Dieser Prozess scheint ein physiologisch relevanter Mechanismus zu sein. Experimente mit überwinternden Säugetieren haben gezeigt, dass die Hyperphosphorylierung von Tau als ein natürlicher Prozess zur Anpassung an veränderte Bedingungen stattfindet. Es wird vermutet, dass die erhöhte reversible Phosphorylierung von Tau in der Torpor-Phase von Eichhörnchen beispielsweise eine Rolle bei der Neuroprotektion und der neuronalen Plastizität unter erniedrigter metabolischer Rate spielt (Arendt et al., 2003). Die Tau-Phosphorylierung wurde unter anderem auch als reversibler und physiologischer Prozess bei der embryonalen Gehirnentwicklung, unter Glucose-Mangel, bei einer Anästhesie, unter Hypothermie und chronischem Stress beobachtet (Brion et al., 1993; Planel et al., 2004; Planel et al., 2009; Run et al., 2009; Yu et al., 2009; Whittington et al., 2013; Lopes et al., 2016).

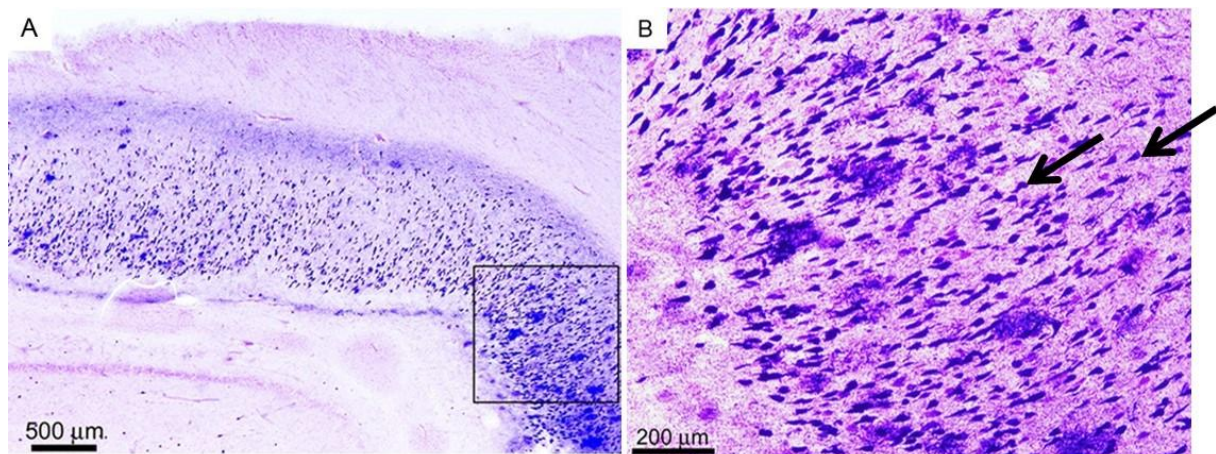


**Abbildung 3 Posttranslationale Modifikation von Tau.**

Das Tau Protein kann an die Mikrotubuli im Axon von Neuronen binden und diese stabilisieren. Wird das Protein durch verschiedene Kinasen übermäßig phosphoryliert, löst es sich von den Mikrotubuli. Eine Hyperphosphorylierung von Tau kann zur Bildung sogenannter Tau-Filamente (Paired helical filaments, PHF) führen. Diese Filamente können aggregieren und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (NFT) bilden. Die Bildung der NFT kann den axonalen Transport, die synaptische Funktion im Neuron und weitere physiologische Funktionen beeinflussen (Duan et al., 2012).

Eine übermäßige Phosphorylierung von Tau kann jedoch auch zur Aggregation des Proteins führen. Es können intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (neurofibrillary tangles = NFT) entstehen, die im Kontext bestimmter Krankheiten wie eben Morbus Alzheimer diskutiert werden (Abbildung 4). Die Isolation von NFTs aus Alzheimer Geweben hat gezeigt, dass die Bündel sogenannte Paired helical filaments (PHF) enthalten (Kidd, 1963). Diese Filamente bestehen aus zwei aneinandergelagerten Tau-Proteinen, die eine Art Doppelhelix bilden (Kidd, 1963; Wiśniewski et al., 1976; Wischik et al., 1988; Crowther, 1991; Crowther und Goedert, 2000). Es wurde gezeigt, dass eine Hyperphosphorylierung von Tau zur Bildung solcher PHFs führt (Abbildung 3) (Grundke-Iqbal et al., 1986; Kosik et al., 1986). Es wird vermutet, dass die Bildung von neurofibrillären Bündeln über eine schrittweise Entwicklung stattfindet. Die Krankheits-spezifische posttranslationale Phosphorylierung von Tau scheint hierbei

entscheidend zu sein (Augustinack et al., 2002). Die begünstigte Bildung von NFTs durch die Hyperphosphorylierung von Tau wird mit der Destabilisierung der Mikrotubuli und mit der Beeinträchtigung des axonalen Transports assoziiert (Abbildung 3). Auch die Regulation synaptischer Rezeptoren wie NMDA-Rezeptoren (NMDAR) kann durch den Phosphorylierungs-Status von Tau beeinflusst werden. Die mit Tau interagierende Src-Kinase Fyn reguliert den Aktivitätszustand der NMDA-Rezeptoren ebenfalls über Phosphorylierung und hat damit einen Einfluss auf die synaptische Plastizität (Ittner et al., 2010; Arendt et al., 2016). Die Bindeaffinität von Tau an Fyn wiederum wird durch den Phosphorylierungsstatus von Tau kontrolliert.



**Abbildung 4 Hippocampale Tau-Pathologie eines Alzheimer-Patienten.**

**A.** Gezeigt ist eine Gallyas-Färbung der Tau-Pathologie eines Alzheimer-Patienten im Hippocampus. **B.** Zu sehen ist die Vergrößerung des in A. markierten Quadrats. Die Pfeile markieren intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (NFT) (Roher et al., 2014).

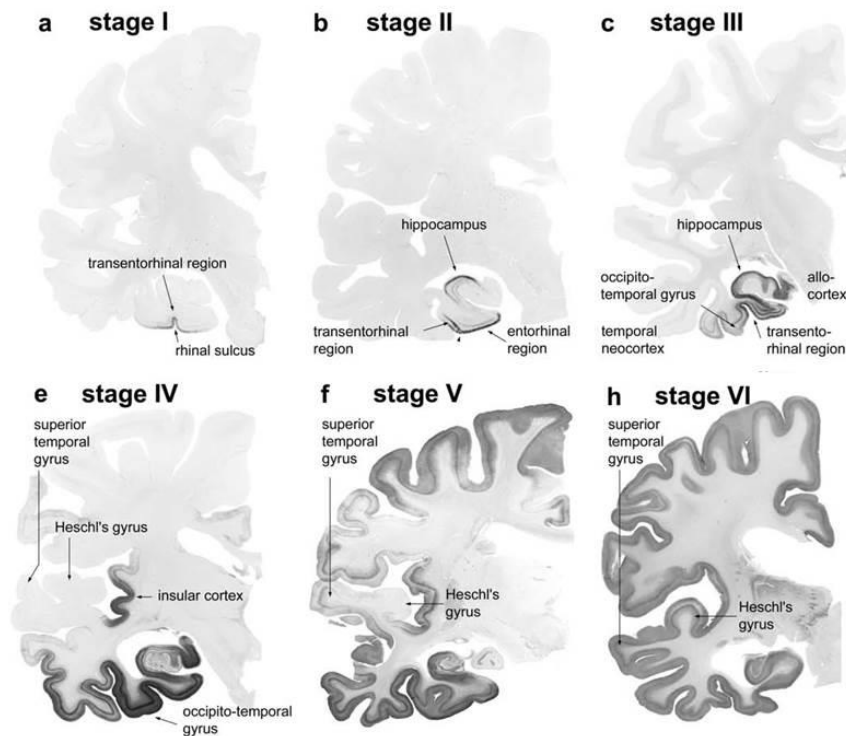
Prominente Tau-spezifische histopathologische Merkmale werden auch unter dem Begriff der „Tauopathie“ zusammengefasst. Dieser Begriff wurde erstmals von Spillantini et al. 1997 verwendet. Er umfasst eine Gruppe von mehr als 20 neurodegenerativen Krankheiten, die durch die Aggregation von phosphoryliertem Tau in Neuronen und Gliazellen charakterisiert werden. Beispiele hierfür sind Morbus Pick, Progressive supranukleäre Blickparese (PSP), Morbus Alzheimer oder Corticobasale Degeneration (CBD) (Arendt et al., 2016). Das Auftreten dieser Pathologie wird für die verschiedenen Krankheiten auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt. Es wurden mehr als 50 Mutationen im *MAPT*-Gen identifiziert, welche beispielsweise zu einem untypischen Auftreten bestimmter Isoformen des Proteins führen können. Es sind jedoch nicht alle dieser Polymorphismen als pathologische Risikofaktoren für Morbus



Alzheimer beschrieben (Arendt et al., 2016). Ein nicht-genetischer Risikofaktor, der mit der Zunahme neurofibrillärer Veränderungen assoziiert ist, ist die natürliche Alterung des Gehirns (Braak et al., 1994a; Braak et al., 1994b).

#### *Tauopathie bei Morbus Alzheimer*

Die unterschiedlichen neurodegenerativen Krankheiten mit Tauopathie zeigen Unterschiede in der Verbreitung der Tau-Aggregate in verschiedenen Zelltypen und Gehirn-Bereichen. Jede der Krankheiten zeigt dabei ein charakteristisches Ausbreitungsmuster. Für die Alzheimersche Krankheit wurde dieses topographische Muster detailliert beschrieben und in verschiedene Stadien (Abbildung 5) unterteilt (Braak und Braak, 1991). In frühen Stadien von Morbus Alzheimer beginnen die neurofibrillären Veränderungen im transentorhinalen Cortex (Stadium I). Im zweiten Stadium schreiten die Veränderungen im entorhinalen Cortex und Hippocampus fort. Die Läsionen breiten sich im späteren Verlauf (Stadium III-IV) über den Isocortex und das limbische System aus. Dies beinhaltet das Subiculum, die Amygdala und weitere Bereiche des Hippocampus und des entorhinalen Cortex. Schließlich schreitet die Tau-Pathologie in allen Schichten des Isocortex fort und betrifft schließlich auch primäre und sekundäre sensorische und motorische Areale (Stadium V-VI) (Braak und Braak, 1991, Braak et al., 2006). Bei Morbus Alzheimer sind neurofibrilläre Tau-Aggregate üblicherweise in pyramidalen Neuronen des Hippocampus, des entorhinalen Cortex und in bestimmten Schichten des Isocortex zu finden. Neurone des Gyrus dentatus und kortikale Interneurone sind überwiegend frei von histopathologischen Merkmalen (Fu et al., 2018). Die Lokalisation der Tau-Aggregate und -Fibrillen innerhalb der Neurone erstreckt sich von den Dendriten, inklusive der Dornfortsätze, bis hin zum Zellsoma, dem Axon und der Synapse. Für die Alzheimersche Krankheit wurden auch außerhalb des Gehirns bestimmte Indikatoren einer Tauopathie gefunden. Für frühe Stadien der Krankheit wurden beispielsweise PHF-ähnliche Taustrukturen im Rückenmark beschrieben (Dugger et al., 2013). Eine erhöhte Tau-Konzentration in der Rückenmarksflüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*, CSF) wurde ebenfalls als Alzheimer-Merkmal genutzt. Die Messung der Tau- und pTau-Konzentrationen im CSF gilt als präklinischer Alzheimer-Marker, da die Veränderungen hier schon bis zu 10 Jahre vor den typischen klinischen Symptomen auftreten können (Bateman et al., 2012; Buchhave et al., 2012).



**Abbildung 5 Charakteristik der Tauopathie bei Morbus Alzheimer nach Braak.**

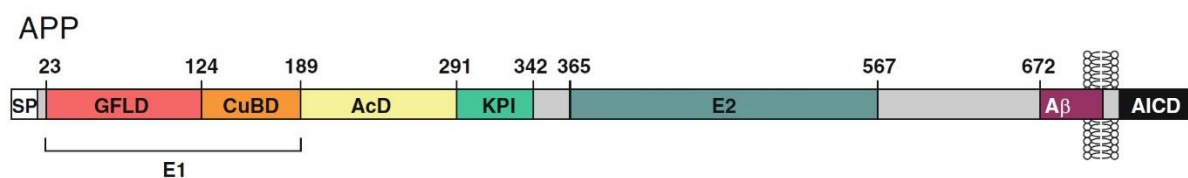
Die mit der Krankheit fortschreitenden Stadien (Braak-Stadien I-VI) der Tauopathie bei Morbus Alzheimer wurden von Braak und Braak, 1991 beschrieben. **a-b.** In den frühen Stadien I-II sind zunächst der transentorhinale Cortex und Hippocampus von Tau-Pathologie betroffen. **c-e.** Bei weiterem Fortschreiten (Stadium III-IV) breitet sich die Pathologie über das limbische System aus. Es beinhaltet unter anderem das Subiculum, den Hippocampus, den entorhinalen Cortex und die Amygdala. **f-h.** Schließlich breiten sich die pathologischen Veränderungen in Stadium V und VI über den Isocortex aus. Betroffen sind hier unter anderem primäre sensorische und motorische Areale (Braak und Braak, 1991). Die Abbildung wurde nach Braak et al., 2006 verändert.

Klinische Studien lassen erkennen, dass die Tauopathie im Cortex von an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten stark mit der kognitiven Schädigung korreliert (Giannakopoulos et al., 2003; Guillozet et al., 2003). Die charakteristische Ansammlung von Tau-Aggregaten in Alzheimer-Patienten impliziert, dass dies im Pathomechanismus der Krankheit eine Rolle spielen könnte. Es ist jedoch weiterhin nicht eindeutig erklärt, welche pathophysiologische Relevanz die Tau-Phosphorylierung bei Morbus Alzheimer einnimmt (Arendt et al., 2016). Ebenso ist unbekannt welche Wechselwirkung zwischen Tau und dem A $\beta$ -Peptid stattfinden. Die extrazelluläre Aggregation des A $\beta$ -Peptids ist ebenfalls ein hervorstechendes Alzheimer-Kennzeichen und tritt häufig parallel zur Tauopathie auf. Es werden sowohl einseitige als auch wechselseitige Interaktionen der beiden Pathologien diskutiert (Ittner und Götz, 2011; Zempel und Mandelkow, 2012; Bright et al., 2015).

### 1.1.2 Senile Plaques

#### *Proteinaufbau des Amyloid-Precursor-Proteins*

Das Amyloid-Precursor-Protein (APP) ist in fast allen Gewebetypen des Körpers zu finden. Am dominantesten wird es jedoch im Gehirngewebe exprimiert (Neve et al, 1988; Kang und Müller-Hill, 1990). APP wird sehr stark mit der Pathophysiologie von Morbus Alzheimer assoziiert. Das APP-Gen besteht aus 18 Exons und ist auf Chromosom 21 lokalisiert. Das codierte APP-Molekül ist ein integrales Membranprotein mit einem großen N-terminalen Bereich im extrazellulären Raum (Abbildung 6). Es besitzt eine E1-Domäne (E1), die eine Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne (GFLD) und eine Kupfer-bindende Domäne (CuBD) enthält. APP umfasst zusätzlich eine saure Domäne (AcD) und eine E2-Domäne (E2). Ebenfalls im extrazellulären Teil des Proteins befindet sich eine Kunitz-Domäne (KPI), also eine Proteindomäne, die Proteasen des Kunitz-Typs inhibiert. Die Amyloid  $\beta$ -Peptidsequenz (A $\beta$ ) befindet sich sowohl im extrazellulären als auch im Intermembran-Bereich des APPs. Der zytosolische Proteinteil wird Amyloid-Precursor-Protein intrazelluläre Domäne (AICD) genannt und trägt ein Endozytose-vermittelndes YENPTY-Motiv. Das Signalpeptid (SP) am N-Terminus vermittelt die Translokation von APP in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER).



**Abbildung 6 Schematischer Überblick des Proteinaufbaus von APP.**

APP ist ein integrales Membranprotein, das ein Signalpeptid (SP) für die Translokation in die Membran des endoplasmatischen Retikulums trägt. Im extrazellulären Bereich besitzt APP eine E1-Domäne, welche eine Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne (GFLD) und eine Kupfer-bindende Domäne (CuBD) enthält. Des Weiteren besitzt es eine saure Domäne (AcD), eine Kunitz-Domäne (KPI) und eine E2-Domäne. Die Amyloid  $\beta$ -Sequenz (A $\beta$ ) liegt zum Teil im extrazellulären Raum und im Intermembran-Bereich. Die zytosolische Amyloid-Precursor-Protein intrazelluläre Domäne (AICD) enthält eine Endozytose-vermittelnde YENPTY-Sequenz (Aydin et al., 2012).

APP kann durch alternatives Spleißen der Exone 7, 8 und 15 in ungefähr zehn verschiedenen Isoformen vorliegen (Yoshikai et al., 1990; Sandbrink et al., 1994; Sandbrink et al., 1996; Kienlen-Campard et al., 2000; Khalifa et al., 2012). Die drei wesentlichen Isoformen sind APP695, APP751 und APP770. Die beiden Kunitz-

Domänen-tragenden Isoformen APP770 und APP751 sind vielseitig in verschiedenen Zelltypen exprimiert, wohingegen die APP695-Isoform überwiegend in Neuronen zu finden ist (Tanzi et al., 1988; Kang und Müller-Hill, 1990; Yoshikai et al., 1990; Khalifa et al., 2012). *APP* gehört zu einer Gengruppe, die im Weiteren die homologen Gene *APLP 1* und *2* umfasst (Wasco et al., 1993). Die beiden homologen Proteine APLP1 und APLP2 werden ebenfalls in sehr vielen Körperkompartimenten exprimiert. APP und APLP2 werden ubiquitär im Nervensystem und in der motorischen Endplatten gefunden (Slunt et al., 1994; Lorent et al., 1995) und überlappen insbesondere in pyramidalen Neuronen im Cortex und Hippocampus (Bendotti et al., 1988; Lorent et al. 1995). In Bezug auf intrazelluläre Kompartimente wurden APP und APLP1/2 sowohl im Soma als auch in Dendriten und Axonen von Neuronen gefunden (Müller und Zheng, 2012). APP ist ein Typ I-Transmembranprotein, wobei „Typ I“ bedeutet, dass der N-Terminus des Proteins in den extrazellulären Bereich ragt (Dyrks et al., 1988). APP kann an der Zelloberfläche internalisiert werden und in Endosomen integriert werden. Die Endozytose wird dabei durch die YENPTY-Sequenz in der intrazellulären Domäne AICD vermittelt (Haass et al., 2012).

APP ist in der Lage, Homo- und Heterodimere zu bilden. Die Heterodimerisation kann mit den homologen Proteinen APLP1 und APLP2 (Soba et al., 2005) stattfinden. Chen et al., 2006 konnten mittels Co-Lokalisation zeigen, dass eine Heterodimerisation zwischen APP und Notch 2 ebenfalls möglich ist. Aufgrund seiner Eigenschaften wie der Dimerisation wird vermutet, dass APP die Funktionen eines Membranrezeptors haben könnte (Kang et al., 1987), deren Funktion klassischerweise über den Mechanismus der Homodimerisation reguliert wird. APP besitzt einige bekannte Interaktions- und Bindepartner, die die Hypothese der Rezeptorfunktion unterstützten. Es ist berichtet, dass der extrazelluläre Bereich von APP beispielsweise mit Spondin-1 (Ho und Südhof, 2004), Notch 2 (Chen et al., 2006), Netrin-1 (Lourenço et al., 2009), dem Nogo-Rezeptor-1 (Park et al., 2006) und weiteren extrazellulären Matrixproteinen beispielsweise Reelin (Hoe et al., 2009a) interagieren kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre C-terminale Teil von APP mit verschiedenen Kinasen und Adapterproteinen wie FE65 interagieren kann (Radzimanowski et al., 2008; Jacobsen und Iverfeldt, 2009). Zudem scheint der C-Terminus von APP, insbesondere dessen YENPTY-Sequenz, einen Einfluss auf die Clathrin-vermittelte Endozytose und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Homöostase zu haben (Perez et al., 1999; Leissring et al., 2002). Die physiologische Relevanz der Interaktionen von APP ist nicht ausreichend geklärt.

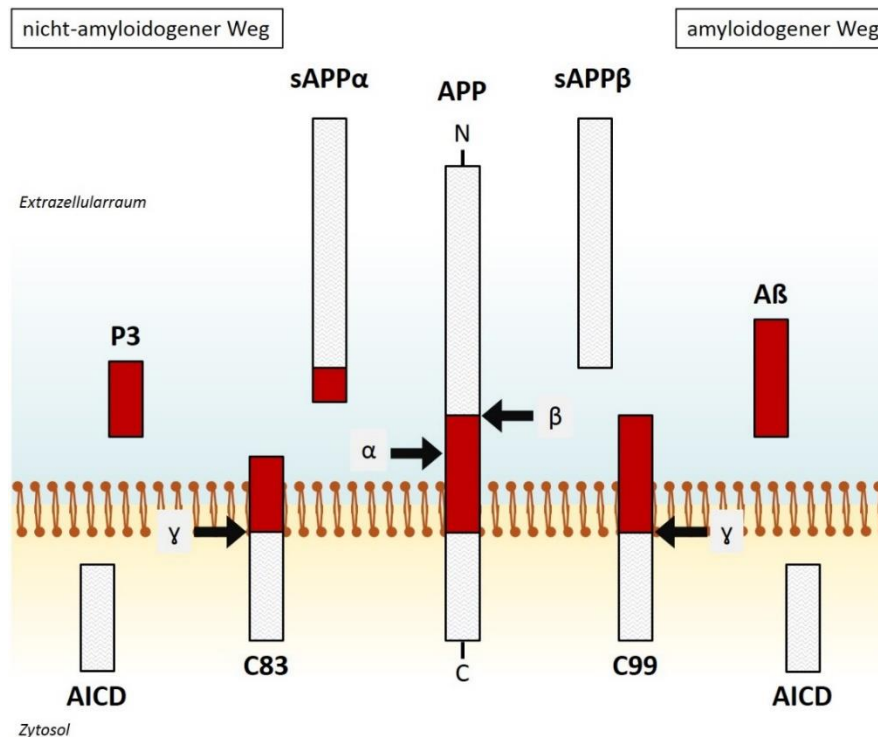
*In vivo* Studien geben einen Hinweis darauf, dass die gefundenen Interaktionen nicht nur eine Auswirkung auf die APP-Prozessierung selbst, sondern möglicherweise auch einen Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden haben (Müller und Zheng, 2012). APP besitzt einige proteolytische Schnittfragmente, die als intrazelluläre Signalpeptide oder Transkriptionsfaktoren agieren könnten. Trotzdem ist bislang nur wenig über die physiologische Relevanz von APP und dessen Schnittfragmenten bekannt. Es wird berichtet, dass es eine Rolle bei der Ausbildung von Synapsen spielt und zur neuronalen Plastizität beiträgt (Ludewig und Korte, 2017). Vor allem die proteolytischen Fragmente von APP scheinen in Neuronen vielfältige Funktionen zu haben. APP kann von verschiedenen Sekretasen prozessiert werden (Wang et al., 2017), sodass unterschiedlich lange Schnittfragmente entstehen können, die sowohl extra- als auch intrazellulär vorliegen. In der Forschung wird vor allem dem 40 bis 42 Aminosäuren langen Amyloid  $\beta$ -Peptid ein großes Interesse gewidmet, da es stark in den pathophysiologischen Prozess von Morbus Alzheimer involviert zu sein scheint. Die A $\beta$ -Sequenz ist für das APP von Säugern hoch konserviert, jedoch wurde die Alzheimersche Krankheit bisher nur für den Menschen beschrieben. Die beiden homologen APLP1- und APLP2-Moleküle besitzen diese Sequenz nicht, obwohl sie denselben Prozessierungs-Prozess durchlaufen (Aydin et al., 2012; Ludewig und Korte, 2017).

#### *Proteolytische Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins*

Wie bereits erwähnt erfährt APP eine posttranslationale Spaltung durch verschiedene Sekretasen. Es wird hierbei zwischen zwei Spaltungswegen unterschieden, dem amyloidogenen und dem nicht-amyloidogenen Weg (Abbildung 7). Diese Unterscheidung richtet sich danach, ob das Amyloid  $\beta$ -Peptid bei der Spaltung freigesetzt wird oder nicht. APP wird klassischerweise von  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Sekretasen gespalten. Wie man erst später herausgefunden hat kann ebenfalls eine Spaltung durch die  $\eta$ - und  $\theta$ -Sekretasen stattfinden. Am häufigsten wird APP wohl durch eine  $\alpha$ -Sekretase der „A Disintegrin And Metalloprotease“ (ADAM)-Familie geschnitten (Lammich et al., 1999). Knockdown-Experimente haben gezeigt, dass ADAM10 die physiologisch relevante  $\alpha$ -Sekretase bei der Spaltung von APP in Neuronen zu sein scheint (Kuhn et al., 2010). Die  $\alpha$ -Spaltung ist Teil des nicht-amyloidogenen Wegs und findet an der Plasmamembran statt (Abbildung 7) (Sisodia, 1992). Dabei wird das extrazelluläre Fragment sAPP $\alpha$  und das integrale/intrazelluläre C83-Fragment generiert. Die Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 ist Teil des amyloidogenen Wegs

(Abbildung 7). BACE1 ist eine Membran-gebundene Protease deren aktive Seite sich im Extrazellulärraum befindet. Es wurde eine homologe Protease BACE2 identifiziert, die als  $\theta$ -Sekretase bezeichnet wird. BACE2 ist jedoch nicht in den amyloidogenen Weg involviert (Haass et al., 2012). Bei der Spaltung durch BACE1 wird APP in das extrazelluläre sAPP $\beta$  und das Membran-Fragment C99 zerteilt (Abbildung 7). Die Entstehung des C99-Fragments ist eine Voraussetzung für jene weitere Prozessierung, bei der das A $\beta$ -Peptid freigesetzt wird. Knockout (KO)-Experimente *in vivo* verdeutlichen, dass die Spaltung durch BACE1 die Produktionsmenge des A $\beta$ -Peptids essenziell beeinflusst (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Interessanterweise zeigten weder junge noch gealterte BACE1 KO-Mäuse Veränderungen in der Genexpression und keine neuronale Schädigung (Luo et al., 2003). Die BACE1 KO-Mäuse sind lebensfähig, fruchtbar und zeigten keine wesentlichen Verhaltensveränderungen oder Entwicklungsdefizite (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001; Haass et al., 2012). Der Verlust von BACE1 hat jedoch zu einer verringerten Myelinisation im peripheren Nervensystem geführt und gezeigt, dass BACE1 in die Regulation von Spannungs-abhängigen Natrium-Kanälen involviert ist (Dominguez et al., 2005; Willem et al., 2006; Kim et al., 2007). Die vorangegangenen Spaltungen durch die  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase geben vor, ob die APP-Prozessierung den amyloidogenen oder nicht-amyloidogenen Weg durchläuft. Die  $\gamma$ -Sekretase spaltet anschließend die entstandenen C-terminalen Fragmente (C83 oder C99) an deren Transmembrandomänen (Abbildung 7). Die  $\gamma$ -Sekretase ist ein Protease-Komplex bestehend aus mehreren Untereinheiten: Nicastrin, welches als Substrat-Rezeptor dient, dem Presenilin-Enhancer PEN-2, APH-1 (anterior pharynx defective), dem eine stabilisierende Wirkung zugeschrieben wird, und einer der katalytischen Domänen Presenilin-1 oder -2 (Dries und Yu, 2008; Shah et al., 2005; Holmes et al., 2014). Die  $\gamma$ -Spaltung sorgt letztlich für die Freisetzung von A $\beta$  im amyloidogenen Weg und dem P3-Peptid im nicht-amyloidogenen Weg in den Extrazellulärraum. Gleichzeitig wird in beiden Spaltungsvorgängen unabhängig vom extrazellulären Produkt die intrazelluläre Domäne AICD abgespalten (Abbildung 6 und Abbildung 7). Die  $\gamma$ -Spaltung ist nicht auf eine einzelne Stelle beschränkt. Innerhalb der Transmembrandomäne kann die  $\gamma$ -Sekretase mehrfach schneiden und somit im amyloidogenen Weg unterschiedlich lange A $\beta$ -Spezies generieren. Es können dabei Amyloid  $\beta$ -Fragmente mit einer Länge von 37, 38, 39, 40, 42 oder 43 Aminosäuren abgespalten werden, wobei die Verlängerung am C-Terminus anhängt. Bei Morbus

Alzheimer scheinen insbesondere das A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub>-Peptid eine Rolle zu spielen. Das längere A $\beta$ <sub>42</sub> scheint verstärkt zur Aggregation zu neigen und „toxische“ Oligomere zu bilden können (Haass et al., 2012).



**Abbildung 7 Überblick über die posttranslationale Prozessierung von APP durch verschiedene Sekretasen.** Die Spaltung durch verschiedene Sekretasen ist Teil der posttranslationalen Prozessierung von APP. Es wird zwischen zwei Prozessierungswegen unterschieden. Der nicht-amyloidogene Weg (linke Seite) setzt die Spaltung durch eine  $\alpha$ -Sekretase (in Neuronen dominiert durch ADAM10) voraus. Hierbei entsteht das Fragment C83 und das extrazelluläre Fragment sAPP $\alpha$ . Der amyloidogene Weg (rechte Seite) wird mit einer Spaltung durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 eingeleitet. Das extrazelluläre Fragment sAPP $\beta$  und das C-terminale Peptid C99 entstehen. In beiden Wegen folgt eine Spaltung durch die  $\gamma$ -Sekretase, welche folgend auf die BACE1-Spaltung zur Entstehung des extrazellulären A $\beta$ -Peptids führt und den Prozessierungsweg somit zum „amyloidogenen“ Weg macht. Die  $\gamma$ -Spaltung führt im nicht-amyloidogenen Weg zur Produktion des extrazellulären P3-Peptids. In beiden Wegen wird gleichermaßen intrazellulär die Amyloid-Precursor-Protein intrazelluläre Domäne (AICD) freigesetzt.

#### *Physiologische Relevanz von APP und dessen Schnittfragmenten*

Die exakte Funktion des APP-Moleküls ist noch unentschlüsselt. Die Relevanz dieser Interaktionen ist jedoch nicht in jedem Fall ausreichend erforscht. Experimente mit KO-Mäusen geben jedoch einen Hinweis darauf, welchen physiologischen Einfluss das APP-Molekül haben könnte. APP-KO Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar. Insgesamt entwickeln die Mäuse ein geringeres Körpergewicht (bis zu 20%) und auch das Gehirn ist kleiner (~10%) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Aydin et al., 2012). APP KO-Mäuse

zeigen ein erhöhtes Level an Cholesterin und Sphingomyelin in embryonalen Fibroblasten (Grimm et al., 2005). Ebenso konnten in APP- und APLP2-defiziten Mäusen erhöhte Kupferniveaus im Cortex und in der Leber festgestellt werden (White et al., 1999). Zusammen mit der Tatsache, dass Proteine der APP-Genfamilie eine Kupfer-Bindedomäne tragen (CuBD) (Abbildung 6), wird hieraus abgeleitet, dass APP und seine Homologe in die Kupfer-Homöostase involviert sind. In Bezug auf das Verhalten weisen gealterte APP-defizite Mäuse eine Beeinträchtigung des Lernens und des räumlichen Erinnerungsvermögens auf. Diese Veränderungen wurden mit einer verminderten Langzeit-Potenzierung (LTP) assoziiert (Dawson et al., 1999; Seabrook et al., 1999). Die LTP ist eine elektrophysiologisch messbare, andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung über einen längeren Zeitraum (>3 Stunden) und wird mit Erinnerungsvermögen und Lernen assoziiert. Die Schwächung der LTP und das beeinträchtigte Lernen scheint in diesen Mäusen altersabhängig zu sein. Junge und adulte Mäuse zeigen im Gegensatz zu „gealterten“ APP KO-Mäusen keine bedeutenden Veränderungen im LTP- oder Lern- und Erinnerungsverhalten (Seabrook et al., 1999; Ring et al., 2007; Weyer et al., 2014; Ludewig und Korte, 2017). Anders als APP KO-Mäuse zeigten APLP2 KO-Mäuse in den verschiedenen Lebensstadien keine Beeinträchtigung des LTP oder der basalen synaptischen Transmission, was mit einem normalen Lernen und Erinnerungsvermögen korreliert (Weyer et al., 2011; Guo et al., 2012; Midthune et al., 2012). Möglicherweise kann APLP2 physiologische Funktionen von APP in APP KO-Mäusen zum Teil kompensieren. Ergebnisse deuten darauf hin, dass APP und APLP2 redundante physiologische Funktionen besitzen. Die beiden Moleküle sind stark homolog und werden auf dieselbe Art und von den gleichen Sekretasen prozessiert, sie haben ein überlappendes neuronales Expressionsmuster und führen im *in vivo* Doppel-Knockout (dKO) zu Letalität (Heber et al., 2000). Mit fortschreitendem Alter scheint diese Kompensation durch APLP2 jedoch nicht mehr aufrecht erhalten werden zu können, da gealterte APP KO-Mäuse im Gegensatz zu APLP2 KO-Mäusen eine verringerte Dichte der synaptischen Dornfortsätze entwickeln (Weyer et al., 2011; Aydin et al., 2012; Midthune et al., 2012; Ludewig und Korte, 2017). Es zeigt sich auch, dass dKO-Mäuse mit APP<sup>-/-</sup>; APLP1<sup>-/-</sup> lebensfähig sind, wohingegen dKO mit APP<sup>-/-</sup>; APLP2<sup>-/-</sup> oder APLP1<sup>-/-</sup>; APLP2<sup>-/-</sup> und auch der triple-Kockout APP<sup>-/-</sup>; APLP1<sup>-/-</sup>; APLP2 letal sind. Die Jungtiere versterben innerhalb der ersten 24 h nach der Geburt (Heber et al., 2000; Herms et al., 2004; Wang et al., 2005). Diese KO-Resultate



sind Indizien dafür, dass APP eine ausgeprägtere oder dominantere neuronale Funktion besitzt (Ludewig und Korte 2017).

In Bezug auf die physiologische Funktion der APP-Schnittfragmente, die bei der posttranslationalen Prozessierung entstehen, lassen sich in der Literatur kontroverse Ergebnisse finden. Es ist unklar, ob diese unterschiedlichen Ergebnisse durch unterschiedliche Methoden, das Versuchstieralter, verschiedene Neuronen-Typen oder den genetischen Hintergrund beeinflusst wurden (Aydin et al., 2012). Im Allgemeinen zeigt sich, dass sowohl APP als auch dessen Schnittfragmente die synaptische Plastizität beeinflussen (Korte et al., 2012). Synaptische Plastizität beschreibt die Aktivitätsabhängige Veränderung der synaptischen Transmissions-Effizienz, Struktur und der Menge an Synapsen (Ludewig und Korte, 2017). Wiederholte *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse legen nahe, dass das sekretierte sAPP $\alpha$ -Fragment einen neurotrophen Einfluss hat. Dies zeigen beispielsweise Experimente, bei denen akute Gehirnschnitte von konditionellen APP/APLP2 dKO Mäusen mit rekombinantem sAPP $\alpha$  inkubiert wurden. Es konnte festgestellt werden, dass sAPP $\alpha$ , jedoch nicht sAPP $\beta$ , die dKO-typische LTP-Verminderung reversieren konnte (Hick et al., 2015). Frühere *in vivo* Maus-Studien konnten ebenfalls feststellen, dass sAPP $\alpha$  auf hippocampalen Schnitten oder bei intrahippocampalen Infusionen eine fördernde Wirkung auf die LTP hatte (Ishida et al., 1997; Ring et al., 2007; Taylor et al., 2008; Moreno et al., 2015). Reziproke Experimente, in denen eine postnatale Inhibition der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 zu weniger sAPP $\alpha$  führte, zeigten Ergebnisse, die diese Schlussfolgerungen unterstützen (Prox et al., 2013). Ferner gibt es Belege, dass sAPP $\alpha$  die Aktivität von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren modulieren kann (Taylor et al., 2008; Moreno et al., 2015). Das sAPP $\alpha$ -Peptid scheint demnach einen Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden zu haben, die die synaptische Aktivität von Neuronen regulieren.

Vergleichende Studien zur Funktion von sAPP $\beta$  haben ergeben, dass es keinen Einfluss auf die synaptische Plastizität besitzt (Taylor et al., 2008; Hick et al., 2015). Das sAPP $\beta$ -Fragment scheint vielmehr eine Rolle bei der Zell-Adhäsion, der Axon-Ausbildung und der neuronalen Differenzierung zu haben (Chasseigneaux et al., 2011; Freude et al., 2011).

Für die intrazelluläre Domäne AICD ist gezeigt, dass sie mit verschiedenen Adapterproteinen interagieren kann (Bukhari et al., 2017). Diese Interaktionspartner sind unter anderem an der Clathrin-abhängigen Endozytose von APP und an dessen Translokation zur Zelloberfläche beteiligt (Aydin et al., 2012; van der Kant und

Goldstein, 2015). Das AICD Fragment kann an das Adapterprotein FE65 binden und zusammen mit der Histon Acetyltransferase Tip60 einen Komplex bilden (Cao und Südhof, 2001; Radzimanowski et al., 2008). Dieser Komplex kann in den Nukleus transloziert werden und beeinflusst dort die Transkription und Expression von bestimmten Zielgenen (Cao und Südhof, 2001). Die Wirkung des AICDs als Transkriptionsfaktor scheint sowohl indirekt als auch direkt, durch die Bindung an bestimmte Promotoren, sein zu können (Wang et al., 2014; Bukhari et al., 2017). Interessant ist, dass AICD die Expression der GSK3 $\beta$ -Kinase stimulieren kann, die bekanntermaßen an der Hyperphosphorylierung von Tau beteiligt ist (Kim et al., 2003). Für die genauere Betrachtung der Funktion der AICD-Domäne und im Speziellen der integrierten YENPTY-Sequenz wurden APP $\Delta$ CT15 Knock-in-Mäuse generiert, denen 15 Aminosäuren am C-Terminus inklusive des YENPTY-Motivs fehlten (Ring et al., 2007). Analysen ergaben, dass diese Mäuse zwar ein erniedrigtes Level an Amyloid  $\beta$  im zentralen Nervensystem hatten, jedoch keine Defizite in der LTP vorlagen. Eine Doppelmutation (DM), bei der sowohl dem APP als auch dem APLP2 der C-terminale Teil inklusive der YENPTY-Sequenz fehlte, zeigte, dass die synaptische Dichte ähnlich wie im dKO von APP und APLP2 erniedrigt war. Zudem wiesen diese Mäuse Defizite in der LTP auf. Das veränderte Verhalten der APP $\Delta$ CT15-DM Mäuse deutete auf eine hippocampale Dysfunktion hin, da das räumliche Erinnerungsvermögen und die synaptische Plastizität vermindert waren (Klevanski et al., 2015). Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die in der AICD enthaltene YENPTY-Sequenz für wichtige intrazelluläre Signalkaskaden verantwortlich ist, die möglicherweise über Adapterproteine wie Fe65 vermittelt werden (Korte et al., 2012). Bestärkt wird diese Annahme dadurch, dass ein Defizit der beiden FE65-Proteine (FE65 und FE65L1) in Mäusen zu einem ähnlichen Phänotyp führt wie eine Dreifachmutation der APP-Genfamilie (Guénette et al., 2006). In nicht-neuronalen Zellen wurde gezeigt, dass AICD auch einen Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Homöostase hat. Bei Verringerung der AICD durch einen Presenilin-KO zeigte sich ein erniedrigter intrazellulärer Calciumgehalt in Fibroblasten. Wiederherstellungsexperimente, bei denen die Zellen mit unterschiedlichen APP-Konstrukten transfiziert wurden, verdeutlichten, dass die AICD-Sequenz hinreichend für die Rückgewinnung des normalen Calciumgehalts der Zellen war (Leissring et al., 2002).

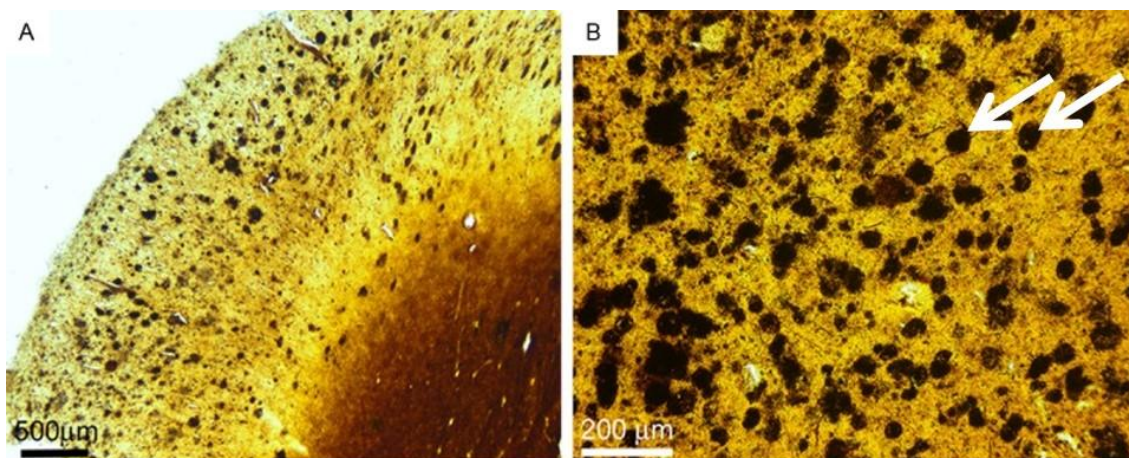
Das bereits erwähnte A $\beta$ -Schnittfragment wird nach der APP-Spaltung durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase in den interzellulären Raum entlassen (Abbildung 7). Dieses Peptid kann je

nach Schnittstelle aus unterschiedlich vielen Aminosäuren bestehen. Am prominentesten sind die A $\beta$ -Peptide mit 40 und 42 Aminosäuren. Diese beiden A $\beta$ -Spezies werden in hohem Maße mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht. Untersuchungen zur Funktion des Peptids im neuronalen System zeigten, dass es in supraphysiologischen Konzentrationen die glutamaterge Exzitotoxizität fördert (Danysz und Parsons, 2012). In niedrigen, physiologischen Konzentrationen waren A $\beta$  Mono- und Oligomere ein positiver Modulator der exzitatorischen Neurotransmission (Puzzo et al., 2008; Garcia-Osta und Alberini, 2009; Morley et al., 2010). Einige Studien zeigen einen toxischen Effekt der Amyloid  $\beta$ -Spezies beziehungsweise löslichen A $\beta$ -Oligomere. Shankar et al. zeigten 2008, dass aus Patienten isolierte unquantifizierte lösliche A $\beta$ -Oligomere in Nagetieren zu einer Verschlechterung der mit Lernen und Erinnern assoziierten synaptischen Plastizität führten und die synaptische Dichte verringerten. Bestimmte Antikörper konnten diesen Effekt durch Präzipitation der A $\beta$ -Oligomere reduzieren (Shankar et al., 2008). Diverse andere *in vitro* und *in vivo* Experimente bestätigen diesen exzitotoxischen Effekt von A $\beta$  in supraphysiologischen Konzentrationen (Harkany et al., 2000; Mattson et al., 1992; Danysz und Parsons, 2012). Im Gegensatz dazu führte die Depletion von A $\beta$  durch spezifische Antikörper oder siRNA in Nagern zu einer Verschlechterung der synaptischen Plastizität und des Erinnerungsvermögens, was durch die Zugabe von humanem A $\beta$ <sub>42</sub> rückgängig gemacht werden konnte (Morley et al., 2010; Puzzo et al., 2011). Diese kontroversen Ergebnisse lassen vermuten, dass Amyloid  $\beta$  in physiologischen Konzentrationen als ein Stimulator der synaptischen Plastizität wirkt, wohingegen höhere Konzentrationen zu einer pathologischen Schädigung durch Exzitotoxizität führen.

#### *Senile Plaques bei Morbus Alzheimer*

Neben der Tauopathie ist die Bildung von extrazellulären senilen Plaques ein weiteres typisches histopathologisches Merkmal der Alzheimerschen Krankheit. Senile Plaques bestehen aus überwiegend extrazellulär aggregiertem Amyloid  $\beta$ -Peptiden (Abbildung 8). Während der Entwicklung der Krankheit zeigt sich ähnlich wie bei NFTs ein stufenweises Ausbreitungsmuster in den Bereichen des Gehirns und eine jeweils lokal steigende Anzahl an A $\beta$ -Plaques (Nelson et al., 2012). Dieses Ausbreitungsmuster wurde von Thal et al., 2002 anhand von Autopsien charakterisiert und in fünf Stadien unterteilt. Die Ausbreitung beginnt typischerweise im Neocortex (Stadium 1) und schreitet dann fort zur CA1-Region des Hippocampus und dem entorhinalen Cortex

(Stadium 2). In Stadium 3 sind Bereiche wie die Amygdala, das Präsubiculum, der Thalamus und Hypothalamus betroffen. Später betroffene Regionen sind unter anderem die hippocampale CA4-Region und Bereiche des Hirnstamms in Stadium 4 und des Cerebellums in Stadium 5 (Thal et al., 2002). Bisher ist die Ursache der Plaque-Bildung bei Morbus Alzheimer nicht eindeutig geklärt. Die 1992 aufgestellte Amyloid-Hypothese, laut der die Akkumulation von A $\beta$  im Gehirn die Ursache sowohl für NFTs als auch für Zellschädigung und Demenz bei Morbus Alzheimer sein soll, wird weiterhin stark diskutiert (Hardy und Higgins, 1992; Selkoe und Hardy, 2016). Kontroverse Forschungsergebnisse haben bisher eine eindeutige Interpretation verhindert.



**Abbildung 8 Färbung von Amyloid  $\beta$ -Plaques eines Alzheimer-Patienten.**

**A.** Zu sehen ist die Silber-Färbung von A $\beta$ -Plaques im Frontalcortex eines Alzheimer-Patienten, der für einen längeren Zeitraum (> 1 Jahr) mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor Semagacestat behandelt wurde. **B.** Die Pfeile markieren extrazelluläre A $\beta$ -Plaques in einer vergrößerten Ansicht. In den Untersuchungen der Patienten zeigten sich keine Unterschiede in der Plaquebildung zwischen Alzheimer-Patienten mit oder ohne Semagacestat-Behandlung (Roher et al., 2014).

Die genetisch beeinflusste Alteration der Amyloid-Produktion ist mit hereditären Formen der Alzheimerschen Krankheit assoziiert. Es wurden bisher mehr als 200 pathogene Mutationen in den Genen PSEN-1, PSEN-2 und APP identifiziert (Hsu et al., 2020). Eine Mutation im *PSEN1*- oder *PSEN2*-Gen, das für Presenilin-1/2 (PS1/2) codiert, gilt als genetischer Risikofaktor für familiäres Morbus Alzheimer (Bekris et al., 2010). Die Mutation kann zu einer veränderten Funktion der  $\gamma$ -Sekretase, da PS1/PS2 die katalytische Einheit der Sekretase darstellen. Eine veränderte Funktion der  $\gamma$ -Sekretase führt nachweislich zu einer veränderten Spaltungsrate von APP und dessen Schnittfragment Amyloid  $\beta$  (Xia et al., 2015; Selkoe und Hardy, 2016; Sun et al., 2017). Auch Mutationen im *APP*-Gen selbst wurden mit hereditären Formen der

Alzheimerschen Demenz korreliert (Bekris et al., 2010). Ein weiterer genetischer Risikofaktor ist das Down Syndrom (DS). Bei dieser Aneuploidie liegt das Chromosom 21 in dreifach vor. Wie bereits beschrieben liegt das Gen von APP ebenfalls auf diesem Chromosom. DS-Patienten haben ein höheres Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken (Wiseman et al., 2015; Castro et al., 2017) daher besteht hier die Annahme, dass das Protein APP aufgrund der erhöhten 1,5-fachen Menge des Gens vermehrt exprimiert wird und es dadurch möglicherweise auch zu einem erhöhten Aufkommen der Schnittfragmente wie A $\beta$  kommen kann. Im Hinblick auf die A $\beta$ -Hypothese wird angenommen, dass eine genetisch-bedingte, gesteigerte A $\beta$ -Bildung Exzitotoxizität vermittelt und die familiäre Alzheimersche Krankheit hier ihren Ursprung hat (Selkoe und Hardy, 2016). Studien zur A $\beta$ -Reduktion in Patienten zeigen jedoch kontroverse Ergebnisse. Klinische Studien mit Anti-A $\beta$  Antikörpern wie Solanezumab oder Aducanumab wiesen in Patienten zwar erste Erfolge bei der Plaque-Reduktion auf, doch zeigten die Studien auf lange Sicht keine Erfolge bei der Reduktion der Symptome (Sevigny et al., 2016; Doggrel, 2018; Selkoe, 2019). Der zunächst vielversprechende Antikörper Aducanumab deutete in Phase 1 der klinischen Studien eine Reduktion der Amyloid-Plaques in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) an und zeigte erste Verbesserungen auf kognitiver Ebene in den Patienten (Sevigny et al., 2016). Im Verlauf der dritten Studienphase konnten diese Erfolge in größeren Kohorten jedoch nicht bestätigt werden, so dass die Studie an dieser Stelle abgebrochen wurde (Selkoe, 2019). Auf ähnliche Weise zeigen auch Studien zur Manipulation der APP-assoziierten Sekretase-Aktivität durch  $\gamma$ - oder  $\beta$ -Sekretase-Inhibitoren bei Alzheimer-Patienten bislang keine erfolgversprechenden kognitiven Verbesserungen trotz Plaque-Reduktion (Godyń et al., 2016, Moussa-Pacha et al., 2019). Da die physiologische Funktion des A $\beta$ -Peptids bis heute nicht eindeutig geklärt ist, bedarf es hier weiterer Forschung und Untersuchungen, um zu verstehen, welche Rolle das Peptid beziehungsweise die Plaques bei der Alzheimerschen Krankheit spielen.

### 1.1.3 Das Zusammenspiel von Tau und Amyloid $\beta$

Sowohl die neurofibrillären Bündel als auch die senilen Plaques sind charakteristische Alzheimer-Kennzeichen. In der derzeitigen Forschung wird intensiv diskutiert, was die Ursache für das Auftreten der jeweiligen histopathologischen Merkmale ist. Des Weiteren ist umstritten, inwiefern die A $\beta$ - und Tau-Pathologie einander beeinflussen. Beobachtungen deuten darauf hin, dass A $\beta$  womöglich upstream von Tau agiert. In der Literatur wird beispielsweise berichtet, dass sowohl die Injektion von A $\beta_{42}$ -Fibrillen als auch Extrakte aus APP-transgenen Mäusen (APP23) im Gehirn von transgenen P301L Tau-Mäusen die NFT-Bildung induzieren (Götz et al., 2001; Bolmont et al., 2007). Zempel und Mandelkow zeigten, dass A $\beta$  zu einem verstärkten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch synaptische Rezeptoren führt und gleichzeitig eine Translokation des Taus vom Axon in dendritische Bereiche induziert (Zempel und Mandelkow, 2012). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Amyloid  $\beta$  die Tau-Pathologie vorantreibt. Andere Studien zeigten jedoch Ergebnisse, die das Gegenteil vermuten lassen. So scheint der Phosphorylierungsstatus von Tau einen Einfluss auf die Menge der APP-Spaltungsprodukte zu haben (Ittner et al., 2016). Weiterhin ist gezeigt, dass Tau-Spezies aus Alzheimer-Patienten zu erhöhten A $\beta$ -Leveln und einer erhöhten neuronalen Aktivität führten (Bright et al., 2015). *In vivo* Experimente von Ittner et al., 2010 zeigten, dass Tau die postsynaptische NMDAR-abhängige Exzitotoxizität von A $\beta$  modulieren kann. Dabei zeigten APP23-Mäuse mit einer verkürzten transgenen Tau-Form oder einem Tau-Knockout eine verringerte A $\beta$ -Toxizität (Ittner et al., 2010). Des Weiteren ist beschrieben, dass sowohl *in vitro* als auch in Alzheimer Patienten lösliche A $\beta$ -Tau-Komplexe gefunden wurden. Diese Komplexe scheinen die Tau-Phosphorylierung durch Erhöhung der Kinase-Aktivität zu fördern (Guo et al., 2006). Diese Ergebnisse liefern Belege für ein potentielles Zusammenspiel zwischen Tau und A $\beta$ , wobei weiterhin unklar ist welche Mechanismen diese Interaktion beeinflussen und welcher Faktor up- oder downstream agiert.

#### 1.1.4 Potenzielle Risikofaktoren zur Erkrankung an Morbus Alzheimer

Trotz vieler unterschiedlicher Modelle kennt man bislang nicht die Ursache für die Alzheimersche Krankheit (Mroczo et al., 2018) in ihrer sporadischen Form. In der Literatur werden verschiedene Risikofaktoren mit dem Auftreten von Morbus Alzheimer assoziiert. Die Krankheit kann in zwei unterschiedlichen Formen, der hereditären und der spontanen Form, vorliegen. Die eher seltene (< 1%) hereditäre Form tritt häufig schon sehr früh mit <65 Jahren auf und wird als Early-Onset-Erkrankung bezeichnet (Blennow et al., 2006; Alzheimer's Association, 2016). Der Ausbruch der Krankheit in dieser Form resultiert meist aus einer autosomalendominant vererbten Mutation in einem von drei spezifischen Genen. Hierzu gehören die Gene des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) und die des Presenilin-1- und -2-Proteins (PS1, PS2) (Bekris et al., 2010). Es sind derzeit über 200 Mutationen dieser Gene bekannt, die krankheitsverursachend sind (Hsu et al., 2020). Diverse Alzheimer-Mausmodelle basieren auch auf transgenen Mutationen dieser Gene. Eine Mutation im APP- oder PS1-Gen hat eine höhere Penetranz zur Erkrankung an Alzheimer als eine Mutation im PS2-Gen (Goldman et al., 2011). 80% der Early-Onset-Erkrankungen an Alzheimer sind einer PS1-Mutation geschuldet. Für PS-2 sind es nur 5% und 14% der Alzheimer-Früherkrankungen werden von einer APP-Mutation induziert (Guerreiro et al., 2012). Da alle drei Gene an der Produktion und Spaltung des A $\beta$ -Peptids beteiligt sind, wurde schon oft gezeigt, dass eine Fehlfunktion dieser Proteine zu einer veränderten Produktion und Menge des Peptids führt (Xia et al., 2015; Selkoe und Hardy, 2016; Sun et al., 2017).

Viel häufiger tritt jedoch die sporadische Form von Alzheimer auf. Ein genetischer Risikofaktor hierbei ist die allelische Variante des Lipoproteins ApoE. Es existieren drei Formen des Allels: ApoE  $\epsilon$ 2, ApoE  $\epsilon$ 3 und ApoE  $\epsilon$ 4. Die Letztere ( $\epsilon$ 4) ist mit einem dreifach höheren Risiko für die Erkrankung an Alzheimer assoziiert; eine homozygote ApoE  $\epsilon$ 4 Kombination ist sogar mit einem acht- bis zwölfmal erhöhten Risiko verbunden (Corder et al., 1993; Holtzman et al. 2012). Das ApoE  $\epsilon$ 4 Allel führt jedoch nicht zwingend zu einer Alzheimer-Erkrankung und ist damit auch kein geeigneter Alzheimer-Marker, denn  $\sim$ 75% der  $\epsilon$ 4 Allel-Träger mit wenigstens einer Kopie bleiben symptomfrei. Auch unter den diagnostizierten Alzheimer-Patienten tragen bis zu 50% der Personen kein  $\epsilon$ 4 Allel (Loy et al., 2014; Alzheimer's Association, 2016).

Das Down Syndrom wird ebenfalls mit der Alzheimerschen Demenz assoziiert. Verschiedene Studien berichten, dass mehr als 50-80% der über 65-Jährigen Down

Syndrom-Patienten an Alzheimer erkrankt sind (Wiseman et al., 2015; Castro et al., 2017). Bei Down Syndrom liegt eine zusätzliche Kopie des Chromosoms 21 vor (Trisomie 21). Auf diesem Chromosom ist auch das Gen lokalisiert, welches für APP codiert. Wegen der typisch auftretenden Amyloid-Plaques bei DS (Lemere et al., 1996) wird vermutet, dass die 1,5-fache Menge des APP-Gens eine mögliche Ursache dafür ist. Neuere Studien in Mäusen zeigen jedoch, dass die Alzheimer-Pathologie bei DS auch unabhängig von der zusätzlich *APP*-Kopie entstehen kann (Wiseman et al., 2018). Es ist unklar, ob nicht noch andere Gentrifikationen auf Chromosom 21 dabei eine Rolle spielen.

Das natürliche Altern ist ein weiterer offensichtlicher Faktor, mit dem die Wahrscheinlichkeit, an Morbus Alzheimer zu erkranken, steigt. Eine US-Studie aus dem Jahr 2016 hat gezeigt, dass in einer Gruppe von Alzheimer-Patienten der Anteil, der unter 65-Jährigen bei nur 4% lag, wohingegen 44% der Patienten 75-84 Jahre alt waren (Alzheimer's Association, 2016). Die Inzidenz von Morbus Alzheimer steigt generell mit dem Alter drastisch an und liegt bei den über 85-Jährigen bei 10-30% (Mayeux, 2003). Epidemiologische Studien und Autopsien haben ergeben, dass es auch einen Zusammenhang zwischen (traumatischen) Kopfverletzungen und Demenz beziehungsweise Morbus Alzheimer gibt (Jellinger, 2004). Es zeigte sich, dass eine starke traumatische Hirnverletzung mit einem 4,5-fach höheren Risiko für Demenz und Alzheimer assoziiert war (Plassman et al., 2000). Trauma-bedingtes CTE, was häufig bei Sportlern wie Fußballspielern oder Boxern vorkommt, wurde ebenfalls als Demenzrisiko beschrieben (Omalu, 2014). Die Auswirkungen einer Kopfverletzung auf kognitive Fähigkeiten scheinen durch den Alzheimer-Risikofaktor Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4-Allel verstärkt zu werden und auch die anschließende Genesung bei  $\epsilon$ 4-Allel-Trägern war negativ beeinflusst (Lichtman et al., 2000; Ariza et al., 2006).

Zusätzlich zum Altern und familiär-genetischen Risikofaktoren werden auch beeinflussbare Risikofaktoren mit Alzheimer assoziiert. Beispielsweise wird eine niedrige Bildung als Risikofaktor diskutiert (Mortimer et al., 2003; Koepsell et al., 2008). Die Hypothese ist, dass eine bessere neuronale Entwicklung zu einer sogenannten „kognitiven Reserve“ führt, die zu einer besseren Kompensation von degenerativen Hirnveränderungen beiträgt (Stern, 2012). Eine gesteigerte mentale und soziale Aktivität scheint ebenfalls einen reduzierenden Einfluss auf das Alzheimer-Risiko zu haben (Mayeux, 2003; Alzheimer's Association, 2016).



Auch das biologische Geschlecht korreliert mit einer erhöhten Vulnerabilität für Morbus Alzheimer. Epidemiologische Studien haben ergeben, dass es in Bezug auf das biologische Geschlecht sowohl Unterschiede in der Ausprägung als auch dem Verlauf der Krankheit gibt (Ferretti et al., 2018). Frauen sind demnach schneller von kognitivem Verfall und Hirn-Atrophie betroffen als Männer (Hua et al., 2010; Lin et al., 2015). Die neuroprotektive Funktion des Hormons Östrogen und der Östrogenverlust von Frauen nach der Menopause könnten hierbei einen Einfluss haben (Li et al., 2014).

## **1.2 Neuronale Transmission**

Als Neurotransmission wird die Weiterleitung von neuronalen Informationen bezeichnet. Die Neurotransmission im zentralen Nervensystem (ZNS) findet an Synapsen statt. Als Synapse wird ein Bereich bezeichnet, an dem zwei Neurone in Kontakt treten. Zwischen dem Axon eines vorgeschalteten (präsynaptischen) Neurons und den Dendriten eines nachgeschalteten (postsynaptischen) Neurons werden bei der Weiterleitung eines Signals bestimmte Botenstoffe, sogenannte Neurotransmitter, aus Vesikeln des Axons in den synaptischen Spalt entlassen. Der synaptische Spalt ist der Raum zwischen einem Axon und einem Dendriten. Bei der anterograden Neurotransmission wandern die entlassenen Neurotransmitter zu spezifischen Rezeptoren, die an der Membranoberfläche der Dendriten sitzen. Bindet ein Neurotransmitter an einem spezifischen Rezeptor wird dessen Aktivitätszustand verändert. Es können beispielsweise selektiv Ionen durch die Membran in das postsynaptische Neuron einströmen. Diese Ionen verändern aufgrund ihrer Ladung das Membranpotential im postsynaptischen Neuron und lösen dadurch weitere Reaktionskaskaden aus. Welche Auswirkung die Signalkaskaden am postsynaptischen Neuron haben wird durch die Eigenschaft der präsynaptischen Neurotransmitter und die Rezeptoren innerhalb der postsynaptischen Membran beeinflusst.

### **1.2.1 Erregende und Hemmende Neurotransmission**

Man unterscheidet zwischen zwei Arten der neuronalen Transmission. Die exzitatorische (erregende) und die inhibitorische (hemmende) Neurotransmission. Erregbare Neurone besitzen ein sogenanntes Ruhemembranpotential von -70 mV. Dieses Ruhepotential wird durch eine unterschiedliche Ionen-Verteilung innerhalb und außerhalb der Zellmembran erzeugt. Hierbei spielen vor allem Kalium-Ionen, neben

Natrium- und Chlorid-Ionen, die entscheidende Rolle (Kandel et al., 1991, Kapitel 5). Eine erregende Synapse sorgt dafür, dass im postsynaptischen Neuron ein exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP) ausgelöst wird. An der postsynaptischen Membran werden somit durch den erregenden Reiz transmittersensitive Natrium- und Kalium-Kanäle geöffnet. Erreicht das Membranpotential durch den Einstrom/Austram der Ionen einen bestimmten Schwellenwert (von ca. -50 mV) werden zusätzlich weitere spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet. Der intensivierte Natrium-Einstrom sorgt schließlich für eine Depolarisation der Postsynapse (bis zu 40 mV). Es entsteht ein Aktionspotential, welches sich als elektrisches Signal bis zum Axon des postsynaptischen Neurons ausbreitet und somit an der nächsten Synapse auf ein weiteres Neuron übertragen werden kann (Kandel et al., 1991, Kapitel 6).

Durch die Aktivierung einer inhibitorischen Synapse wird das Ruhepotential im postsynaptischen Neuron erniedrigt. Man spricht hier von einem inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP). Präsynaptische Neurotransmitter sorgen hier ebenfalls für die Öffnung von postsynaptischen Ionenkanälen. Der Ausstrom von Kalium- mit gleichzeitigem Einstrom von Chlorid-Ionen führt in der postsynaptischen Zelle zu einer Hyperpolarisation der Membran. Hierbei verringert sich das Ruhepotential von -70 mV auf bis zu -100 mV. Das erniedrigte Potential erschwert das Erreichen des Schwellenpotentials (-50 mV) und verhindert somit die Entstehung eines Aktionspotentials; die Erregungsweiterleitung wird somit gehemmt.

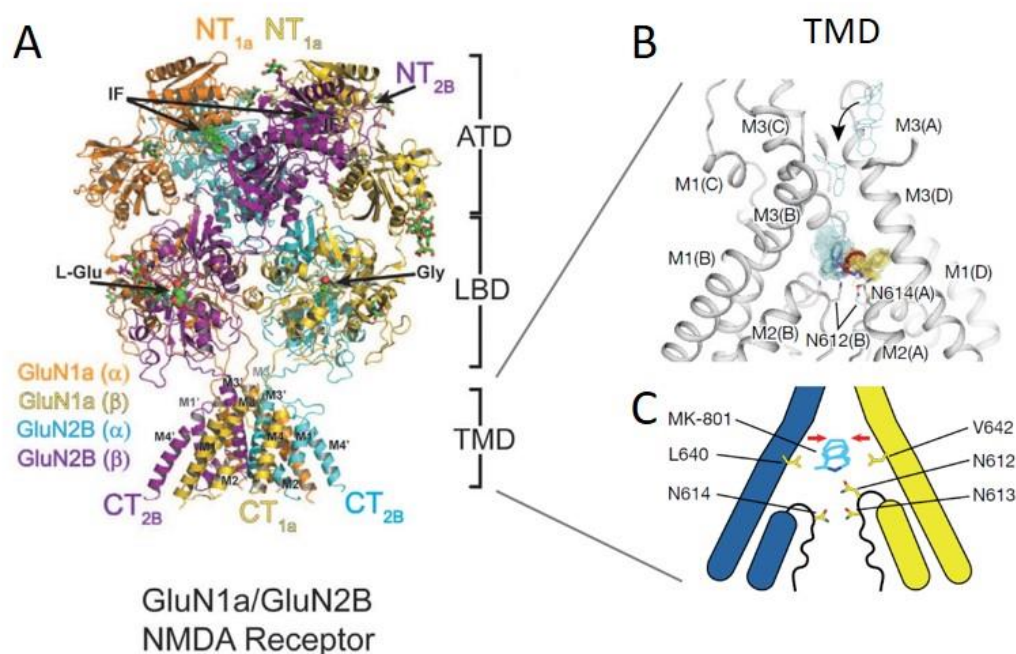
Ob ein Neuron erregend oder hemmend wirkt, wird zum einen vom Typ des Neurotransmitters entschieden; zum anderen sind die jeweiligen Rezeptoren-Typen in der postsynaptischen Membran entscheidend. Typische hemmende Neurotransmitter im ZNS sind die Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glycin. Andere Neurotransmitter wie Dopamin und Serotonin können je nach Rezeptor-Typ in der postsynaptischen Membran sowohl ein IPSP als auch ein EPSP auslösen (Kandel et al., 1991, Kapitel 11). Ein klassischer erregender Neurotransmitter ist das L-Glutamat (Watkins, 2000). Glutamat ist ein Ligand für ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Ionotrop bedeutet, dass die jeweiligen Rezeptoren auch als Kanäle für Ionen fungieren. Hierzu gehören AMPA-, NMDA- und Kainat-Rezeptoren, die neben Glutamat weitere namensgebende Agonisten besitzen. Bei metabotropen Rezeptoren wird durch die Bindung des Liganden eine Second-Messenger-Signalkaskade eingeleitet. Für Glutamat

sind bisher acht metabotrope G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bekannt (mGlu 1-8) (Sugiyama et al., 1987; Watkins, 2000).

### 1.2.2 Aufbau und Funktion von NMDA-Rezeptoren

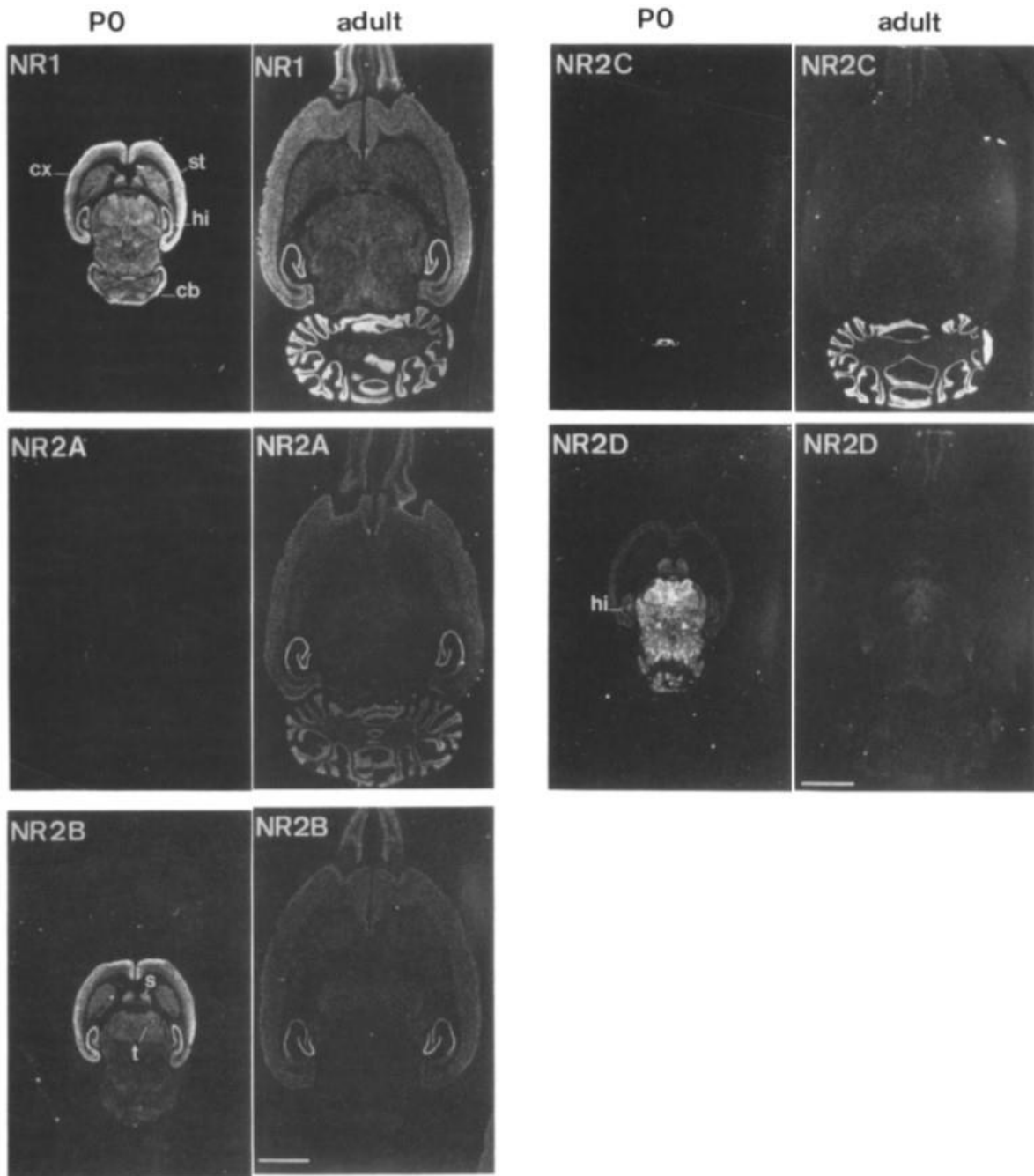
Der glutamaterge NMDA-Rezeptor (NMDAR) ist nach seinem spezifischen Liganden N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) benannt, der jedoch physiologisch nicht vorkommt. NMDARs haben im Vergleich zu anderen ionotropen Glutamat-Rezeptoren eine langsamere Liganden-Dissoziationsrate und eine höhere Glutamat-Affinität (Andersen et al., 2007; Patneau und Mayer, 1990; Traynelis et al., 2014). Wenn Glutamat am NMDAR gebunden wird, öffnet sich dieser über einen längeren Zeitraum wiederholte Male und hält damit den Ionen-Einstrom in die Zelle über mehrere hundert Millisekunden aufrecht (Lester et al., 1990). Funktionsfähige NMDARs sind aus vier Untereinheiten zusammengesetzt (Abbildung 9). Der Rezeptor besitzt eine aminoternale Domäne (ATD), eine Lianden-bindende Domäne (LBD) und eine Transmembran-Domäne (TMB) (Abbildung 9A). Die NMDAR-Untereinheiten werden in drei unterschiedliche Subtypen unterteilt, die NR1-, NR2- und NR3-Untereinheiten. Die NR2-Untereinheit kann als NR2A, -B, -C oder -D-Variante vorliegen und enthält die Bindestelle für den Agonisten Glutamat (Abbildung 9A) (Laube et al., 1997; Anson et al., 1998). Diese Untereinheit entscheidet auch über die elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors (Monyer et al., 1994). Für die NR1-Untereinheit sind acht Spleißvarianten bekannt (Zukin und Bennett, 1995). NR1 ist für die Bildung eines funktionsfähigen Rezeptors essentiell. Belegt wird dies durch die Ergebnisse von KO-Experimenten in Mäusen; Mäuse mit einem komplett-KO der NR1-Untereinheit sind letal (Forrest et al., 1994). Die NR1-Untereinheit besitzt Bindestellen für die sogenannten Co-Agonisten Glycin und D-Serin (Abbildung 9A) (Kuryatov et al., 1994; Mothet et al., 2010). Experimente haben gezeigt, dass die Bindung der Co-Agonisten eine Bedingung für die Aktivierung des Rezeptors ist (Johnson und Ascher, 1987; Kew et al., 2000). Die Co-Agonisten scheinen somit eine Rolle als physiologische Regulatoren der Rezeptoraktivität zu übernehmen. Die A- und B-Variante der NR3-Untereinheit besitzen wie NR1 eine Glycin-Bindestelle und kommen im Gegensatz zu den beiden anderen Untereinheiten nicht im Hippocampus vor. Die Aktivität von NR1/NR3-Rezeptortypen ist aufgrund der fehlenden Glutamat-Bindestelle Glycin-gesteuert (Chatterton et al., 2002). Ein funktionsfähiger NMDAR ist

ein Heterotetramer, der sich aus zwei obligatorischen NR1-Untereinheiten und zwei homologen NR2- beziehungsweise NR3-Untereinheiten zusammensetzt (Laube et al., 1998). Das Vorkommen der verschiedenen Isoformen der Untereinheiten ist sowohl Hirnregion-spezifisch, als auch abhängig vom Entwicklungsstadium (Monyer et al., 1994; Wenzel et al., 1997). Färbungen von Gehirnschnitten aus Ratten in verschiedenen Entwicklungsstadien zeigen beispielsweise, dass im Hippocampus hauptsächlich der NR1 und die Isoformen A und B der NR2-Untereinheit exprimiert werden, wohingegen NR2C ausschließlich im Cerebellum transkribiert wird (Abbildung 10). Weiterhin ist aufgrund des Transkriptionsmusters anzunehmen, dass beispielsweise NR2C in der postnatalen Entwicklung eine geringere Bedeutung hat als im adulten Zustand des Tiers (Abbildung 10).



**Abbildung 9 Aufbau des heterotetrameren NMDA-Rezeptors.**

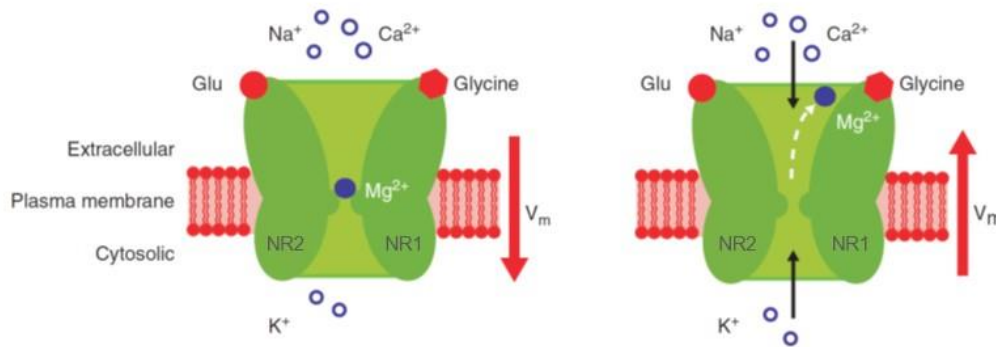
**A.** Der heterotetramere NMDA-Rezeptor setzt sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen. Der hier exemplarisch gezeigte N1a/N2B-Rezeptor besitzt zwei NR1-Untereinheiten (GluN1α α: orange; β: gelb) und zwei NR2B-Untereinheiten (GluN2B α: blau; β: violett). Der N-terminale Bereich (NT) des Rezeptors befindet sich im extrazellulären Raum und das C-terminale Ende (CT) ragt in den intrazellulären Raum. Der Rezeptor besitzt drei Domänen: eine Aminoterminal Domäne (ATD), eine Liganden-bindende Domäne (LBD) und eine Transmembran-Domäne (TMD). Die Bindestelle für den Co-Agonisten Glycin (Gly, rot) und die Bindetaschen für den Agonisten L-Glutamat (L-Glu, grün) befinden sich in der LBD der NR1- beziehungsweise NR2-Untereinheit. Verschiedene Antagonisten wie beispielsweise das hier abgebildete Ifendrotil (IF, grün) binden im Bereich der ATD (Karakas und Furukawa, 2014). **B.** Der Rezeptor-Blocker Magnesium und der nicht-kompetitive Inhibitor MK-801 hingegen binden in der Pore der TMD (Song et al., 2018). **C.** Die schematische Darstellung der MK-801-Rezeptorblockade (Song et al., 2018).



**Abbildung 10 mRNA-Expressionsmuster der NMDAR-Untereinheiten in Gehirnschnitten von Ratten.**

Gezeigt ist das postnatale und adulte mRNA-Expressionsmuster der NMDAR-Untereinheiten NR1, NR2A, NR2B, NR2C und NR2D in horizontalen Rattengehirn-Schnitten. Zu sehen ist, dass die Transkription der NR1- und NR2B-mRNA bereits am postnatalen Tag 0 (P0) sehr stark ist. NR1 ist großflächig exprimiert und bleibt auch im adulten Zustand konstant. NR2B ist an P0 vor allem im Cortex, Striatum, Septum, Thalamus und Hippocampus verbreitet und im Cerebellum nur schwach bis gar nicht exprimiert. In der adulten Ratte findet sich NR2B überwiegend im Hippocampus und im Cortex. Die NR2A- und NR2C-Transkription beginnt zu einem späteren Entwicklungsstadium. Die NR2A mRNA wird ähnlich wie NR1 im adulten Zustand in nahezu allen Gehirnarealen transkribiert. Das NR2C-Transkriptom begrenzt sich im adulten Tier auf das Cerebellum. Die NR2D-Untereinheit wird vor allem im frühen Entwicklungsstadium transkribiert und ist im adulten Zustand stark reduziert. cb: Cerebellum, cx: Cortex, hi: Hippocampus, s: Septum, st: Striatum, t: Thalamus (Abbildung verändert nach Monyer et al., 1994).

Ein funktionsfähiger NMDAR formt innerhalb der Zellmembran einen spannungsabhängigen Ionen-Kanal, der permeabel für  $\text{Ca}^{2+}$  und weitere monovalente Kationen wie  $\text{Na}^{+}$  und  $\text{K}^{+}$  ist (Mayer et al., 1988). Die relative Durchlässigkeit von NMDARs ist im Vergleich zu den anderen Ionen für Calcium deutlich höher und spielt eine große Rolle für die Langzeit-Plastizität von Neuronen (Mayer und Westbrook, 1987). Calcium-Ionen fungieren zudem innerhalb der Zelle als Second Messenger, die bestimmte Signalkaskaden einleiten (Kovalchuck et al., 2000). Damit sich postsynaptische NMDARs öffnen können und  $\text{Ca}^{2+}$  einströmen kann müssen zwei Bedingungen erfüllt sein. (I) An der Präsynapse muss es zur Ausschüttung von Glutamat kommen und (II) die postsynaptische Membran muss ausreichend depolarisiert werden (Wigström und Gustafsson, 1986). Es muss also eine gleichzeitige prä- und postsynaptische Aktivität vorliegen, denn während des Membranruhepotentials ist die Durchlässigkeit der NMDARs durch extrazelluläre Magnesium-Ionen blockiert (Abbildung 11). Die  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen binden spannungsabhängig im Inneren der Rezeptorpore und blockieren den Ionenfluss (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Die durch die Depolarisierung erzeugte Spannungsveränderung an der Membran führt zur Auflösung der Magnesium-Blockade und der Rezeptor kann sich öffnen (Abbildung 11). Die spannungsabhängige Regulation des Calcium-Einstroms durch die Magnesium-Blockade wirkt der sogenannten Exzitotoxizität entgegen. Ist die Aktivität der NMDARs über einen längeren Zeitraum gegeben, können Calcium und andere Ionen übermäßig in die Zelle einströmen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass neuronale Zellkörper und Dendriten unter diesen Bedingungen anschwellen (Rothman und Olney, 1987). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation im Inneren der Zelle führt dabei zur Aktivierung vieler Calcium-abhängiger Proteine wie NOS und Calpaine, die Zellstrukturen, Membranen oder die DNA schädigen können und schließlich zum exzitatorischen Zelltod führen.



**Abbildung 11 Funktion des ionotropen NMDA-Rezeptors.**

Innerhalb der Rezeptor-Pore (Transmembran-Domäne) befindet sich eine Bindetasche für Magnesium-Ionen (Mg<sup>2+</sup>). Bindet Magnesium am NMDA-Rezeptor, wird dieser blockiert und die Ionen können nicht transportiert werden. Die Aktivitäts-abhängige Ablösung des Mg<sup>2+</sup> führt zur Öffnung des Rezeptorkanals. Natrium- (Na<sup>+</sup>), Kalium- (K<sup>+</sup>) und Calcium-Ionen (Ca<sup>2+</sup>) können nun in den extra- beziehungsweise intrazellulären Raum strömen. Durch die Ladungsverschiebungen an der Membran verändert sich folglich auch das Membranpotential (V<sub>m</sub>) (Zito und Scheuss, 2009).

### 1.2.3 Die physiologische Relevanz von NMDARs

NMDA-Rezeptoren sind nachweislich in den Prozess der synaptischen Plastizität involviert (Lüscher und Malenka, 2012). Als synaptische Plastizität bezeichnet man die Fähigkeit von Synapsen ihre Effizienz durch funktionelle oder morphologische Anpassung zu verändern. Die morphologische Veränderung kann bedeuten, dass die Anzahl oder Strukturierung der Synapsen angepasst wird. Die funktionellen Veränderungen beziehen sich auf die synaptische Signalübertragung selbst und können in Form von Verstärkung (Potenzierung) oder Abschwächung (Depression) auftreten. Diese Veränderungen können als kurzzeitige oder langzeitige Plastizität auftreten. Bei der Langzeit-Potenzierung (LTP) und Langzeit-Depression (LTD) unterscheidet man zwischen einer NMDAR-abhängigen und NMDAR-unabhängigen Form.

#### *Langzeit-Potenzierung (LTP)*

Die NMDA-abhängige Langzeit-Potenzierung findet in der CA1-Region des Hippocampus statt und ist auch in anderen Bereichen des Gehirns nachgewiesen (Nicoll und Malenka, 1995). Versuche zur Inhibition der NMDARs durch kompetitive und nicht-kompetitive Antagonisten haben gezeigt, dass die Induktion der LTP im CA1-Areal von der Aktivierung postsynaptischer NMDA-Rezeptoren abhängig ist (Collingridge et al., 1983; Harris et al. 1984; Coan et al., 1987), und dass Ca<sup>2+</sup>-Ionen dabei eine essentielle Rolle spielen. (Lynch et al., 1983). Für akute Gehirnschnitte nutzt man üblicherweise hochfrequente, krampfartige Impulse (50-100 Hz), um eine LTP zu

induzieren (Lüscher und Malenka, 2012). Diese Art der Stimulation sorgt für eine Summierung von aufeinanderfolgenden EPSPs, die zu einer starken Depolarisation der postsynaptischen Membran führen. Die NMDAR-Blockade durch Magnesium wird gelöst und die intrazelluläre Calciumkonzentration steigt. Das akkumulierte Calcium setzt Kinase-abhängige Signalkaskaden in Gang, die die Exozytose und Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren (AMPA) in die Membran vermitteln (Benke et al., 1998; Derkach et al., 1999; Ehlers, 2000; Lisman et al., 2002). Bei dem Prozess der Exozytose verschmelzen zytosolische Vesikel mit der Zellmembran, so können zum Beispiel Rezeptoren in die Zellmembran eingebaut werden. Die gesteigerte AMPAR-Anzahl innerhalb der postsynaptischen Membran sorgt für die Sensitivierung der Synapse gegenüber Glutamat, was schließlich zu einer langanhaltenden Verstärkung der synaptischen Effizienz führt (Lisman et al., 2002; Lüscher und Malenka, 2012). Für die NMDAR-abhängige LTP ist sowohl die Aktivierung der Präsynapse, mithin der Neurotransmitterausstoß, als auch die Depolarisation der Postsynapse entscheidend. Die NMDAR-unabhängige LTP entsteht an den hippocampalen Moosfasern. Diese Fasern projizieren von den Granularzellen des Gyrus dentatus zur CA3-Region (Nicoll und Malenka, 1995). Versuche mit NMDAR-Antagonisten haben gezeigt, dass die Entstehung dieser LTP unabhängig von der NMDAR-Aktivierung stattfindet (Harris und Cotman, 1986; Katsuki et al., 1991). Entscheidend für die Entstehung der Moosfaser-LTP ist nicht der postsynaptische, sondern der präsynaptische  $Ca^{2+}$ -Einstrom, der schließlich zu einer verstärkten Transmitterausschüttung führt (Castillo et al., 1994; Mellor und Nicoll, 2001).

#### *Langzeit-Depression (LTD)*

Die NMDAR-abhängige Langzeit-Depression kann in akuten Gehirnschnitten durch Niedrigfrequenz-Impulse im Bereich von 0,5-3 Hz eingeleitet werden (Lüscher und Malenka, 2012). Im Bereich der Schaffer-Kommissural-CA1-pyramidalen Synapsen ist die Aktivität der NMDAR essentiell für die Induktion einer LTD wie Experimente mit NMDAR-Antagonisten zeigten (Dudek und Bear, 1992). Anders als bei der LTP leitet das intrazelluläre Calcium hier keine Kinase-abhängige, sondern eine Phosphatase-abhängige Signalkaskade ein (Mulkey et al., 1993; Mulkey et al., 1994). Diese Kaskade führt zur Dephosphorylierung und Endozytose von AMPAR (Carroll et al., 2001). Hierdurch wird die Sensitivität der Synapse gegenüber Glutamat verringert und die synaptische Effizienz wird geschwächt. Neben der NMDAR-abhängigen LTD konnte



man an den Schaffer-Kommissural-CA1-pyramidalen Synapsen ein LTD nachweisen, dass abhängig von metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR) ist. Die spezifische Inhibition von mGluR durch Antagonisten zeigte eine Verhinderung dieser Form der LTD (Bashir et al., 1993). Eine weitere NMDAR-unabhängige Form der LTD entsteht an den Synapsen zwischen den Moosfasern und den Neuronen der CA3-Region (Dominici et al., 1998).

*NMDAR-Insuffizienz: Auswirkungen auf synaptische Plastizität und Kognition*

Langzeit-Veränderungen der synaptischen Effizienz sind in die Prozesse des Lernens und der Erinnerung involviert (Lynch, 2004; Whitlock et al., 2006; Neves et al., 2008; Takeuchi et al., 2013). Die Aktivität der exzitatorischen NMDARs scheint aufgrund ihrer Rolle bei der LTP und LTD essentiell für verschiedenen Formen des Lernens und Erinnerens zu sein (Lüscher und Malenka, 2012). Bei alternden Ratten konnte der kognitive Verfall mit der Reduktion der NMDAR-abhängigen LTP assoziiert werden (Boric et al., 2008). Mehrere Untersuchungen zur Alterung bei Ratten und Affen belegen einen altersbedingten Verlust der verschiedenen NMDAR-Untereinheiten (Sheng et al., 1994; Gazzaley et al., 1996; Liu et al., 2008). KO-Experimente in Nagern (Tabelle 1) zeigten, dass vor allem der hippocampale Verlust der NR1-Untereinheit beziehungsweise deren Glutamatbindestelle zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernens und einer Verringerung der LTP führte (Tsien et al., 1996; Kew et al., 2000). Ein zeitabhängiges Ausschalten der NR1-Expression in der CA1-Region hat verdeutlicht, dass die NR1-Isoform auch in die Speicherung von Langzeit-Erinnerungen involviert ist (Shimizu et al., 2000). KO-Experimente der hippocampal exprimierten NR2 Varianten zeigten, dass NR2A und NR2B ebenfalls eine Rolle bei der NMDAR-abhängigen LTP und LTD spielen. Der jeweilige KO der Varianten führte zu einer Reduktion der NMDAR-vermittelten synaptischen Aktivität in Neuronen innerhalb der CA1-Region (Sakimura et al., 1995; Kutsuwada et al., 1996). Auch die pharmakologische Inhibition des NMDAR durch verschiedene Antagonisten legte nahe, dass NMDA-Rezeptoren eine essentielle Rolle bei verschiedenen Formen des Lernens und des Erinnerungsvermögens spielen (Tabelle 1). Für NMDARs existieren diverse spezifische antagonistische Liganden. Ein kompetitiver Inhibitor der NR2-Untereinheit ist beispielsweise (R)-2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure (AP5), welches mit Glutamat um dessen Bindestelle am Rezeptor konkurriert. Nicht kompetitive Antagonisten sind Phencyclidin (PCP), Ketamin und Dizocilpin (MK-801) (Watkins, 2000). Der Antagonist

**Tabelle 1 Auswirkungen experimenteller NMDA-Rezeptor-Manipulation.**

<b>Manipulation</b>	<b>Spezies</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>Quelle</b>
NMDAR Inhibition mit AP5	Ratte	Verhinderung der LTP-Induktion	Collingridge et al., 1983
	Ratte	Dosis-abhängige Defizite der LTP und im räumlichen Lernen	Butcher et al., 1990
	Ratte	Verhinderung der LTP-Induktion; Defizite im räumlichen Lernen	Morris et al., 1986
	Ratte	Defizite im räumlichen Lernen; keine Defizite in der Retention von gespeicherter räumlicher Information	Morris et al., 1989
	Ratte	Beeinträchtigung des zeitlichen Erinnerungsvermögens bei nicht-räumlichen Lernaufgaben	Tonkiss et al., 1988
NMDAR Inhibition mit PCP	Ratte	Defizite bei der Retention von Langzeit-Erinnerungen	Handelmann et al., 1987
NMDAR Inhibition mit MK-801	Ratte	Defizite beim Lernen; keine Defizite bei Retentionsaufgaben	McLamb et al., 1990
	Ratte	Beeinträchtigte Retention (niedrige Dosis); Beeinträchtigung bei der Aufgabenausführung (berauschende Dosis)	Wozniak et al., 1989
NMDAR Inhibition mit MK-801 und AP7	Maus	Defizite beim Lernen; keine Defizite beim Abrufen von Erlerntem	Mondadori et al., 1989
NR1 KO in der CA1 Region	Maus	Beeinträchtigung des zeitlichen Erinnerungsvermögens	Huerta et al., 2000
	Maus	Defizite der LTP und im räumlichen Lernen	Tsien et al., 1996
Mutation der Glycin-Bindestelle in NR1	Maus	Defizite der LTP und im räumlichen Lernen, Veränderungen im Angstverhalten	Kew et al., 2000
NR2A KO	Maus	Reduktion der LTP; mäßige Beeinträchtigung des räumlichen Lernens	Sakimura et al., 1995
NR2B KO	Maus	Minderung der LTD	Kutsuwada et al., 1996
NR2B Überexpression im Vorderhirn	Maus	Verstärkte LTP; Verbesserung in assoziiertem Lernen und Erinnern	Tang et al., 1999

PCP wurde in den 1950ern und 1960ern als Anästhetikum eingesetzt. Der akute Effekt dieser Substanz führte bei vielen Patienten zu psychotischen Nebeneffekten wie Aufmerksamkeitsstörungen, verlangsamter Reaktionszeit, Halluzinationen, Verwirrtheit und verschlechterter kognitiver Funktion (Davies und Beech, 1960; Bakker und Amini, 1961). PCP wurde später aufgrund der starken Nebenwirkungen durch das weniger potente Ketamin ersetzt (Newcomer et al., 2000). Beide Substanzen gelten auch als sogenannte Rauschdrogen. Auch für Ketamin sind Auswirkungen wie retrograde Amnesie und eine Verschlechterung des Langzeitlernens und Erinnerungsvermögens beschrieben (Pandit et al., 1971; Krystal et al., 1994; Harborne et al. 1996).

Die Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität wird mit diversen Symptomen verschiedener Krankheitsbildern assoziiert. Hierzu gehören beispielsweise Demenz, Depression, Suchtkrankheiten, Angststörungen, Nervenschmerzen und Bewegungsstörungen. Die Alzheimersche Krankheit gehört auch zu diesen Krankheiten und wird vor allem mit dem Verlust der synaptischen Plastizität in Verbindung gebracht (Lüscher und Malenka, 2012). In der Forschung wird stark diskutiert, ob eine NMDAR-vermittelte Exzitotoxizität oder NMDAR-Hypofunktion eine Rolle bei Morbus Alzheimer spielen könnte (Lee et al., 2002). Untersuchungen haben reduzierte Proteinlevel und mRNA-Level der NMDAR-Untereinheiten bei Alzheimerpatienten belegt (Hynd et al., 2001; Sze et al., 2001; Mishizen-Eberz et al., 2004). John Olney beschrieb in der Literatur seine NMDAR-Hypofunktions-Hypothese, die eine Insuffizienz von NMDAR und damit verbundene Downstream-Effekte als mögliche mechanistische Ursache für verschiedene Psychosen (wie Schizophrenie) oder kognitive Beeinträchtigungen (wie bei Morbus Alzheimer) in Betracht zieht (Olney und Farber, 1995; Olney et al, 1998; Newcomer et al., 2000). Die Hypothese begründet sich unter anderem auf Ergebnissen, dass die Behandlung mit NMDAR-Antagonisten und die dadurch resultierende NMDAR-Hypofunktion eine neuronale Schädigung in Form von Läsionen und neuronalen Zelltod erzeugen kann, besonders während der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Olney et al., 1989; Corso et al., 1997; Horváth et al., 1997; Wozniak et al., 1998). Eine mögliche Erklärung für die einsetzende Neurodegeneration liefert die Glutamat-gesteuerte Regulation der inhibitorischen Transmission (Newcomer et al., 2000). Studien zum Verschaltungskreislauf von Neuronen haben gezeigt, dass Glutamat die NMDARs an GABAergen Interneuronen stimuliert, was in einer Inhibition der exzitatorischen Transmission an pyramidalen

Neuronen resultierte (Giovannini et al., 1994; Kim et al., 1999). Ist diese Regulation aufgrund der NMDA-Hypofunktion nicht gegeben, sinkt die Aktivität der GABAergen Neurone und das System verliert seine inhibitorische Kontrolle der exzitatorischen Transmission im Cortex (Farber et al., 2002; Homayoun und Moghaddam, 2007). Diese Disinhibition zieht eine exzessive Freisetzung der exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat (Moghaddam et al., 1997; Adams und Moghaddam, 1998; Farber et al., 2002) und Acetylcholin im Cortex mit sich (Giovannini et al., 1994; Kim et al., 1999), die zu einer NMDAR-unabhängigen Überstimulation von exzitatorischen Neuronen führt (Farber et al., 2002; Homayoun und Moghaddam, 2007).

### 1.3 Fragestellung

Trotz intensiver jahrelanger Forschung und hunderter klinischer Studien ist man bis heute daran gescheitert, die Ursache des Morbus Alzheimer zu verstehen (Godyń et al., 2016). Das Nichtwissen über ihren Ursprung erschwert die Früherkennung der Krankheit. Die histopathologischen Merkmale, die für die Definition der Alzheimerschen Demenz entscheidend sind, sind erst post mortem zu erkennen, was eine eindeutige Diagnose der Alzheimerschen Krankheit zu Lebzeiten des Patienten stark erschwert. Bildgebende Verfahren wie PET oder CSF-Untersuchungen auf Marker (zum Beispiel Tau) sind hier zwar möglich, erlauben aber keine eindeutige Diagnose. Die falsche Definition der Demenzart kann ein Grund für das Scheitern vieler klinischer Studien mit potentiellen Medikamenten gegen Morbus Alzheimer gewesen sein (Dubois et al., 2007). Die mikroskopischen pathologischen Merkmale bei Morbus Alzheimer wurden in der Vergangenheit oft als direkte Auslöser der Krankheit definiert. Es stellt sich jedoch die Frage, wieso es überhaupt zur Anhäufung dieser pathologischen Merkmale kommt. Bei familiären Formen scheinen es genetische Gründe zu sein, wohingegen es bei sporadischen Formen der Alzheimerschen Demenz keine eindeutigen Erklärungen gibt. Betrachtet man viele andere Erkrankungen, erklären sich mikroskopisch sichtbare Merkmale häufig als physiologische Antwort auf einen bestimmten pathologischen Auslöser. Bei der Serum-Amyloid-A-Amyloidose kommt es beispielsweise aufgrund einer chronischen Entzündung oder chronischen Infektion (z.B. Tuberkulose) zur Entstehung mikroskopisch sichtbarer Amyloid A-Fibrillen. Als unspezifische Immunreaktion auf die Infektion wird das Akute-Phase-Protein Amyloid A übermäßig exprimiert, welches dann aggregiert (Westermarck et al., 2014). Die Bildung des Amyloid A ist aber nicht der Auslöser der Erkrankung, sondern eine physiologische Kompensationsreaktion als Antwort auf einen pathologischen Auslöser, die Infektion. Mit Hinblick auf diese kompensatorischen Mechanismen ergibt sich die Überlegung, ob die Amyloid  $\beta$ -Bildung und die Phosphorylierung von Tau bei Morbus Alzheimer möglicherweise auch eine physiologische Kompensation eines bisher noch unbekanntes Auslösers sein könnten. Ein dauerhaftes Anhalten des Auslösers könnte zu einer übermäßigen physiologischen Kompensation führen, die schließlich pathologisch wird.

Basierend auf in der Literatur beschriebenen Ergebnissen ergab sich für die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass eine Inhibition der exzitatorischen

Neurotransmission durch eine Insuffizienz der NMDA-Rezeptoren ein möglicher pathologischer Auslöser bei Morbus Alzheimer sein könnte.

Es ist beschrieben, dass supraphysiologische Konzentrationen von Amyloid  $\beta$  ( $\mu\text{M}$  -  $\text{mM}$ ) durch Supplementation *in vitro* oder Überexpression *in vivo* zu einer Steigerung der Exzitotoxizität geführt haben (Harkany et al., 2000; Mattson et al., 1992; Danysz und Parsons, 2012). Zieht man in Betracht, dass diese supraphysiologischen Konzentrationen die physiologische Funktion in einem stark übersteigerten Maße widerspiegeln könnten, könnte das bedeuten, dass A $\beta$  in physiologischen Konzentrationen ( $\text{pM}$  -  $\text{nM}$ ) zur Stabilisierung oder Intensivierung der exzitatorischen Neurotransmission beiträgt. Tatsächlich konnten drei unabhängige Arbeitsgruppen zeigen, dass physiologische Konzentrationen von A $\beta$  zu einer gesteigerten NMDA-Rezeptor-abhängigen LTP führten und auch Lernprozesse und das Erinnerungsvermögen verbesserten (Puzzo et al., 2008; Garcia-Osta und Alberini, 2009; Morley et al., 2010).

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau stabilisiert wiederum die Mikrotubuli und reguliert den axonalen Transport in Neuronen (Wang und Mandelkow, 2016). Es gibt Ergebnisse, die die Annahme unterstützen, dass die posttranslationale Phosphorylierung von Tau zu einer Umverteilung vom Axon in die somatodendritischen Bereiche führt (Papasozomenos und Binder 1987; Tashiro et al., 1997; Zempel und Mandelkow, 2012). Die postsynaptische Interaktion zwischen Tau und der Src-Kinase Fyn führt in somatodendritischen Arealen zur Phosphorylierung der NMDAR-Untereinheit NR2B, was die NMDAR-PSD-95-Komplexbildung fördert und physiologisch Lernvorgänge unterstützen könnte (Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Eine übermäßige Akkumulation von Tau in den Dendriten könnte schließlich zu Exzitotoxizität führen. Eine Reduktion von Tau hat in verschiedenen *in vivo* Krankheits-Modellen auch die Unterdrückung von Krampfanfällen und Übererregbarkeit bewirkt (Roberson et al., 2007; Holth et al., 2013). Diese Literaturergebnisse deuten an, dass beide Proteine der Alzheimer-Pathologie physiologisch an der Steigerung der exzitatorischen Neurotransmission beteiligt sind. Eine Insuffizienz des glutamatergen Systems könnte demnach eine Induktion sowohl der A $\beta$ -Produktion als auch der Tau-Phosphorylierung als kompensatorische Antworten zur Folge haben.

Um diese Hypothese zu prüfen, untersuchte ich den Effekt einer pharmakologischen Inhibition von NMDARs auf besagte Proteine. Alle Versuche wurden unter normalen

physiologischen und nicht transgenen Bedingungen durchgeführt, um dem bislang völlig ungelösten Problem der sporadischen Alzheimer-Erkrankung nahezukommen. Zunächst wurden hierzu *in vitro* Experimente mit primären kortikalen Zellen durchgeführt. Diese Zellen zeigten nach Inkubation mit dem NMDAR-Inhibitor AP5 signifikante Induktionen von Phospho-Tau, A $\beta$  und APP. Anschließende *in vivo* Experimente mit dem Blut-Hirn-Schranken-gängigen NMDAR-Inhibitor MK-801 in Wildtyp-Mäusen konnten diese Ergebnisse validieren. Die Mäuse wurden mit unterschiedlichen Dosen des NMDAR-Antagonisten behandelt, und die Behandlungsdauer wurde ebenfalls zwischen wenigen Stunden und mehreren Wochen variiert, um zu sehen, wie sich die Effekte unter wiederholter Inhibition der NMDAR-Funktion verhalten. Der Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Mäusen brachte zusätzlich Aufklärung über die unterschiedliche geschlechtsspezifische Habituation auf NMDAR-Insuffizienz. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten im Zuge der Interpretation mit verschiedenen bekannten Alzheimer-Risikofaktoren in Verbindung gebracht werden.

## 2 Material

### 2.1 Spezielle Chemikalien

Tabelle 2 Liste der speziellen Chemikalien

Chemikalie	Unternehmen	Lösungsmittel
2-Amino-5-phosphonovaleriansäure (D-AP5)	Biotrend; Cayman Chemicals	Milli-Q-Wasser
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich	Methanol
Mononatriumglutamat	Sigma-Aldrich	Milli-Q-Wasser
Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium-bromid (MTT)	Sigma-Aldrich	ddH <sub>2</sub> O
(+)-MK-801(Dizocilpin)	Sigma-Aldrich	Milli-Q-Wasser
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Biotrend; Sigma-Aldrich;	Milli-Q-Wasser

### 2.2 Antikörper

Tabelle 3 Liste der primären und sekundären Antikörper

Antigen	Wirt / Klasse	Verdünnung	Konjugat	Unternehmen	Artikel- Nummer	Lot-Nummer
<b>Primäre Antikörper:</b>						
Aktin	Kaninchen / monoklonal	1:1000 (WB)	-	Abcam	ab200658	GR211881-2
ADAM10	Kaninchen / polyklonal	1:500 (WB)	-	Merck Millipore	AB19026	0702052630; 2776884
APP	Kaninchen / polyklonal	1:500 (WB)	-	Abcam	ab2072	GR25367-12; GR25367-13
AT8	Maus / monoklonal	1:200 (WB)	-	Thermo fisher	MN1020	QE217252; MB154113
BACE1	Kaninchen / polyklonal	1:1000 (WB)	-	Sigma-Aldrich	B0681	076K4780
MAP-2	Maus / monoklonal	1:500 (IF)	-	Sigma-Aldrich	M4403	035M4780V
PS-1	Kaninchen / polyklonal	1:500 (WB)	-	Cell Signaling	3622s	2
S404	Kaninchen / monoklonal	1:1000 (WB)	-	Abcam	ab92676	GR45351-13
S396	Kaninchen / monoklonal	1:5000 (WB)	-	Abcam	ab109390	GR189096-9



Tau-1	Maus / monoklonal	1:500 (WB)	-	Merck Millipore	MAB3420	254903; 2683924
Tubulin	Ratte / monoklonal	1:250 (WB)	-	Serotec	MCA77P	n.b.
Tubulin	Maus / monoklonal	1:1000 (WB)	-	Sigma-Aldrich	T9026	n.b.
Tubulin	Maus / monoklonal	1:3000- 10.000 (WB)	HRP	Abcam	ab40742	GR174230-1; GR314710-1

**Sekundäre Antikörper:**

Maus IgG (H+L)	Esel / polyklonal	1:10.000 (WB)	HRP	Jackson Immuno Research	715-035- 150	116722 114611
Kaninchen IgG (H+L)	Esel / polyklonal	1:10.000 (WB)	HRP	Jackson Immuno Research	711-035- 152	134411 117118 114793
Maus IgG (H+L)	Esel / polyklonal	1:200 (IF)	Cy3	Jackson Immuno Research	715-165- 151	n.b.

HRP: Meerrettich-Peroxidase; WB: Westernblot; IF: Immunfluoreszenz; n.b: nicht bekannt; Cy3: Indocarbocyanin

## 2.3 Weitere Verbrauchsmaterialien und Kits

**Tabelle 4 Liste von Verbrauchsmaterialien und Kits**

Material/Kit	Unternehmen	Artikel-Nummer	Lot-Nummer
BCA Protein Assay Kit	Thermo scientific	23225	n.b.
Detergent Removal Spin Columns, 0,5 ml	Thermo scientific	87777	SA240956
Human/Rat $\beta$ Amyloid (40) ELISA Kit	Wako Chemicals	294-62501	WDP2982 WDL6357
Human/Rat $\beta$ Amyloid (42) ELISA Kit	Wako Chemicals	292-64501	WDQ1686 WDK0714
Novex™ 10-20% Tricin- Protein-Gel, 1,0 mm, 15-well	Thermo fisher (Invitrogen)	EC66255BOX	n.b.
Novex™ Sharp Pre-Stained Protein Standard	Thermo fisher (Invitrogen)	LC57800	n.b.
Novex™ Tricin SDS Proben Puffer 2x	Thermo fisher (Invitrogen)	LC1676	n.b.
Novex™ Tricin SDS Laufpuffer 10x	Thermo fisher (Invitrogen)	LC1675	n.b.
Novex™ Tris-Glycin Transferpuffer 25x	Thermo fisher (Invitrogen)	LC3675	
peqGold Protein-Marker IV	Peqlab; VWR	27-2110	n.b.

Protan Nitrocellulose-Membran 0,2 µm	Amersham	10600001	n.b.
TPP-Zellkulturmaterial	Faust Lab Science	60 cm <sup>2</sup> Schalen: TPP93100 6 Well Platten: TPP92006 96 Well Platten: TPP92096	n.b. n.b. n.b.
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich	P8340	n.b.
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche	4906845001	n.b.

n.b.: *nicht bekannt*

## 2.4 Embryonale Zellen

Zur Generierung der primären Zellkultur wurden schwangere Sprague-Dawley-Ratten von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Die Embryonen wurden jeweils am 17. Embryonaltag entnommen und zur Zellentnahme präpariert.

## 2.5 Mäuse

Für alle *in vivo* Studien wurden sowohl weibliche als auch männliche C57BL/6J-Mäuse von Janvier Labs eingesetzt. Die Mäuse waren zum Start der Studien zwischen 10 und 12 Wochen alt. Alle Experimente und die Entnahme der Maus-Gehirne wurden von QPS Austria, vorklinische Neuropharmakologie-Gruppe, (Grambach, Österreich), durchgeführt. QPS Austria (Teil von QPS Holdings) ist ein Auftragsforschungsinstitut (CRO), das sowohl vorklinische als auch klinische Leistungen anbietet (URL: <http://qpsneuro.com/home/about-qps-neuropharmacology>). Die Gewebe wurden in vollständigem Zustand bei -80°C Schock-gekühlt per Kurier von Österreich (Grambach) nach Deutschland an das Institut für Pathobiochemie im biomedizinischen Forschungszentrum der Universitätsmedizin in Mainz geliefert.

## 2.6 Tierethik

Die QPS Austria-Tiereinrichtung ist von der „Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care“ (AAALAC) akkreditiert. Die Vorgehensweisen aller Maus-Studien entsprach den Vorgaben des lokalen „Animal Care and Welfare Committee“ (AWC). Die Tiere wurden entsprechend der Tierschutz-Vorschriften des Wissenschaftsministeriums des Landes Österreich betreut.

In Bezug auf die Präparation neuronaler Zellen aus Sprague-Dawley-Ratten wurden alle Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes und die Richtlinien der „Central Animal Facility“ der Universität Mainz beachtet.

## 2.7 Puffer und Lösungen

### 2.7.1 Lösungen und Medien für die primäre Zellkultur

#### *Kulturmedium*

Neurobasal-Medium (#21103049, Gibco)

1x B27-Supplement (#17504044, Gibco)

2 mM L-Glutamin (#25030081, Gibco)

25 µg/ml Gentamicin (#15750037, Gibco)

Substanzen, die zum Ansetzen der Ringer-Salz-Lösung verwendet wurden, wurden von den Vertreibern Carl Roth und Sigma-Aldrich bezogen:

#### *Ringer-Salz-Lösung (2,5 mM K<sup>+</sup>)*

125 mM NaCl

2,5 mM KCl

1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

25 mM D(+)-Glucose

25 mM NaHCO<sub>3</sub>

angesetzt in Milli-Q Wasser.

2 mM CaCl<sub>2</sub> (Calcium wurde erst in der Zellkulturschale hinzugefügt).

#### *Ringer-Salz-Lösung (27,5 mM K<sup>+</sup>)*

125 mM NaCl

2,5 mM KCl

1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

25 mM D(+)-Glucose

25 mM NaHCO<sub>3</sub>

angesetzt in Milli-Q Wasser.

2 mM CaCl<sub>2</sub> (Calcium wurde erst in der Zellkulturschale hinzugefügt).

Die Zellen wurden in der Zellkulturschale zusätzlich mit 25 mM KCl versetzt.

Die Ringer-Salz-Lösung, CaCl<sub>2</sub> und KCl wurden sterilfiltriert (0,22 µm) und vor der Verwendung mindestens 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub> in Zellkulturschalen inkubiert, um einen pH-Wert von 7,4 einzustellen.

#### *Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (#14170138, Gibco)*

Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-frei

#### *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (#D8537, Sigma-Aldrich)*

Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-frei

*Trypsin-Lösung*

0,1% Trypsin  
0,2% (w/v) Ethylendiamintetraacetat (EDTA)  
in sterilem PBS angesetzt.

*Fötale Rinder-Serum (FCS)*

Das FCS wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert.

*Beschichtungs-Lösung*

0,1 mg/ml Poly-L-Ornithin (#P3655, Sigma-Aldrich)  
in sterilem PBS angesetzt.

*0,4% Trypanblau-Lösung (#93595, Sigma Aldrich)*

zur Anwendung bei Zellzahlbestimmungen 1:10 mit sterilem PBS verdünnt.

## **2.7.2 Lösungen und Puffer für die Gewebepräparation**

*Präparations-Ringer-Lösung*

125 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
25 mM D(+)-Glucose  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
25 mM HEPES  
pH 7,4 eingestellt mit NaOH

Jedes Mal vor der Benutzung wurden frisch dazugegeben:

2 mM Imidazol  
1 mM NaF  
1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

## **2.7.3 Lösungen und Puffer für die Proteinanalytik**

***Lysieren:***

*1x Lysispuffer (nicht denaturierend)*

100 mM Tris/Tris-HCl  
+ Protease-Inhibitor-Cocktail (#P8340, Sigma-Aldrich)  
+ Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (#4906845001, Roche)  
pH 7,4

*1x Lysispuffer (denaturierend)*

100 mM Tris/Tris-HCl  
0,5% (w/v) SDS  
20% Saccharose  
+ Protease-Inhibitor-Cocktail (#P8340, Sigma-Aldrich)  
+ Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (#4906845001, Roche)  
pH 7,4

*Lysispuffer für die 1:3 Verdünnung (denaturierend)*

100 mM Tris/Tris-HCl  
0,75% (w/v) SDS  
30% Saccharose  
+ Protease-Inhibitor-Cocktail (#P8340, Sigma-Aldrich)  
+ Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (#4906845001, Roche)  
pH 7,4

*Lysispuffer für die 1:8 Verdünnung (denaturierend)*

100 mM Tris/Tris-HCl  
0,55% (w/v) SDS  
23% Saccharose  
+ Protease-Inhibitor-Cocktail (#P8340, Sigma-Aldrich)  
+ Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (#4906845001, Roche)  
pH 7,4

*Lysispuffer für die 1:2 Verdünnung (denaturierend)*

100 mM Tris/Tris-HCl  
1 % (w/v) SDS  
40% Saccharose  
+ Protease-Inhibitor-Cocktail (#P8340, Sigma-Aldrich)  
+ Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (#4906845001, Roche)  
pH 7,4

**Gelelektrophorese:**

*10% Laufgel für die SDS-PAGE*

Für ein 1,5 mm Gel:  
2,25 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 29:1  
3,42 ml (4x) Tris-Puffer; pH 8,8  
45 µl 20% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in ddH<sub>2</sub>O  
3,29 ml ddH<sub>2</sub>O  
90 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat (APS) in ddH<sub>2</sub>O  
5,63 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

*4% Sammelgel für die SDS-PAGE*

Für ein 1,5 mm Gel:

0,375 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 29:1

0,469 ml (4x) Tris-Puffer; pH 6,8

18,75 µl 20% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in ddH<sub>2</sub>O

2,85 ml ddH<sub>2</sub>O

37,5 µl 10% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat (APS) in ddH<sub>2</sub>O

3 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)

*4x Trispuffer*

1,5 mM Tris-HCl; pH 8,8

0,6 mM Tris-HCl; pH 6,8

*4x denaturierender Ladepuffer*

200 mM Tris-HCl

20 mM EDTA

8% (w/v) SDS

40% (v/v) Glycerol

0,02% (w/v) Bromphenolblau

20% (v/v) β-Mercaptoethanol

pH 6,8

*10x Laufpuffer*

2,5 M Glycin

250 mM Tris-Base

1% (w/v) SDS

pH 8,3

**Westernblot:**

*10x Transferpuffer*

2,5 M Glycin

250 mM Tris-Base

pH 8,3

*1x Transferpuffer mit Methanol*

1:10 Verdünnung des 10x Ansatzes

+ 20% (v/v) Methanol

*1x Ponceau-S Lösung*

0,2% (w/v) Ponceau S

5% (v/v) Essigsäure

*10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)*

250 mM Tris/Tris-HCl  
1,37 M NaCl  
27 mM KCl  
pH 7,4

*1x TBS mit Tween 20 (TBS-T)*

1:10 Verdünnung des 10x Ansatzes  
+ 0,05% (v/v) Tween-20

*Blockierungspuffer (Westernblot)*

2% (w/v) Magermilchpulver  
1x TBS-T

**MTT-Test:**

*MTT-Lösung*

5 mg/ml MTT  
in ddH<sub>2</sub>O

*Solubilisierungslösung*

40% (v/v) Dimethylformamid  
10% (w/v) SDS  
pH 4,0 (Essigsäure)

**Immunfluoreszenz-Färbung:**

*10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)*

1,37 M NaCl  
27 mM KCl  
100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O  
18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4 (NaOH)

*1x PBS mit Tween 20 (PBS-T)*

1:10 Verdünnung des 10x Ansatzes  
+ 0,05% (v/v) Tween-2

*Blockierungspuffer (Immunfluoreszenz)*

3% hitzeinaktiviertes FCS  
1x PBS-T

*DAPI-Stocklösung*

50 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol  
in Methanol

## 3 Methoden

### 3.1 *In vitro* AP5-Behandlung primärer kortikaler Zellen

Alle verwendeten Medien und Puffer für die primäre Zellkultur sind in Abschnitt 2.7.1 aufgelistet. Für die Präparation des Zellmaterials wurden schwangere Sprague-Dawley-Ratten von Janvier Labs verwendet. Zur Entnahme der Embryonen am Embryonaltag 17 wurde die Mutterratte zunächst über die Inhalation von Isofluran narkotisiert und anschließend mit einer Guillotine dekapitiert. Die zügig entnommenen Embryonen wurden ebenfalls dekapitiert und für wenige Minuten bei 4°C in Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> freiem PBS gelagert. Das kortikale Gewebe der Embryonen wurde unter sterilen Bedingungen präpariert und in ebenfalls Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup> freiem HBSS bei 4°C gesammelt. Sezierte Gewebestücke wurden anschließend in einer 0,1% Trypsin-, 0,2% EDTA-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Zur Inhibition des Lysierungsprozesses durch Trypsin wurde das Gewebe in eine 10% FCS Lösung (in Mg<sup>2+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-freiem HBSS) überführt und vorsichtig dissoziiert. Zur Filtration grober Gewebestücke wurde ein zuvor in 100% Ethanol eingelegtes Nybolt-Netz mit 50 µm Porengröße verwendet. Anschließend wurden die neuronalen Zellen bei 1200 g für 4 min zentrifugiert. Das FCS-haltige Medium wurde abgenommen und die Zellen in frischem Neurobasal-Medium (angereichert mit 1x B27-Supplement, 25 µg/ml Gentamicin und 2 mM L-Glutamin) suspendiert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 80.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in TPP-Zellkulturplatten ausgesät. Zur besseren Anheftung der Zellen wurden alle Platten zuvor für 30 min mit einer 0,1 mg/ml Poly-L-Ornithin-Lösung (in PBS) beschichtet und dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 3.1.1 Zellzahlbestimmung

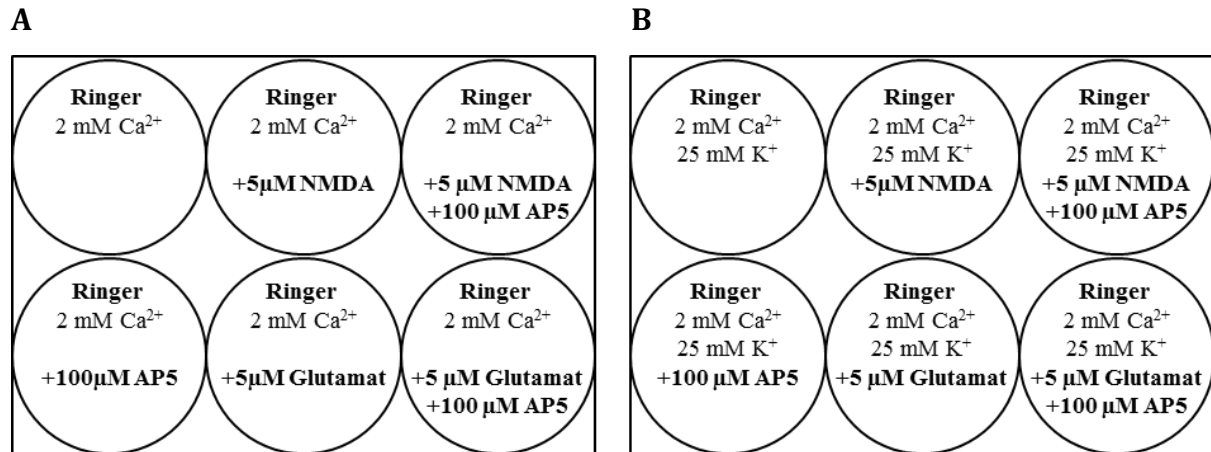
Zur Bestimmung von Zellzahlen wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Hierzu wurde die Zellsuspension 1:1 mit der 1:10 verdünnten Trypanblau-Lösung (in PBS) vermischt und in die Zählkammer gegeben. Da Trypanblau ein Membran-impermeabler Farbstoff ist, konnte man unter dem Mikroskop lebende Zellen gut von toten, bläulichen und nicht lichtbrechenden Zellen unterscheiden. Es wurden die lebenden Zellen in allen vier Quadranten der Kammer gezählt, um den Durchschnitt für einen Quadranten zu



errechnen. Dieser Wert multipliziert mit  $2 \cdot 10^4$  ergab die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

### 3.1.2 Zellexperimente

Die Zellexperimente wurden nach 14 oder 17 Tagen *in vitro* (days in vitro, DIV) gestartet (Tabelle 5). Während aller Experimente wurden die neuronalen Kulturen weiterhin in einem Zellkultur-Inkubator bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Versuche wurde das Neurobasal-Medium vorsichtig abgenommen und durch unter gleichen Bedingungen vorinkubierte (24 h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) und sterilfiltrierte (0,22 µm) Ringer-Salz-Lösung (2,5 mM K<sup>+</sup>) ersetzt (3 ml/Well). Anschließend wurden der Ringer-Salz-Lösung 2 mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt (100x Stockkonzentration). Calcium wurde erst nach der CO<sub>2</sub>-Inkubation der Ringer-Salz-Lösung hinzugegeben, da die vorherige Supplementation zu einem Niederschlag führte. Die Experimente wurden unter zwei unterschiedlichen Versuchsbedingungen durchgeführt (Tabelle 5). Einige Versuche wurden mit einer üblichen K<sup>+</sup>-Konzentration von 2,5 mM durchgeführt wie sie auch für die Herstellung künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit eingesetzt wird (Dine et al., 2014). Zusätzlich wurden dieselben Behandlungen unter einer erhöhten Kalium-Konzentration von 27,5 mM durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zum Start der jeweiligen Behandlung (Abbildung 12) mit 25 mM KCl (100x Stockkonzentration) supplementiert. Die höhere Kalium-Konzentration sollte die Häufigkeit der spontanen Selbstentladung der Neurone in der Zellkultur begünstigen (Heck et al., 2008). Für Westernblot-Analysen wurden die Zellen in 6-Well-Platten behandelt (Abbildung 12). Eine 6-Well-Platte repräsentiert dabei ein biologisches Replikat (n). Pro Replikat wurden innerhalb einer K<sup>+</sup>-Bedingung die Embryonen einer Ratte eingesetzt, wobei aus einer Ratte jeweils ein 2,5 mM und ein 27,5 mM K<sup>+</sup>-Experiment resultierte. Jede 6-Well-Platte (n) enthielt ein Kontroll-Well, in dem die Zellen nur mit Ringer-Salz-Lösung, Ca<sup>2+</sup> und der entsprechenden K<sup>+</sup>-Konzentration inkubiert wurden. Auf dem Hintergrund dieser Bedingungen wurde pro Replikat jeweils ein Well mit 5 µM N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) beziehungsweise L-Glutamat behandelt (100x Stockkonzentration) (Traynelis et al., 2014). Zusätzlich wurde jeweils ein Well mit 5 µM dieser Agonisten und 100 µM des kompetitiven Antagonisten AP5 (1000x Stockkonzentration) behandelt. Ein Well pro Platte mit 100 µM AP5 ohne Agonisten behandelt. Alle zugegebenen Substanzen wurden in Milli-Q Wasser gelöst. Die zugegebenen Salze-Lösungen (KCl, CaCl<sub>2</sub>) wurden zusätzlich zuvor sterilfiltriert (0,22 µm).



**Abbildung 12** Behandlungsschema der 6-Well-Zellkulturschalen für Westernblot-Analysen.

Das Behandlungsschema ist für niedrige K<sup>+</sup>-Konzentration (2,5 mM) **(A)** und hohe K<sup>+</sup>-Konzentration (27,5 mM) **(B)** gezeigt. Finale Konzentrationen von AP5, NMDA, L-Glutamat und Calcium (Ca<sup>2+</sup>) sind ebenfalls angegeben. Das Zellmaterial dieser Proben wurde für Westernblot-Analysen verwendet. Für jede K<sup>+</sup>-Konzentration wurden drei biologische Replikate (n = 3) mit je einer Ratte durchgeführt. Die Zellen wurden 4 h und 24 h mit den Substanzen inkubiert und anschließend analysiert.

Die Experimente wurden jeweils zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Hierzu wurden die Zellen 4 beziehungsweise 24 Stunden nach der Behandlung geerntet. Dabei wurde zunächst die Ringer-Salz-Lösung abgenommen und die Zellen pro Well mit 100 μl denaturierendem Lysispuffer (supplementiert mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor) überschichtet. Bei einigen Experimenten wurde jeweils 1 ml der Ringer-Salz-Lösung von jedem Well gesammelt, ebenfalls mit Inhibitoren versetzt und für weitere Analysen bei -25°C gelagert. Mit Hilfe eines Zellkulturspatels wurden die Zellen durch Schaben vom Plattenboden abgelöst und in ein Probengefäß überführt. Die Proben wurden im Anschluss unter Verwendung eines Ultraschall-Sonifikators jeweils ~5 Sekunden homogenisiert und für weitere biochemische Analysen ebenfalls bei -25°C gelagert.

Tabelle 5 Zusammenfassung der Versuchsdurchführungen in primärer kortikaler Zellkultur

K <sup>+</sup> -Konzentration	DIV	Behandlungszeitraum	Replikate (n)
2,5 mM	14/17	4 h	3
	14/17	24 h	2
27,5 mM	14/17	4 h	3
	14/17	24 h	2

DIV: *days in vitro*, Tage der Kultivierung vor dem Start der Behandlung; /: oder

### 3.1.3 Viabilitäts-Bestimmung

Für die zellbiologische Analyse wurden die primären Zellen 17 Tage in Poly-Ornithin-beschichteten 96-Well-Platten (MTT-Test) und 24-Well-Platten (Immuno-Färbung) differenziert. In die Wells der 24-Well-Platten wurde vor dem Aussähen jeweils ein sterilisiertes Deckglas (12 mm) eingelegt und mit Poly-L-Ornithin beschichtet (siehe Abschnitt 3.1). Es wurde wie in den 6-Well-Platten eine Zelldichte von 80.000 Zellen/cm<sup>2</sup> eingesetzt. Zur Kultivierung bis zum Differenzierungstag 14 wurde supplementiertes Neurobasal-Medium (siehe Abschnitt 2.7.1) verwendet. Beim Start der Versuche wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit konditionierter Ringer-Salz-Lösung überbeschichtet. Die Wells wurden anschließend mit 2 mM Ca<sup>2+</sup> versetzt. Auch hier wurden Experimente mit niedriger K<sup>+</sup>- (2,5 mM) und erhöhter (27,5 mM) K<sup>+</sup>-Konzentration durchgeführt. Die Behandlungszeiträume lagen bei 4 und 24 Stunden.

#### *MTT-Test*

Für den MTT-Test wurden die Zellen in 100 µl Ringer-Salz-Lösung pro Well inkubiert. Eine Hälfte der 96-Well-Platte wurde unter niedrigen (2,5 mM), die andere unter hohen (27,5 mM) K<sup>+</sup>-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde mit 5 µM NMDA oder 5 µM Glutamat jeweils mit und ohne 100 µM AP5 sowie 100 µM AP5 einzeln behandelt. Als Kontrolle dienten mit reiner Ringer-Salz-Lösung behandelte Zellen. Für jede Behandlung wurden fünf technische Replikate (r) pro Platte (n) angefertigt. Für jeden Behandlungszeitraum (4 und 24 Stunden) wurden dabei jeweils vier Platten (n = 4) getestet. Bei beiden Zeitpunkten wurde eine Stunde vor Ablauf pro Well 10 µl einer 5 mg/ml MTT-Lösung addiert und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Innerhalb dieser Stunde wurde das MTT durch die metabolische Zellaktivität zu Formazan

reduziert, welches als bräunlicher Niederschlag sichtbar wurde. Zum Stoppen der MTT-Reduktion wurden die Zellen mit jeweils 100 µl Solubilisierungs-Lösung pro Well versehen. Die Platten wurden mit dieser Lösung (pH 4) über Nacht (16-24 h) im Dunkeln inkubiert. Während dieser Zeit lösten sich die Formazan-Kristalle. Anschließend konnte eine Absorption bei 560 nm Wellenlänge im Photometer (Plate Reader von Thermo fisher) detektiert werden. Zusätzlich zur Kontrolle wurde ein Leerwert ohne Zellen mit reiner Ringer-Salz-Lösung, MTT und Solubilisierungs-Lösung mitgeführt ( $r = 10$  pro  $n$ ). Dieser Leerwert wurde vor der Auswertung von allen Extinktionswerten subtrahiert.

#### *Immunfluoreszenz*

Das Medium der Zellen in den 24-Well-Platten wurde an DIV 14 vorsichtig entfernt und durch 1 ml Ringer-Salz-Lösung ersetzt, die mit 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ergänzt wurde. Auch bei diesem Versuch wurde auf einer Platte gleichzeitig die niedrige und die hohe  $\text{K}^+$ -Konzentration getestet. Die Zellen wurden wie auch in den anderen Versuchen mit 5 µM NMDA oder Glutamat mit und ohne 100 µM AP5 beziehungsweise mit AP5 alleine behandelt. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit der entsprechenden Ringer-Salz-Lösung inkubiert. Nach 4 h respektive 24 h Behandlung wurde die Ringer-Salz-Lösung entfernt und die Zellen zur Fixierung mit  $-80^\circ\text{C}$ -kaltem Methanol überschichtet und abgedeckt. Die Methanol-behandelten Platten wurden anschließend für mindestens eine Stunde bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zur weiteren Behandlung wurde das Methanol abgenommen und die Zellen an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Platte drei Mal vorsichtig mit PBS-T gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 3% FCS-haltigem PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Lösung wieder abgenommen und ohne einen weiteren Waschschrift wurde der primäre Antikörper MAP-2 (1:500 verdünnt in 3% FCS-haltigem PBS-T) auf die Zellen gegeben (200 µl pro Well). Die Zellen wurden über Nacht im Dunkeln bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Am Folgetag wurde der primäre Antikörper abgenommen und zur weiteren Verwendung bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T konnte schließlich der sekundäre Anti-Maus-Fluoreszenz-Antikörper Cy3 (1:200 verdünnt in 3% FCS-haltigem PBS-T) auf die Zellen gegeben werden. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Der sekundäre Antikörper wurde nach der Behandlung ebenfalls für eine weitere Benutzung aufbewahrt. Nach der Abnahme des Cy3-Antikörpers wurden die

Zellen wiederholt gewaschen. Ein 50 µg/ml (in Methanol) Stock des Fluoreszenz-Farbstoffs DAPI wurde 1:50 mit PBS verdünnt für 10 Minuten auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde der Farbstoff abgenommen und eventuelle Reste wurden durch zweifaches Waschen entfernt. Die Zellen mit PBS wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet. Das MAP-2-Signal in den Neuronen, das mit Hilfe des Cy3-Fluoreszenz-Farbstoffs markiert wurde, konnte mit einer Wellenlänge von 550 nm angeregt werden. Der DAPI-Farbstoff, der spezifisch an DNA bindet, wurde mit 358 nm Wellenlänge angeregt. Es wurden jeweils zwei überlappende Bilder (Cy3 und DAPI) von je drei Ausschnitten pro Well gemacht, wobei pro Behandlung zwei Wells in einer Platte genutzt wurden. Jedes Well galt dabei als biologisches Replikat (n). Es wurden insgesamt n = 4 Replikate für jede Behandlungsbedingung ausgewertet. Die Signal-positiven Zellen pro Aufnahme wurden als dann per Hand ausgezählt. Zur weiteren Auswertung wurden alle MAP-2-positiven Zellen auf die DAPI-positiven Zellkerne normiert.

### **3.2 *In vivo* MK-801-Behandlung von C57BL/6J-Mäusen**

Die Behandlungsdurchführung und Tötungen der Tiere inklusive der Gehirn-Entnahme wurden vom Unternehmen QPS Austria (Grambach, Österreich) durchgeführt. Alle untersuchten Mäuse wurden durch instantane zervikale Dislokation getötet, um mögliche Nebeneffekte einer oftmals anti-exzitatorischen Anästhesie zu vermeiden (Planel et al., 2009; Run et al., 2009; Whittington et al., 2013). Zu ethischen Aspekten und rechtlichen Grundlagen der Mausexperimente wird im Absatz 2.6 Stellung genommen. Die Planung der Experimente, die Präparation der einzelnen Gehirnregionen und alle weiteren Analysen der Proben wurden am Institut für Pathobiochemie der Universität Mainz durchgeführt.

#### **3.2.1 MK-801-Einmalbehandlung von Wildtyp-Mäusen**

Für die Einmalbehandlung wurden zehn Wochen alte, männliche C57BL/6J-Mäuse einmalig mit 1 mg/kg des nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 (M107, Lot# 080M4610V, Sigma Aldrich) behandelt. MK-801 bindet spannungsabhängig in der Transmembran-Domäne des NMDA-Rezeptors und führt die Schließung der Rezeptorpore herbei (Abbildung 9B, C). Die Substanz wurde subkutan injiziert. Eine Kontroll-Gruppe von sieben Tieren (n = 7) wurde mit Vehikel (Saline) behandelt. Die MK-801-behandelten Gruppen mit jeweils fünf Tieren (n = 5) wurden

nach 4 h beziehungsweise 24 h getötet (siehe Tabelle 6). Die Gehirne wurden direkt entnommen und auf Trockeneis (-80°C) schockgefroren. Die Gehirne der Kontroll-Gruppe wurden nach 4 Stunden unter denselben Bedingungen entnommen. Die Gewebe wurden bei -80°C gelagert und vom Unternehmen QPS Austria per Kurier nach Mainz verschickt.

**Tabelle 6 Behandlungsübersicht der MK-801-Einmalbehandlung**

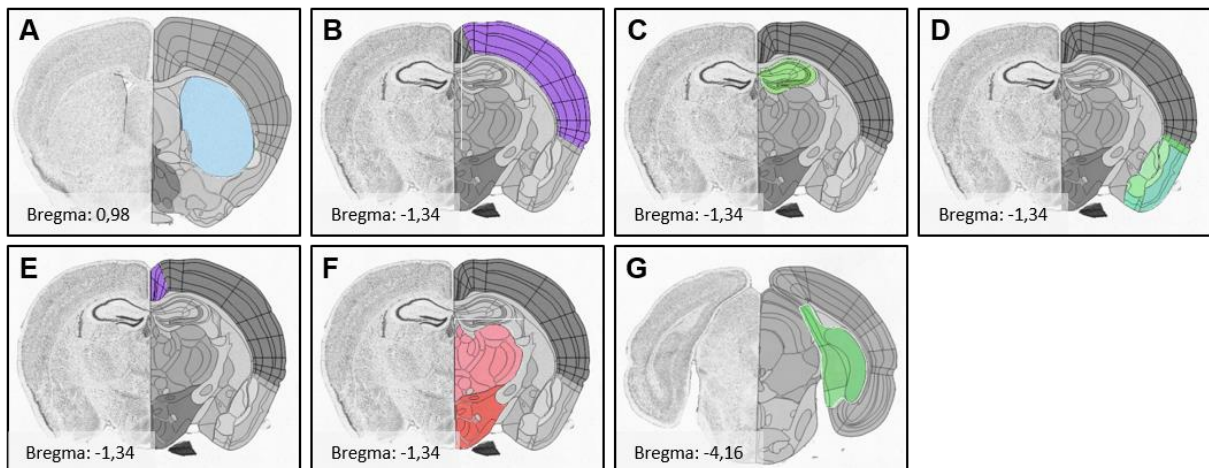
Gruppe	Substanz	Behandlung	Dosis	Behandlungsdauer	Geschlecht	Anzahl (n)
Kontrolle	Saline	i.p.	n.a.	1x, 4 h	♂	7
4 h	MK-801	i.p.	1 mg/kg	1x, 4 h	♂	5
24 h	MK-801	i.p.	1 mg/kg	1x, 24 h	♂	5

**h** Stunden; **i.p.** intraperitoneal; **n.a.** nicht angegeben; **Zahl x** Behandlungshäufigkeit

#### *Gewebepräparation der einmalig mit MK-801 behandelten Mäuse*

Die Mäusegehirne wurden zur Präparation der einzelnen Geweberegionen im gefrorenen Zustand mit Histoacryl-Gewebekleber auf einem Probenhalter befestigt. Zuvor wurde mit einer Rasierklinge ein coronaler Schnitt am Cerebellum vorgenommen. Die dadurch entstandene glatte Schnittfläche sollte einen besseren Halt auf dem Probenhalter ermöglichen. Stabilisiert wurde das aufgeklebte Gehirn mit Hilfe eines 5% Agarose-Blocks. Der Probenhalter wurde mit der Probe in ein Vibratom (Microm HM 650V; Thermo Scientific) eingesetzt und dabei in eiskalte Präparations-Ringer-Lösung eingetaucht (Dine et al., 2014). Die Ringer-Lösung war teilweise gefroren, sodass die Temperatur während des Schneidevorgangs auch in fluiden Bereichen durchgehend bei < 4°C lag. Die coronalen Schnitte des Vibratoms wurden von rostral nach caudal (Bregma 1,54 bis Bregma -5,20) durchgeführt (Paxinos und Franklin, 2001). Es wurden insgesamt 10 bis 11 Schnitte mit einer Dicke von 750 µm angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte direkt in eine Zellkulturschale mit Präparations-Ringer-Lösung (Abschnitt 2.7.2) auf Eis überführt und dort bis zur weiteren Präparation zwischengelagert. Die Ringer-Lösung war zusätzlich mit einem Mix aus Phosphatase-Inhibitoren (2 mM Imidazol, 1 mM Natriumfluorid (NaF) und 1 mM Natrium-Orthovanadat (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)) versetzt. Unter einem Binokular wurden insgesamt sieben verschiedene Gewebe-Regionen isoliert (Abbildung 13). Die Auswahl

der Gewebe-Bereiche wurde anhand verschiedener Studien zur veränderten Glucose-Verwertung nach NMDAR-Antagonismus in Mäusen gewählt (Kurumaji et al., 1989; Kurumaji et al., 1991; Miyamoto et al., 2000). Für Bregma 1,54 bis -0,94 wurde die Region des Nucleus Caudatus und des Putamens (CPu) präpariert (Abbildung 13A). Der Hippocampus (Hc) wurde in den Schnitten zwischen Bregma -1,06 bis -3,08 entnommen (Abbildung 13C). Zusätzlich wurde der Thalamus inklusive des Hypothalamus (Th) von Bregma -1,06 bis -2,70 zusammengefasst (Abbildung 13F). Der Cortex wurde in vier spezifischere Regionen unterteilt. Der Bereich des Retroplenialen Cortex (Rsp) (Abbildung 13E) und des Isocortex (Ctx) (Abbildung 13B) wurden getrennt voneinander für Bregma -1,06 bis -3,08 präpariert. Der Isocortex umfasste Regionen der motorischen, visuellen, auditorischen und somatosensorischen Cortices (Allen Institute für Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas, 2008). Die präparierte Region des Entorhinalen Cortex (Ent) von Bregma -2,54 bis -5,20 enthielt sowohl Bereiche des Pririformen Cortex und der Amygdala (Abbildung 13D). Die Areale des Subiculum und Parasubiculum (Sub) wurden von Bregma -4,16 bis -4,48 separat isoliert (Abbildung 13G). Die einzelnen Gewebe wurden in denaturierendem Lysispuffer lysiert und anschließend mit einem Ultraschallgerät homogenisiert. Für weitere Analysen wurden die Proben bei -80°C gelagert.



**Abbildung 13 Präparationsbereiche der Gehirnregionen der einmalig mit MK-801 behandelten Mäuse.**

Die Gehirne der MK-801-Einmalbehandlung wurden in spezifische Regionen zerteilt. Es wurden 750 µm dicke coronale Schnitte von rostral nach caudal angefertigt. Die Regionen wurden anschließend nach coronalen Bregma-Bereichen entnommen (Paxinos und Franklin, 2001). Die Aufteilung der Gewebsregionen in den jeweiligen Schnitten ist farblich markiert (Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas, 2008. Available from: [http://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100142143?image\\_type=atlas](http://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100142143?image_type=atlas)). **A:** Nucleus Caudatus und Putamen; **B:** Isocortex; **C:** Hippocampus; **D:** Entorhinaler Cortex; **E:** Retroplenialer Cortex; **F:** Thalamus und **G:** Subiculum.

### 3.2.2 MK-801-Mehrfachbehandlung von Wildtyp-Mäusen

In diesen Experimenten wurden sowohl männliche als auch weibliche C57BL/6J-Mäuse von Janvier Labs eingesetzt. Zu Beginn waren die Tiere 10-12 Wochen alt. In unterschiedlichen Gruppen wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 6 oder 12 Wochen mit dem NMDAR-Antagonisten MK-801 (M107, Lot# 105M4606V, Sigma Aldrich) behandelt. Den Mäusen wurde innerhalb dieses Zeitraums dreimal wöchentlich eine subkutane Injektion mit Saline oder 1 mg/kg beziehungsweise 0,2 mg/kg MK-801 verabreicht (Tabelle 7). MK-801 besitzt eine Halbwertszeit von ~2 h (Vezzani et al., 1989) und um einen akuten Effekt der Substanz wie in der Einfachbehandlung (Tabelle 6) auszuschließen, wurden die Tiere erst 24 h nach der letzten Injektion durch eine zervikale Dislokation getötet und die Gehirne wurden direkt als Ganzes entnommen. Es wurden insgesamt n = 8 Mäuse pro Gruppe behandelt. Die Gehirne wurden für Proteinanalysen unbehandelt bei -80°C schockgefroren und bei -80°C per Kurier nach Mainz verschickt.

**Tabelle 7** Behandlungsübersicht der MK-801-Mehrfachbehandlung

Gruppe	Substanz	Behandlung	Dosis	Behandlungsdauer	Geschlecht	Anzahl
Vehikel 6 w ♂	Saline	i.p.	n.a.	3x/ W; 18 Inj.; 6 W	♂	8
	MK-801	i.p.	1,0 mg/kg	3x/ W; 18 Inj.; 6 W	♂	8
Vehikel 12 w ♂	Saline	i.p.	n.a.	3x/ W; 36 Inj.; 12 W	♂	8
	MK-801	i.p.	1,0 mg/kg	3x/ W; 36 Inj.; 12 W	♂	8
Vehikel 6 w ♀ 6 w ND ♀	Saline	i.p.	n.a.	3x/ W; 18 Inj.; 6 W	♀	8
	MK-801	i.p.	1,0 mg/kg	3x/ W; 18 Inj.; 6 W	♀	8
	MK-801	i.p.	0,2 mg/kg	3x/ W; 18 Inj.; 6 W	♀	8

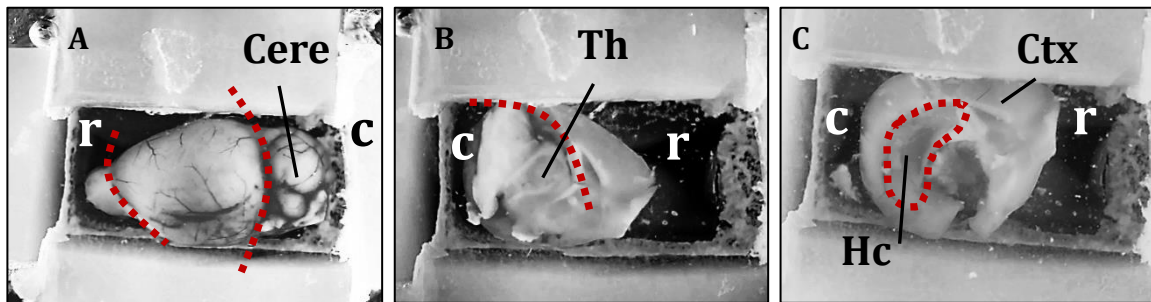
**W** Wochen; **ND** niedrig dosiert; **i.p.** intraperitoneal; **n.a.** nicht angegeben; **Zahlx** Behandlungshäufigkeit; **Inj.** Gesamtinjektionen

#### *Gewebepräparation der mehrfach mit MK-801 behandelten Mäuse*

Die auf -80°C gelagerten Gehirne wurden in eine sterile Plastikschaale überführt und bei Raumtemperatur kurz angetaut, bis sie sich mit einer Rasierklinge leicht in die beiden Hemisphären zerteilen ließen. Die linke Gehirnhälfte wurde zur weiteren Präparation in eine 10 cm Zellkulturschaale mit eiskalter Präparations-Ringer-Lösung transferiert. Die rechte Hemisphäre wurde mit Hilfe von Trockeneis erneut schockgefroren und



weiterhin bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Mittels vier zugeschnittenen Agaroseblöcken (5% Agarose in Ringer-



**Abbildung 14 Gewebepräparation der mehrfach mit MK-801 behandelten Mäuse.**

Das Maus-Gehirn wurde in noch teilweise gefrorenem Zustand in die Präparations-Ringer-Lösung überführt. **A.** Zunächst wurde der Bulbus entfernt und das Cerebellum (Cere) präpariert. **B.** Anschließend wurde das Gehirn gewendet, so dass man auf die sagittale Schnittebene blickte. Der Thalamus (Th) wurde zusammen mit dem Hypothalamus entfernt. **C.** Der Hippocampus (Hc) war nun deutlich zu erkennen und wurde entnommen. Der restliche Cortex-Bereich (Ctx) wurde als Ganzes aufgenommen. r: rostral; c: caudal. Die rot gestrichelten Linien markieren die Schnittführungen.

Lösung) wurde eine Stabilisationsvorrichtung für die Gehirn-Sektion innerhalb der Zellkulturschale modelliert. Unter der Vergrößerung eines Binokulars wurden die Gehirnhälften wie in Abbildung 14 gezeigt in die Bereiche Cerebellum (Cere), Thalamus (Th), Cortex (Ctx) und Hippocampus (Hc) zerlegt. Die Probe des Cerebellums enthielt neben dem Cerebellum auch Medulla, Pons und Teile des Mittelhirns. Der Thalamus umfasste ebenfalls den Hypothalamus. Als Cortex wird hier die gesamte kortikale Platte bezeichnet, wobei der Hippocampus separat präpariert wurde (Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas, 2008). Die Gewebestücke wurden auf  $4^{\circ}\text{C}$  gekühltem, nicht-denaturierendem Lysispuffer (100 mM Tris, pH 7,4) gesammelt und direkt mit einem Pistill homogenisiert. Zusätzlich wurden sie mit einem Ultraschallstab sonifiziert. Anschließend wurde ein Teil der aufgeschlossenen Proben für Westernblot-Analysen mit denaturierendem Lysispuffer weiter verdünnt. Für die jeweilige Verdünnung (Cere 1:3, Ctx 1:8, Hc 1:2, Th 1:3) wurde ein entsprechend angepasster, denaturierender Lysispuffer (Absatz 2.7.2) verwendet, so dass alle Proben nach der Verdünnung die gleichen Konzentrationen an Salzen und Detergenzien enthielten: 100 mM Tris, 0,5% SDS, 20% Saccharose, pH 7,4. Alle Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3 Proteinanalytik

#### *Protein-Quantifizierung*

Zur Quantifizierung der Gesamt-Proteinmenge wurde die Bicinchoninsäure-Methode (BCA-Methode) nach Smith et al., 1985 angewandt. Diese Methode basiert auf zwei chemischen Reaktionen. Zunächst wird Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ ) im alkalischen Milieu zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert und bildet mit einer Peptidbindung einen Biuret-Komplex (Biuret-Reaktion). Anschließend bildet ein Kupfer-Ion mit zwei BCA-Molekülen einen Chelat-Komplex, der eine spezifische Absorption bei 562 nm besitzt. Für diese Messung wurde ein BCA Assay Kit verwendet (Thermo fisher). Der darin enthaltene BSA-Standard (Rinderalbumin; 2 mg/ml) wurde zum Ansetzen der Eichgerade eingesetzt. Zu messende Proben wurden angemessen verdünnt und in einer Mikrotiterplatte zusammen mit den Standardkonzentrationen aufgetragen. Schließlich wurde die BCA/2%-Kupfer-Lösung zugegeben. Das Endvolumen jedes Wells betrug 100  $\mu\text{l}$ . Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 60 °C wurde die Absorption der Proben bei 560 nm gemessen. Mindestens vier Wells wurden als Leerwert mitgeführt und enthielten reine BCA/2%-Kupfer-Lösung. Bevor die Protein-Konzentrationen berechnet werden konnten, wurden die Leerwerte zu einem Mittelwert zusammengefasst und von allen gemessenen Werten subtrahiert. Die jeweiligen Verdünnungen wurden in den Konzentrationsberechnungen der Proben berücksichtigt.

#### *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Für die Analysen spezifischer Proteine sollten die Proteingemische der Zellkultur- und Gewebeproben mit Hilfe der Gelelektrophorese differenziert werden. Es wurde die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 angewandt. Bei der SDS-PAGE werden Proteine aus Gemischen in einem Gel unabhängig von ihrer eigenen Ladung und Konformation fast ausschließlich nach ihrer Masse (Dalton) in einem elektrischen Feld voneinander getrennt. Hierzu wurden alle Proteinproben mit Natriumdodecylsulfat- (SDS) und  $\beta$ -Mercapthoethanol-haltigem Ladepuffer (2.7.3) versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Somit wurden die Proteine überwiegend bis auf die Ebene der Primärstruktur denaturiert. Die Eigenladung der Proteine wurde durch die Zugabe der anionischen SDS-Moleküle überlagert, sodass die Proteine dieselbe negative Nettoladung pro Sequenzlänge trugen. Für die Elektrophorese werden Gele aus Polyacrylamid verwendet. Ein Gemisch aus Acrylamid

und N,N-Methylenbisacrylamid wird unter Verwendung eines Radikalbildners Ammoniumperoxidisulfat (APS) und des Katalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED) polymerisiert, sodass ein vernetztes Gel entsteht. Die hier verwendeten Gele wurden in zwei Phasen (diskontinuierliches Gel) mit Hilfe einer Bio-Rad Gieß-Apparatur selbst gegossen (Rezepte in Abschnitt 2.7.3). Die untere Phase bildete das Trenngel. Durch die starke Vernetzung innerhalb dieser Gel-Phase werden Proteine aufgrund ihrer spezifischen Sequenzlänge unterschiedlich stark in ihrer Laufgeschwindigkeit gebremst. Das Trenngel hatte eine Konzentration von 10% Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid und war durch einen Tris-HCl-Puffer auf einen pH-Wert von 8,8 gepuffert. Die obere Phase ist das Sammelgel, das auf das zuvor polymerisierte Trenngel gegossen wurde. Diese obere Gelphase enthielt 4% Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid und wurde auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt. Im Sammelgel wurden unter Verwendung eines Kamms Gel-Vertiefungen erzeugt, sogenannte Taschen, in die die Proteinproben eingelassen wurden. Die selbsthergestellten Gele wurden in ein Gelelektrophorese-Kammer-System von Bio-Rad eingespannt und die Kammer wurde mit einem SDS-haltigen Laufpuffer (2.7.3) befüllt, der zudem Glycin- und Cl-Ionen enthielt. Die vorbereiteten Protein-Proben wurden zusammen mit einem vorgefärbten Protein-Marker (peqGold Marker IV, VWR) in die Taschen aufgetragen. Mit einer angelegten Spannung von 80 V wanderten die Proteine auf Grund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode in das Gel ein. Beim Start wandern die Proteine zunächst in die Sammelgel-Phase. Aufgrund des pH-Werts des Sammelgels (pH 6,8) haben die Glycin-Zwitterionen (Folgeion) eine niedrige Mobilität und die Chlorid-Ionen (Leitton) eine hohe Mobilität im elektrischen Feld. Die Mobilität der aufgetragenen Proteine liegt zwischen diesen beiden. Beim Wandern der Proteine stellt sich ein Feldstärkegradient ein, der dazu führt, dass sich alle Proteine unmittelbar hinter dem Leitton fortbewegen. Beim Eintreten in das Trenngel führt die pH-Wert Änderung dazu, dass die Glycinat-Ionen eine höhere Mobilität erlangen und die Proteine überholen. Es kommt zu einem sogenannten „stacking“-Effekt, bei dem die Proteine räumlich konzentriert werden und gleichzeitig in das Trenngel eintreten. Nach dem Eintritt in das Trenngel wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Der mit Bromphenolblau versetzte Ladepuffer in den Proben zeigte an, wann die Protein-Lauffront am Ende des Gels angekommen war, sodass der Strom rechtzeitig abgestellt werden konnte.

*Tricin-Gradientengel*

Zur besseren Auftrennung von Fragmenten des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) wurde ein kommerzielles Tricin-Gradienten-Gel mit Polyacrylamid-Konzentrationen von 10-20% verwendet. Um diese Gele anzuwenden, wurden die Proteinproben zunächst 1:1 mit dem Novex™ SDS Proben Puffer (2x) versetzt. Es wurden zur weiteren Denaturierung zusätzlich 50 µM Dithiothreitol (DTT) pro Probe zugegeben und für 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf das 10-20% Tricin-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit entsprechend verdünntem Novex™ SDS Tricin Laufpuffer 10x befüllt. Die Gele liefen für ~ 1h bei 120 V und wurden währenddessen von außen mit Eis gekühlt. Für alle Tricin-Gele wurde der vorgefärbte Protein-Standard Novex Sharp Pre-Stained™ mit Banden von 3,5 bis 260 kDa eingesetzt.

*Immunologischer Proteinnachweis auf Westernblot-Ebene*

Die Gele der Elektrophorese wurden mittels Westernblot für weitere Proteinanalysen zugänglich gemacht. Hierzu wurde das Gel aus der Platten-Vorrichtung entnommen und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Das Gel und die Membran wurden zusammen mit Filterpapier in einer Westernblot-Klammer (Sandwich) eingespannt. Die Kammer wurde mit Methanol-haltigem Transferpuffer befüllt. Über Nacht wurde eine Spannung von 30 V angelegt und somit für etwa 16-24 Stunden geblottet. Anschließend wurde die Membran aus dem Sandwich entnommen und kurz mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Zur Färbung der geblotteten Proteine auf der Membran wurde diese für ungefähr 10 min in eine Ponceau S-Färbelösung eingetaucht. Die Färbung der Membran wurde digital dokumentiert, bevor ein Blockierungsschritt stattfand. Hierzu wurde die Membran für 1 h mit 2% Magermilch in TBS-T auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit TBS-T (3x 10 min) wurde ein primärer Antikörper auf die Membran gegeben. Für alle primären Antikörper wurde eine Inkubationszeit von mindestens 16 h bei 4°C auf einem Schüttler eingehalten (Antikörperliste Abschnitt 2.2). Nach der Abnahme des primären Antikörpers und mehrmaligem Waschen wurde ein sekundärer Antikörper auf die Membran gegeben. Dessen Inkubation fand für 2 h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur statt. Die Bindung der Antikörper auf der Membran wurde anschließend mit Hilfe von Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Hierzu wurde eine selbstangesetzte ECL-A-Lösung mit 10% einer selbstangesetzten ECL-B-Lösung und 1% einer 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-

Lösung versetzt (Abschnitt 2.7.3). Dieses Gemisch wurde auf die Membran gegeben und gleichmäßig verteilt. Die Entwicklung des optischen Signals wurde mit Hilfe eines Blot-Entwicklers (Amersham Imager 600; GE Healthcare Life Sciences) aufgenommen und in Form einer Tif-Datei festgehalten. Diese digitalen Signale wurden mit dem Programm AIDA Image Analyzer quantitativ ausgewertet. Hierzu wurde die Intensität der Banden eines Blots in einem definierten Bereich festgestellt. Die Banden wurden einzeln für jede aufgetragene Probe ausgewertet. Als Ladekontrolle wurde für jeden Blot ein Strukturprotein herangezogen. In den meisten Fällen war dies  $\alpha$ -Tubulin, für BACE1-Blots hingegen wurde aufgrund von Bandenüberschneidungen Aktin verwendet.

#### *Immunologischer Proteinnachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Um das APP-Fragment Amyloid  $\beta$  (A $\beta$  1-40 und 1-42) nachzuweisen, wurde die Methode des Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) angewandt. Es wurden Sandwich ELISA-Kits von Wako Chemicals (Japan) verwendet (Abschnitt 2.3). Für den Nachweis von A $\beta$  in den Zellkulturexperimenten wurde der Überstand der Ringer-Salz-Lösung verwendet. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde die Lösung abgenommen und mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt. Für den ELISA wurden  $n = 6$  der 4 h-Experimente für A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> getestet. Hierzu wurde der Überstand für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf die Platte gegeben. Die Gewebe-Proben der MK-801-Einmalbehandlung mussten zuvor gereinigt werden. Das im denaturierenden Lysispuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) musste entfernt werden. Es bestand die Gefahr, dass das anionische Detergenz den auf der ELISA-Platte angehefteten primären Antikörper denaturieren könnte. Es wurden zwei Methoden zur SDS-Entfernung angewandt. Für die erste Methode wurden kommerzielle Detergent Removal Spin Columns (Säulen) von Thermo Fisher verwendet und für die Hippocampus- und Cortex-Proben eingesetzt. Zunächst wurden alle Proben mit denaturierendem Lysispuffer auf eine Konzentration vom 2 mg/ml Gesamtprotein verdünnt. Anschließend wurden diese Proben bei RT für 2 min bei 1.500 g durch die Säulen zentrifugiert. Die aufgefangenen, gereinigten Proben wurden 1:1 mit der im Kit enthaltenen Standard-Verdünnungslösung auf 1 mg/ml Gesamtprotein verdünnt und auf die ELISA-Platte aufgetragen. Für die zweite Reinigungsmethode wurde eine SDS-Fällung durchgeführt (Zhou et al., 2012). Durch die Zugabe von Kaliumchlorid zu den SDS-haltigen Proben bildete sich Kalium-Dodecylsulfat, welches in der Lösung ausfiel. Diese Methode wurde für die Proben des Entorhinalen Cortex, des Thalamus, des

Retroplenialen Cortex, des N. Caudatus und Putamens und zu Vergleichszwecken auch für die des Cortex durchgeführt.

Alle Proben wurden zu Beginn mit dem denaturierenden Lysispuffer auf eine einheitliche Gesamtproteinkonzentration von 2 mg/ml gebracht. Anschließend wurden jeweils 200 mM KCl (in MilliQ-Wasser) addiert. Die Proben wurden 10 min bei RT inkubiert. Um das präzipitierte Kalium-Dodecylsulfat zu entfernen, wurden die Proben für 10 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit MilliQ-Wasser verdünnt, um die gewünschte Konzentration von 1 mg/ml Gesamtprotein zu erhalten. Es zeigte sich, dass die Ergebnisse des Cortex mit Methode Nr. 1 und Nr. 2 sehr ähnlich waren. In dieser Arbeit werden daher die Ergebnisse des Cortex nur nach Behandlung mit Methode Nr. 2 gezeigt. Die Standard-Eich-Kurven der ELISAs wurden nach den Vorschriften der Kit-Anleitungen angesetzt und in einer Doppelbestimmung aufgetragen. Jeweils 100 µl jeder Probe wurde für den ELISA-Test verwendet. Die weitere Vorgehensweise entsprach den Anweisungen des Kits. Die Proben wurden aufgetragen und anschließend über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Der auf der Platte angeheftete erste primäre Antikörper konnte in dieser Inkubationszeit an A $\beta$  binden. Im nächsten Schritt wurden die Proben sorgfältig entfernt und die Platte 5x gründlich mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer gewaschen. Der Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP)-gekoppelte zweite primäre Antikörper, der spezifisch an den C-Terminus von A $\beta$ <sub>40</sub> oder A $\beta$ <sub>42</sub> binden sollte, wurde in einem Volumen von 100 µl in jedes Well gegeben. Die Inkubationszeit betrug hier 1 h bei 4°C im Dunkeln. Nach erneutem Waschen wurden in jedes Well 100 µl der mitgelieferten 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-(TMB)-Lösung gegeben und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit wurde das TMB durch die HRP oxidiert und eine blaue Färbung konnte wahrgenommen werden. Ohne die TMB-Lösung zu entfernen, wurden jeweils 100 µl der Schwefelsäure-haltigen Stopp-Lösung zugegeben. Die Zugabe der Schwefelsäure führte zu einem Farbumschlag der blauen TMB-Färbung nach gelb. Diese Färbung konnte anschließend im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Anhand der Eichgerade konnten nun die A $\beta$ -Konzentrationen der verschiedenen Proben ermittelt werden.

### 3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der *in vitro* Daten wurde mittels parametrischer zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Für alle zweifaktoriellen ANOVA galt: Faktor 1 bezog sich auf die exzitatorische Erregung durch NMDA oder Glutamat, und Faktor 2 auf die Inhibition durch den Antagonisten AP5.

Alle *in vivo* Daten wurden mit Hilfe parametrischer einfaktorieller ANOVA statistisch evaluiert. Verglichen wurden die MK-801-behandelten Gruppen mit den jeweiligen Saline-behandelten Kontrollgruppen. Für die Ermittlung der paarweisen Signifikanzen im Vergleich mit der Kontrollgruppe wurde für alle zweifaktoriellen und einfaktoriellen ANOVA der Holm-Sidak-Post-Hoc-Test durchgeführt. Alle in den Abbildungen gezeigten p-Werte ( $p \leq 0,05$ ) stammen von Post-Hoc-Tests. In den Abbildungslegenden werden die p-Werte ( $p \leq 0,05$ ) der Gesamtsignifikanzen der entsprechenden ANOVA genannt. Weitere Angaben, darunter der F-Wert und die Freiheitsgrade, sind vollständig im Anhang „Statistische Auswertung“ (Abschnitt 9.1) zu finden. In Fällen, in denen die Annahme der Normalverteilung oder die Annahme der Varianzen-Gleichheit nicht bestätigt werden konnte (Normalitäts-Test fehlgeschlagen N.T.f.:  $p > 0,05$ ; Varianzen-Gleichheits-Test fehlgeschlagen V.T.f.:  $p > 0,05$ ), wurde die jeweilige ANOVA durch eine ANOVA an Rängen ergänzt. Diese zusätzlichen Daten sind ebenfalls dem statistischen Anhang zu entnehmen (Abschnitt 9.1). Alle in dieser Arbeit gezeigten Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

## 4 Ergebnisse

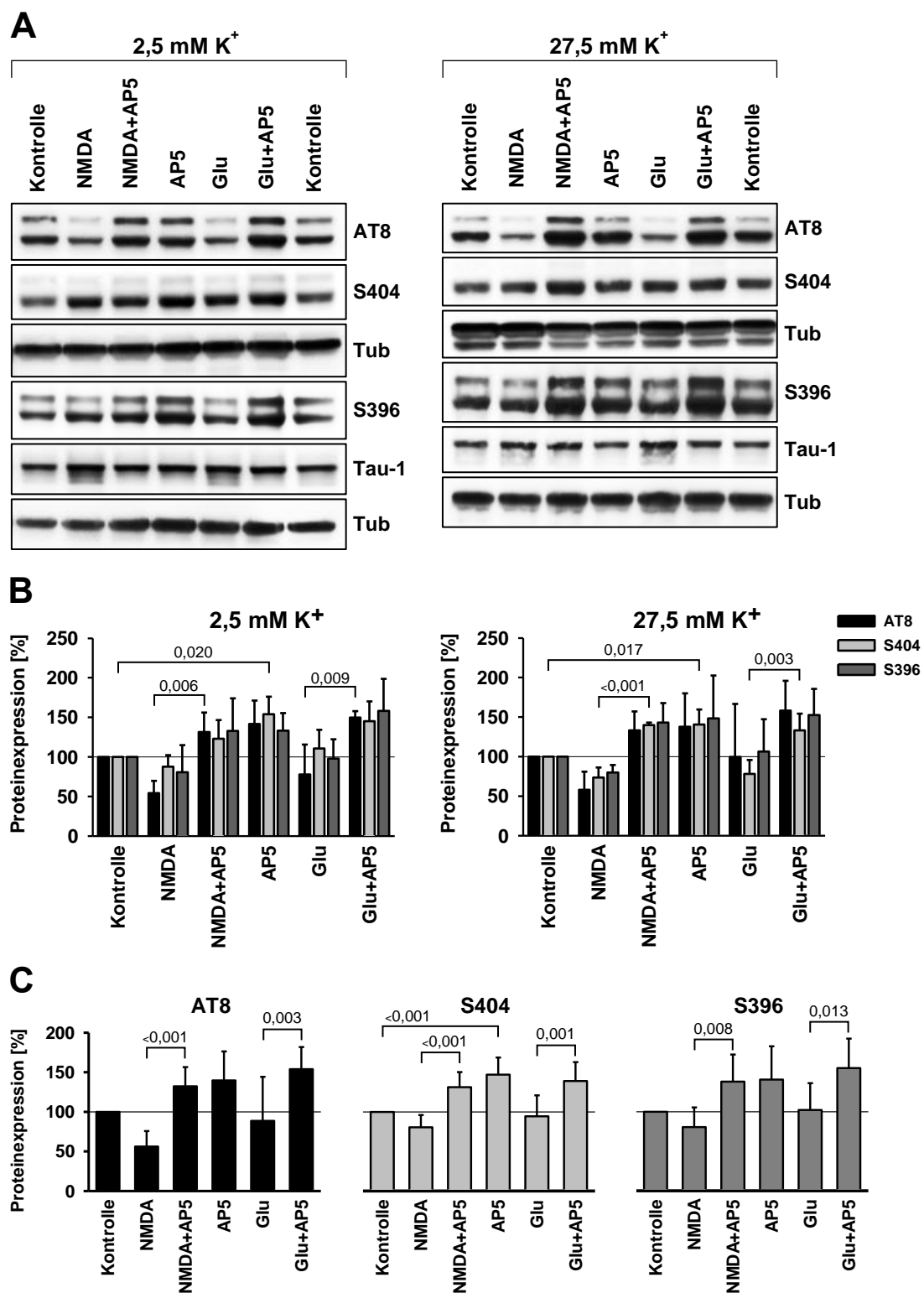
### 4.1 Auswirkung inhibierter NMDA-Rezeptoraktivität auf Alzheimer-assoziierte Proteine in primärer neuronaler Zellkultur.

Die Hypothese, dass eine verminderte NMDA-Rezeptor-Funktion in der Ausbildung Alzheimer-typischer Histopathologien wie Tau-Tangles und A $\beta$ -Plaques resultiert, wurde zunächst in dem Modell der primären neuronalen Zellkultur getestet. Aus Rattenembryonen wurden kortikale Zellkulturen etabliert. In früheren Studien war bereits gezeigt worden, dass die NMDA-Rezeptor-Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B in primärer kortikaler Zellkultur frühestens ab dem vierzehnten Tag der Kultivierung (days in vitro, DIV) vollständig exprimiert werden (Li et al. 1998). Die Zellen dieser Arbeit wurden für 14-17 Tage differenziert, bevor die Experimente gestartet. Um zu testen, welchen Einfluss die Inhibition der NMDA-Rezeptoren (NMDAR) auf die in Alzheimer-relevanten Proteine hat, wurden die Zellen mit dem sehr spezifischen NMDA-Rezeptor-Antagonisten D-AP5 (D-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure) (Davies und Watkins, 1981) behandelt. AP5 konkurriert um die Glutamatbindestelle im NMDA-Rezeptor. Das dort bindende L-Glutamat ist ein natürlicher Neurotransmitter, der exzitatorisch wirkt und NMDAR aktiviert. Zusätzlich zum Antagonisten AP5 wurden in den Experimenten auch die zwei Agonisten z Glutamat und anderen NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) eingesetzt (Watkins et al., 1990). Die Substanzen wurden einzeln und auch kombiniert getestet (Agonist + Antagonist). Für die Inkubation mit den Substanzen wurde das zuvor verwendete Neurobasal-Medium gegen eine Magnesium-freie Ringer-Salz-Lösung ausgetauscht (siehe 2.7.1 Lösungen und Medien für die primäre Zellkultur). Magnesium hat die Eigenschaft NMDAR spannungsabhängig zu blockieren (Nowak et al, 1984). Für die Experimente sollte diese Blockade jedoch minimiert werden, um die verringerte Aktivität der Rezeptoren in vitro tendenziell auszuschließen. Weiterhin wurden die Zellen während den Versuchen unter zwei unterschiedlichen Kalium-Bedingungen kultiviert. Es hat sich bereits gezeigt, dass eine Erhöhung der Kaliumkonzentration auf 25 mM in kultivierten Mausgehirn-Schnitten zu einer verstärkten Depolarisation führt (Heck et al., 2008). Die Experimente dieser Arbeit wurden daher unter normalen Bedingungen (2,5 mM) und mit erhöhter Kaliumkonzentration (27,5 mM) durchgeführt.



#### 4.1.1 Untersuchung der Tau-Phosphorylierung nach Modulation der exzitatorischen Neurotransmission *in vitro*.

Die Zellexperimente wurden wie in Abbildung 12 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das Zellmaterial mittels Westernblot untersucht. Um die für Alzheimer spezifische Phosphorylierung von Tau zu untersuchen, wurden die Phosphospezifischen Antikörper AT8 (S202/ T205), S404 und S396 eingesetzt (Abbildung 15A). Die Ergebnisse wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA analysiert, wobei Faktor 1 die Anwesenheit einer der beiden Agonisten widerspiegelte und Faktor 2 die Behandlung mit AP5. Bei Betrachtung der Westernblot Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Behandlung mit AP5 innerhalb von 4 h zu einem Anstieg in allen drei getesteten Epitopen führte (Abbildung 15A). Dieser erwies sich in der statistischen Auswertung (Abbildung 15B) als signifikant (2,5 mM K<sup>+</sup>: Anti-AT8:  $p_2 < 0,001$ , Anti-S404:  $p_2 = 0,004$ , Anti-S396:  $p_2 = 0,017$ ; 27,5 mM K<sup>+</sup>: Anti-AT8:  $p_2 = 0,024$ , Anti-S404:  $p_2 < 0,001$ , Anti-S396:  $p_2 = 0,017$ ). Eine Behandlung mit 5  $\mu$ M L-Glutamat oder 5  $\mu$ M NMDA führte hingegen zu keinem signifikanten Abfall in der Phosphorylierung von Tau, obwohl die evaluierten Werte eine Tendenz zur Reduktion aufwiesen (Abbildung 15B). Die Verabreichung beider Substanztypen gleichzeitig zeigte die deutliche Dominanz des Antagonisten-Effekts. Ein Grund hierfür könnte die potentere Inhibitionseigenschaft von AP5 sein (Jespersen et al., 2014) oder die vergleichsweise niedrige Agonisten-Konzentration von 5  $\mu$ M, die gewählt wurde, um Exzitotoxizität zu vermeiden. Es zeigten sich weiterhin keine merklichen Unterschiede zwischen den beiden K<sup>+</sup>-Konditionen auf Ebene der Tau-Phosphorylierung. Während der Versuche wurde ausschließlich Magnesium-freie Ringer-Salz-Lösung verwendet. Die spannungsabhängige Blockade der NMDARs durch Magnesium war somit reduziert. Möglicherweise führte die Vordepolarisierung der Zellmembran durch das zusätzliche Kalium (25 mM) daher zu keinem signifikanten Effekt. Eine Zusammenfassung der  $n = 6$  Experimente ( $n = 3$  für jede K<sup>+</sup>-Bedingung) zeigte eine Signifikanz von  $p_2 < 0,001$  für alle drei Antikörper in der zweifaktoriellen ANOVA (Abbildung 15C). Die paarweisen Vergleiche im Post-Hoc-Test verdeutlichten, dass die Anwesenheit von AP5 in den Agonisten-Experimenten zu einem signifikanten Anstieg der jeweiligen Phosphorylierungsstelle führte ( $p \leq 0,05$ ). Die Anwesenheit von NMDA oder L-Glutamat alleine erzeugte jedoch keine signifikanten gegenläufigen Ergebnisse.

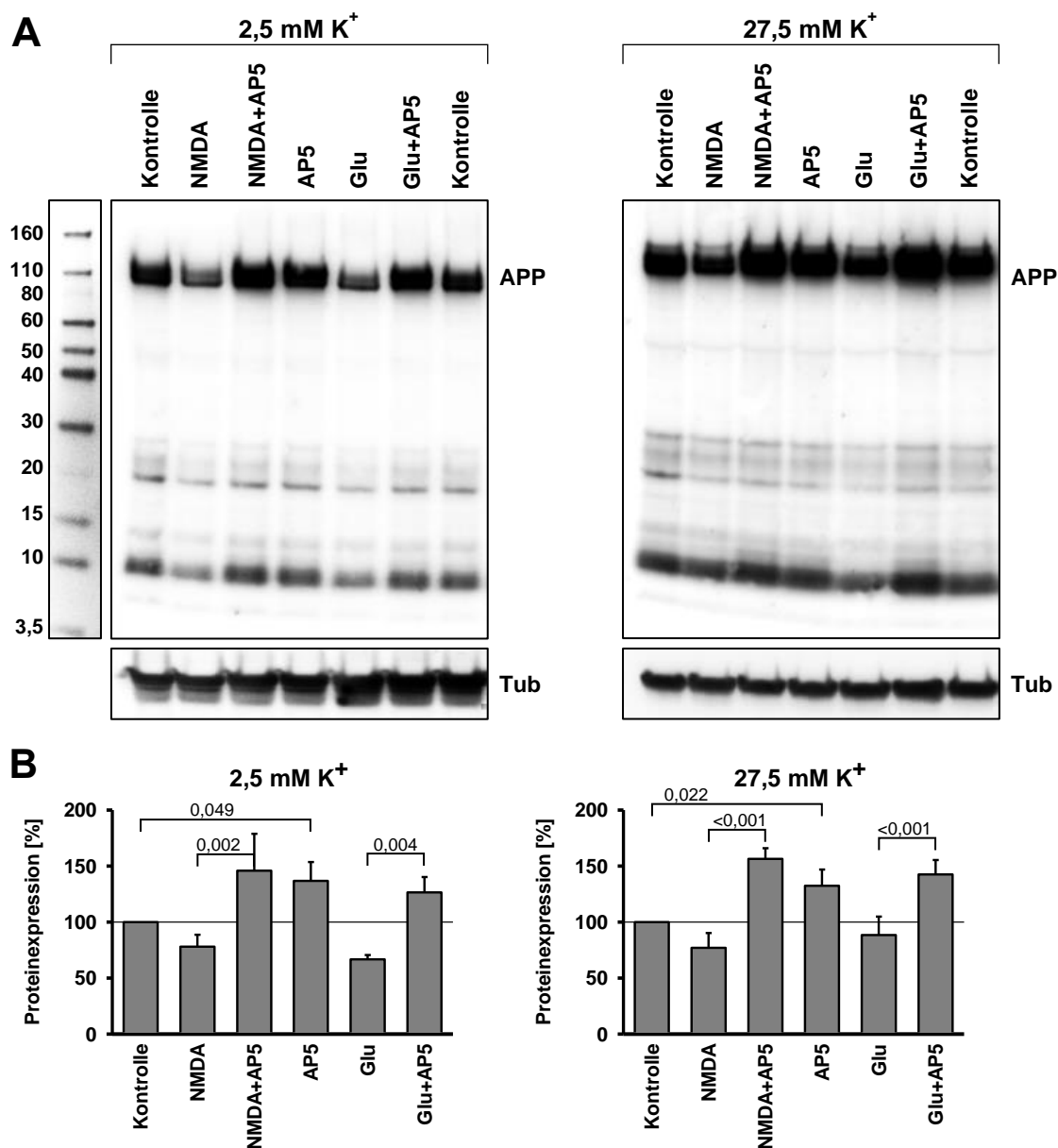


**Abbildung 15 NMDA-Rezeptor-abhängige Tau-Phosphorylierung in kortikalen Neuronen aus der Ratte.**

**A.** Die Zellen wurden mit den NMDA-Rezeptor-Agonisten NMDA (5  $\mu\text{M}$ ) oder Glutamat (Glu, 5  $\mu\text{M}$ ) und dem Antagonisten AP5 (100  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Die Effekte der Behandlung auf spezifische Phosphorylierungs-Epitope des Proteins Tau wurden mit Hilfe der Westernblot-Methode analysiert. Die Versuche wurden für 4 h unter normalen  $\text{K}^+$ -Bedingungen (2,5 mM  $\text{K}^+$ , links) oder hohen  $\text{K}^+$ -Konzentrationen durchgeführt (27,5 mM  $\text{K}^+$ , rechts). Es wurden die spezifischen, mit Alzheimer assoziierten Epitope Serin 404 (S404), Serin 396 (S396) und Serin 202+Threonin 205 (AT8) betrachtet. Die Menge des unphosphorylierten Taus (Tau-1) wurde ebenfalls detektiert. Das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Die gezeigten Tub-Signale beziehen sich jeweils auf die darüberliegenden Tau-Signale. **B.** Für die Quantifizierung von  $n = 3$  unabhängigen Westernblot-Auswertungen wie in **(A)** wurden zunächst alle Protein-Signale auf das entsprechende Tubulin-Signal normiert. Weiterhin wurden alle phospho-spezifischen Tau-Antikörper auf die Intensität des jeweiligen Gesamt-Taus (Tau-1) bezogen. Die statistische Bewertung wurde für alle Zell-Experimente mittels zweifaktorieller ANOVA durchgeführt. Faktor 1 war der Einsatz eines Agonisten (NMDA oder Glutamat) und Faktor 2 stellte die Behandlung mit dem Antagonisten AP5 dar. In dieser und allen folgenden Abbildungen werden ausschließlich Signifikanz-Level aus paarweisen Post-Hoc-Tests dargestellt, sofern eine ANOVA-Gesamtsignifikanz vorhanden war ( $p_{\text{ANOVA}} < 0,05$ ). Ausführliche Details zu den statistischen Auswertungen sind dem statistischen Anhang (Abschnitt 9.1) zu entnehmen. ANOVA-Signifikanzlevel: Anti-AT8: 2,5 mM  $\text{K}^+$ :  $p_1 = 0,246$ ,  $p_2 < 0,001$ ,  $n = 3$ ; 27,5 mM  $\text{K}^+$ :  $p_1 = 0,473$ ,  $p_2 = 0,024$ ,  $n = 3$ , Anti-S404: 2,5 mM  $\text{K}^+$ :  $p_1 = 0,241$ ,  $p_2 = 0,004$ ,  $n = 3$ ; 27,5 mM  $\text{K}^+$ :  $p_1 = 0,322$ ,  $p_2 < 0,001$ ,  $n = 3$  and Anti-S396: 2,5 mM  $\text{K}^+$ :  $p_1 = 0,625$ ,  $p_2 = 0,017$ ,  $n = 3$ ; 27,5 mM  $\text{K}^+$ :  $p_1 = 0,735$ ,  $p_2 = 0,017$ ,  $n = 3$ . **C.** Die Auswertung der zusammengefassten Ergebnisse beider  $\text{K}^+$ -Bedingungen für Antikörper Anti-AT8:  $p_1 = 0,122$ ,  $p_2 < 0,001$ ,  $n = 6$ ; Anti-S404:  $p_1 = 0,148$ ,  $p_2 < 0,001$ ,  $n = 6$ ; Anti-S396:  $p_1 = 0,399$ ,  $p_2 < 0,001$ ,  $n = 6$ .

#### 4.1.2 Detektion der APP-Expression und Amyloid $\beta$ -Bildung als Reaktion auf veränderte NMDA-Rezeptoraktivität.

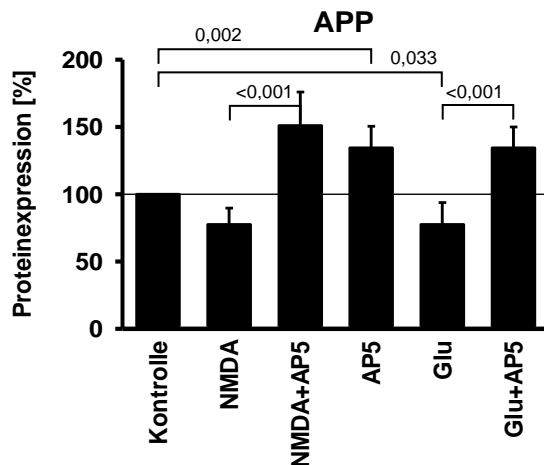
Die 4 h-Proben wurden neben der Tau-Phosphorylierung auch zur Analyse der APP-Expression und A $\beta$ -Peptid Bildung genutzt. Westernblot-Analysen zeigten, dass die Behandlung mit AP5 unter beiden  $\text{K}^+$ -Bedingungen zu einer deutlichen Induktion der APP-Expression führte (Abbildung 16A). Nicht näher zu identifizierende Schnittfragmente von APP zwischen 10-15 kDa und 20-30 kDa zeigten ebenfalls ein erhöhtes Aufkommen. In der Auswertung zeigte sich, dass die Behandlung mit AP5 in beiden  $\text{K}^+$ -Konzentrationen in der uweifaktoriellen ANOVA deutlich signifikant war:  $p_2 < 0,001$  (Abbildung 16B). Die Gabe der Agonisten zeigte hingegen keine signifikanten Auswirkungen auf die APP-Expression.



**Abbildung 16 Modulation der APP-Expression in kortikalen Neuronen nach NMDAR-Inhibition.**

**A.** Gezeigt ist der Nachweis von APP-Expressionsniveaus nach 4-stündiger Behandlung mit NMDA-Rezeptor-Agonisten (5  $\mu$ M NMDA oder Glutamat; Glu) oder -Antagonisten (100  $\mu$ M AP5). Der eingesetzte Antikörper richtete sich gegen die ersten zehn Aminosäuren der A $\beta$ -Sequenz. **B.** Quantitative Auswertung der Westernblot-Analysen mit  $n = 3$  biologischen Replikaten für jede der beiden Kalium-Bedingungen. Das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Alle in den Graphen gezeigten Signifikanzen resultieren aus Post-Hoc-Tests. Zweifaktorielle ANOVA-Signifikanzen: 2,5 mM K<sup>+</sup>:  $p_1 = 0,209$ ,  $p_2 < 0,001$ ,  $n = 3$ ; 27,5 mM K<sup>+</sup>:  $p_1 = 0,988$ ,  $p_2 < 0,001$ ,  $n = 3$ .

Da die verschiedenen  $K^+$ -Konzentrationen keine wesentlichen Unterschiede in der APP-Expression hervorriefen, wurden alle Ergebnisse auch noch einmal unabhängig von ihrer  $K^+$ -Bedingung zusammengefasst ( $n = 6$ ) und ausgewertet (Abbildung 17). Die signifikante Erhöhung der APP-Expression nach AP5-Zugabe, die sich bereits in den Einzelexperimenten in Abbildung 16 dokumentieren ließ, blieb bestehen und wies in weiterführenden Post-Hoc-Tests erhöhte Signifikanzen auf (Abbildung 17). Eine APP-Reduktion von  $>20\%$  durch die Behandlung mit Glutamat wurde nach der Zusammenfassung aller Ergebnisse ebenfalls signifikant (Post-Hoc-Test:  $p = 0,033$ ). Zusätzlich wurde mittels zweifaktorieller ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen der Agonisten- und Antagonisten-Behandlung ermittelt ( $p_{\text{Interaktion}} = 0,034$ ).

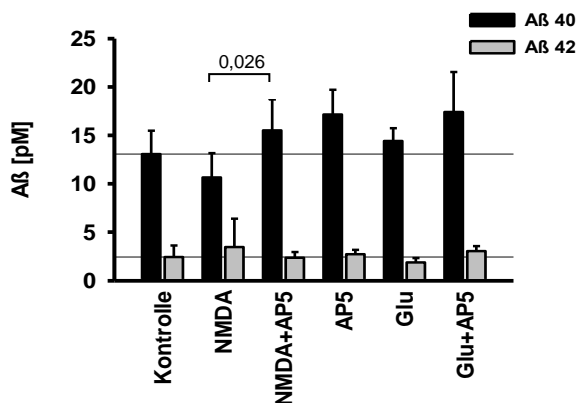


**Abbildung 17** Auswertung der APP-Expression unabhängig von der  $K^+$ -Konzentration *in vitro*.

Die per Westernblot analysierten APP-Expressionen aus den 2,5 mM und 27,5 mM  $K^+$ -Experimenten wurden zusammengefasst ( $n = 6$ ). Die statistische Auswertung zeigte zusätzlich zu einer zweifaktoriellen ANOVA-Signifikanz für die Anwesenheit des Antagonisten ( $p_2 < 0,001$ ) (Agonisten:  $p_1 = 0,270$ ) auch eine signifikante Interaktion der beiden Faktoren ( $p_{\text{Interaktion}} = 0,034$ ).

Zur Analyse der Amyloid  $\beta$ -Sekretion wurde der Zellkulturüberstand (Ringer-Salz-Lösung) nach 4-stündiger Behandlung verwendet. Die Messungen wurden mit ELISA-Kits durchgeführt, die spezifisch die endogene  $A\beta_{40}$ - beziehungsweise  $A\beta_{42}$ -Sequenz in Mäusen und Ratten erkennen. Die Auswertung der Ergebnisse ( $n = 6$ ,  $K^+$ -übergreifend) ergab eine signifikant erhöhte  $A\beta_{40}$ -Sekretion in den Überstand nach AP5-Behandlung (zweifaktorielle ANOVA  $A\beta_{40}$ :  $p_2 = 0,003$ ). Eine separate Auswertung der  $K^+$ -Konzentrationen führte zu keinen signifikanten Ergebnissen. Die Menge an löslichem  $A\beta_{42}$  im Überstand war jedoch weder durch die Behandlung mit Antagonist noch mit Agonisten signifikant beeinflusst ( $A\beta_{42}$ :  $p_1 = 0,784$ ,  $p_2 = 0,925$ ).

Insgesamt ist zu sehen, dass die sekretierte Konzentration von A $\beta$ <sub>40</sub> (pM) um ein Sechsfaches höher war, als die des A $\beta$ <sub>42</sub>.



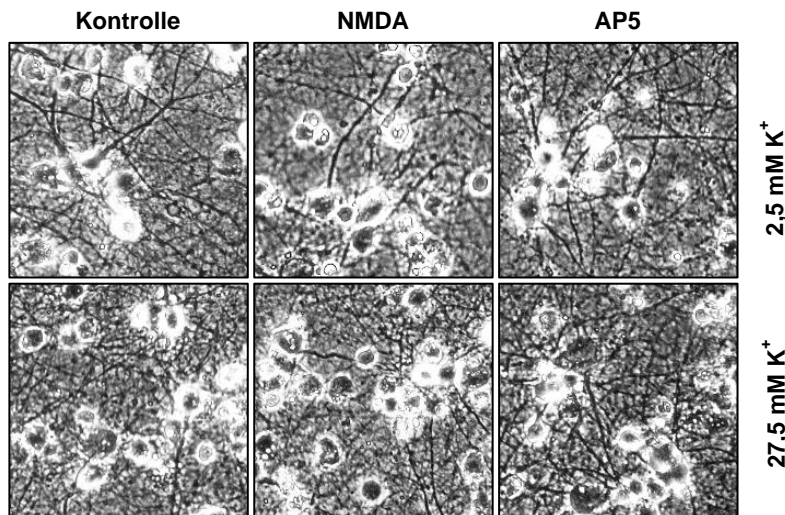
**Abbildung 18 Analyse der Amyloid  $\beta$ -Sekretion im Zellkulturüberstand nach 4-stündiger Behandlung.**

Analyse des sekretierten A $\beta$ <sub>40</sub>- und A $\beta$ <sub>42</sub>-Fragments aus dem Zellkulturüberstand (Ringer-Salz-Lösung) nach 4-stündiger Behandlung. Es wurden Maus/Ratten-spezifische ELISA-Kits von Wako Chemicals verwendet. Die Zellen wurden hierfür wie bereits in Abbildung 15 erwähnt behandelt. Die Ergebnisse der beiden K<sup>+</sup>-Bedingungen wurden als n = 6 im Graphen zusammengefasst. Zweifaktorielle ANOVA-Signifikanzen: A $\beta$ <sub>40</sub>: p<sub>1</sub> = 0,100, p<sub>2</sub> = 0,003, n = 6; A $\beta$ <sub>42</sub>: p<sub>1</sub> = 0,784, p<sub>2</sub> = 0,925, n = 6.

In den Experimenten zeigte sich, dass eine Inhibition der NMDA-Rezeptoren durch AP5 in primärer kortikaler Zellkultur sowohl zu einer signifikanten Erhöhung der Epitop-spezifischen Tau-Phosphorylierung als auch zur Induktion der APP-Expression und A $\beta$ <sub>40</sub>-Sekretion führte.

#### 4.1.3 Analyse der Zellmorphologie und Metabolismus-Rate *in vitro*.

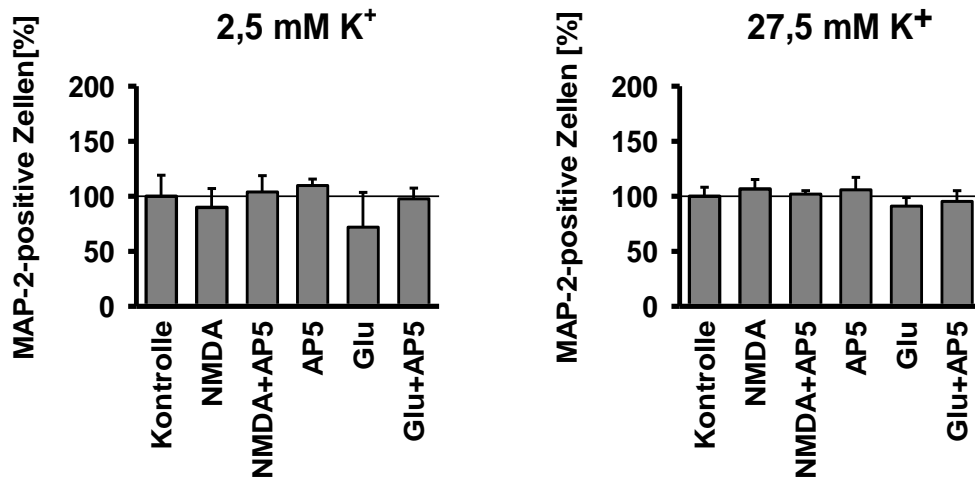
Zur Validierung dieser Ergebnisse wurden potenzielle zytotoxische Effekte und Veränderungen in der metabolischen Aktivität der Zellen während der Experimente dokumentiert. Eine Betrachtung der Zellmorphologie nach 4-stündiger Behandlung mit 5  $\mu$ M NMDA beziehungsweise 100  $\mu$ M AP5 wurde mittels mikroskopischer Aufnahmen durchgeführt (Abbildung 19). Die Aufnahmen wurden für beide Kaliumkonzentrationen angefertigt und mit der jeweiligen Vehikel-Gruppe verglichen. Optisch konnten keine morphologischen Veränderungen der unterschiedlich behandelten Zellen festgestellt werden (Abbildung 19). Auch der Vergleich zwischen der 2,5 mM K<sup>+</sup> und 27,5 mM K<sup>+</sup> Vehikel-Gruppe zeigte, dass durch eine erhöhte Kaliumkonzentration keine Zellstrukturanomalien entstanden waren (Abbildung 19).



**Abbildung 19 Mikroskopische Aufnahmen der Zellversuche nach 4 h-Behandlungen.**

Die Zellen wurden nach 4-stündiger Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  NMDA und 100  $\mu\text{M}$  AP5 mikroskopiert, um eventuelle morphologische Veränderungen oder Zelldegradierung zu registrieren. Verglichen wurden die Aufnahmen mit den Bildern der jeweiligen Vehikel-Gruppe nach 4-stündiger Inkubation mit Ringer-Salz-Lösung. Die Aufnahmen wurden für beide  $\text{K}^+$ -Konzentrationen angefertigt. Es wurden keine weiteren quantitativen Auswertungen der Bilder vorgenommen.

Für die Registrierung neuronenspezifischer Veränderungen oder veränderter Zellzahlen wurde eine Immunfärbung für das Neuronen-spezifische Protein MAP-2 (Mikrotubulus-assoziiertes-Protein 2) mit einer parallelen Zellkernfärbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff DAPI durchgeführt. Die MAP-2-positive Neuronen-Anzahl innerhalb eines mikroskopischen Bildausschnitts wurde auf die Anzahl der DAPI-positiven Kerne im jeweiligen Bild normiert. Der Anteil MAP-2-positiver Zellen im Vergleich zur Gesamtanzahl der Kerne (DAPI) wurde mit der jeweiligen Vehikel-Gruppe verglichen. Es wurden  $n = 4$  biologische Replikate angefertigt, die jeweils mit 3 Bildern pro Behandlung dokumentiert wurden. Die Auswertung bestätigte, dass nach vier Stunden unter hohen  $\text{K}^+$ -Bedingungen keine veränderte Neuronen-Anzahl durch die Behandlung mit einem Agonisten oder AP5 vorlag (Abbildung 20) (zweifaktorielle ANOVA: 27,5 mM  $\text{K}^+$ :  $p_1 = 0,075$ ;  $p_2 = 0,659$ ). Unter  $\text{K}^+$ -Normal-Bedingungen zeigte sich jedoch eine marginal erhöhte MAP-2-positive Zellzahl in den AP5-behandelten Gruppen mit einer zweifaktoriellen ANOVA-Signifikanz von  $p_2 = 0,039$ . In den Post-Hoc-Tests ergaben sich jedoch keine paarweisen Signifikanzen (Abbildung 20). Die mutmaßliche Ursache hierfür könnte in einem minimal besseren Überleben der Zellen unter AP5 gelegen haben, welches jene Exzitotoxizität effektiv blockiert.

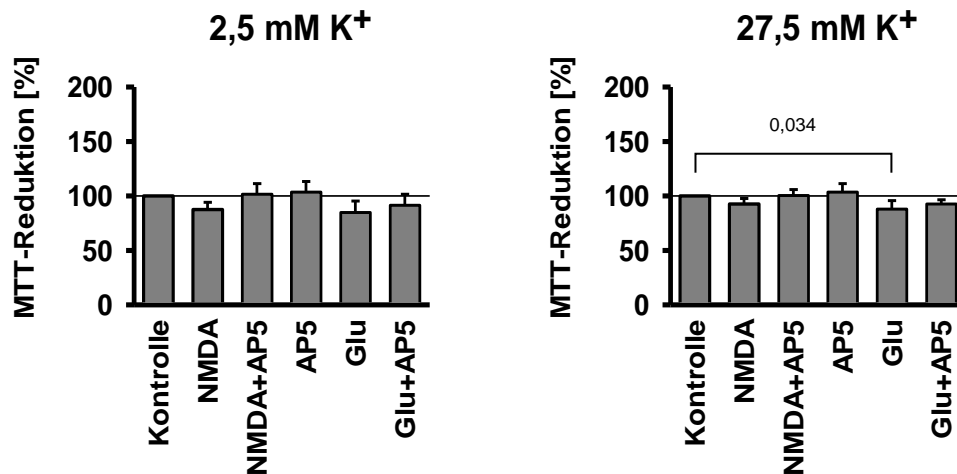


**Abbildung 20 Immunfluoreszenz-Färbung für den Neuron-spezifischen Marker MAP-2.**

Eine Immunfluoreszenz-Färbung für MAP-2 diente der Identifikation lebender Zellen nach der entsprechenden Behandlung für 4 h. Eine parallele DAPI-Färbung zeigte die Gesamtheit aller Zellkerne inklusive denen der Glia-Zellen. Für jedes der vier biologischen Replikate ( $n = 4$ ) wurden drei unterschiedliche Aufnahmen (technische Replikate,  $r = 3$ ) angefertigt und gemittelt. Die Neurone (MAP-2-positive Zellen) wurden gezählt und auf die Gesamtanzahl der Zellkerne (DAPI-positive Zellkerne) des jeweiligen Bildausschnitts normiert. ANOVA-Signifikanzen: 2,5 mM K<sup>+</sup>:  $p_1 = 0,110$ ,  $p_2 = 0,039$ ,  $n = 4$ ; 27,5 mM K<sup>+</sup>:  $p_1 = 0,075$ ,  $p_2 = 0,659$ ,  $n = 4$ .

Die metabolische Aktivität der 4 h behandelten Zellen wurde mit dem MTT-Reduktions-Test ermittelt. Metabolisch aktive Zellen reduzieren den Farbstoff MTT zu einem Formazan, das bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch gemessen werden kann. Es wurden für jede Behandlung  $n = 4$  biologische Replikate aus  $r = 5$  technischen Replikaten pro 96-Well-Platte generiert. Für beide Versuchsbedingungen zeigte sich, dass die Behandlung mit einem NMDAR-Agonisten zu einer signifikanten Erniedrigung der metabolischen Aktivität führte (Abbildung 21) (zweifaktorielle ANOVA-Signifikanzen: 2,5 mM K<sup>+</sup>:  $p_1 = 0,042$ ; 27,5 mM K<sup>+</sup>:  $p_1 = 0,009$ ). Die AP5-Behandlung erzeugte keine signifikante Veränderung der metabolischen Rate (Abbildung 21). Es ist nur eine minimale Exzitotoxizität zu sehen wie bereits in den Mikroskopiebildern in Abbildung 19 und der Auswertung MAP-2-positiver Zellen in Abbildung 20. Die Aktivität metabotoper Rezeptoren scheint keinen Einfluss auf die Metabolischerate im MTT-Test zu haben, da die Behandlung mit Glutamat tendenziell eher zu einer metabolischen Reduktion führte.

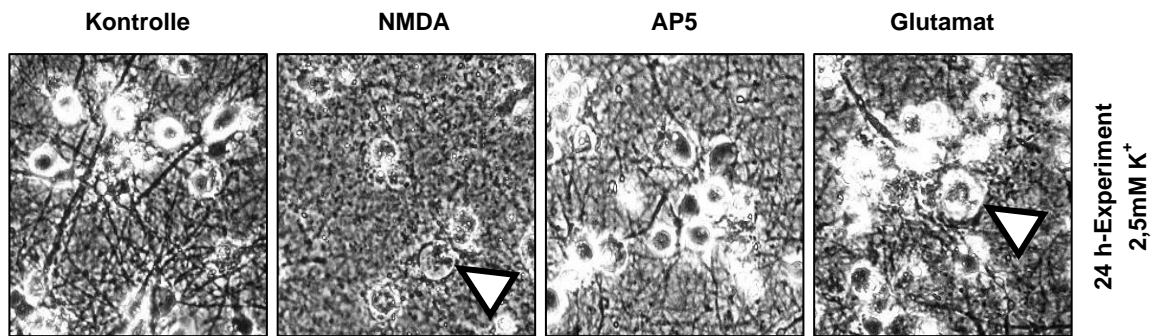




**Abbildung 21 Messung der metabolischen Rate *in vitro* durch MTT-Reduktion.**

Die metabolische Aktivität der neuronalen Zellen wurde anhand der Reduktionsrate von MTT gemessen. Jedes biologische Replikate ( $n = 4$ ) entstand aus fünf technischen Replikaten ( $r = 5$ ) innerhalb derselben 96-Well-Platte. Zweifaktorielle ANOVA-Signifikanzen: 2,5 mM K<sup>+</sup>:  $p_1 = 0,042$ ,  $p_2 = 0,067$ ,  $n = 4$ ; 27,5 mM K<sup>+</sup>:  $p_1 = 0,009$ ,  $p_2 = 0,063$ ,  $n = 4$ .

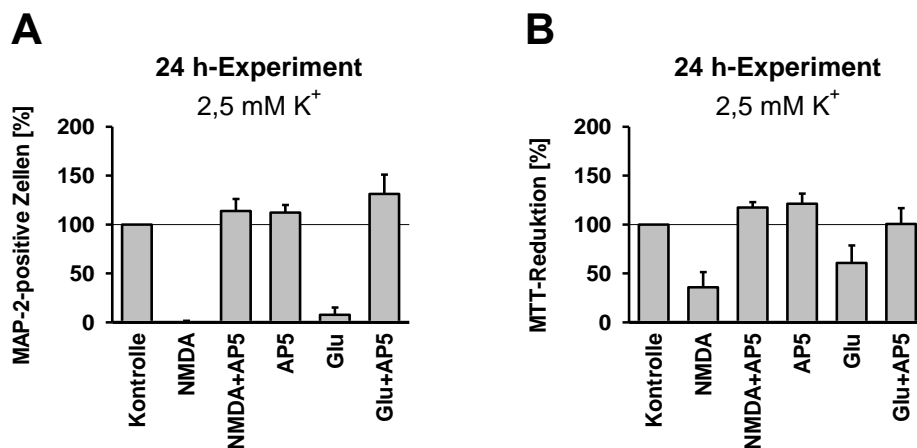
Zusätzlich zum 4 h-Zeitpunkt wurden ebenfalls Versuche mit einer Inkubationszeit von 24 h durchgeführt, um die Frage nach der Exzitotoxizität *in vitro* zu klären. Die Behandlung mit den NMDA-Rezeptor-Agonisten NMDA und Glutamat in Ringer-Salzlösung führte nach 24 h zu einer deutlichen Schädigung der Zellen (Abbildung 22). Unter der hohen Kaliumkonzentration (27,5 mM) kam es sowohl in den mit Agonisten behandelten Zellen als auch in der Kontroll-Gruppe zur fast vollständigen Zelldegradation. Die zusätzlich mit AP5 behandelten Zellen zeigten eine deutlich bessere Toleranz nach 24 h unter hohem Kaliumgehalt (keine mikroskopischen Aufnahmen vorhanden). Die Zellen, die unter normalen Kaliumbedingungen (2,5 mM) kultiviert wurden, sahen nach 24 h optisch intakter aus. Zellen, die jedoch mit NMDA oder Glutamat behandelt wurden, waren unter normalen Kalium-Konzentrationen ebenfalls in einem schlechten Zustand (Abbildung 22). Die dauerhaft stimulierte Rezeptor Öffnung durch das Fehlen von Magnesium und die Zugabe der Agonisten führte in den Zellen vermutlich zu einem übermäßigen Calcium-Einstrom und schließlich zum Zelltod durch Exzitotoxizität. Bekräftigt wird diese Annahme durch die sichtbare Vergrößerung des Zytoplasmas dieser Zellen (Pfeil in der NMDA- und Glutamat-Behandlung in Abbildung 22).



**Abbildung 22** Mikroskopische Aufnahmen der Zellen nach den 24 h-Experimenten.

Es wurden mikroskopische Phasen-Kontrast-Aufnahmen der Zellen nach den 24 h-Behandlungen gemacht. Die Zellen wurden 24 h in Ringer-Salz-Lösung unter normalen Kaliumbedingungen (2,5 mM) inkubiert. Es wurden Aufnahmen für alle Versuchsbedingungen angefertigt. Exemplarisch werden hier Ausschnitte für die Kontrolle, die beiden Agonisten-Behandlungen und die AP5-Behandlung gezeigt. Die Pfeile in der NMDA- und Glutamat-Aufnahme zeigen Zellen mit vergrößertem Zytosol.

Quantitative Tests der 24 h-Experimente zeigten, dass durch Agonisten-Behandlung die MAP-2-positiven Zellen zu fast 100% verschwanden und dass auch die metabolische Rate dieser Zellkulturen erheblich reduziert war. Die MTT-Reduktionsrate war um 65% beziehungsweise 40% in den NMDA- und Glutamat-Behandlungsgruppen reduziert. Die detektierte Restaktivität innerhalb der Agonisten-Gruppen könnte aus funktionellen Glia-Zellen resultieren.



**Abbildung 23** Dokumentation des *in vitro* Zellüberlebens und der metabolischen Rate nach 24 h Behandlung.

Die in Abbildung 12 beschriebenen Behandlungen wurden für 24 h durchgeführt. Das Zellüberleben und die metabolische Aktivität wurden für die 2,5 mM Kalium-Konzentration dokumentiert. **A.** Eine Immunfluoreszenz-Färbung für MAP-2 mit gleichzeitiger Zellkernfärbung mit DAPI wurde durchgeführt und quantifiziert (n = 4). **B.** Die metabolische Aktivität der Zellen wurde anhand ihrer MTT-Reduktion photometrisch gemessen und dokumentiert (n = 4). (Die Ergebnisse wurden aufgrund der sehr deutlichen Effekte nicht weiter statistisch analysiert.)

Die 24 h-Experimente wurden aufgrund der starken Anzeichen für Exzitotoxizität nicht weiter ausgewertet. Insbesondere wurden keine Tau/APP-Analysen angefertigt. Die sehr milden Veränderungen der 4 h-Experimente in der Neuronen-Anzahl (Abbildung 20) und der metabolischen Rate der Zellen (Abbildung 21) können hingegen aufgrund ihrer geringen Effektgrößen nicht die technische Ursache für die in Abbildung 15, Abbildung 17 und Abbildung 18 festgestellten deutlichen und signifikanten Expressions- und Phosphorylierungs-Effekte darstellen.

#### **4.2 Auswirkung kurzzeitiger *in vivo* NMDA-Rezeptor Inhibition in männlichen Wildtyp-Mäusen.**

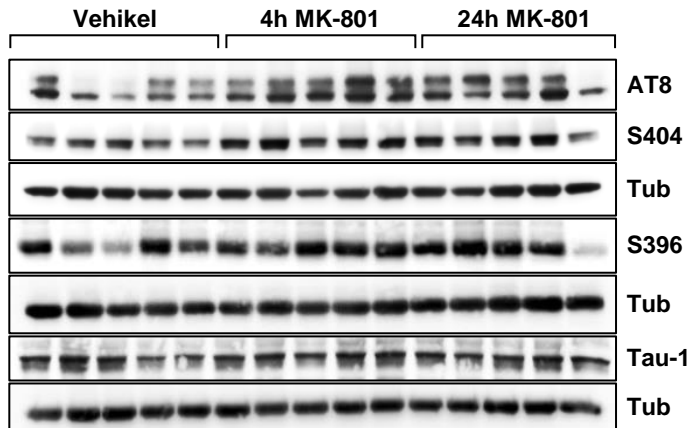
Die bereits *in vitro* analysierte Hypothese wurde auch in lebenden Säugern getestet. Hierfür wurden zehn Wochen alte, männliche Wildtypmäuse (C57BL/6Jrj, Black 6) der Firma Janvier (Paris, Frankreich) eingesetzt. Den Tieren wurde einmalig intraperitoneal 1,0 mg/kg des Gehirnschranken-gängigen NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 injiziert. Die Gehirngewebe wurden 4 h beziehungsweise 24 h nach der Injektion entnommen (zu entnehmen aus: Tabelle 6 Behandlungsübersicht). Die Behandlung und Tötung der Tiere wurde von der Firma QPS Austria GmbH (Grambach, Österreich) übernommen. Die Gehirngewebe wurden anschließend an uns (Universitätsmedizin Mainz) verschickt. Für die folgenden Analysen wurden definierte Gehirn-Regionen präpariert (Abbildung 13). Für statistische Tests wurde die einfaktorielle ANOVA angewendet.

##### **4.2.1 Untersuchung der Epitop-spezifischen *in vivo* Tau-Phosphorylierung 4 h und 24 h nach einmaliger MK-801-Behandlung.**

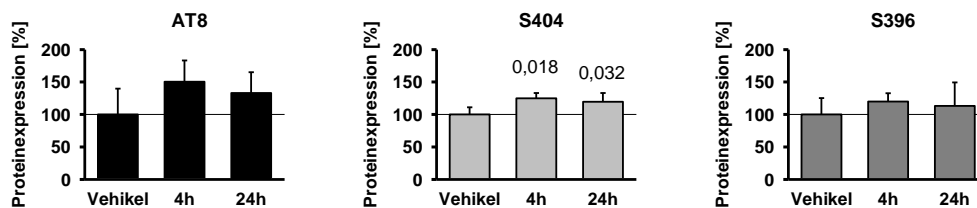
Eine Westernblot-Analyse der Gehirngewebe des Hippocampus (Abbildung 24), des Cortex (Abbildung 25) und des Thalamus (Abbildung 26) sollten Aufschluss über den Phosphorylierungsstatus spezifischer Epitope des Tau-Proteins aufzeigen. Es wurden die Alzheimer-assoziierten Epitope Serin 202/Threonin 205, Serin 404 und Serin 396 mit den spezifischen Antikörpern AT8, S404 und S396 mittels Westernblot getestet. Die Signale für phosphoryliertes Tau wurden auf ihre jeweilige Ladekontrolle (Tubulin) und anschließend auf das Proben-spezifische Gesamt-Tau normiert (Anti-Tau-1). Die Auswertung der Westernblot-Ergebnisse in Abbildung 24B belegt eine signifikante Induktion der Phosphorylierung des S404-Tau-Epitops im Hippocampus nach 4 h und 24 h (einfaktorielle ANOVA:  $p = 0,022$ ). Das S396-Epitop und die AT8-Epitope zeigten

in den Blots ebenfalls eine Tendenz zur Erhöhung (Abbildung 24A), diese erwies sich jedoch in der statistischen Auswertung als nicht signifikant (AT8:  $p = 0,163$ ; S396:  $p = 0,574$ , einfaktorielle ANOVA).

### A Hippocampus



### B

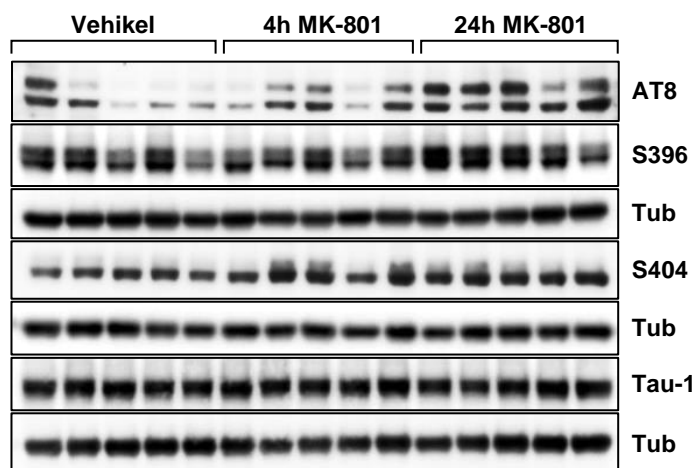


### Abbildung 24 Analyse der *in vivo* Tauphosphorylierung im Hippocampus männlicher Wildtypmäuse nach einmaliger MK-801-Injektion.

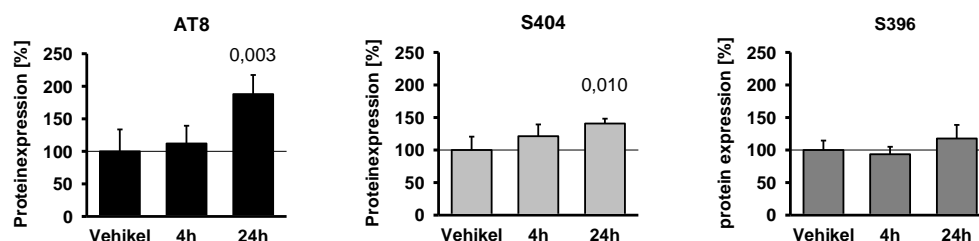
Zehn Wochen alte, männliche Black 6 Wildtyp-Mäuse ( $n = 7$ ) wurden einmalig mit 1,0 mg/kg des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 intraperitoneal injiziert. Der Kontrollgruppe (Vehikel,  $n = 7$ ) wurde Salzlösung injiziert. Die Gehirne dieser Mäuse wurden 4 h beziehungsweise 24 h nach der Behandlung (Vehikel ebenfalls 4 h) entnommen. **A.** Der Hippocampus wurde seziiert und auf spezifische Tau-Phosphorylierungen mittels Westernblot analysiert. Aufgrund der Anzahl (15 Stück) an Geltaschen wurden pro Gruppe nur  $n = 5$  Tiere getestet. Es wurden für alle Analysen immer die selben fünf Mäuse verwendet. **B.** Für die quantitative Auswertung wurden die Expressionssignale aller Antikörper auf das jeweilige Tubulin-Signal normiert. Anschließend wurden alle Phospho-Tau-Antikörper auf das Gesamt-Tau (Tau-1) bezogen. Statistische Evaluationen für diese und alle folgenden Maus-Experimente wurden mittels einfaktorieller ANOVA durchgeführt. Die in der Abbildung gezeigten Signifikanzen resultieren aus Post-Hoc-Tests und beziehen sich auf den Vergleich mit der Vehikel-Gruppe. Einfaktorielle ANOVA-Signifikanzen: Anti-AT8:  $p = 0,163$ ; Anti-S404:  $p = 0,022$ ; Anti-S396:  $p = 0,574$ .

Die Untersuchung des Cortex bestätigte hier ebenfalls eine signifikant erhöhte Phosphorylierung des S404-Epitops um 40% im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (einfaktorielle ANOVA:  $p = 0,016$ ) (Abbildung 25B). Zusätzlich war die Phosphorylierung der beiden AT8-Epitope um  $> 80\%$  angestiegen (einfaktorielle ANOVA:  $p = 0,003$ ). Für das S396-Epitop wurden keine signifikanten Veränderungen dokumentiert. Die durch exzitatorische Insuffizienz erhöhten Tau-Phosphorylierungen im Cortex fanden ausschließlich 24 h nach der MK-801-Injektion statt (Abbildung 25B). Der Hippocampus hingegen wies bereits nach 4 Stunden eine signifikante Modulation für S404 auf (Abbildung 24B).

### A Cortex



### B

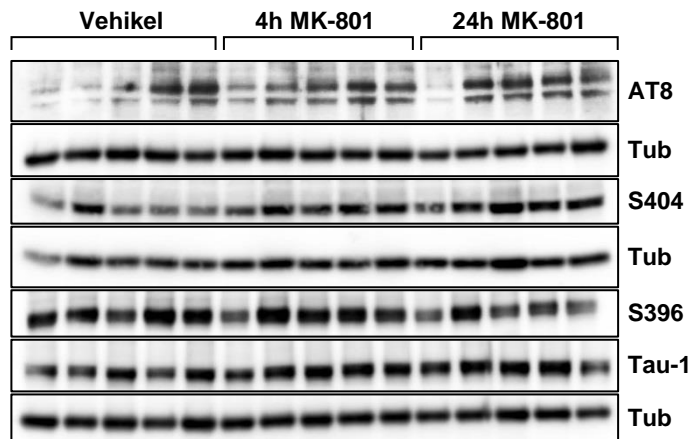


**Abbildung 25 Analyse der *in vivo* Tau-Phosphorylierung im Cortex männlicher Wildtyp-Mäuse nach einmaliger MK-801-Injektion.**

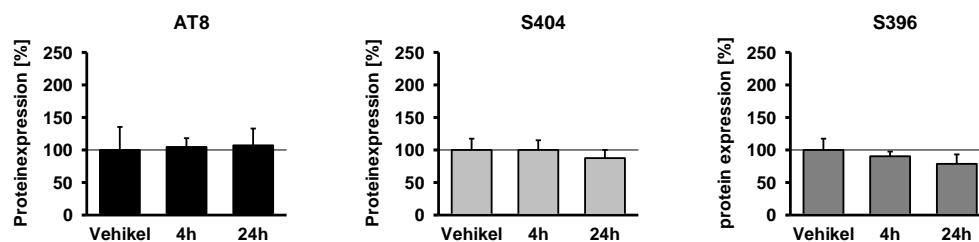
**A.** Der Cortex wurde seziiert und auf spezifische Tau-Phosphorylierungen mittels Westernblot analysiert. **B.** Die in der quantitativen Auswertung gezeigten Signifikanzen resultieren aus Post-Hoc-Tests und beziehen sich auf den Vergleich mit der Vehikel-Gruppe. Das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Einfaktorielle ANOVA-Signifikanzen: Anti-AT8:  $p = 0,003$ ; Anti-S404:  $p = 0,016$ ; Anti-S396:  $p = 0,134$ .

Als zusätzliches Gewebe wurde der Thalamus analysiert (Abbildung 26A). Bei der Präparation wurde sowohl der Bereich des eigentlichen Thalamus, als auch der Bereich des Hypothalamus gemeinsam seziiert und unter dem Begriff „Thalamus“ zusammengefasst (Abbildung 13). Der Thalamus zeigte keine signifikanten Veränderungen in den drei untersuchten Phospho-Tau-Epitopen (Abbildung 26B).

### A Thalamus



### B



**Abbildung 26** Analyse der *in vivo* Tau-Phosphorylierung im Thalamus männlicher Wildtyp-Mäuse nach einmaliger MK-801-Injektion.

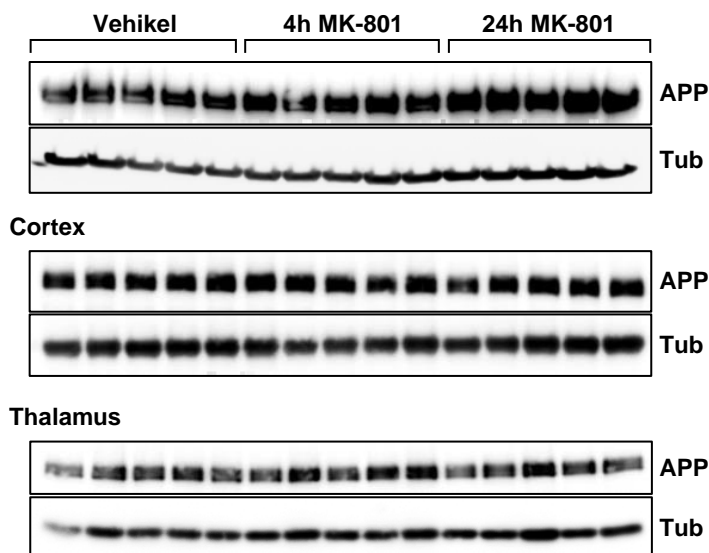
**A.** Der Thalamus wurde seziiert und auf spezifische Tau-Phosphorylierungen mittels Westernblot analysiert. **B.** Die in der quantitativen Auswertung gezeigten Signifikanzen resultieren aus Post-Hoc-Tests und beziehen sich auf den Vergleich mit der Vehikel-Gruppe.  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Einfaktorielle ANOVA-Signifikanzen: Anti-AT8:  $p = 0,935$ ; Anti-S404:  $p = 0,353$ ; Anti-S396:  $p = 0,126$ .

Zusammengefasst zeigt die Auswertung der Westernblot-Ergebnisse, dass die Inhibition der NMDA-Rezeptoraktivität durch eine einmalige MK-801-Injektion in männlichen Mäusen zu einer signifikanten gewebs- und epitop-spezifischen Induktion der Tau-Phosphorylierung führte. Der Thalamus schien in einem Zeitraum von 4 bis 24 h davon nicht betroffen zu sein. Der Cortex wies im Vergleich zum Hippocampus eine verzögerte Reaktion erst zum späteren 24 h-Messzeitpunkt auf.

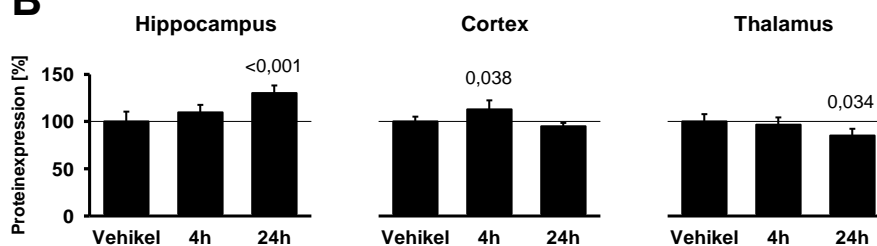
#### 4.2.2 *In vivo* Expressions-Analysen von APP und APP-assoziierten Proteinen in männlichen Mäusen nach einmaliger MK-801-Injektion.

Zusätzlich zur Tau-Analyse wurden die generierten Proben auch hinsichtlich der Expression von APP untersucht (Abbildung 27A). In der Auswertung (Abbildung 27B) war 24 h nach der MK-801-Behandlung ein signifikanter Anstieg der APP-Expression im Hippocampus zu registrieren (einfaktorielle ANOVA:  $p = 0,001$ ). Im Cortex war eine signifikante zeitabhängige Modulation mit einem Anstieg nach 4 h zu sehen, der sich nach 24 h wieder auf das Basisniveau der APP-Expression einstellte ( $p = 0,007$ ). Der Thalamus reagierte nach 24 h mit einer signifikanten Reduktion von APP als Antwort auf die MK-801-Behandlung ( $p = 0,041$ ).

##### A Hippocampus



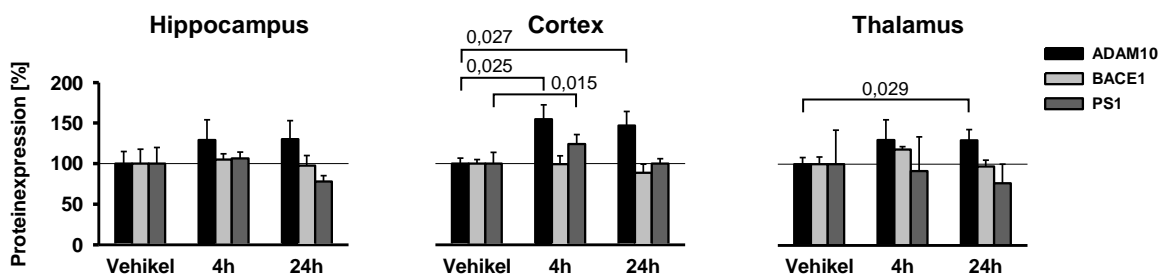
##### B



**Abbildung 27** Messung der gewebspezifischen APP-Expression in männlichen Mäusen nach einmaliger MK-801 Injektion.

**A.** Gezeigt ist die Westernblot-Analyse der APP-Expression in drei unterschiedlichen Hirnregionen. Die Proben entsprechen denen der bereits gezeigten Tau-Phosphorylierungsanalysen. **B.** Für die Auswertung der Westernblot-Ergebnisse wurden alle Signale auf die jeweilige Ladekontrolle (Tubulin, Tub) normiert. Einfaktorielle ANOVA-Signifikanzen: Hippocampus:  $p = 0,001$ ,  $n = 5$ ; Cortex:  $p = 0,007$ ,  $n = 5$ ; Thalamus:  $p = 0,041$ ,  $n = 5$ .

Weiterhin wurde die Expression der beiden APP-assoziierten Sekretasen ADAM10 und BACE1 sowie der  $\gamma$ -Sekretase-Komponente Presenilin-1 (PS1) untersucht (Abbildung 28). Die Metalloprotease ADAM10 reagierte im Cortex und Thalamus mit einer signifikanten Hochregulation um bis zu 55% (einfaktorielle ANOVA: Cortex:  $p = 0,026$ ; Thalamus:  $p = 0,043$ ). In paarweisen Post-Hoc-Tests ergab sich für beide getesteten Zeitpunkte ein signifikanter Anstieg im Vergleich zum basalen Niveau (Vehikel-Gruppe) im Cortex. Im Thalamus stieg die ADAM10-Expression erst 24 h nach der Medikamentengabe signifikant an (Abbildung 28). Für den Hippocampus war eine ähnliche Tendenz zu erkennen, die jedoch nach statistischer Auswertung nicht signifikant war. Die  $\beta$ -Sekretase BACE1 blieb in allen Geweben zu beiden Zeitpunkten unverändert. Presenilin-1 (PS1) ist neben Nicastrin und dem Stabilisationsfaktor APH-1 eine wichtige Untereinheit des Proteinkomplexes der  $\gamma$ -Sekretase. In den analysierten Westernblots zeigte sich, dass PS1 im Hippocampus und Cortex signifikant moduliert war (Hippocampus:  $p = 0,023$ ; Cortex:  $p = 0,010$ ). In den Post-Hoc-Tests ergab sich eine reversible PS1-Induktion im Cortex nach 4 h (Abbildung 28). Der Thalamus zeigte ebenso wie der Hippocampus eine nicht-signifikante, tendenzielle Reduktion von PS1 24 h nach der induzierten NMDA-Rezeptor Blockade.



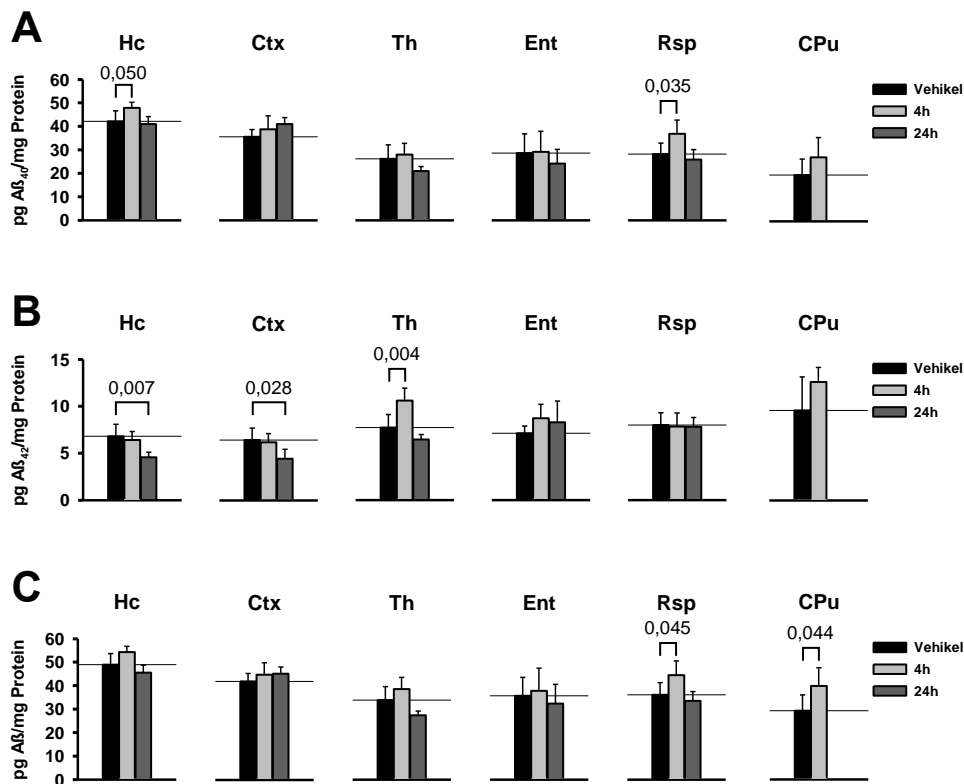
**Abbildung 28 Analyse der gewebsspezifischen Expression APP-assoziiierter Proteine.**

Mit der Westernblot-Methode wurden die APP-prozessierenden Sekretasen ADAM10 und BACE1 sowie die  $\gamma$ -Sekretase-Komponente Presenilin-1 (PS1) untersucht. Gezeigt ist eine quantitative Auswertung ( $n = 5$ ) mit den aus Post-Hoc-Tests resultierenden Signifikanzen ( $p \leq 0,05$ ). Als Ladekontrolle für BACE1 wurde Aktin verwendet; ansonsten wurde wie in allen vorangegangenen Experimenten Tubulin herangezogen. ANOVA-Signifikanzen: Anti-ADAM10: Hippocampus:  $p = 0,114$ ; Cortex:  $p = 0,026$ ; Thalamus:  $p = 0,043$ ; Anti-BACE1: Hippocampus:  $p = 0,722$ ; Cortex:  $p = 0,171$ ; Thalamus:  $p = 0,218$ ; Anti-PS1: Hippocampus:  $p = 0,023$ ; Cortex:  $p = 0,010$ ; Thalamus:  $p = 0,671$ . Alle statistischen Auswertungen wurden mit  $n = 5$  Mäusen pro Gruppe durchgeführt.



#### 4.2.3 Messung der Amyloid $\beta$ -Bildung als Reaktion auf NMDA-Rezeptor-Insuffizienz *in vivo*.

Neben der Expression von APP und dessen assoziierten Sekretasen war auch die Bildung des Amyloid  $\beta$ -Peptids interessant. Die Gewebe wurden daher mit spezifischen ELISAs auf ihre Menge an löslichem endogenen Amyloid  $\beta_{40}$  ( $A\beta_{40}$ ) und Amyloid  $\beta_{42}$  ( $A\beta_{42}$ ) untersucht. Dieses Peptid geht aus der APP-Prozessierung durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase hervor und ist im Prozess der Alzheimerschen Krankheit von Bedeutung, da er zur Aggregation neigt und so die Alzheimer-typischen Plaques bildet. Neben den bereits getesteten Geweben des Hippocampus, Cortex und Thalamus wurden vier weitere Gehirnregionen der MK-801-behandelten Mäuse analysiert. Der Entorhinale Cortex (Ent), der Retrospleniale Cortex (Rsp) und der N. Caudatus und Putamen (CPu) wurden zusätzlich betrachtet, wobei für das CPu nur der 4 h-Zeitpunkt getestet werden konnte. Für die Menge an löslichem  $A\beta_{40}$  (Abbildung 29A) zeigte sich, dass eine signifikante zeitabhängige Modulation im Hippocampus und im retrosplenialen Cortex stattfand (Hc:  $p = 0,029$ ; Rsp:  $p = 0,016$ ). Es war ein signifikanter, aber reversibler  $A\beta_{40}$ -Anstieg nach 4 h zu erkennen (Abbildung 29A), der nach 24 h wieder auf dem basalen Niveau beziehungsweise im Rsp sogar etwas darunter lag. In der Betrachtung der  $A\beta_{42}$ -Ergebnisse in Abbildung 29B fällt auf, dass eine signifikante Modulation im Hippocampus, Cortex und Thalamus stattfand (Hc:  $p = 0,010$ ; Ctx:  $p = 0,034$ ; Th:  $p < 0,001$ ). Der Hippocampus und Cortex zeigten für die Messung nach 24 h eine signifikante Reduktion der löslichen  $A\beta_{42}$ -Menge (pg/mg Gesamtprotein). Der Thalamus hingegen wies eine signifikante Induktion nach 4 h auf, die nach 24 h wieder bis unter das Basalniveau sank (Abbildung 29B). Die Zusammenfassung beider  $A\beta$ -Auswertungen in Abbildung 29C wurde pro Maus berechnet. Der Hippocampus, der Thalamus und der retrospleniale Cortex waren signifikant moduliert (einfaktorielle ANOVA: Hc:  $p = 0,015$ ; Th:  $p = 0,014$ ; Rsp:  $p = 0,019$ ). Das Caudate/Putamen verzeichnete nach 4 h eine signifikante Erhöhung des Gesamt- $A\beta$  als Reaktion auf die Inhibition der NMDA-Rezeptoren (Abbildung 29C).



**Abbildung 29** Messung der gewebspezifischen Amyloid  $\beta$ -Sekretion in männlichen Mäusen nach einmaliger MK-801-Injektion.

Proben verschiedener Hirnregionen (Hippocampus: Hc, Cortex: Ctx, Thalamus: Th, Entorhinaler Cortex: Ent, Retroplenialer Cortex: Rsp, N. Caudatus und Putamen: CPu) wurden mittels spezifischer ELISAs auf ihre Menge an löslichem  $A\beta$  (pg/mg Protein) untersucht. Zuvor wurde das SDS der jeweiligen Proben durch eine Säule (Hc) beziehungsweise durch eine KDS-Fällung mit KCl (Ctx, Th, Ent, Rsp und CPu) entfernt. **A.** Die Menge an  $A\beta_{40}$  für Vehikel ( $n = 7$ ) sowie 4 h und 24 h nach Behandlung ( $n = 5$ ) wurde quantifiziert und mittels einfaktorieller ANOVA statistisch ausgewertet. Alle in der Abbildung gezeigten Signifikanzen stammen aus paarweisen Post-Hoc-Tests versus die Vehikel-Gruppe. ANOVA-Signifikanzen: Hc:  $p = 0,029$ ; Ctx:  $p = 0,136$ ; Th:  $p = 0,111$ ; Ent:  $p = 0,597$ ; Rsp:  $p = 0,016$ ; CPu:  $p = 0,149$ . Der 24 h Zeitpunkt wurde für CPu nicht getestet. **B.** Es wurde ein zweiter spezifischer ELISA verwendet, um die Menge an  $A\beta_{42}$  (pg/mg Protein) in denselben Proben zu ermitteln. ANOVA-Signifikanzen: Hc:  $p = 0,010$ ; Ctx:  $p = 0,034$ ; Th:  $p < 0,001$ ; Ent:  $p = 0,266$ ; Rsp:  $p = 0,966$ ; CPu:  $p = 0,135$ . **C.** Die Auswirkungen der MK-801-Behandlung auf das Gesamt- $A\beta$ -Level sind gezeigt. Die Mengen an  $A\beta_{40}$  und  $A\beta_{42}$  wurden pro Maus addiert und dargestellt (pg/mg Protein). Die statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA ergab folgende Signifikanzen: Hc:  $p = 0,015$ ; Ctx:  $p = 0,340$ ; Th:  $p = 0,014$ ; Ent:  $p = 0,661$ ; Rsp:  $p = 0,019$ ; CPu:  $p = 0,044$ .

Zusammenfassend zeigen die Auswertungen, dass die Sekretion von  $A\beta_{40}$  und  $A\beta_{42}$  eine regionsspezifische, MK-801-induzierte Modulation *in vivo* aufwies. Nach 4 Stunden war in einigen Geweberegionen eine signifikante Induktion zu registrieren, die in allen Fällen (CPu wurde nicht gemessen) nach 24 h reversibel war oder sogar unter das Basalniveau des Vehikels fiel. Möglicherweise geben diese Daten einen Hinweis auf eine

schnelle und kurzzeitige Funktion von A $\beta$ , die durch den NMDAR-Antagonismus induziert wird.

### **4.3 Untersuchung biochemischer Veränderungen durch subchronische NMDA-Rezeptor-Inhibition *in vivo*.**

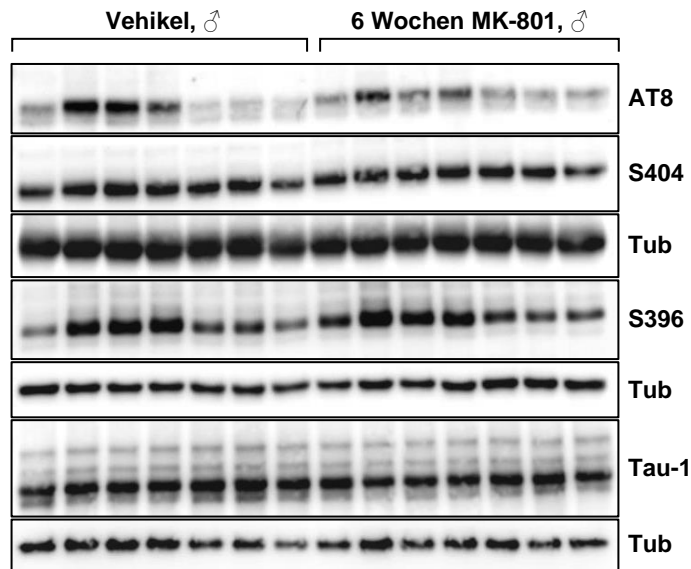
Einige weitere *in vivo* Experimente wurden durchgeführt, um zu testen, welche Auswirkungen eine subchronische Hemmung der exzitatorischen Neurotransmission auf Alzheimer-assoziierte Proteine haben könnte. Eine Langzeitbehandlung mit drei Injektionen pro Woche (Mo, Mi, Fr) wurde mit weiblichen und männlichen Mäusen für 6 oder 12 Wochen mit 1,0 oder 0,2 mg/kg MK-801 durchgeführt (Tabelle 7 ). Die Gewebe wurden 24 h nach der letzten Injektion präpariert, um sicherzustellen, dass die Substanz zu diesem Zeitpunkt bereits eliminiert war und akute Effekte damit ausgeschlossen werden können. Untersuchungen zu den kinetischen Eigenschaften von MK-801 in Ratten haben gezeigt, dass die Plasmakonzentration nach einer Injektion (2 mg/kg) ihr Maximum nach 10-30 min hat und die Substanz mit einer Halbwertszeit von  $\sim$ 2 h eliminiert wird (Vezzani et al., 1989). Im Unterschied zu den vorherigen *in vivo*-Proben wurden die Mausgehirne für die folgenden Analysen in nur vier Gewebe unterteilt. Jeweils die linke Gehirnhälfte wurde hierzu unter einem Binokular in Cerebellum, Thalamus, Hippocampus und Cortex zerlegt (Abbildung 14). Die lysierten Gewebe wurden wie die vorangegangenen Proben auf Tau-Phosphorylierung, APP-Expression und die Expression der APP-Sekretasen untersucht.

#### **4.3.1 Auswirkungen subchronischer Inhibition der NMDA-Rezeptoren auf die Expression Alzheimer-assoziiierter Proteine in männlichen Mäusen.**

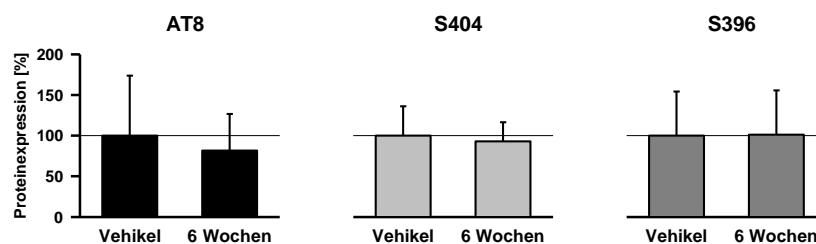
Männliche, 16 Wochen alte Mäuse wurden für 6 Wochen behandelt (6 w ♂), wobei drei Injektionen pro Woche (insgesamt 18) mit 1,0 mg/kg MK-801 verabreicht wurden. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe war  $n = 8$ . Aus Platzgründen wurden im Elektrophorese-Gel jeweils sieben der acht Proben analysiert. Die Gewebe des Hippocampus (Abbildung 30) und Cortex (Abbildung 31) wurden mittels Westernblot auf veränderte Tau-Phosphorylierung untersucht. Die Auswertungen der Westernblot-Experimente zeigten, dass nach 6 Wochen sowohl im Hippocampus (Abbildung 30B) als auch im Cortex (Abbildung 31) keine signifikanten Veränderungen der Phosphorylierung induziert waren (ANOVA-Signifikanzen: Hippocampus: Anti-AT8:  $p = 0,544$ , Anti-S404:

p = 0658, Anti-S396: p = 0,968; Cortex: Anti-AT8: p = 0,774, Anti-S404: p = 0384). Der Anti-S396-Antikörper wurde in den Westernblot-Analysen des Cortex nicht getestet.

### A Hippocampus

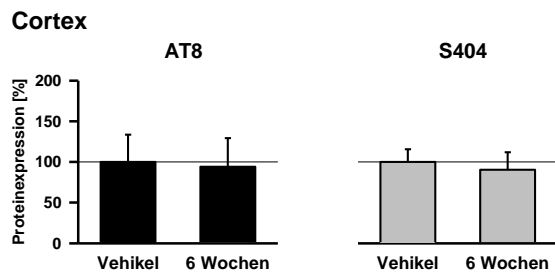


### B



**Abbildung 30 Hippocampale Phosphorylierung von Tau *in vivo* nach 6-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.**

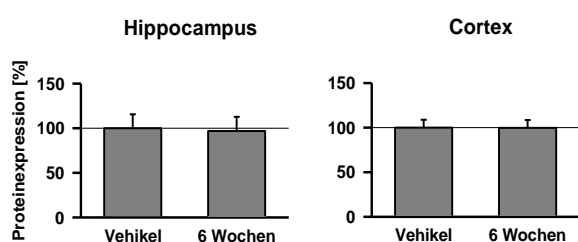
Männlichen Mäusen wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen dreimal wöchentlich (Mo, Mi, Fr) 1,0 mg/kg MK-801 injiziert (insgesamt 18 Injektionen). Die Vehikel-Gruppe wurde im selben Intervall mit einer Salzlösung behandelt. Die Gehirne wurden 24 h nach der letzten Injektion entnommen. **A.** Das Gewebe des Hippocampus wurde separiert und mittels Westernblot analysiert. Gezeigt sind die Signale der Phospho-spezifischen Antikörper (AT8, S404 und S396) und von Tau-1 mit den jeweiligen Tubulin-Ladekontrollen für die Vehikel- und MK-801-behandelte Gruppe (6 Wochen) mit jeweils n = 7. **B.** Die Westernblot-Ergebnisse wurden mittels einfaktorier ANOVA statistisch evaluiert. Für die quantitative Auswertung wurden die Phospho-Tau-Werte auf die jeweiligen Gesamt-Tau-Ergebnisse (Tau-1) normiert. Hippocampus: Anti-AT8: p = 0,544; Anti-S404: p = 0658; Anti-S396: p = 0,968; n = 7.



**Abbildung 31 Korticale Phosphorylierung von Tau *in vivo* nach 6-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.**

Das Gewebe des Cortex wurde separiert und mittels Westernblot analysiert. Die Westernblot-Ergebnisse wurden mittels einfaktorieller ANOVA statistisch evaluiert. Für die quantitative Auswertung wurden die Phospho-Tau-Werte auf die jeweiligen Gesamt-Tau-Ergebnisse (Tau-1) normiert. Das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Cortex: Anti-AT8:  $p = 0,774$ , Anti-S404:  $p = 0,384$ ;  $n = 7$ . Der Anti-S396 Antikörper wurde im Cortex nicht getestet.

Die weitere Analyse der APP-Expression ergab, dass durch die subchronische NMDAR-Insuffizienz ebenfalls keine Modulation der APP-Expression induziert wurde (Abbildung 32). Weder der Hippocampus noch der Cortex zeigten in der einfaktoriellen ANOVA eine signifikante Veränderung (Hippocampus:  $p = 0,718$ ; Cortex:  $p = 0,931$ ). Die Tau- und APP-Ergebnisse könnten eine Habituation der männlichen Mäuse an die wiederholte MK-801-vermittelte Rezeptorblockade innerhalb der 6-wöchigen Behandlung anzeigen oder einen anderen Unterschied zwischen der *in vivo* Situation und der Zellkultur.

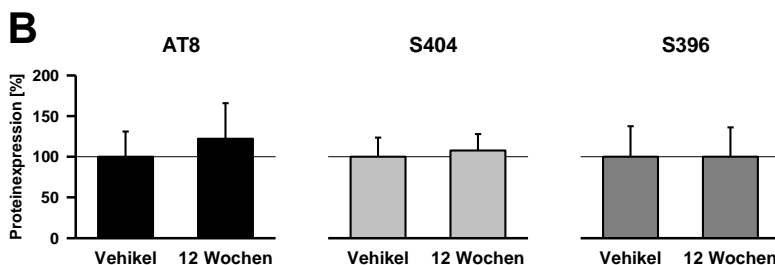
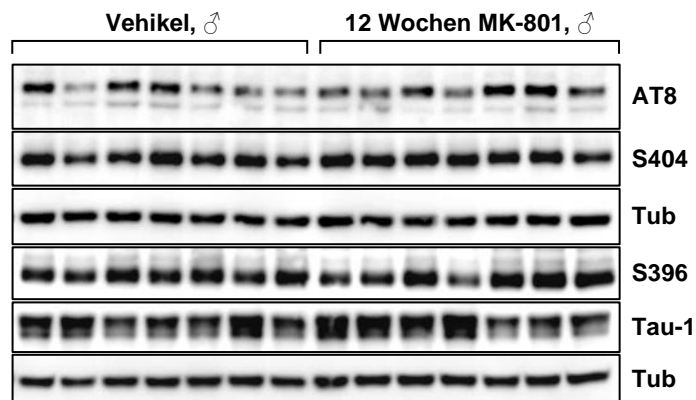


**Abbildung 32 *In vivo* APP-Expression nach 6-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.**

Die Gewebe des Hippocampus und Cortex wurden auf ihre Expression von APP mittels Westernblot analysiert. Das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mittels einfaktorieller ANOVA statistisch evaluiert. Hippocampus:  $p = 0,718$ ;  $n = 7$ ; Cortex:  $p = 0,931$ ;  $n = 7$ .

Um dies näher zu untersuchen wurde eine zweite Gruppe männlicher Mäuse (bei Start 10 Wochen alt) für 12 Wochen im selben Intervall mit MK-801 behandelt (12 w ♂). Die Tiere bekamen somit insgesamt 36 Injektionen mit jeweils 1,0 mg/kg MK-801. Auch die verlängerte Behandlungszeit (12 Wochen) zeigte im hippocampalen Gewebe keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung der getesteten Tau-Epitope (Abbildung 33A). Die statistische Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA ergab ebenfalls keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 33B) (ANOVA-Signifikanzen: Anti-AT8:  $p = 0,335$ ; Anti-S404:  $p = 0,554$ ; Anti-S396:  $p = 0,996$ ).

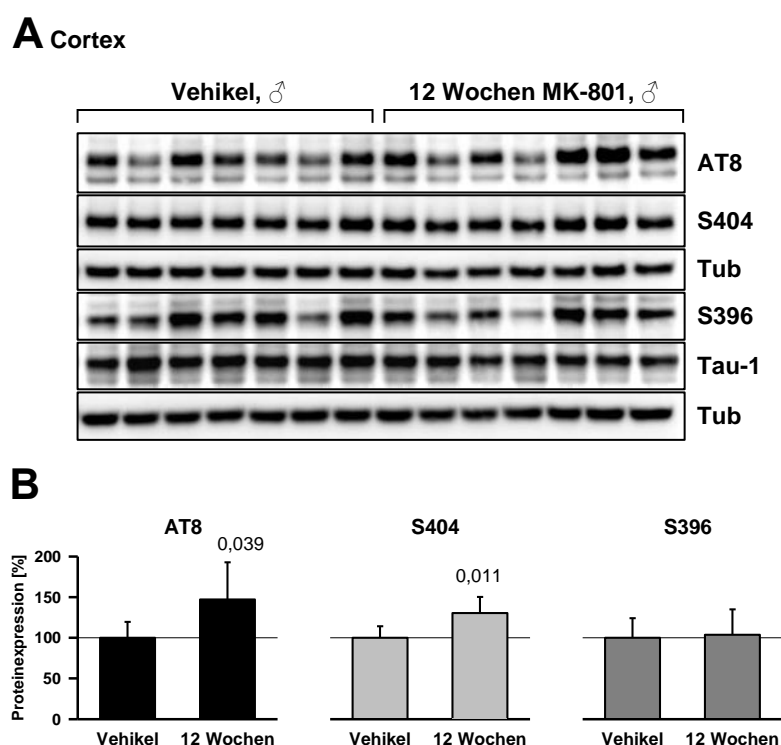
### A Hippocampus



**Abbildung 33 Hippocampale *in vivo* Phosphorylierung von Tau nach 12-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.**

Männliche Mäusen wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen dreimal wöchentlich (Mo, Mi, Fr) mit 1,0 mg/kg MK-801 injiziert (insgesamt 36 Injektionen). Die Vehikel-Gruppe wurde im selben Intervall mit einer Salzlösung behandelt. **A.** Das Gewebe des Hippocampus wurde mittels Westernblot analysiert ( $n = 7$ ). Die Signale der Phospho-spezifischen Antikörper (S404, S396 und AT8) und von Tau-1 sind gezeigt. Tubulin wurde als Ladekontrollen verwendet. **B.** Die Westernblot-Ergebnisse wurden mit einfaktorieller ANOVA statistisch evaluiert. Die Phospho-Tau-Werte wurden auf das jeweilige Gesamt-Tau (Tau-1) normiert. Hippocampus: Anti-AT8:  $p = 0,335$ ; Anti-S404:  $p = 0,554$ ; Anti-S396:  $p = 0,996$ .

Die Untersuchung der Tau-Phosphorylierung im Cortex zeigte hingegen Veränderungen durch die Inhibition der exzitatorischen Neurotransmission (Abbildung 34A). Die subchronische MK-801-Behandlung führte bei diesen Tieren innerhalb von 12 Wochen zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung des AT8-Epitops um 47% und des S404-Epitops um 30% im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (Abbildung 34B) (ANOVA-Signifikanz: Anti-AT8:  $p = 0,039$ ; Anti-S404:  $p = 0,011$ ). Der Anti-S396-Antikörper konnte keine statistisch relevante Modulation ( $p = 0,819$ ) erkennen (Abbildung 34B).

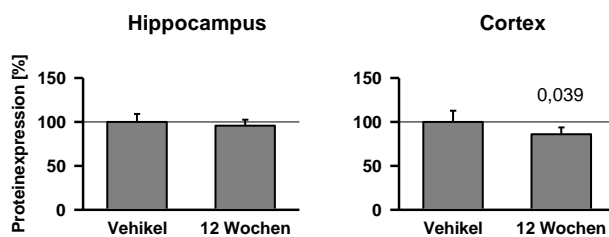


**Abbildung 34** Kortikale *in vivo* Tau-Phosphorylierung nach 12-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.

**A.** Das Gewebe des Cortex wurde mittels Westernblot analysiert. Gezeigt sind die Signale der Phosphospezifischen Antikörper (S404, S396 und AT8) und von Tau-1 mit den jeweiligen Tubulin-Ladepkontrollen für die Vehikel- und MK-801-behandelte Gruppe (12 Wochen) mit jeweils  $n = 7$ . **B.** Die Westernblot-Ergebnisse wurden mittels einfaktorieller ANOVA statistisch evaluiert. Für die quantitative Auswertung wurden die Phospho-Tau-Werte auf die jeweiligen Gesamt-Tau-Ergebnisse (Tau-1) normiert. Cortex: Anti-AT8:  $p = 0,039$ ; Anti-S404:  $p = 0,011$ ; Anti-S396:  $p = 0,819$ .

Weitere Westernblot-Analysen dokumentierten, dass es keine hippocampale Veränderung in der Expression von APP gab, wohingegen jedoch die kortikale APP-Expression nach 12-wöchiger MK-801-Behandlung um ~15% signifikant reduziert war (Abbildung 35) (Hippocampus:  $p = 0,362$ ; Cortex:  $p = 0,039$ ;  $n=7$ ).

Die Ergebnisse der 12-Wochen-Behandlung legen nahe, dass es im Zuge der 6-wöchigen Behandlung eine Habituation gab, die jedoch nicht völlig beständig war. Eine längere Inhibition der NMDA-Rezeptoren führte zumindest im Cortex nach 12 Wochen zu einer signifikanten Induktion der spezifischen Tau-Phosphorylierung. Der Cortex schien auch in der Modulation der APP-Expression stärker betroffen zu sein, als das getestete hippocampale Gewebe.



**Abbildung 35** *In vivo* APP-Expression nach 12-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.

Die 12 Wochen behandelten Mäuse wurden auf ihre gewebsspezifische APP-Expression hin untersucht. Es wurden Westernblots für den Hippocampus und Cortex angefertigt. Als Ladekontrolle diente ein Anti-Tubulin-Antikörper. Die Westernblot-Ergebnisse wurden mittels einfaktorier ANOVA statistisch evaluiert. Hippocampus:  $p = 0,362$ ; Cortex:  $p = 0,039$ ;  $n=7$ .

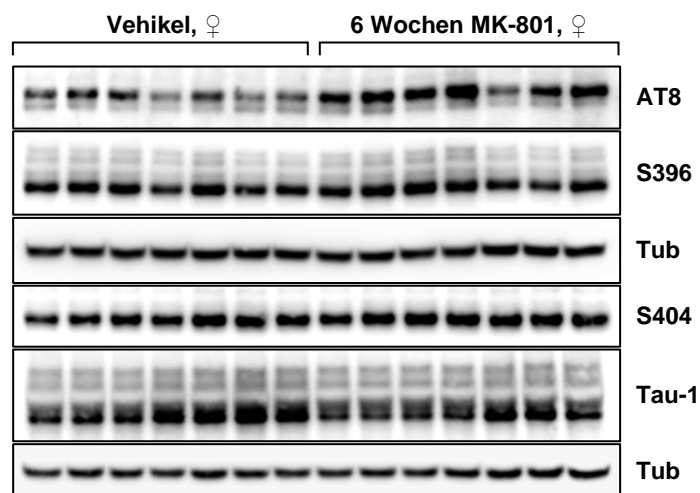
#### 4.3.2 Analyse Alzheimer-assoziiierter Proteine nach subchronischer NMDA-Rezeptor-Inhibition in weiblichen Mäusen.

In einem parallelen Experiment wurden die Auswirkungen einer MK-801-Behandlung auch in weiblichen Mäusen getestet. Es ist dokumentiert, dass weibliche Mäuse eine größere Plasmakonzentration an MK-801 akkumulieren als Männchen (Andiné et al., 1999). Die weiblichen Mäuse wurden wie die männlichen ebenfalls für 6 Wochen mit 1,0 mg/kg MK-801 behandelt (Tabelle 7). Die weiblichen Gruppen wurden analog den Experimenten der männlichen Gruppen aus Abschnitt 4.3.1 und im selben Intervall behandelt. Ihre Gehirne wurden ebenfalls 24 h nach der letzten Injektion entnommen und untersucht. Eine gewebsspezifische Westernblot-Analyse ergab, dass Weibchen im Gegensatz zu männlichen Mäusen nach einer 6-wöchigen Behandlung eine deutliche Induktion bestimmter Phospho-Tau-Epitope aufzeigten. Im Hippocampus waren zwei der getesteten Epitope signifikant höher phosphoryliert (Abbildung 36) (einfaktorielle

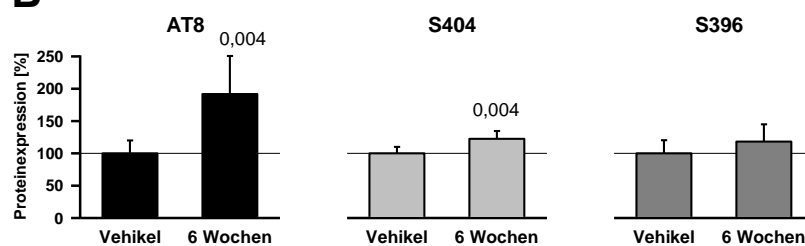


ANOVA-Signifikanzen: Anti-AT8:  $p = 0,004$ ; Anti-S404:  $p = 0,004$ ). Das AT8-Epitop war mit  $> 90\%$  Erhöhung am stärksten beeinflusst (Abbildung 36B). Der Cortex zeigte für das Signal des AT8-Epitops im Westernblot-Ergebnis zwar eine Tendenz zur Erhöhung (Abbildung 37A) allerdings konnte diese statistisch nicht belegt werden (Abbildung 37B). Doch wie auch bei den männlichen Versuchstieren in Abbildung 34, konnte eine signifikante Induktion von  $> 25\%$  für das S404-Epitop nachgewiesen werden (ANOVA-Signifikanz:  $p = 0,002$ ).

### A Hippocampus

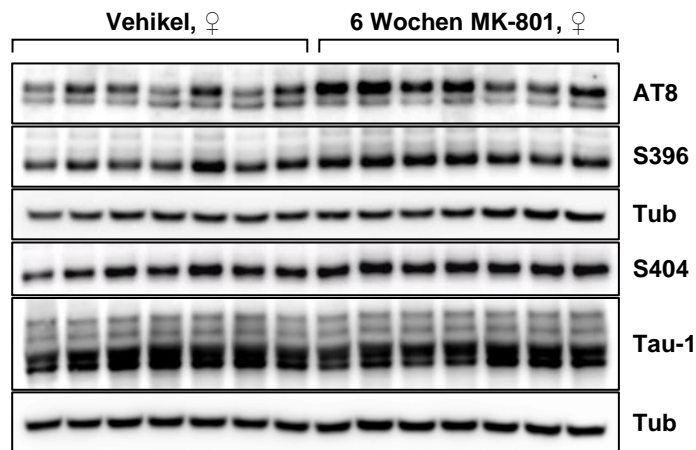
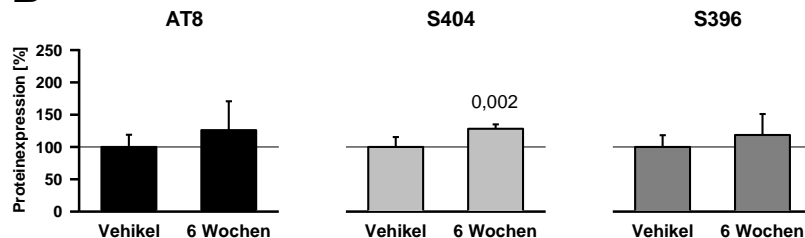


### B



**Abbildung 36** Auswirkung subchronischer NMDA-Rezeptor Inhibition auf die Phosphorylierung von Tau im Hippocampus weiblicher Mäuse.

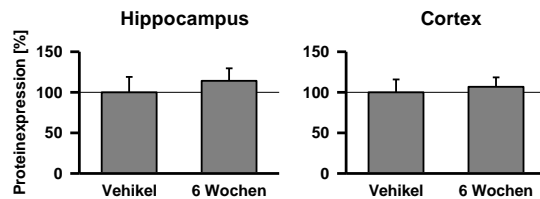
Weiblichen Mäusen wurde über einen Zeitraum von 6 Wochen dreimal wöchentlich (Mo, Mi, Fr) 1 mg/kg MK-801 injiziert (insgesamt 18 Injektionen). Die Vehikel-Gruppe wurde im selben Intervall mit einer Salzlösung behandelt. Alle Gehirne wurden 24 h nach der letzten Injektion entnommen. **A.** Gezeigt sind die hippocampalen Signale der Phospho-spezifischen Antikörper (S404, S396 und AT8) und von Tau-1 mit den jeweiligen Tubulin-Ladekontrollen für die Vehikel- und MK-801-behandelte Gruppe (6 Wochen) mit jeweils  $n = 7$ . **B.** Die Westernblot-Ergebnisse wurden mittels einfaktorieller ANOVA statistisch evaluiert. Für die quantitative Auswertung wurden die Phospho-Tau-Werte auf die jeweiligen Gesamt-Tau-Ergebnisse (Tau-1) normiert. ANOVA-Signifikanzen: Anti-AT8:  $p = 0,004$ ; Anti-S404:  $p = 0,004$ ; Anti-S396:  $p = 0,201$ .

**A** Cortex**B**

**Abbildung 37** Auswirkung subchronischer NMDA-Rezeptor Inhibition auf die Phosphorylierung von Tau im Cortex weiblicher Mäuse.

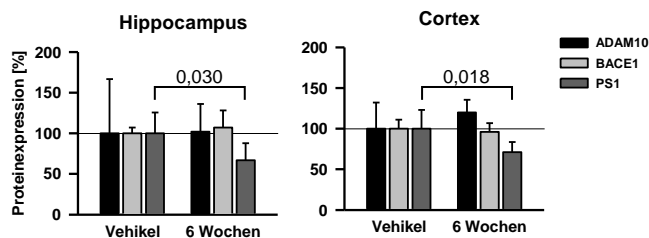
**A.** Gezeigt sind die kortikalen Signale der Phospho-spezifischen Antikörper (S404, S396 und AT8) und von Tau-1 mit den jeweiligen Tubulin-Ladekontrollen für die Vehikel- und MK-801-behandelte Gruppe (6 Wochen) mit jeweils  $n = 7$ . **B.** Die Westernblot-Ergebnisse wurden mittels einfaktorier ANOVA statistisch evaluiert. Für die quantitative Auswertung wurden die Phospho-Tau-Werte auf die jeweiligen Gesamt-Tau-Ergebnisse (Tau-1) normiert. ANOVA-Signifikanzen: Anti-AT8:  $p = 0,216$ ; Anti-S404:  $p = 0,002$ ; Anti-S396:  $p = 0,252$ .

Die Expression von APP wurde ebenfalls per Westernblot analysiert. Die quantitative Auswertung der Ergebnisse zeigte keine Expressionsveränderungen für beide Gewebetypen (Abbildung 38). Zusätzlich wurde untersucht, ob die Expression APP-prozessierender Sekretasen (ADAM10 und BACE1) oder Sekretase-assoziierten Proteine (Presenilin-1) durch die subchronische MK-801-Behandlung beeinflusst war. Die analysierten Geweberegionen (Abbildung 39) zeigten beide keine signifikanten Einflüsse auf Ebene der ADAM10- und BACE1-Expression (ANOVA-Signifikanzen: ADAM10: Hippocampus:  $p = 0,949$ , Cortex:  $p = 0,196$ ; BACE1: Hippocampus:  $p = 0,434$ , Cortex:  $p = 0,552$ ). Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Verlust für PS1 um  $\sim 30\%$  in beiden Geweben (Abbildung 39) (Hippocampus:  $p = 0,030$ ; Cortex:  $p = 0,018$ ). Ein ähnlicher Effekt war bereits in den einmalig behandelten Mäusen nach 24 h dokumentiert worden (Abbildung 28) und konnte nun reproduziert werden.



**Abbildung 38 Auswirkungen subchronischer NMDA-Rezeptor-Inhibition auf die gewebsspezifische APP-Expression in weiblichen Mäusen.**

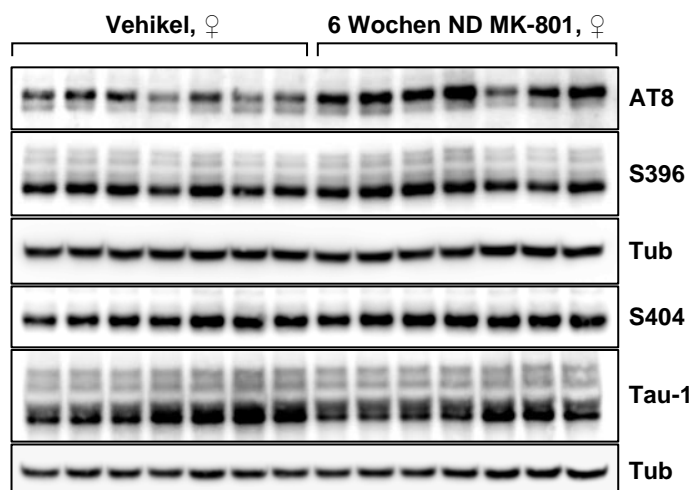
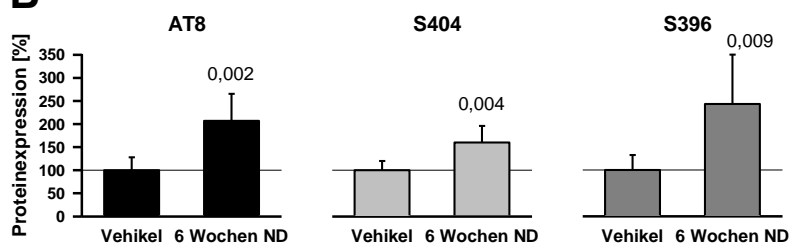
Nach 6-wöchiger MK-801-Behandlung wurden die hippocampalen und kortikalen Bereiche weiblicher Mausgehirne auf potentielle Veränderungen ihrer APP-Expression getestet. Das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Die Westernblot-Ergebnisse wurden mittels einfaktorieller ANOVA statistisch evaluiert. Hippocampus:  $p = 0,176$ ; Cortex:  $p = 0,418$ .



**Abbildung 39 Einfluss von subchronischer NMDA-Rezeptor-Inhibition auf die gewebsspezifische Sekretase-Expression in weiblichen Mäusen.**

Es wurden die Expressionslevel der APP-prozessierenden Sekretasen ADAM10 und BACE1 und der  $\gamma$ -Sekretase Komponente Presenilin-1 (PS1) in subchronisch (6 Wochen) mit MK-801 behandelten weiblichen Mäusen untersucht. Die Westernblot-Ergebnisse wurden quantifiziert und statistisch mittels einfaktorieller ANOVA ausgewertet: Anti-ADAM10: Hippocampus:  $p = 0,949$ , Cortex:  $p = 0,196$ ; Anti-BACE1: Hippocampus:  $p = 0,434$ , Cortex:  $p = 0,552$ ; Anti-PS1: Hippocampus:  $p = 0,030$ , Cortex:  $p = 0,018$ . Das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. Als Ladekontrolle für BACE1 wurde Aktin herangezogen.

Um die Konformität der Effekte bei einer angestrebten „Fairness der Dosen“ zu prüfen, wurde daher eine weitere Gruppe weiblicher Mäuse für 6 Wochen mit einer niedrigeren Dosis (ND) von 0,2 mg/kg MK-801 behandelt. Untersucht wurde dabei die kortikale Tau-Phosphorylierung. Die Ergebnisse in Abbildung 40 ergaben eine deutliche Induktion der drei getesteten pTau-Epitope durch die Behandlung mit einer niedrigen Dosis. Die Auswertung mittels ANOVA zeigte signifikante Erhöhungen des Phosphorylierungsstatus für Anti-AT8:  $p = 0,002$ , Anti-S404:  $p = 0,004$  und Anti-S396:  $p = 0,009$  (Abbildung 40B).

**A** Cortex**B**

**Abbildung 40** Tau-Phosphorylierung nach niedrigdosierter, subchronischer MK-801-Behandlung in weiblichen Mäusen.

Weibliche Mäuse wurden im bereits zuvor beschriebenen Intervall von 6 Wochen mit einer niedrigen Dosis (ND) MK-801 (0,2 mg/kg) behandelt. **A.** Der Einfluss auf die Phosphorylierung von Tau im Cortex der Mäuse wurde mit Immunoblots ermittelt. Getestet wurden  $n = 7$  Mäuse pro Gruppe. Das Strukturprotein  $\alpha$ -Tubulin (Tub) wurde als Ladekontrolle eingesetzt. **B.** Die Ergebnisse wurden quantitativ und statistisch mit einer einfaktoriellen ANOVA evaluiert. ANOVA-Signifikanzen: Anti-AT8:  $p = 0,002$ ; Anti-S404:  $p = 0,004$ ; Anti-S396:  $p = 0,009$ .

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der subchronischen Behandlung, dass eine NMDA-Rezeptor-Inhibition langfristig zu einer Induktion Alzheimer-assoziierten Marker-Proteine wie der Phosphorylierung von AT8 und S404 in beiden Geschlechtern führt. Zwischen den Geschlechtern ergaben sich Unterschiede in der Vulnerabilität. Die Reduktion von Presenilin-1 zeigt sich sowohl im akuten als auch im subchronischen Inhibitionsmodell konsistent. Zwischen den Geschlechtern ergeben sich deutliche Unterschiede in der Vulnerabilität.

## 5 Diskussion

Weitweit sind ca 50 Millionen Menschen an Demenz erkrankt. Morbus Alzheimer ist dabei mit 60-70% die am häufigsten auftretende Form der Demenz (World Alzheimer Report, 2018). Nicht nur die Patienten selbst, sondern auch deren soziales Umfeld leidet stark unter den psychischen Symptomen, die diese Demenz mit sich bringt. Obwohl die Alzheimersche Demenz seit mehr als 100 Jahren charakterisiert ist, kann man die Ursache für die Entstehung weiterhin nicht. Die Diagnose von Morbus Alzheimer und die Abgrenzung von anderen Demenzformen basiert zum einen auf typischen Verhaltenssymptomen und ist zum anderen abhängig von histologischen Veränderungen im Gehirn. Diese molekularen Krankheitsmarker sind jedoch trotz neuer Bildgebungsverfahren erst eindeutig post mortem festzustellen, was eine eindeutige Diagnose zu Lebzeiten des Patienten erschwert und auch die Ursachenforschung vor eine Herausforderung stellt. Die typischen molekularen Phänomene, die bei Morbus Alzheimer auftreten, sind Neurofibrilläre Bündel und Amyloid-Plaques. Es ist nicht bekannt aus welchem Grund diese Pathologien auftreten. Die beiden Proteine, die für die Entstehung dieser Aggregaten verantwortlich sind, sind phospho-Tau und  $\beta$ -Amyloid. Für beide Moleküle sind die physiologischen Funktionen eindeutig geklärt. Im Allgemeinen spiegeln mikroskopisch sichtbare Merkmale einer Krankheit häufig eine physiologische Reaktion wieder, die als kompensatorische Antwort auf eine meist unsichtbare Ursache ausgelöst wird wie zum Beispiel bei der Serum-Amyloid-A-Amyloidose. Bei dieser Amyloidose wird als unspezifische Immunreaktion auf eine chronische Entzündung vermehrt das entzündungshemmende Akute-Phase-Protein „Serum-Amyloid-A“ (SAA) in der Leber produziert. Die Überproduktion von SAA führt dann zu einer erhöhten Bildung des Amyloid-A-Peptids. Amyloid-A neigt zur Aggregation und führt beispielsweise in der Niere oder im Darm zu molekularen, sichtbaren Ablagerungen (Westermarck et al., 2014). Diese Ablagerungen sind jedoch nicht die Ursache des Problems, sondern ein Resultat aus der kompensatorischen Reaktion auf die chronische Entzündung.

Im Hinblick auf Morbus Alzheimer führt diese Argumentation zu der Idee, dass sowohl die Bildung von Amyloid  $\beta$  als auch die Phosphorylierung von Tau die Kompensation eines bisher unbekanntes Auslösers darstellen könnte. Um dieses Alzheimer-Modell genauer zu untersuchen wurde in dieser Arbeit das Auftreten der Alzheimer-

spezifischen molekularen Merkmale der Krankheit im Zusammenhang mit gezielter Blockade der exzitatorischen Transmission erforscht. Die exzitatorische Insuffizienz bei sporadischen Formen der Alzheimerschen Demenz könnte durch funktionelle Inhibition der erregenden Neurotransmission hervorgerufen werden, beispielsweise durch die Anwesenheit des ApoE4-Allels oder autoreaktive NMDAR-Antikörper. Die genetisch bedingte Unterentwicklung des exzitatorischen Systems könnte bei familiären Formen von Morbus Alzheimer ebenfalls ein Ungleichgewicht der exzitatorischen und inhibitorischen Transmission hervorrufen. Beide Formen der Krankheit würden dann dieselbe kompensatorische Antwort hervorrufen. Die übermäßige und letztlich ineffiziente Kompensation würde über einen längeren Zeitraum zu einer pathologischen Ansammlung der aggregierten Proteine in Form von NFTs und Plaques führen.

### **5.1 Tau-Phosphorylierung als physiologische Kompensation exzitatorischer Hypofunktion.**

Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung bestimmter Alzheimer-assoziiierter Tau-Phospho-Epitope durch die Inhibition von NMDARs signifikant erhöht war. Eine gesteigerte Phosphorylierung konnte hier sowohl in primären kortikalen Zellen als auch in Mäusen nach einmaliger oder mehrfacher Behandlung mit einem NMDAR-Antagonisten gewebsspezifisch nachgewiesen und reproduziert werden. Die Inkubation mit NMDAR-Agonisten (NMDA und Glutamat) *in vitro* zeigte tendenziell die entgegengesetzte Regulation, indem eine Reduktion der Tau-Phosphorylierung zu erkennen war, die jedoch statisch keine Signifikanz zeigte. Bereits in vergangenen Studien wurde dieser Effekt dokumentiert (Davis et al., 1995). Die Tau-bezogenen Ergebnisse dieser Arbeit werden von Daten älterer Studien bekräftigt, die gezeigt haben, dass die Aktivität der NMDARs die spezifische Tau-Phosphorylierung in hippocampalen (Allyson et al., 2010; De Montigny et al., 2013) und kortikalen (Felming und Johnson, 1995) Geweben von Ratten signifikant modulierte. Eine weitere Studie von Yeung et al. 2010 hat gezeigt, dass eine Langzeit-Verabreichung des nicht kompetitiven NMDAR-Antagonisten Ketamin bei Mäusen und Affen zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von Tau in kortikalen Arealen führte. Ich konnte zeigen, dass sich die gewebsspezifischen Erhöhungen der Tau-Phosphorylierung *in vivo* auf kortikale und hippocampale Regionen beschränkt. Die Mäuse wiesen unter einmaliger Inhibition mit MK-801 nach 4 h und 24 h keine signifikante Phospho-Tau-Induktion in

thalamischen Geweben auf (Abbildung 26). Diese Ergebnisse korrelieren mit der Erkenntnis, dass der Thalamus bei Alzheimer-Patienten häufig keine Tauopathie oder in der Regel erst im sehr späten Krankheitsverlauf aufweist (Delacourte et al., 1999; Braak et al., 2006). Die pharmakologische Inhibition der Rezeptoren dieser Experimente legt also ebenfalls nahe, dass zwischen der NMDAR-Aktivität und der Phosphorylierung von Tau ein physiologischer Zusammenhang besteht.

Neben der Regulation der Mikrotubuli-Stabilisation ist bekannt, dass Tau und dessen posttranslationale Phosphorylierung weitere physiologische Funktionen wie die Regulation des axonalen Transports besitzt (Dixit et al., 2008). Die zahlreichen Interaktionspartner von Tau legen die Vermutung nahe, dass noch weitere physiologische Funktionen bestehen. Die Lokalisation von Tau und dessen phosphorylierter Isoformen war lange Zeit nur für das Axon beschrieben. Inzwischen wurde jedoch bewiesen, dass Tau auch im somatodendrischen Bereich der Neurone eine Rolle spielt. Es gibt unterschiedliche Modelle, die die Akkumulation von Tau und pTau in den Dendriten erklären sollen. Das ältere Modell beschreibt die Ablösung von phosphoryliertem Tau von den Mikrotubuli und dessen Relokalisation und Akkumulation in dendritischen Bereichen (Frandemiche et al., 2014). Ein neueres Modell erweitert diese Annahme durch eine Auslöser-induzierte lokale Translation von Tau innerhalb der Dendriten (Li und Götz, 2017).

Es ist nicht vollständig geklärt, welche Rolle Amyloid  $\beta$  bei der Akkumulation und Phosphorylierung von Tau hat. In der Literatur wurden gegensätzliche Hypothesen diskutiert, nämlich die Tau-Phosphorylierung in den Dendriten durch A $\beta$  induziert wird und die Phosphorylierung von Tau die A $\beta$ -induzierte Exzitotoxizität vermittelt (Haass und Mandelkow, 2010; Ittner et al., 2010; Frandemiche et al., 2014). Für beide Hypothesen gilt jedoch, dass die Phosphorylierung von Tau und die Akkumulation im somatodendritischen Raum eine A $\beta$ -vermittelte erhöhte exzitatorische Transmission an der Postsynapse mit sich bringt (Roberson et al., 2007; Haass und Mandelkow, 2010; Ittner et al., 2010; Li und Götz, 2017). In Bezug auf seine somatodendritische Funktion ist bekannt, dass Tau phospho-abhängig mit der Src-Kinase Fyn interagieren kann (Ittner et al., 2010). Die somatodendritische Aktivität der Fyn-Kinase förderte wiederum die Interaktion und Komplexbildung von NMDARs mit PSD-95 (Montragón-Rodríguez et al., 2012), indem Fyn die NMDAR-Untereinheit NR2B an Position Y1472 phosphorylierte (Rong et al., 2001). Die Interaktion von NMDARs und PSD-95

vermittelt eine stabile Verankerung der NMDARs in der postsynaptischen Membran (Roche et al., 2001) und eine verstärkte Glutamat-induzierte Signalübertragung (Haass und Mandelkow, 2010). Mit der Hemmung der Fyn-vermittelten NR2B-Phosphorylierung haben sich verringerte NMDAR-Ströme gezeigt (Zhang et al., 2016). Die Anwesenheit des funktionellen Tau-Proteins in dendritischen Kompartimenten zeigte sich hierbei essentiell für die Fyn-vermittelte postsynaptische Regulation der NMDAR-Aktivität (Ittner et al., 2010).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigten, dass eine Tau-Phosphorylierung durch Insuffizienz der NMDARs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* induziert wird. Dieser Regulation könnte eine physiologische Kompensationsreaktion zu Grunde liegen, die zum Ziel hat, die exzitatorische Transmission zu verstärken, indem die NMDARs in der postsynaptischen Membran stabilisiert werden und somit die A $\beta$ -induzierte Aktivierung erleichtert wird. Bei dieser Kompensation müssten sowohl Fyn als auch PSD-95 essentielle Interaktionspartner sein. Fasst man die vorliegenden Ergebnisse und die Erkenntnisse aus vergangenen Studien zusammen, macht es den Anschein, dass Tau als intrinsischer Stabilisator der exzitatorischen Aktivität fungiert und damit in die Regulation der neuronalen Aktivität involviert ist (Roberson et al., 2007). Die Tatsache, dass exzitatorische Neurone bei Morbus Alzheimer vulnerabler sind (Fu et al., 2018) und die Erkenntnis, dass die Tauopathie in verschiedenen Braak-Stadien bei Morbus Alzheimer und Frontotemporaler Demenz signifikant mit exzitatorischen Neuronen kolokalisieren (Fu et al., 2019), unterstützt die Annahme, dass Tau physiologisch mit der exzitatorischen Transmission verknüpft ist. Bei der Alzheimerschen Krankheit kommt es womöglich zu einer pathologischen Überkompensation der exzitatorischen Insuffizienz, im Dauerzustand zu einer Aggregation des Proteins führt, die schließlich als neurofibrilläre Bündel sichtbar wird.

## **5.2 Amyloid $\beta$ als Stimulator exzitatorischer Transmission**

Die physiologische Funktion von APP und von dessen Schnittfragmenten wurde bislang nicht eindeutig aufgeklärt. Für die Alzheimersche Krankheit ist die pathologische Aggregation des Amyloid  $\beta$ -Peptids in Form von Senilen Plaques beschrieben. Warum dieses Peptid im Verlauf der Krankheit zur Aggregation neigt, ist nicht verstanden. Wallace et al., 1993 konnten zeigen, dass der Verlust der subkortikalen Innervation zu einem schnellen und anhaltenden Anstieg der kortikalen APP-Expression führte. Auch in der vorliegenden Arbeit führte die einmalige NMDAR-Inhibition in Mäusen zu einem



hippocampalen Anstieg des APP. Was ist also die Funktion des gestiegenen APP-Spiegels? Studien haben gezeigt, dass APP und NMDA-Rezeptoren koimmunopräzipitieren, und dass die Reduktion von APP zu einer Verringerung der NMDAR-Oberflächendichte und zu niedrigeren elektrophysiologischen NMDAR-abhängigen Signalen führte (Cousins et al. 2009). Ebenfalls hat man gezeigt, dass die Überexprimierung von APP zu erhöhten NMDAR-Signalen und einer vermehrten Rekrutierung von NR2B-Rezeptoren führte (Hoe et al., 2009b). Auch bestimmte Schnittfragmente des APP scheinen eine Rolle bei der Regulation exzitatorischer Neurotransmission zu spielen. Eine vielzählig beschriebene Eigenschaft des Amyloid  $\beta$ -Peptids ist die Induktion von Exzitotoxizität (Harkany et al., 2000; Mattson et al., 1992; Danysz und Parsons, 2012; Roberson et al., 2007). A $\beta$  zeigt diese Eigenschaften in supraphysiologischen Konzentrationen ( $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  M), beispielsweise durch die pharmakologische Zugabe *in vitro* oder eine Überexpression von mutiertem APP *in vivo* (Harkany et al., 2000; Mattson et al., 1992; Danysz und Parsons, 2012). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass A $\beta$  unter physiologischen Bedingungen ( $10^{-10}$  –  $10^{-9}$  M) als ein positiver Modulator der exzitatorischen Transmission fungiert. Tatsächlich konnten unabhängige Forschungsgruppen nachweisen, dass physiologische A $\beta$ -Konzentrationen *in vivo* eine verstärkende Wirkung auf die erregende Neurotransmission hatten, die Langzeit-Plastizität in Form von LTP und LTD verstärkten und die Gedächtnisbildung verbesserten (Brorson et al., 1995; Wu et al., 1995; Molnár et al., 2004; Puzzo et al., 2008; Alberdi et al., 2010; Texidó et al., 2011). Eine supraphysiologische Zufuhr von A $\beta$  hat ebenso wie die A $\beta$ -Reduktion durch Antikörper oder siRNA zu einer Reduktion der synaptischen Plastizität und Verschlechterung des Gedächtnisses geführt (Puzzo et al., 2008; Puzzo et al., 2011). Die Supplementation verschiedener A $\beta$ -Spezies in Zellkultur hat einen erhöhten Calcium-Einstrom bewirkt, der sich auch selektiv in exzitatorischen und nicht in inhibitorischen Gehirnregionen zeigte (Brorson et al., 1995; Texidó et al., 2011; Zempel und Mandelkow 2012). Zudem wurde dokumentiert, dass A $\beta$  an exzitatorischen dendritischen Fortsätzen in kultivierten Neuronen binden kann (Zhao et al., 2010). Die Vermutung liegt nahe, dass dieser Calcium-Einstrom durch spezifische postsynaptische Mechanismen vermittelt wird. In der Tat wurde gezeigt, dass die pharmakologische Inhibition der NMDA-Rezeptoren eine Blockade der A $\beta$ -induzierten exzitatorischen

Effekte herbeiführte, was auf eine NMDAR-abhängige Induktion der Exzitation hindeutet (Brorson et al., 1995; Ye et al., 2004; Alberdi et al., 2010; Texidó et al., 2011). Es ist bereits erforschten, dass die Ausbreitung von Glutamat-Transporter auf der Zelloberfläche von Gliazellen eine physiologische Rolle bei der Ausbildung synaptischer Transmission spielt (Murphy-Royal et al., 2015). Neue Ergebnisse zeigen zudem, dass A $\beta$ -Mikroinjektionen in den Cortex von Ratten über einen indirekten Mechanismus zu einer Verringerung von Glutamat-Transportern führen (Wu et al., 2020). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die A $\beta$ -vermittelten exzitatorischen Effekte über den Mechanismus der Freilassung und Wiederaufnahme von Glutamat über Glutamat-Transporter gesteuert wird (Li et al., 2009).

Die pharmakologische Blockade der NMDAR-Aktivität innerhalb der vorliegenden Studie führte *in vitro* nach einer 4-stündigen AP5-Behandlung zu einer signifikanten Induktion des A $\beta_{40}$ . Dieses Resultat wurde in MK-801-behandelten Mäusen reproduziert. In den *in vivo*-Experimenten zeigte sich für spezifische exzitatorische Gehirnareale eine signifikante, reversible A $\beta$ -Induktion 4 h nach der MK-801-Behandlung (Abbildung 29). Bereits andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass verschiedene A $\beta$ -Spezies eine gesteigerte NMDA-Rezeptor-Aktivität induzierten und eine A $\beta$ -vermittelte Sensitivierung der NMDAR stattfand (Wu et al., 1995, Molnár et al., 2004; Alberdi et al., 2010; Uhász et al., 2010). Interpretiert man die signifikante Reversibilität des hier gezeigten Effekts nach 24 h gemeinsam mit den vorangegangenen Forschungsergebnissen, impliziert dies, dass A $\beta$  möglicherweise als ein akuter Sensibilisator agiert, der die gehemmte NMDAR-vermittelte exzitatorische Transmission kurzfristig kompensieren soll. Der schnelle Anstieg und die darauffolgende Reduktion nach 24 h können zusätzlich mit der kurzen Halbwertszeit des A $\beta$ -Peptids von < 2 h *in vivo* vereinbart werden (Abramowski et al., 2008). Neben der zeitabhängigen A $\beta$ -Modulation zeigten sich hier auch Gehirnareal-spezifische Effekte. Die beobachteten gewebspezifischen Effekte von APP und Tau nach der NMDAR-Blockade sind den typischen Verlaufsmustern bei Morbus Alzheimer ähnlich. Die nicht induzierte Tau-Phosphorylierung im Thalamus (Abbildung 26) und dessen gleichzeitige selektive Erhöhung der A $\beta_{42}$ -Konzentration (Abbildung 29B) korrelieren mit der Tatsache, dass der Thalamus in sehr frühen Stadien der Alzheimerschen Krankheit amyloidogene Plaques aufweist, allerdings erst in sehr späten Stadien NFTs aufzeigt (Aggleton et al., 2016). Auch der Retrospleniale Cortex, eine der ersten

betroffenen Regionen bei früher Alzheimerscher Demenz, zeigte unter MK-801-Behandlung eine deutliche Induktion von A $\beta$ <sub>40</sub> (Abbildung 29C). Innerhalb des Gehirns sind der anteriore Thalamus und der Retrospleniale Cortex funktionell miteinander verbunden (Nestor et al., 2003). Die Beeinträchtigung beider Regionen wird für den frühen Verlust der episodischen Erinnerung bei Alzheimerscher Demenz verantwortlich gemacht (Aggleton et al., 2016).

Die Agonisten-vermittelte NMDAR-Aktivierung in der primären Zellkultur und die Aufhebung der NMDAR-Inhibition *in vivo* durch den Abbau von MK-801 in den 24 h nach der Behandlung führte in beiden Fällen eine Reduktion der A $\beta$ -Konzentration herbei. Dieses Resultat geht einher mit anderen Befunden, die gezeigt haben, dass eine erhöhte NMDAR-Aktivierung in APPsw/PS1-mutierten Mäusen zu einer Erniedrigung der A $\beta$ -Sekretion in die interstitielle Flüssigkeit führte (Verges et al., 2011) und in kortikaler Zellkultur die Inhibition des amyloidogenen Sekretionswegs des APP induzierte (Hoey et al., 2009). Die hier dokumentierte Erniedrigung des zellulären APP unter NMDAR-Aktivierung in der neuronalen Zellkultur konnte ebenfalls von Hoe et al., 2009b und Hoey et al., 2009 gezeigt werden. Die Ergebnisse von Verges et al., 2011 verdeutlichen zudem, in welchem sensiblen regulatorischen Gleichgewicht die A $\beta$ -Sekretion und die NMDAR-Aktivität stehen. Eine leichte Erhöhung der NMDAR-Aktivität hatte zu einem Anstieg der A $\beta$ -Sekretion geführt, wohingegen eine höhere Dosis NMDA zu einer deutlichen Verstärkung der synaptischen Aktivität geführt hatte, die jedoch von einer Reduktion der A $\beta$ -Konzentration im Zellzwischenraum begleitet wurde. Beide Mechanismen waren simultan aktiv. Die Balance dieser synaptischen Vorgänge könnte daher eine wichtige Bedeutung für das Verständnis der Alzheimer-Pathogenese haben.

Über welchen Mechanismus A $\beta$  die exzitatorischen Neurotransmission vermittelt, ist weitgehend unbekannt. Es gibt einige Forschungsergebnisse, die Indizien liefern. Es wurde beispielsweise entdeckt, dass lösliches A $\beta$  die NMDAR-abhängige LTD erleichtert, in dem es die extrazelluläre Glutamat-Konzentration erhöhte. Diese Erhöhung schien durch die Hemmung der Glutamat-Wiederaufnahme vermittelt worden zu sein und nicht durch eine erhöhte präsynaptische Ausschüttung (Li et al., 2009; Zott et al., 2019). Neuere Studien unterstützen diese Hypothese des A $\beta$ -vermittelten Modifikation der Glutamat-Wiederaufnahme. Tong et al., 2017 haben festgestellt, dass A $\beta$  die Protein-Expression und Aktivität der Glutamat-Transporter

posttranslational inhibierte (Tong et al., 2017). Es konnte ebenfalls eine Kolo­kalisierung von A $\beta$  mit synaptischen NMDARs und dem PSD-95 beschrieben werden, was ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion zwischen A $\beta$  und exzitatorischen Rezeptoren ist (Lacor et al., 2007; Hoe et al., 2009b; Hoey et al., 2009). Eine Studie zur chronischen pharmakologischen Inhibition der NMDARs in Gehirnschnitten hatte gezeigt, dass dies zunächst zu einer anfänglichen Erniedrigung der AMPA-Rezeptor (AMPA)-Ströme und es mit anhaltender Inhibition dann aber zu einer NMDAR-unabhängigen Erhöhung des AMPAR-Signals kam (Zhu et al., 2002). Möglicherweise kommt es bei der gestörten NMDAR-Funktion zu einer unabhängigen AMPAR-Kompensation, die möglicherweise auch A $\beta$ -induzierbar ist. Dieser Verdacht wird unterstützt durch die Ergebnisse einer weiteren Studie, bei der eine erhöhte AMPAR-Aktivität in Alzheimer-Mäusen eine Erniedrigung des A $\beta$ -Spiegels in der ISF induzierte (Hettinger et al., 2018). Es lässt sich vermuten, dass das A $\beta$ -Peptid als ein akuter Sensitizer fungiert, der eine Insuffizienz des glutamatergen Systems jedoch nur kurzfristig kompensieren soll (Mattson et al., 1992; Harkany et al., 2009; Puzzo et al., 2008; Garcia-Osta und Alberini, 09; Morley et al., 2010; Danysz und Parsons, 2012). Diese Wirkung wird später dann scheinbar durch die Produktion anderer proteolytischer APP-Fragmente wie dem synaptotrophen sAPP $\alpha$  oder AICD abgelöst (Moechars et al., 1996; Bell et al., 2008; Nicolas und Hassan, 2104).

Beide APP-Fragmente werden mit der physiologischen Langzeit-Regulation von NMDARs assoziiert (Heftner und Draguhn, 2017; Pousinha et al., 2017). In der Tat haben verschiedene Labore gezeigt, dass die pharmakologische Aktivierung der NMDA-Rezeptoren zu einer Verschiebung der APP-Prozessierung führte (Marcello et al., 2007; Hoey et al., 2009). Das APP wurde bei erhöhter NMDAR-Aktivität vermehrt über den nicht-amyloidogenen Weg prozessiert, woraufhin die sAPP $\alpha$ -Sekretion und C83-Prozessierung anstiegen. Zusätzliche Experimente lassen vermuten, dass sAPP $\alpha$  eine Rolle bei der Neurogenese, der synaptischen Plastizität und dem Erinnerungsvermögen besitzt (Taylor et al., 2008; Hick et al., 2015; Puzzo et al., 2015). Die Prozesse der Synaptogenese sind der Sensitivierung durch A $\beta$  wohl übergeordnet, da eine übermäßige A $\beta$ -Produktion das Risiko einer exzitatorischen Überstimulation zum Beispiel in Form von Krampfanfällen birgt. Außerdem kann A $\beta$  als mutmaßlicher Sensitizer nicht die Balance des Signal-Rausch-Verhältnisses im neuronalen System ausgleichen, da hierfür strukturelle Veränderungen nötig wären. Ein gestörtes

Verhältnis zwischen Signal und Rausch ist ein häufiges Phänomen bei Morbus Alzheimer (Danyz und Parsons, 2012) und erklärt wohl zum Teil das erhöhte Vorkommen von Krampfanfällen bei Alzheimer-Patienten (Amatniek et al., 2006; Minkeviciene et al., 2009; Pandis und Scarmeas, 2012). Die Bildung neuer synaptischer Strukturen hat jedoch den einen Nachteil, dass diese Vorgänge mehr Zeit benötigen, weshalb A $\beta$  die Zwischenzeit durch die akute Sensitivierung des glutamatergen Systems überbrücken kann. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt. In den einmalig behandelten Mäusen zeigte sich eine kurzzeitige Erhöhung von A $\beta$  in den 4 h nach der Behandlung mit MK-801 (Abbildung 29). Auf Ebene der Sekretasen-Expression gingen diese Beobachtungen mit einer vorübergehenden PS1-Induktion einher, die nach 24 h wieder reduziert war (Abbildung 28). Eine konstante PS1-Reduktion zeigte sich in den mehrfachbehandelten weiblichen Mäusen (Abbildung 39), die möglicherweise den funktionellen Effekt widerspiegeln, den Alzheimer-assoziierte PS1-Mutationen verursachen (Shen und Kelleher, 2007; Xia et al., 2015; Sun et al., 2017). Die  $\beta$ -Sekretase BACE1 war in den Mäusen nicht induziert (Abbildung 28). Der reversible Charakter der A $\beta$ -Induktion bei einmaliger MK-801-Behandlung wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass ADAM10 sowohl im Cortex als auch im Thalamus anhaltend erhöht war (Abbildung 28). Ähnliche Entdeckungen, bei denen die  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 induziert, BACE1 unverändert und PS1 reduziert war, hat man auch in Geweben von Alzheimer-Patienten gemacht (Takami et al., 1997; Davidsson et al., 2001; Gatta et al., 2002). Eine auf die A $\beta$ -Produktion zeitlich folgende Verlagerung der APP-Prozessierung zum synaptotrophen sAPP $\alpha$  (Bell et al., 2008; Nicolas und Hassan, 2014) oder dem Glutamatmetabolismus-verstärkenden, Synapsen-regulierenden AICD (Schrenk-Siemens et al., 2008; Bukhari et al., 2017) könnte also eine zweistufige Anpassung sein, um der Hemmung der exzitatorischen Neurotransmission entgegenzuwirken. Endokrinologisch sind auch andere kompensatorische Regulationen bekannt, bei denen proteolytische Fragmente mehrstufig aus demselben Vorläuferprotein prozessiert werden, beispielsweise Angiotensinogen (Santos et al., 2018) oder Proopiomelanocortin (O'Donohue und Dorsa, 1982).

### **5.3 Diskussion des Modells der exzitatorischen Insuffizienz als Ursache für die Alzheimersche Demenz**

Das Modell der exzitatorischen Insuffizienz als Ursache für Morbus Alzheimer kann sowohl für sporadische als auch hereditäre Formen dieser Demenz gelten (Abbildung 41). Die hereditären Formen der Krankheit machen nur einen geringen Anteil von <1 % aus (Alzheimer's Association, 2016; Blennow et al., 2006). Häufig wird die genetische Disposition durch eine autosomal-dominant vererbte Mutation im APP-, PS1- oder PS2-Gen vermittelt oder durch eine vermehrt vorliegende Kopie des APP-Gens (Bekris et al., 2010). Da alle drei codierten Proteine an der Bildung des A $\beta$  beteiligt sind, ist es zunächst naheliegend, dass die Folge der genetischen Veränderung ein dauerhaft erhöhtes Level von Amyloid  $\beta$  oder dessen toxischer Subspezies sein könnte (Hardy und Selkoe, 2002).

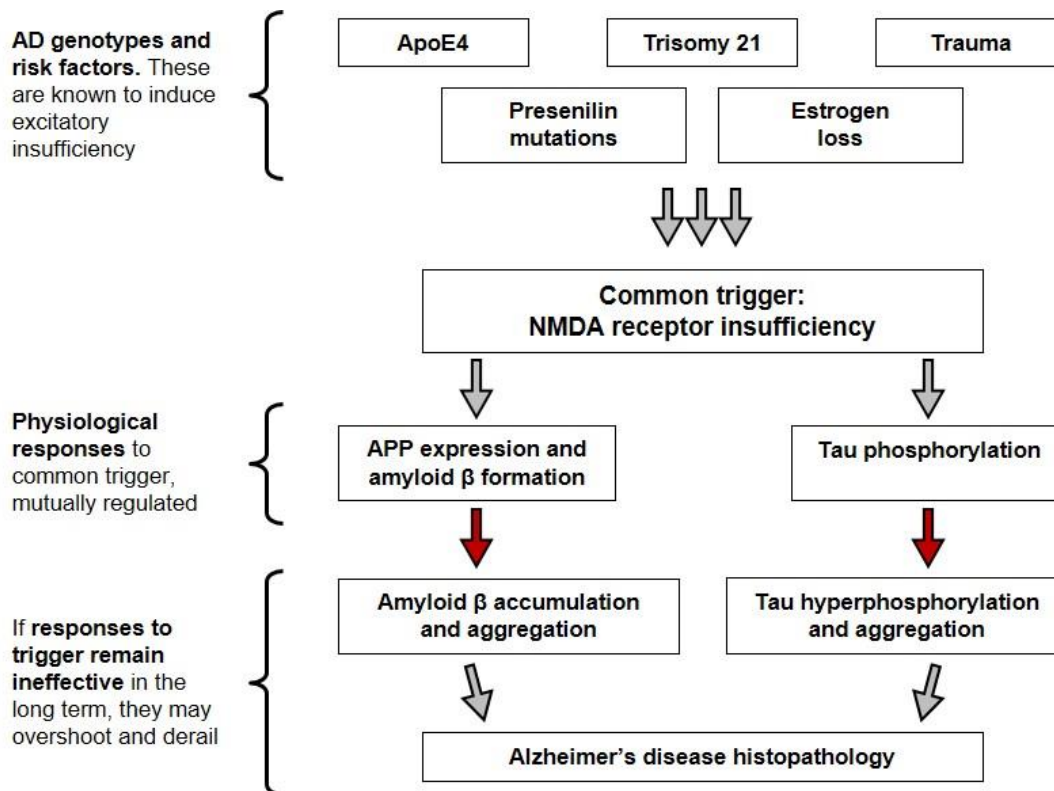
Wie bereits diskutiert scheint A $\beta$  als Verstärker exzitatorischer Signale zu fungieren. Da das glutamaterge System auch während der neuronalen Entwicklung strikt reguliert ist (Spitzer, 2006), hat eine Dysregulation der exzitatorischen Aktivität möglicherweise dauerhafte Auswirkungen auf die neuronale Funktion. Es ist gezeigt, dass eine frühe Hypoaktivität des exzitatorischen Systems unmittelbar zum neuronalen Zelltod führt (Ikonomidou et al., 1999). Auch eine übermäßig erhöhte erregende Aktivität kann zu lebensbedrohlichen Folgen wie Krampfanfällen oder Epilepsie führen (Chapman, 1998; Coulter und Eid, 2013). Eine genetisch bedingte erhöhte A $\beta$ -induzierte Sensibilisierung der erregenden Neurotransmission während der Entwicklung würde vermutlich sonst auch wiederum eine kompensatorische Regulation herbeiführen. Denkbar hierbei ist die systematische Reduktion exzitatorischer Strukturen im Gehirn, um der A $\beta$ -induzierten Hyperaktivität strukturell entgegenzuwirken. Diese Veränderungen würden gleichzeitig bedeuten, dass das strukturell hypogenetisch ausbalancierte neuronale System deutlich anfälliger für die altersbedingte oder extrinsisch verursachte Schwächung der Exzitation wäre. Die erhöhte Anfälligkeit könnte zum einen durch verringerte neuronale Komponenten und zum anderen durch bereits maximale A $\beta$ -Konzentration vermittelt werden. Das frühe Auftreten symptomatischer und pathologischer Merkmale der Alzheimerschen Krankheit könnte bei den hereditären Formen also ein Resultat aus einer kompensatorischen Unterentwicklung exzitatorischer Strukturen im Gehirn sein.

Diese Annahme wird durch eine gute Evidenzlage unterstützt. Beispielsweise erzeugte eine zeitlich eingegrenzte Erhöhung der A $\beta$ -Produktion während der frühen postnatalen Entwicklung in Mäusen permanente lokomotorische Hyperaktivität in den adulten Tieren (Rodgers et al., 2012). Locomotorische Hyperaktivität ist ein typischer Phänotyp von Tieren, die mit NMDAR-Antagonisten behandelt wurden (Andiné et al., 1999). In zwei- bis dreimonatigen „APPind“-Mäusen wurde eine reduzierte Anzahl an präsynaptischen Endknöpfen und Neuronen im Hippocampus dokumentiert (Hsia et al., 1999), begleitet von einem verkleinerten Corpus callosum und Gyrus dentatus (Redwine et al., 2003). Für Menschen mit heterozygotem ApoE4-Allel ist eine Hypogenese des Entorhinalen Cortex (Shaw et al., 2007) und eine Fehlfunktion der Gitterzellen beschrieben (Kunz et al., 2015). Das Phänomen tritt bereits in den frühen 20ern der Patienten auf, also weitaus früher als die entorhinale Pathologie bei Alzheimer-Patienten. Gitterzellen befinden sich im entorhinalen Cortex und ihre Funktion ist somit NMDAR-abhängig (Gil et al., 2018). Für Patienten mit autosomal-dominanter PS1-Mutation haben Untersuchungen ebenfalls abnormale Gehirnstrukturen und Funktionsstörungen in der Jugend gezeigt (Reiman et al., 2012), begleitet von einer hippocampalen metabolischen Hyperaktivität, möglicherweise um Defizite zu kompensieren (Quiroz et al., 2010). Bei Down Syndrom ist ebenfalls eine genetische Disposition gegeben, die bereits während der juvenilen Entwicklung zu einer Disbalance zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission führt (Belichenko et al., 2004; Fernandez et al., 2007; Wiseman et al., 2015).

Für hereditäre Formen der Alzheimerschen Demenz ist eine Mutation des PS1-Gens am häufigsten anzutreffen. Neue Befunde legen nahe, dass die Mutationen jedoch keine systematisch erhöhte A $\beta$ -Produktion hervorrufen (Sun et al., 2017), sondern vielmehr ein Defizit während der neuronalen Entwicklung und ein Versagen des exzitatorischen Netzwerks verursachen (Shen und Kelleher, 2007; Heilig et al., 2010; Heilig et al., 2013; Xia et al., 2015). Presenilin ist nachweislich essentiell für die Prozesse des Lernens und Erinnerens und das Überleben neuronaler Zellen während Alterungsprozessen (Saura et al., 2004; Wines-Samuelson et al., 2010; Watanabe et al., 2012; Xia et al., 2015). Diese Entwicklungsdefizite in Mäusen mit humaner familiärer PS1-Mutation führen zur Beeinträchtigung glutamaterger Prozesse wie der Langzeit-Plastizität (Xia et al., 2015). Ähnliche Beobachtungen von frühzeitig gestörter LTP wurden in mutierten APP transgenen Mäusen gemacht (Moechars et al., 1996; Hsia et al., 1999; Jacobsen et al.,

2006). Außerdem wurde ein NMDAR-Defizit für PS1/PS2 KO-Mäuse beschrieben (Saura et al., 2004). Mit diesen Kenntnissen lassen sich familiäre Formen der Krankheit zwanglos in das Modell der NMDAR-Insuffizienz als Ursache von Morbus Alzheimer einordnen. Die bei der Alzheimerschen Demenz auftretenden pathologischen Merkmale werden allgemein häufig als Auslöser der Krankheit beschrieben. Bei genauerem Betrachten scheinen diese Merkmale in der Tat eher generelle Ereignisse zu sein, statt Alzheimer-spezifische, denn das Auftreten von Plaques und NFTs ist auch bei weiteren neuronalen Krankheiten stark verbreitet. Sie können dabei sowohl einzeln als auch in Kombination auftreten. Beispiele hierfür sind die frontotemporale Demenz (Gordon et al., 2016), zerebrale Amyloidangiopathie (Revesz et al., 2002) oder Trisomie-21 (Down Syndrom) (Wiseman et al., 2015). Zudem gibt es das Phänomen, dass kognitiv gesunde Menschen ebenfalls Amyloid-Plaques besitzen können (Elobeid et al., 2014), wohingegen es erwiesenermaßen Patienten gibt, die zwar eine klinische Alzheimer-Diagnose haben, jedoch vollständig Plaque-negativ sind (Monsell et al., 2015; Landau et al., 2016). Das generelle Vorkommen der beiden Merkmale bei diversen neuronal-assoziierten Krankheiten macht es daher plausibel, die Pathologien in das Modell einer molekularen kompensatorischen Antwort auf einen gemeinsamen Auslöser einzuordnen (Abbildung 41). Wie bereits in Abschnitt 1.1.4 beschrieben, gibt es verschiedene nicht-genetische Risikofaktoren, die mit dem Aufkommen der Alzheimerschen Demenz in Verbindung gebracht werden. Für einige dieser Risikofaktoren zeigt sich eine Korrelation mit einer gestörten exzitatorischen Neurotransmission.





**Abbildung 41 Exzitatorische Insuffizienz als Ursachen der Alzheimerschen Krankheit.**

Das dargestellte Modell spiegelt die Hypothese wieder, dass eine Insuffizienz der exzitatorischen Neurotransmission durch inhibierte NMDA-Rezeptor-Funktion den pathologischen Auslöser der Alzheimerschen Demenz darstellt. Die Insuffizienz wird innerhalb familiärer Alzheimer-Formen und Trisomie 21-verursachter Alzheimer-Demenz durch die genetisch bedingte Hypogenese exzitatorischer Strukturen verursacht. Bei sporadischen Formen geht die Schwächung der NMDAR-Aktivität aus dauerhaft NMDAR-antagonistisch wirkenden Faktoren wie Traumata, ein ApoE4-Allel oder autoreaktiven Antikörpern hervor. In dieser Arbeit konnte durch die pharmakologische Inhibition der NMDAR gezeigt werden, dass die Erhöhung von APP, die Entstehung von A $\beta$  und die Phosphorylierung von Tau eine regulatorische Antwort auf die Rezeptor-Insuffizienz darstellen. Die hervorgerufenen Effekte dienen der kurzfristigen Stabilisierung und permanenten Wiederherstellung der exzitatorischen Neurotransmission nach einer temporären Beeinträchtigung. Die Auslöser der exzitatorischen Beeinträchtigung werden in der vorliegenden Diskussion erläutert. Da keine der physiologischen Regulationsreaktionen in der Lage ist, die ursprüngliche Quelle der chronischen NR-Insuffizienz zu beseitigen, wird die kompensatorische Antwort chronisch induziert, was zu einer nicht regulierten Anhäufung von pTau und A $\beta$  führt, die schließlich die Aggregation dieser Moleküle provoziert.

### 5.3.1 Traumatische Kopfverletzungen als Ursache für exzitatorische Insuffizienz

Epidemiologische Studien und Autopsien haben gezeigt, dass traumatische Kopfverletzungen (TBI) das Risiko für neurodegenerative Krankheiten wie Morbus Alzheimer erhöhen (Jellinger, 2004; Johnson et al., 2010; Ramos-Cejudo et al., 2018). Das APP wird dabei auch als früher Marker für die axonale Beschädigung nach mechanischen Traumata genutzt (Sheriff et al., 1994). Unter experimenteller Induktion

von TBI hat sich wiederholt gezeigt, dass als Konsequenz die A $\beta$ -Produktion in einem Zeitraum von 24 h bis ein Monat nach der Verletzung hochreguliert wird (Bird et al., 2016). In Patienten mit einer tödlich verlaufenden Kopfverletzung zeigten sich bereits nach 2 h erhöhte  $\beta$ -APP Niveaus (McKenzie et al., 1996). Tatsächlich zeigen einige Patienten, auch bereits Kinder im Alter von zehn Jahren, schon kurze Zeit nach einem Neurotrauma A $\beta$ -positive Plaque-ähnliche Ablagerungen im Gehirn (Roberts et al., 1994; Graham et al., 1995; Ikonovic et al., 2004; Johnson et al., 2010). Der schnelle Anstieg von A $\beta$  nach einem Trauma ist ein Hinweis auf seine akute Wirkung zur Stabilisierung der Neurotransmission zur Lebenserhaltung, so wie es auch in dieser Arbeit den Anschein machte. Die entstandenen Ablagerungen hingegen sind auch über einen langen Zeitraum von bis zu mehreren Jahren nach der Kopfverletzung im Gehirn zu finden (Scott et al., 2016). Der Knockout von APP in Mäusen sorgte für schwerere Auswirkungen milder Traumata im Vergleich zum Wildtyp (Corrigan et al., 2012). Auch in Folge von Rückenmarkstraumata waren die Expressionslevel von APP und A $\beta$  nachweislich erhöht und eine Studie zeigte auch einen positiven Effekt dieser Proteine nach neuronaler Schädigung. Durch genetische und pharmakologische Inhibition von APP beziehungsweise der A $\beta$ -Produktion war die Genesung sowohl auf physischer als auch auf kognitiver Ebene negativ beeinträchtigt (Pajoohesh-Ganji et al., 2014). Untersuchungen von Gehirnflüssigkeit aus Patienten haben ebenfalls gezeigt, dass ein erhöhter A $\beta$ -Spiegel mit einer positiveren Genesung von TBI-Patienten korrelierte (Brody et al., 2008; Magnoni et al., 2012). Diese und weitere Ergebnisse implizieren eine neuroprotektive Aufgabe des APP beziehungsweise A $\beta$  bei der Wiederherstellung der Basis-Transmission (Corrigan et al., 2012; Plummer et al., 2016). Einige Studien berichten auch über eine vermehrte Tau-Akkumulation nach traumatischen Kopfverletzungen in Patienten (Edwards et al., 2017). Tatsächlich konnte dabei auch die Hyperphosphorylierung von Tau als Folge von TBI beschrieben werden (Zanier et al., 2018). Die Phosphorylierungsstellen bei TBI und auch bei chronisch-traumatischer Enzephalopathie (CTE), welche häufig nach einem Trauma auftritt, waren Alzheimer-assoziierte Epitope (Katsumoto et al., 2019). Zwischen den Pathologien bei Morbus Alzheimer und den Phänomenen, die nach einem Trauma entstehen, bestehen demnach Parallelen (Ramos-Cejudo et al., 2018). Die strukturellen Schädigungen nach einer traumatischen Verletzung betreffen primär axonale Bereiche. Die bekannten Funktionen von Tau als Stabilisator des axonalen Transports lassen vermuten, dass

auch Tau und dessen Phosphorylierung eine neuroprotektive Aufgabe bei TBI hat. Für die beschriebenen Ergebnisse ist es daher plausibel, die erhöhte APP Expression, A $\beta$ -Produktion und Phosphorylierung von Tau als eine kompensatorische Antwort einzuordnen, die darauf gerichtet ist, eine vorläufige Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion an der beschädigten Stelle zu generieren (A $\beta$ ) und die strukturelle Wiederherstellung zu orchestrieren (AICD, pTau und sAPP $\alpha$ ).

### **5.3.2 Prädisposition zur Unterentwicklung des exzitatorischer Systems bei Down Syndrom**

Das Down Syndrom (DS) wird ebenfalls mit Demenz und dem Auftreten von Alzheimer-Pathologie in relativ jungen Jahren assoziiert (Wiseman et al., 2015). 50-80% der über 65-Jährigen mit Down Syndrom sind an Morbus Alzheimer erkrankt (Castro et al., 2017; Wiseman et al., 2015). Das APP-Gen wird auf Chromosom 21 kodiert. Da beim Down Syndrom eine zusätzliche Kopie dieses Chromosoms vorliegt (Trisomie 21) vermutete man, dass dies automatisch zu einer erhöhten Produktion von APP und dessen Schnittfragmenten führt (Rumble et al., 1989). Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Menge an APP in DS-Patienten weder alters- noch zellspezifisch erhöht ist, was impliziert, dass es einen speziellen regulatorischen Mechanismus geben muss, der die pathologische Anhäufung von A $\beta$  bei DS vermittelt (Antonarakis, 2017). Studien haben bereits bewiesen, dass die Überexpression von wildtypischem APP in Mäusen nicht ausreicht, um Neurodegeneration und Plaque-Bildung zu induzieren (Elder et al., 2010).

Eine plausible Erklärung für Alzheimer-typische Pathologien bei Down Syndrom-Patienten wäre jedoch ein entwicklungsbedingtes Defizit des exzitatorischen Netzwerks, das eine permanent erhöhte, kompensatorische Produktion des A $\beta$  induzierte, die wiederum die Plaque-Bildung bedingen würde. Tatsächlich ist das Down Syndrom mit einer Disbalance der exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmission assoziiert. Entdeckungen bei DS-Mausmodellen unterstützen diese These der unausgeglichene Neurotransmission bei DS. In diesen Modellen zeigte sich die exzitatorische Transmission selektiv unterdrückt, wohingegen inhibitorische Signale dominierten (Kurt et al., 2000; Belichenko et al., 2004; Fernandez et al., 2007). Die gezeigte erhöhte synaptische Inhibition mit gleichzeitiger Erniedrigung von NMDAR-Strömen führte zu einer verringerten NMDAR-vermittelten Depolarisation und zu einer Schwächung der LTP (Schulz et al., 2019). Die pharmakologische

Erniedrigung der Inhibition durch GABA-Rezeptoren in diesen Mäusen zeigte hierbei wiederum positive Effekte auf das Lernen und das Erinnerungsvermögen (Potier et al., 2014). In weiteren DS-Mausmodellen konnte zudem ein glutamaterges Defizit und eine reduzierte NR1-Expression nachgewiesen werden (Kaur et al., 2014).

### 5.3.3 Exzitatorische Hemmung durch Apolipoprotein E4-Polymorphismus

Der überragendste mit Morbus Alzheimer assoziierte Risikofaktor ist das ApoE4-Allel (Rosenthal und Kamboh, 2014; Deming et al., 2017). ApoE4 ist mit einem bis zu zwölfmal erhöhten Risiko verbunden, an der Alzheimerschen Demenz zu erkranken (Corder et al., 1993; Holtzman et al. 2012). Es wurde 1993 das erste Mal im Kontext der Alzheimerschen Demenz beschrieben (Strittmatter et al., 1993). Seither gibt es viele verschiedene und sehr widersprüchliche Hypothesen, wie der Cholesterol-Transporter ApoE und die A $\beta$ -Bildung biochemisch verknüpft sind (Liu et al., 2013; 2014; Zhao et al., 2018). Bekannt ist, dass ApoE4 an den postsynaptischen Rezeptor ApoER2 bindet und gemeinsam mit dem Rezeptor internalisiert wird. Während der ApoER2-Endocytose werden jedoch parallel auch glutamaterge NMDA-Rezeptoren ko-internalisiert. Die ApoE4-Internalisierung dauert im Vergleich zu anderen Isoformen länger an (Heeren et al., 2004), was zu einer Beeinträchtigung des Rezeptor-Recyclings führt und somit auch die NMDAR-Dichte an der Zelloberfläche verringert (Chen et al., 2010; Xian et al., 2018). *In vitro* wurde nachgewiesen, dass ApoE4 die Rezeptordichte der NMDARs um ein 3- bis 5-faches im Vergleich zu den Isoformen E2 und E3 verringert (Chen et al., 2010).

Der ApoER2 ist neben einem ApoE4-Rezeptor auch ein kanonischer Rezeptor für das synaptotrophe, extrazelluläre Glykoprotein Reelin (Tissir und Goffinet, 2003; Hoe et al., 2009a). Reelin hat verschiedene Funktionen bei der Regulation der exzitatorischen synaptischen Plastizität (Beffert et al., 2005; Wasser und Herz, 2017). Das extrazelluläre Reelin fördert durch seine Bindung an den ApoER2 den NMDAR-abhängigen Calcium-Einstrom in die Zelle (Chen et al., 2005). Diese Funktion von Reelin ist abhängig von der Phosphorylierung der NMDAR-Untereinheiten durch die Src-Kinase Fyn und die damit begünstigte Interaktion der NMDARs mit PSD-95 (Beffert et al., 2005; Chen et al., 2005). Wie bereits beschrieben sorgt die Komplexbildung mit PSD-95 für die Stabilisierung der NMDA-Rezeptoren in der Zellmembran. Es hat sich gezeigt, dass ApoE4 die Reelin-vermittelte Modulation der exzitatorischen Synapsen beeinträchtigt (Xian et al., 2108). Bei Anwesenheit von ApoE4 zeigte sich eine

Schwächung des LTP und ein erniedrigtes NMDAR-Feldpotential (Korwek et al., 2009; Chen et al., 2010). Ein Knockin von ApoE4 bei Mäusen erzeugte eine Erniedrigung der exzitatorischen Signale, was eine kompensatorische Erhöhung der A $\beta$ -Konzentrationen herbeiführte (Liraz et al., 2013; Nuriel et al., 2017). In ApoE4/APPind-Mäusen und bei humanen ApoE4-Allelträgern wurde ein Anstieg an A $\beta$  ebenso dokumentiert (Bales et al., 2009; Monsell et al., 2015). Rekapituliert man diese Ergebnisse, agiert ApoE4 demnach als ein starker Supressor der NMDAR-Funktionalität innerhalb der postsynaptischen Membran. Untersuchungen zu molekularen Interaktionen haben gezeigt, dass nicht nur NMDARs mit PSD-95 und NMDARs mit ApoER2 interagieren, sondern dass ApoER2 und PSD-95 ebenfalls Interaktionspartner sind, was die Bildung eines Multikomplexes der drei Proteine nahelegt (Hoe et al., 2006a). Der ApoER2 hat weitere Interaktionspartner, die ebenfalls physiologisch mit APP interagieren, beispielsweise das synaptotrophe Spondin-1 und das Adapterprotein Fe65, die die Oberflächenexpression des APPs erhöhen und dessen nicht-amyloidogene Prozessierung fördern (Ho und Südhof, 2004; Hoe et al., 2005; Hoe et al., 2006b; Wasser und Herz, 2017). Die Anwesenheit von ApoE4 wiederum förderte die APP-ApoER2-Endocytose und damit indirekt auch die endosomale Spaltung des A $\beta$ -Peptids (He et al., 2007; Wasser und Herz, 2017). Neben den Effekten auf A $\beta$  wurde gezeigt, dass ApoE4 auch einen Effekt auf die Taupathologie hat (Liraz et al., 2013). Der KO von ApoER2 zeigte ebenfalls eine gesteigerte Hyperphosphorylierung von Tau (Hiesberger et al., 1999). Bei der Abwesenheit des ApoER2 war die Interaktion mit Reelin gestört, was hier möglicherweise zu einer Kompensation durch die Phosphorylierung von Tau führte, um die NMDAR-Aktivität zu stabilisieren.

Die beschriebenen Dokumentationen lassen die Schlussfolgerung zu, dass bei ApoE4-Trägern die exzitatorische NMDAR-vermittelte Neurotransmission beeinträchtigt ist. Aus diesem Ungleichgewicht heraus hat das neuronale System bereits eine angepasste, erhöhte Kompensation durch A $\beta$ -Bildung und Tau-Phosphorylierung. Weitere Störungen beispielsweise durch ein mildes Trauma könnten diese Wiederherstellungsmechanismen erschöpfen. In der Tat gibt es Belege dafür, dass die Auswirkungen einer Kopfverletzung durch den Faktor ApoE4 verstärkt werden und auch die anschließende Genesung negativ beeinflusst wird (Lichtman et al., 2000; Ariza et al., 2006).

### **5.3.4 Weitere Alzheimer-assoziierte Faktoren im Ätiologie-Modell der NMDAR-Insuffizienz**

Epidemiologische und klinische Auswertungen haben eine Vielzahl an Faktoren ergeben, die mit der Alzheimerschen Krankheit korrelieren, obwohl sie auf den ersten Blick zusammenhangslos erscheinen. Mit dem Modell der NMDA-Rezeptor-Insuffizienz als Ursache von Morbus Alzheimer bekommen einige dieser Faktoren eine Plausibilität. Beispielsweise zeigt sich das biologische Geschlecht als Faktor, der eine Auswirkung auf die Alzheimer-Vulnerabilität zu haben scheint (Snyder et al., 2016). Studien zeigten, dass Frauen und Männer zu Beginn gleichermaßen von Amyloidpathologie betroffen sind, diese jedoch in weiblichen Patienten signifikant schneller voranschreitet (Braak et al., 2011). Bei milden kognitiven Beeinträchtigungen (MCI) und Morbus Alzheimer zeigt sich, dass Frauen in einem stärkeren Ausmaß von kognitiven Beeinträchtigungen und Hirn-Atrophie betroffen sind als Männer (Lin et al., 2015; Mosconi et al., 2017a). Magnetresonanztomographie-Studien zeigen auch, dass Frauen bei MCI mit einer Rate von 1% - 1,5% nachweislich schneller von Hirn-Atrophien betroffen sind (Hua et al., 2010). Die Geschlechter-bezogenen Ergebnisse in dieser Dissertation spiegeln die Alzheimer-Epidemiologie wieder (Snyder et al., 2016). Die weiblichen Mäuse in dieser Arbeit zeigten bereits nach kürzerer Behandlungszeit und unter geringen MK-801-Dosen signifikante Effekte auf Proteinebene im Vergleich zu den parallel behandelten männlichen Mäusen. Möglicherweise entstanden die Effekte durch die nachgewiesenen erhöhte Sensitivität von weiblichen Nagern gegenüber NMDAR-Inhibitoren, die maßgeblich von Geschlechts-Hormonen beeinflusst wird (De Olmos et al., 2008). Die fehlende Habituation der weiblichen Mäuse (Absatz 4.3.2) in dieser Arbeit könnte alternativ auch aus höheren MK-801-Konzentrationen im Gehirn auch bei geringeren Injektionsdosen resultieren (Andiné et al., 1999).

Allgemein wird diskutiert, ob die neuroprotektive Funktion des Hormons Östrogen (Moosmann und Behl, 1999) und der Östrogenverlust von Frauen im Zuge der Menopause einen Einfluss auf die geschlechtlichen Unterschiede haben könnten (Li et al., 2014). Studien zur Funktion des Östrogens in neuronalen Strukturen haben gezeigt, dass dieses Hormon einen positiven Einfluss auf die NMDAR-vermittelten Signale und die Rezeptordichte im Hippocampus hat (Woolley et al., 1997; Spencer et al., 2008; Murakami et al., 2015). Der Östrogen-Spiegel verringert sich bei Frauen mit einem Alter von über 50 Jahren, korrelierend mit dem Einsetzen der Menopause. Frauen in und

nach der Menopause zeigen einen Glukose-Hypometabolismus in Hirnarealen, die auch bei der Alzheimerschen Demenz betroffen sind (Mosconi et al., 2017b). Die durch den Verlust des Östrogens geschaffene NMDAR-Insuffizienz würde in diesem Modell eine kompensatorische Erhöhung des A $\beta$ -Peptids provozieren. Tatsächlich konnte in Alzheimer-Modellmäusen und auch Patienten eine gegensätzliche Korrelation von A $\beta$ -Ablagerungen und Östrogen-Spiegeln entdeckt werden (Li et al., 2014), die bei weiblichen ApoE4-Trägern sogar noch deutlicher ausgeprägt war (Mosconi et al., 2017b)

Der Faktor Schlaf. Die Analyse mehrerer KO-Mauslinien hat ergeben, dass die Calcium-abhängige Hyperpolarisation von Neuronen einen Einfluss auf die Schlafdauer und die Tiefschlafphase haben (Tatsuki et al., 2016). Ist die Hyperpolarisation gehemmt, zeigt sich die Schlafdauer verringert. Die pharmakologische Inhibition von NMDA-Rezeptoren hat ebenfalls zu verkürzten Schlafphasen in Mäusen (Tatsuki et al., 2016) und Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) geführt (Tomita et al., 2015). Diese Ergebnisse implizieren, dass die Funktion der NMDARs auch die Regulation von Schlaf fördert. Der KO der NR1-Untereinheit in Fruchtfliegen (Tomita et al., 2015) und Versuche zur Glycin-Suppression (Kawai et al., 2015) haben gezeigt, dass vor allem die Glycin-Bindestelle bei der NMDAR-abhängigen Schlafregulation eine Rolle zu spielen scheint. Auch bei Patienten mit Alzheimerscher Demenz zeigen sich sehr oft charakteristische Schlafstörungen (Rothman und Mattson, 2012; Bubu et al., 2017), die möglicherweise auf eine Störung der NMDAR-Aktivität zurückzuführen sind. Einige neuere Studien könnten die Menge an A $\beta$ -Ablagerungen und Tau-Akkumulation in nicht-dementen > 60-Jährigen mit schlechterer Schlafqualität, exzessiver Tagesschläfigkeit und erniedrigtem non-rapid-eye-movement-(REM)-Schlaf korrelieren (Spira et al., 2013; Carvalho et al., 2018; Lucey et al., 2019). Unklar ist jedoch, ob die Beeinträchtigung des Schlafs den Alzheimer-Pathologien vorausgeht oder ihnen folgt. Die Hippocampus-abhängige Festigung und Verarbeitung von Erinnerungen korrelierte ebenfalls mit gestörten Schlafphasen und erhöhten A $\beta$ -Konzentrationen (Mander et al., 2015).

Der Faktor Hörverlust. Bei Morbus Alzheimer sind auditive Gehirnareale von den typischen Pathologien betroffen (Sinha et al., 1993). Ein Hörverlust wird stark mit der Alzheimerschen Demenz assoziiert und gilt als Risikofaktor (Livingston et al., 2017). Auch DS-Patienten zeigen sehr häufig eine Beeinträchtigung des Hörvermögens

(Kreicher et al., 2018). Die auditive Funktion im Gehirn wird von verschiedenen Systemen gesteuert. Es scheint plausibel, dass bei einer Störung die Balance der exzitatorischen und inhibitorischen Signale nicht gegeben ist und eine gestörte NMDAR-vermittelte Calcium-Regulation die Ursache für auditive Beeinträchtigungen sein kann (Rabang et al., 2015; Sanchez et al., 2015). Viele Gehirnareale, die am auditiven System beteiligt sind, exprimieren funktionelle NMDARs. Beispielsweise die Cochlea, die Colliculi und der auditive Cortex besitzen NMDA-Rezeptoren, deren Funktion nachweislich essentiell für die Ausbildung der „auditory space map“ während der Entwicklung und für die Aufrechterhaltung seiner Funktion in der adulten Phase ist (Schnupp et al., 1995; Ingham et al., 1998). Mausmodelle mit reduzierter NMDAR-Funktion haben gezeigt, dass NMDARs auch essentiell für die auditive Verarbeitung sind (Bickel et al., 2008). Es existieren weitere neuere Studien, die die Rolle der NMDAR-Aktivität, für die Ausbildung auditiver Potentiale beschrieben haben (Askew und Metherate, 2016; Teichert et al., 2017; Schuelert et al., 2018). Tatsächlich konnten auditive Defizite bereits klinisch mit NMDAR-Agonisten verbessert werden (Kantrowitz et al., 2016). Die NMDAR-Blockade als Ursache der Alzheimerschen Krankheit könnte daher eine mögliche Erklärung für die Demenz-begleitenden frühen Beeinträchtigungen des Gehörs sein.

### **5.3.5 Anti-NMDA-Antikörper als mögliche Quelle der NMDAR-Insuffizienz bei sporadischen Formen Alzheimerscher Demenz**

Vor 15 Jahren wurden autoreaktive Antikörper gegen NMDA-Rezeptoren erstmals in Enzephalitis-Patienten beschrieben (Takahashi et al., 2005) und im Jahr 2007 wurde eine spezielle „Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis“ dokumentiert (Dalmau et al., 2007). Heute weiß man, dass Anti-NMDAR-Autoantikörper (Anti-NMDAR) sehr häufig und mit einer Seroprävalenz von 10-20% vorkommen, die mit zunehmendem Alter ansteigt (Dahm et al., 2014; Zerche et al., 2015). Diese Autoantikörper können verschiedenen Immunglobulin-Klassen angehören und es wurden bereits Anti-NMDAR IgA, IgM und IgG identifiziert (Castillo-Gómez et al., 2016). Anti-NMDAR haben eine *in vitro* nachgewiesene hemmende Wirkung auf die NMDAR-vermittelte Exzitation (Prüss et al., 2012a; Doss et al., 2014). Für Anti-NMDAR-Enzephalitis-Modelle wurde beschrieben, dass die Autoantikörper zur Internalisierung der Rezeptoren führten (Hughes et al., 2010; Lynch et al., 2018). Dies würde bedeuten, dass eine verringerte Anzahl an NMDARs an der Zelloberfläche vorläge, was die Verringerung der exzitatorischen



Neurotransmission erklären würde. Anti-NMDAR-Autoantikörper wurden mit kognitiven Defiziten und verschiedenen Formen von Demenz assoziiert (Doss et al., 2014; Finke et al., 2017). Am häufigsten und am relevantesten bei den Krankheits-assoziierten NMDAR-Autoantikörpern scheinen die Anti-NR1-Untereinheiten-Antikörper zu sein (Doss et al., 2014; Castillo-Gómez et al., 2016; Finke et al., 2017). Bei einer Genom-weiten Assoziationsstudie bei Alzheimer-Patienten wurde entdeckt, dass diverse Gene der Immunantwort von Mikroglia-Zellen erhöht waren (Sims et al., 2017). Da Mikroglia-Zellen Antigen-präsentierende Zellen im zentralen Nervensystem sind (Aloisi et al., 2000), passt dies zur Hypothese der auto Anti-NMDAR-Antikörper bei Morbus Alzheimer. Ein zusätzlicher Faktor könnte hier die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu sein (Hammer et al., 2013). Für Morbus Alzheimer und weitere neurodegenerative Krankheiten wurde eine Störung der BHS beschrieben (Sweeney et al., 2018). Mausmodelle bestätigten, dass eine ineffiziente BHS zum Beispiel durch eine ApoE-Mutation oder einen KO, einen deutlich verstärkten Effekt von NMDAR-Antikörper auf das Verhalten der Mäuse zeigten (Hammer et al., 2013; Pan et al., 2019). ApoE4, ein Risikofaktor für die Alzheimersche Demenz, scheint ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Funktion der BHS zu haben (Bell et al., 2012; Alata et al., 2014; Halliday et al., 2016). Die exzitatorische Insuffizienz durch Anwesenheit von Anti-NMDAR könnte also in ApoE4-Trägern stärker induziert sein als in nicht-Trägern des Allels. Auch andere Alzheimer-Risikofaktoren, die mit einer exzitatorischen Insuffizienz in Verbindung gebracht werden können wie neuronale strukturelle Läsionen durch mechanische Traumata (Li et al., 2017), wiederkehrende Blutungen im Gehirn (Rebesz et al., 2002; Cordonnier und von der Flier, 2011) oder neurotrophe virale Infektionen wie beispielsweise *Herpes simplex* (Harris und Harris, 2015; Itzhaki et al., 2016). Interessanterweise können auch diese Risikofaktoren mit einem Aufkommen autoreaktiver NMDAR-Antikörper korreliert werden (Prüss et al., 2012b; Dalmau et al., 2019).

## 5.4 Fazit

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine NMDA-Rezeptor-Hypofunktion zu Alzheimer-ähnlichen Verhaltensveränderungen und Beeinträchtigungen des Lern- und Erinnerungsvermögens in Nagern führt (Ellison, 1995; Wozniak et al., 1996; Andiné et al., 1999; Creeley et al., 2006; von der Staay et al., 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass NMDAR-Antagonisten in adulten Ratten unter hohen Dosen Neurodegeneration induzieren können (Horváth et al., 1997; Wozniak et al., 1998). In dieser Arbeit habe ich jedoch erstmals gezeigt, dass eine pharmakologische Inhibition neuronaler NMDA-Rezeptoren unter milden physiologischen und nicht-transgenen Bedingungen eine gleichzeitige gewebspezifische Erhöhung der APP-Expression, der A $\beta$ -Bildung und der Epitop-spezifischen Tau-Phosphorylierung induziert (Abschnitt 4.2 und 4.3). Alle drei Ereignisse sind mit der Pathologie von Morbus Alzheimer assoziiert. In einer milden Form konnte ich diese Effekte auch in primärer kortikaler Zellkultur nachweisen (Abschnitt 4.1). Insbesondere weibliche Mäuse zeigten augenscheinlich nur geringe biochemische Habituation in Bezug auf wiederholte Injektionen von MK-801, was das pathologische Potential einer chronischen NMDAR-Insuffizienz unterstreicht (Abschnitt 4.3.2). Die sich ergebende Hypothese, dass chronische NMDAR-Insuffizienz die mechanistische Ursache der Alzheimerschen Krankheit ist, beinhaltet die Annahme, dass die pathologischen Merkmale der Demenz aus einer übermäßigen physiologischen Kompensationsantwort auf die gehemmte Neurotransmission hervorgehen. In diesem Ätiologie-Modell der Alzheimerschen Krankheit führt eine permanente und irreversible Blockade der NMDAR zu einer fortlaufenden, aber letztlich ineffizienten kompensatorischen Antwort in Form einer erhöhten A $\beta$ -Produktion und Tau-Phosphorylierung, die schließlich zur Aggregation der beteiligten molekularen Komponenten führt. Weiterhin ist zu vermerken, dass der ursprüngliche Auslöser der NMDAR-Blockade nicht bekannt ist. In meiner Diskussion konnte ich jedoch einige Bezüge zwischen exzitatorischer Insuffizienz und verschiedenen Alzheimer-assoziierten Risikofaktoren herstellen, die eine offenkundige Inhibition der exzitatorischen Neurotransmission zur Folge haben. Die gewonnenen Erkenntnisse eröffnen neue diagnostische Herangehensweisen und potenzielle Präventionsmöglichkeiten wie eine positive Modulation der glutamatergen Neurotransmission beispielsweise mit D-Serin (Lin et al., 2014). Kleinere, präliminäre

Studien zeigten, dass der positive NMDAR-Modulator D-Cycloserin eine günstige Auswirkung auf die kognitiven Fähigkeiten von Alzheimer-Patienten hatte (Tsai et al., 1999); andere Studien konnten diesen Effekt jedoch nicht belegen (Laake und Oeksengaard, 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Modulationsfähigkeit dieser Substanzen möglicherweise zu schwach ist. Die Entwicklung neuer Substanzen, die eine aktivitätsabhängige, positive Modulation der NMDAR-vermittelten Exzitation hervorrufen, könnte hier ein vielversprechender Therapieansatz sein. Die Idee wäre dabei, dass eine substanzabhängige Stimulation der NMDAR-Aktivität eine exzitatorische Hypoaktivität beispielsweise durch eine genetische Hypostimulation und Unterentwicklung oder eine Schädigung durch Traumata oder Entzündungen kompensieren kann. Die publizierten neuen Erkenntnisse über die Korrelation von autoreaktiven Anti-NMDAR-Antikörpern mit Demenz würden weitere diagnostische und therapeutische Möglichkeiten bei Morbus Alzheimer liefern. Ein Screening nach Anti-NMDAR-Antikörpern in Patienten hätte beispielsweise das Potential, in bestimmten Subpopulationen eine frühzeitige Alzheimer-Diagnose zu ermöglichen. Diesbezüglich könnten größere, Alzheimer-spezifische Studien mit Patienten neue Aufschlüsse geben. Sollte sich die Hypothese der Anti-NMDAR-Antikörper bei Morbus Alzheimer bewahrheiten, wäre die Entfernung solcher autoreaktiver Antikörper beispielsweise durch eine Plasmapherese und Anti-B-Zell-Therapien mit bereits existierenden B-Zell-inhibierenden monoklonalen Antikörpern wie dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab (Alexopoulos et al., 2016) ein wichtiger neuer Therapie-Ansatz zur Bekämpfung der Alzheimerschen Demenz.

## 6 Zusammenfassung

Die Alzheimersche Demenz ist eine häufige auftretende neurodegenerative Erkrankung, die durch zwei zellbiologische Merkmale charakterisiert wird, zum einen die intrazelluläre Aggregation des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, zum anderen die Bildung von extrazellulären senilen Plaques, die aus aggregiertem Amyloid  $\beta$ -Peptid bestehen. Bei erneuter Betrachtung der bekannten genetischen Risikofaktoren für hereditäre Formen der Krankheit (z.B. *APP*- und *PSEN1*-Mutationen) sowie anderer Alzheimer-assoziiierter Risikofaktoren wie Trisomie 21, ApoE4 oder Traumata fällt auf, dass diese Faktoren die gemeinsame Konsequenz einer exzitatorischen Insuffizienz teilen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Inhibition von NMDA-Rezeptoren als mögliche Ursache für die Entstehung der charakteristischen Histopathologie von Morbus Alzheimer untersucht. In primärer kortikaler Zellkultur aus Ratten wurde der kompetitive NMDA-Rezeptor Antagonist AP5 verwendet. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit AP5 die Phosphorylierung von Tau an den Epitopen S202, T205 (AT8) und S404 erhöhte und ebenso die Expression des APPs steigerte. Die Freisetzung von A $\beta$ <sub>40</sub> in das Zellkulturmedium war nach 4-stündiger Inkubationszeit ebenfalls erhöht. *In vivo* Experimente zeigten, dass eine einzelne intraperitoneale Injektion des Blut-Hirn-Schranken-gängigen NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 (1,0 mg/kg) in männlichen C57BL/6-Mäusen 4 h und 24 h nach der Behandlung ähnliche, gewebsspezifische Veränderungen hervorrief. Eine mehrfache Behandlung mit drei Injektionen pro Woche über eine Periode von 12 Wochen induzierte eine chronische Phosphorylierung von Tau-Epitopen im Cortex. Parallel wurden weibliche C57BL/6-Wildtyp-Mäuse für einen Zeitraum von 6 Wochen mit 0,2 oder 1,0 mg/kg MK-801 behandelt. Die Tau-Epitope AT8, S404 und S396 zeigten eine gewebsspezifische Verstärkung, wohingegen die APP-Expression nicht beeinflusst war. Presenilin-1, ein Bestandteil der  $\gamma$ -Sekretase, die an der APP-Prozessierung beteiligt ist, zeigte einen signifikanten Abfall in der Proteinexpression. Zusammengefasst wird postuliert, dass die wesentlichen pathologischen Veränderungen bei Morbus Alzheimer aus einer fortlaufenden physiologischen Antwort auf eine Insuffizienz der exzitatorischen Neurotransmission resultieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten neue Perspektiven zur Therapie der Alzheimerschen Krankheit eröffnen.

## 7 Abstract

Alzheimer's disease is a frequent neurodegenerative disorder which is characterized by two main cell biological hallmarks, the aggregation of the intracellular microtubule associated protein tau, and the formation of extracellular plaques consisting of aggregated amyloid  $\beta$ -peptide. Revisiting known genetic causes for hereditary forms of AD (e.g. *APP* or *PSEN1* mutations) as well as other disease-related risk factors such as trisomy 21, ApoE4 or trauma, we noted that they all shared the consequence of excitatory insufficiency. Hence, we have examined NMDA receptor inhibition as possible trigger for the occurrence of the characteristic disease-related histopathologies. In primary rat cortical cell culture, the competitive NMDA receptor antagonist AP5 was. We found that AP5 led to an increase in tau phosphorylation at the AT8 and S404 epitopes as well as increased APP expression and A $\beta$ <sub>40</sub> release into the cell culture medium after 4 h incubation. In vivo experiments showed that a single intraperitoneal injection of the blood-brain barrier permeable NMDA receptor antagonist MK-801 (1.0 mg/kg) in male wild-type C57BL/6 mice caused similar changes in a brain region-specific manner 4 h or 24 h after treatment. Repeated treatment with three injections per week over a twelve-week period induced chronically phosphorylated tau epitopes in the cortex. In parallel, groups of female wild-type C57BL/6 mice were treated for a six-week period with 0.2 or 1.0 mg/kg MK-801. The epitopes at AT8, S404 und S396 showed a tissue-specific increase, whereas the expression of APP appeared not to be altered, while Presenilin-1, which is part of the APP-processing  $\gamma$ -secretase, showed a significant drop in expression. In conclusion, we propose that the major pathological alterations in Alzheimer's disease derive from runaway physiological responses to insufficient excitatory neurotransmission. Our results may open new perspectives for a causal therapy of Alzheimer's disease.

## 8 Literaturverzeichnis

Abramowski D, Wiederhold KH, Furrer U, Jatou AL, Neuenschwander A, Runser MJ, Danner S, Reichwald J, Ammaturo D, Staab D, Stoeckli M, Rueeger H, Neumann U, Staufenbiel M. Dynamics of Abeta turnover and deposition in different beta-amyloid precursor protein transgenic mouse models following gamma-secretase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 327(2):411-24 (2008).

Adams B, Moghaddam B. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J Neurosci.* 15;18(14):5545-54 (1998).

Aggleton JP, Pralus A, Nelson AJ, Hornberger M. Thalamic pathology and memory loss in early Alzheimer's disease: moving the focus from the medial temporal lobe to Papez circuit. *Brain.* 139(Pt 7):1877-90 (2016).

Alata W, Ye Y, St-Amour I, Vandal M, Calon F. Human apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 expression impairs cerebral vascularization and blood-brain barrier function in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 35(1):86-94 (2015).

Alberdi E, Sánchez-Gómez MV, Cavaliere F, Pérez-Samartín A, Zugaza JL, Trullas R, Domercq M, Matute C. Amyloid beta oligomers induce Ca<sup>2+</sup> dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium.* 47(3):264-72 (2010).

Alexopoulos H, Biba A, Dalakas MC. Anti-B-Cell Therapies in Autoimmune Neurological Diseases: Rationale and Efficacy Trials. *Neurotherapeutics.* 13(1):20-33 (2016).

Allen Institute for Brain Science. Allen Mouse Brain Atlas. URL: [http://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100142143?image\\_type=atlas](http://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100142143?image_type=atlas) (2008).

Allyson J, Dontigny E, Auberson Y, Cyr M, Massicotte G. Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neural Plast.* 340168 (2010).

Aloisi F, Ria F, Adorini L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today.* 21(3):141-7 (2000).

Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr.* 64, 146-148. (1907).

Alzheimer A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z Ges Neurol u Psych.* 4, 356-385. (1911).

Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 12(4):459-509 (2016).

- Amatniek JC, Hauser WA, DelCastillo-Castaneda C, Jacobs DM, Marder K, Bell K, Albert M, Brandt J, Stern Y. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia*. 47(5):867-72 (2006).
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. The hippocampus book. New York, USA: *Oxford University Press* (2007).
- Andiné P, Widermark N, Axelsson R, Nyberg G, Olofsson U, Mårtensson E, Sandberg M. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 290(3):1393-408 (1999).
- Anson LC, Chen PE, Wyllie DJ, Colquhoun D, Schoepfer R. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci*. 15;18(2):581-9 (1998).
- Antonarakis SE. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. *Nat Rev Genet*. 18(3):147-163 (2017).
- Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rüdiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Härtig W. Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci*. 6;23(18):6972-81. (2003)
- Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Res Bull*. 126(Pt 3):238-292 (2016).
- Ariza M, Pueyo R, Matarín Mdel M, Junqué C, Mataró M, Clemente I, Moral P, Poca MA, Garnacho A, Sahuquillo J. Influence of APOE polymorphism on cognitive and behavioural outcome in moderate and severe traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 77(10):1191-3 (2006).
- Askew CE, Metherate R. Synaptic interactions and inhibitory regulation in auditory cortex. *Biol Psychol*. 116:4-9 (2016).
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 103(1):26-35 (2002).
- Bakker CB, Amini FB. Observations on the psychotomimetic effects of Sernyl. *Compr Psychiatry*. 2:269-80 (1961).
- Bales KR, Liu F, Wu S, Lin S, Koger D, DeLong C, Hansen JC, Sullivan PM, Paul SM. Human APOE isoform-dependent effects on brain beta-amyloid levels in PDAPP transgenic mice. *J Neurosci*. 27;29(21):6771-9 (2009).
- Bashir ZI, Jane DE, Sunter DC, Watkins JC, Collingridge GL. Metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 3;239(1-3):265-6 (1993).

Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC; Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 367(9):795-804 (2012).

Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelman G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron.* 18;47(4):567-79 (2005).

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23(4):213-27. (2010).

Belichenko PV, Masliah E, Kleschevnikov AM, Villar AJ, Epstein CJ, Salehi A, Mobley WC. Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of Down Syndrome. *J Comp Neurol.* 13;480(3):281-98 (2004).

Bell KF, Zheng L, Fahrenholz F, Cuello AC. ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging.* 29(4):554-65 (2008).

Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, Holtzman DM, Betsholtz C, Armulik A, Sallstrom J, Berk BC, Zlokovic BV. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature.* 16;485(7399):512-6 (2012).

Bendotti C, Forloni GL, Morgan RA, O'Hara BF, Oster-Granite ML, Reeves RH, Gearhart JD, Coyle JT. Neuroanatomical localization and quantification of amyloid precursor protein mRNA by in situ hybridization in the brains of normal, aneuploid, and lesioned mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(10):3628-32 (1988).

Benke TA, Lüthi A, Isaac JT, Collingridge GL. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature.* 25;393(6687):793-7 (1998).

Bickel S, Lipp HP, Umbricht D. Early auditory sensory processing deficits in mouse mutants with reduced NMDA receptor function. *Neuropsychopharmacology.* 33(7):1680-9 (2008).

Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.* 101(4):1371-1378 (1985).

Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med.* 10(4):231-9 (2008).

Bird SM, Sohrabi HR, Sutton TA, Weinborn M, Rainey-Smith SR, Brown B, Patterson L, Taddei K, Gupta V, Carruthers M, Lenzo N, Knuckey N, Bucks RS, Verdile G, Martins RN. Cerebral amyloid- $\beta$  accumulation and deposition following traumatic brain injury--A narrative review and meta-analysis of animal studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 64:215-28 (2016).



- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 29;368(9533):387-403 (2006).
- Bolmont T, Clavaguera F, Meyer-Luehmann M, Herzog MC, Radde R, Staufenbiel M, Lewis J, Hutton M, Tolnay M, Jucker M. Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *Am J Pathol*. 171(6):2012-20 (2007).
- Boric K, Muñoz P, Gallagher M, Kirkwood A. Potential adaptive function for altered long-term potentiation mechanisms in aging hippocampus. *J Neurosci*. 6;28(32):8034-9 (2008).
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82(4):239-59 (1991).
- Braak H, Braak E, Bohl J. Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol*. 33(6):403-8 (1993).
- Braak E, Braak H, Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol*. 87(6):554-67 (1994a).
- Braak H, Braak E, Strothjohann M. Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neurosci Lett*. 25;171(1-2):1-4. (1994b).
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*. 112(4):389-404 (2006).
- Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol*. 70(11):960-9 (2011).
- Bright J, Hussain S, Dang V, Wright S, Cooper B, Byun T, Ramos C, Singh A, Parry G, Stagliano N, Griswold-Prenner I. Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiol Aging*. 36(2):693-709 (2015).
- Brion JP, Smith C, Couck AM, Gallo JM, Anderton BH. Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 61(6):2071-80 (1993).
- Brody DL, Magnoni S, Schwetye KE, Spinner ML, Esparza TJ, Stocchetti N, Zipfel GJ, Holtzman DM. Amyloid-beta dynamics correlate with neurological status in the injured human brain. *Science*. 29;321(5893):1221-4 (2008).

- Brorson JR, Bindokas VP, Iwama T, Marcuccilli CJ, Chisholm JC, Miller RJ. The Ca<sup>2+</sup> influx induced by beta-amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *J Neurobiol.* 26(3):325-338 (1995).
- Bubu OM, Brannick M, Mortimer J, Umasabor-Bubu O, Sebastião YV, Wen Y, Schwartz S, Borenstein AR, Wu Y, Morgan D, Anderson WM. Sleep, Cognitive impairment, and Alzheimer's disease: A Systematic and Meta-Analysis. *Sleep.* 1;40(1) (2017).
- Buchhave P, Minthon L, Zetterberg H, Wallin AK, Blennow K, Hansson O. Cerebrospinal fluid levels of  $\beta$ -amyloid 1-42, but not of tau, are fully changed already 5 to 10 years before the onset of Alzheimer dementia. *Arch Gen Psychiatry.* 69(1):98-106 (2012)
- Bukhari H, Glotzbach A, Kolbe K, Leonhardt G, Loosse C, Müller T. Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 156:189-213 (2017).
- Burns A, Iliffe S. Alzheimer's disease. *BMJ* 338:b158 (2009).
- Butcher SP, Davis S, Morris RG. A dose-related impairment of spatial learning by the NMDA receptor antagonist, 2-amino-5-phosphonovalerate (AP5). *Eur Neuropsychopharmacol.* 1(1):15-20 (1990).
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci.* 4(3):233-4 (2001).
- Cao X, Südhof TC. A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* 24;293(5534):1436 (2001).
- Carroll RC, Beattie EC, von Zastrow M, Malenka RC. Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2(5):315-24 (2001).
- Carvalho DZ, St Louis EK, Knopman DS, Boeve BF, Lowe VJ, Roberts RO, Mielke MM, Przybelski SA, Machulda MM, Petersen RC, Jack CR Jr, Vemuri P. Association of Excessive Daytime Sleepiness With Longitudinal  $\beta$ -Amyloid Accumulation in Elderly Persons Without Dementia. *JAMA Neurol.* 1;75(6):672-680 (2018).
- Castillo PE, Weisskopf MG, Nicoll RA. The role of Ca<sup>2+</sup> channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron.* 12(2):261-9 (1994).
- Castillo-Gómez E, Oliveira B, Tapken D, Bertrand S, Klein-Schmidt C, Pan H, Zafeiriou P, Steiner J, Jurek B, Trippe R, Prüss H, Zimmermann WH, Bertrand D, Ehrenreich H, Hollmann M. All naturally occurring autoantibodies against the NMDA receptor subunit NR1 have pathogenic potential irrespective of epitope and immunoglobulin class. *Mol Psychiatry.* 22(12):1776-1784 (2017).

- Castro P, Zaman S, Holland A. Alzheimer's disease in people with Down's syndrome: the prospects for and the challenges of developing preventative treatments. *J Neurol.* 264(4):804-813 (2017).
- Chapman AG. Glutamate receptors in epilepsy. *Prog Brain Res.* 116:371-83 (1998).
- Chasseigneaux S, Dinc L, Rose C, Chabret C, Couplier F, Topilko P, Mauger G, Allinquant B. Secreted amyloid precursor protein  $\beta$  and secreted amyloid precursor protein  $\alpha$  induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PLoS One.* 27;6(1):e16301 (2011).
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature.* 14;415(6873):793-8 (2002).
- Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J. Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci.* 7;25(36):8209-16 (2005).
- Chen CD, Oh SY, Hinman JD, Abraham CR. Visualization of APP dimerization and APP-Notch2 heterodimerization in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Neurochem.* 97(1):30-43 (2006).
- Chen Y, Durakoglugil MS, Xian X, Herz J. ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29;107(26):12011-6 (2010).
- Coan EJ, Saywood W, Collingridge GL. MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 11;80(1):111-4 (1987).
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol.* 334:33-46 (1983).
- Cook Maher A, Kielb S, Loyer E, Connelley M, Rademaker A, Mesulam MM, Weintraub S, McAdams D, Logan R, Rogalski E. Psychological well-being in elderly adults with extraordinary episodic memory. *PLoS One.* 23;12(10):e0186413 (2017).
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 13;261(5123):921-3 (1993).
- Cordonnier C, van der Flier WM. Brain microbleeds and Alzheimer's disease: innocent observation or key player? *Brain.* 134(Pt 2):335-44 (2011).
- Corrigan F, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, Cappai R, van den Heuvel C. Characterisation of the effect of knockout of the amyloid precursor protein on outcome following mild traumatic brain injury. *Brain Res.* 1451: 87-99 (2012).

- Corso TD, Sesma MA, Tenkova TI, Der TC, Wozniak DF, Farber NB, Olney JW. Multifocal brain damage induced by phencyclidine is augmented by pilocarpine. *Brain Res.* 28;752(1-2):1-14 (1997).
- Coulter DA, Eid T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia.* 60(8):1215-26 (2012).
- Cousins SL, Hoey SE, Anne Stephenson F, Perkinson MS. Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery. *J Neurochem.* 111(6):1501-13 (2009).
- Creeley C, Wozniak DF, Labruyere J, Taylor GT, Olney JW. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci.* 12;26(15):3923-32 (2006).
- Crowther RA. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc Nat Acad Sci U S A.* 88(6):2288-92 (1991).
- Crowther RA, Goedert M. Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J Struct Biol.* 130(2-3):271-9 (2000).
- Cummings JL, Morstorf T, Zhong K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther.* 6(4):37 (2014).
- Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimers Dement (N Y).* 5:272-293 (2019).
- Dahm R. Alzheimer's discovery. *Curr Biol.* 16(21):R906-10 (2006).
- Dahm L, Ott C, Steiner J, Stepniak B, Teegen B, Saschenbrecker S, Hammer C, Borowski K, Begemann M, Lemke S, Rentzsch K, Probst C, Martens H, Wienands J, Spalletta G, Weissenborn K, Stöcker W, Ehrenreich H. Seroprevalence of autoantibodies against brain antigens in health and disease. *Ann Neurol.* 76(1):82-94 (2014).
- Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, Baehring JM, Shimazaki H, Koide R, King D, Mason W, Sansing LH, Dichter MA, Rosenfeld MR, Lynch DR. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol.* 61(1):25-36 (2007).
- Dalmau J, Armangué T, Planagumà J, Radosevic M, Mannara F, Leypoldt F, Geis C, Lancaster E, Titulaer MJ, Rosenfeld MR, Graus F. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *Lancet Neurol.* 18(11):1045-1057 (2019).
- Danysz W, Parsons CG. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.* 167, 324-352 (2012).

- Davidsson P, Bogdanovic N, Lannfelt L, Blennow K. Reduced expression of amyloid precursor protein, presenilin-1 and rab3a in cortical brain regions in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 12(4):243-50 (2001).
- Davies BM, Beech HR. The effect of 1-arylcylohexylamine (sernyl) on twelve normal volunteers. *J Ment Sci*. 106:912-24 (1960).
- Davies J, Watkins JC. Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovalerate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord. *Brain Research* 235:378-386 (1982).
- Davis DR, Brion JP, Couck AM, Gallo JM, Hanger DP, Ladhani K, Lewis C, Miller CC, Rupniak T, Smith C, Anderton BH. The phosphorylation state of the microtubule-associated protein tau as affected by glutamate, colchicine and beta-amyloid in primary rat cortical neuronal cultures. *Biochem J*. 1;309(Pt 3):941-9 (1995).
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, Van der Ploeg LH, Sirinathsinghji DJ. 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):1-13 (1999).
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, et al. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 52(6):1158-1165 (1999).
- Deming Y, Li Z, Kapoor M, Harari O, Del-Aguila JL, Black K, Carrell D, Cai Y, Fernandez MV, Budde J, Ma S, Saef B, Howells B, Huang KL, Bertelsen S, Fagan AM, Holtzman DM, Morris JC, Kim S, Saykin AJ, De Jager PL, Albert M, Moghekar A, O'Brien R, Riemenschneider M, Petersen RC, Blennow K, Zetterberg H, Minthon L, Van Deerlin VM, Lee VM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Schellenberg G, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA, Peskind ER, Li G, Di Narzo AF; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI); Alzheimer Disease Genetic Consortium (ADGC), Kauwe JS, Goate AM, Cruchaga C. Genome-wide association study identifies four novel loci associated with Alzheimer's endophenotypes and disease modifiers. *Acta Neuropathol*. 133(5):839-856 (2017).
- De Montigny A, Elhiri I, Allyson J, Cyr M, Massicotte G. NMDA reduces Tau phosphorylation in rat hippocampal slices by targeting NR2A receptors, GSK3 $\beta$ , and PKC activities. *Neural Plast*. 261593 (2013).
- De Olmos S, Bueno A, Bender C, Lorenzo A, De Olmos J. Sex differences and influence of gonadal hormones on MK801-induced neuronal degeneration in the granular retrosplenial cortex of the rat. *Brain Struct Funct*. 213(1-2):229-38 (2008).
- Derkach V, Barria A, Soderling TR. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16;96(6):3269-74 (1999).

- Dine J, Ducourneau VR, Fénelon VS, Fossat P, Amadio A, Eder M, Israel JM, Oliet SH, Voisin DL. Extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in forebrain neurones contributes to osmoregulatory mechanisms. *J Physiol.* 1;592(7):1637-54 (2014).
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science.* 22;319(5866):1086-9. (2008)
- Doggrell SA. Grasping at straws: the failure of solanezumab to modify mild Alzheimer's disease. *Expert Opin Biol Ther.* 18(12):1189-1192 (2018).
- Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, De Strooper B. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem.* 2;280(35):30797-806 (2005).
- Domenici MR, Berretta N, Cherubini E. Two distinct forms of long-term depression coexist at the mossy fiber-CA3 synapse in the hippocampus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7;95(14):8310-5 (1998).
- Doss S, Wandinger KP, Hyman BT, Panzer JA, Synofzik M, Dickerson B, Mollenhauer B, Scherzer CR, Ivinson AJ, Finke C, Schöls L, Müller Vom Hagen J, Trenkwalder C, Jahn H, Höltje M, Biswal BB, Harms L, Ruprecht K, Buchert R, Höglinger GU, Oertel WH, Unger MM, Körtvélyessy P, Bittner D, Priller J, Spruth EJ, Paul F, Meisel A, Lynch DR, Dirnagl U, Endres M, Teegen B, Probst C, Komorowski L, Stöcker W, Dalmau J, Prüss H. High prevalence of NMDA receptor IgA/IgM antibodies in different dementia types. *Ann Clin Transl Neurol.* 1(10):822-32 (2014).
- Dries DR, Yu G. Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 5(2):132-46 (2008).
- Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease: focusing on tau-mediated neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 15;1(1):24 (2012).
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 6(8):734-46 (2007).
- Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;89(10):4363-7 (1992).
- Dugger BN, Hidalgo JA, Chiarolanza G, Mariner M, Henry-Watson J, Sue LI, Beach TG. The distribution of phosphorylated tau in spinal cords of Alzheimer's disease and non-demented individuals. *J Alzheimers Dis.* 34(2):529-36 (2013).

- Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Müller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J.* 7(4):949-57 (1988).
- Edwards G 3rd, Moreno-Gonzalez I, Soto C. Amyloid-beta and tau pathology following repetitive mild traumatic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 19;483(4):1137-1142 (2017).
- Ehlers MD. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron.* 28(2):511-25 (2000).
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 77(1):69-81 (2010).
- Ellison G. The N-methyl-D-aspartate antagonists phencyclidine, ketamine and dizocilpine as both behavioral and anatomical models of the dementias. *Brain Res Brain Res Rev.* 20(2):250-67 (1995).
- Elobeid A, Rantakömi S, Soininen H, Alafuzoff I. Alzheimer's disease-related plaques in nondemented subjects. *Alzheimers Dement.* 10(5):522-9 (2014).
- Esmaeli-Azad B, McCarty JH, Feinstein SC. Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J Cell Sci.* 107(Pt 4):869-79 (1994).
- Farber NB, Kim SH, Dikranian K, Jiang XP, Heinkel C. Receptor mechanisms and circuitry underlying NMDA antagonist neurotoxicity. *Mol Psychiatry.* 7(1):32-43 (2002).
- Fernandez F, Morishita W, Zuniga E, Nguyen J, Blank M, Malenka RC, Garner CC. Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci.* 10(4):411-3 (2007).
- Ferretti MT, Iulita MF, Cavedo E, Chiesa PA, Schumacher Dimech A, Santuccione Chadha A, Baracchi F, Girouard H, Misoch S, Giacobini E, Depypere H, Hampel H; Women's Brain Project and the Alzheimer Precision Medicine Initiative. Sex differences in Alzheimer disease - the gateway to precision medicine. *Nat Rev Neurol.* 14(8):457-469 (2018).
- Finke C, Bartels F, Lütt A, Prüss H, Harms L. High prevalence of neuronal surface autoantibodies associated with cognitive deficits in cancer patients. *J Neurol.* 264(9):1968-1977 (2017).
- Fleming LM, Johnson GV. Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *Biochem J.* 1;309(Pt 1):41-7 (1995).
- Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron.* 13(2):325-38 (1994).

- Frandemiche ML, De Seranno S, Rush T, et al. Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J Neurosci.* 34(17):6084–6097 (2014).
- Freude KK, Penjwini M, Davis JL, LaFerla FM, Blurton-Jones M. Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 8;286(27):24264-74 (2011).
- Fu H, Hardy J, Duff KE. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci.* 21(10):1350-1358 (2018).
- Fu H, Possenti A, Freer R, Nakano Y, Hernandez Villegas NC, Tang M, Cauhy PVM, Lassus BA, Chen S, Fowler SL, Figueroa HY, Huey ED, Johnson GVW, Vendruscolo M, Duff KE. A tau homeostasis signature is linked with the cellular and regional vulnerability of excitatory neurons to tau pathology. *Nat Neurosci.* 22(1):47–56 (2019).
- Garcia-Osta A, Alberini CM. Amyloid beta mediates memory formation. *Learn Mem.* 24;16(4):267-72 (2009).
- Gatta LB, Albertini A, Ravid R, Finazzi D. Levels of beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 mRNAs in Alzheimer hippocampus. *Neuroreport.* 15;13(16):2031-3 (2002).
- Gauthier-Kemper A, Weissmann C, Golovyashkina N, Sebö-Lemke Z, Drewes G, Gerke V, Heinisch JJ, Brandt R. The frontotemporal dementia mutation R406W blocks tau's interaction with the membrane in an annexin A2-dependent manner. *J Cell Biol.* 192(4):647-61 (2011).
- Gazzaley AH, Siegel SJ, Kordower JH, Mufson EJ, Morrison JH. Circuit-specific alterations of N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 in the dentate gyrus of aged monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;93(7):3121-5 (1996).
- Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussièrè T, Bouras C, Kövari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology.* 60(9):1495-500 (2003).
- Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, Trojanowski JQ, Lee VM. Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science.* 300(5619):636-40 (2003).
- Gil M, Ancau M, Schlesiger MI, Neitz A, Allen K, De Marco RJ, Monyer H. Impaired path integration in mice with disrupted grid cell firing. *Nat Neurosci.* 21(1):81-91 (2018).
- Giovannini MG, Mutolo D, Bianchi L, Michelassi A, Pepeu G. NMDA receptor antagonists decrease GABA outflow from the septum and increase acetylcholine outflow from the hippocampus: a microdialysis study. *J Neurosci.* 14(3 Pt 1):1358-65 (1994).
- Godyń J, Jończyk J, Panek D, Malawska B. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Rep.* 68(1):127-38 (2016).



- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. 3(4):519-26 (1989).
- Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulinpolymerization. *EMBO J*. 9(13):4225-30 (1990).
- Goldman JS, Hahn SE, Catania JW, LaRusse-Eckert S, Butson MB, Rumbaugh M, Strecker MN, Roberts JS, Burke W, Mayeux R, Bird T. Genetic counseling and testing for Alzheimer disease: joint practice guidelines of the American College of Medical Genetics and the National Society of Genetic Counselors. *Genet Med*. 13(6):597-605 (2011).
- Gordon E, Rohrer JD, Fox NC. Advances in neuroimaging in frontotemporal dementia. *J Neurochem*. 138 Suppl 1:193-210 (2016).
- Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*. 293(5534):1491-5 (2001).
- Graham DI, Gentleman SM, Lynch A, Roberts GW. Distribution of beta-amyloid protein in the brain following severe head injury. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 21(1):27-34 (1995).
- Grimm MO, Grimm HS, Pätzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, Tschäpe JA, De Strooper B, Müller U, Shen J, Hartmann T. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol*. 7(11):1118-23 (2005).
- Grandke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(13):4913-7 (1986).
- Guénette S, Chang Y, Hiesberger T, Richardson JA, Eckman CB, Eckman EA, Hammer RE, Herz J. Essential roles for the FE65 amyloid precursor protein-interacting proteins in brain development. *EMBO J*. 25;25(2):420-31 (2006).
- Guerreiro RJ, Gustafson DR, Hardy J. The genetic architecture of Alzheimer's disease: beyond APP, PSENs and APOE. *Neurobiol Aging*. 33(3):437-56 (2012).
- Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM. Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 60(5):729-36 (2003).
- Guo JP, Arai T, Miklossy J, McGeer PL. Abeta and tau form soluble complexes that may promote self-aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(6):1953 (2006).

- Guo Q, Wang Z, Li H, Wiese M, Zheng H. APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. *Cell Res.* 22(1):78-89 (2012).
- Haass C, Mandelkow E. Fyn-tau-amyloid: a toxic triad. *Cell.* 142(3):356-358 (2010).
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(5):a006270 (2012).
- Halliday MR, Rege SV, Ma Q, Zhao Z, Miller CA, Winkler EA, Zlokovic BV. Accelerated pericyte degeneration and blood-brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36(1):216-27 (2016).
- Handelmann GE, Contreras PC, O'Donohue TL. Selective memory impairment by phencyclidine in rats. *Eur J Pharmacol.* 4;140(1):69-73 (1987).
- Harborne GC, Watson FL, Healy DT, Groves L. The effects of sub-anaesthetic doses of ketamine on memory, cognitive performance and subjective experience in healthy volunteers. *J Psychopharmacol.* 10(2):134-40 (1996).
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 10;256(5054):184-5 (1992).
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 19;297(5580):353-6 (2002).
- Harkany T, et al. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2735-2745 (2000).
- Harris EW, Ganong AH, Cotman CW. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res.* 3;323(1):132-7 (1984).
- Harris EW, Cotman CW. Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett.* 25;70(1):132-7 (1986).
- Harris SA, Harris EA. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 48(2):319-53 (2015).
- Harrison SM, Harper AJ, Hawkins J, Duddy G, Grau E, Pugh PL, Winter PH, Shilliam CS, Hughes ZA, Dawson LA, Gonzalez MI, Upton N, Pangalos MN, Dingwall C. BACE1 (beta-secretase) transgenic and knockout mice: identification of neurochemical deficits and behavioral changes. *Mol Cell Neurosci.* 24(3):646-55 (2003).

- He X, Cooley K, Chung CH, Dashti N, Tang J. Apolipoprotein receptor 2 and X11 alpha/beta mediate apolipoprotein E-induced endocytosis of amyloid-beta precursor protein and beta-secretase, leading to amyloid-beta production. *J Neurosci.* 11;27(15):4052-60 (2007).
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rüllicke T, von Kretzschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Müller U. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci.* 1;20(21):7951-63 (2000).
- Heck N, Golbs A, Riedemann T, Sun JJ, Lessmann V, Luhmann HJ. Activity-dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 18:1335-1349 (2008).
- Heeren J, Grewal T, Laatsch A, Becker N, Rinninger F, Rye KA, Beisiegel U. Impaired recycling of apolipoprotein E4 is associated with intracellular cholesterol accumulation. *J Biol Chem.* 31;279(53):55483-92 (2004).
- Hefter D, Draguhn A. APP as a Protective Factor in Acute Neuronal Insults. *Front Mol Neurosci.* 2;10:22 (2017).
- Heilig EA, Xia W, Shen J, Kelleher RJ 3rd. A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of gamma-secretase activity. *J Biol Chem.* 16;285(29):22350-9 (2010).
- Heilig EA, Gutti U, Tai T, Shen J, Kelleher RJ 3rd. Trans-dominant negative effects of pathogenic PSEN1 mutations on  $\gamma$ -secretase activity and A $\beta$  production. *J Neurosci.* 10;33(28):11606-17 (2013).
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretzschmar H, Sisodia S, Müller U. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 13;23(20):4106-15 (2004).
- Hettinger JC, Lee H, Bu G, Holtzman DM, Cirrito JR. AMPA-ergic regulation of amyloid- $\beta$  levels in an Alzheimer's disease mouse model. *Mol Neurodegener.* 15;13(1):22 (2018).
- Hick M, Herrmann U, Weyer SW, Mallm JP, Tschäpe JA, Borgers M, Mercken M, Roth FC, Draguhn A, Slomianka L, Wolfer DP, Korte M, Müller UC. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APPs $\alpha$  in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol.* 129(1):21-37 (2015).
- Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J. Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. *Neuron.* 24(2):481-9 (1999).
- Ho A, Südhof TC. Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8):2548-53 (2004).

- Hoe HS, Wessner D, Beffert U, Becker AG, Matsuoka Y, Rebeck GW. F-spondin interaction with the apolipoprotein E receptor ApoEr2 affects processing of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol.* 25(21):9259-68 (2005).
- Hoe HS, Pocivavsek A, Chakraborty G, Fu Z, Vicini S, Ehlers MD, Rebeck GW. Apolipoprotein E receptor 2 interactions with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem.* 10;281(6):3425-31 (2006a).
- Hoe HS, Magill LA, Guenette S, Fu Z, Vicini S, Rebeck GW. FE65 interaction with the ApoE receptor ApoEr2. *J Biol Chem.* 25;281(34):24521-30 (2006b).
- Hoe HS, Lee KJ, Carney RS, Lee J, Markova A, Lee JY, Howell BW, Hyman BT, Pak DT, Bu G, Rebeck GW. Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J Neurosci.* 29(23):7459-73 (2009a).
- Hoe HS, Fu Z, Makarova A, Lee JY, Lu C, Feng L, Pajoohesh-Ganji A, Matsuoka Y, Hyman BT, Ehlers MD, Vicini S, Pak DT, Rebeck GW. The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. *J Biol Chem.* 27;284(13):8495-506 (2009b).
- Hoey SE, Williams RJ, Perkinton MS. Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production. *J Neurosci.* 29(14):4442-4460 (2009).
- Holmes O, Paturi S, Selkoe DJ, Wolfe MS. Pen-2 is essential for  $\gamma$ -secretase complex stability and trafficking but partially dispensable for endoproteolysis. *Biochemistry.* 15;53(27):4393-406 (2014).
- Holth JK, Bomben VC, Reed JG, Inoue T, Younkin L, Younkin SG, Pautler RG, Botas J, Noebels JL. Tau loss attenuates neuronal network hyperexcitability in mouse and Drosophila genetic models of epilepsy. *J Neurosci.* 23;33(4):1651-9 (2013).
- Holtzman DM, Herz J, Bu G. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(3):a006312 (2012).
- Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci.* 24;27(43):11496-500 (2007).
- Horváth ZC, Czopf J, Buzsáki G. MK-801-induced neuronal damage in rats. *Brain Res.* 11;753(2):181-95 (1997).
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16;96(6):3228-33 (1999).
- Hsu S, Pimenova AA, Hayes K, Villa JA, Rosene MJ, Jere M, Goate AM, Karch CM. Systematic validation of variants of unknown significance in APP, PSEN1 and PSEN2. *Neurobiol Dis.* 139:104817 (2020).

Hua X, Hibar DP, Lee S, Toga AW, Jack CR Jr, Weiner MW, Thompson PM; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Sex and age differences in atrophic rates: an ADNI study with n=1368 MRI scans. *Neurobiol Aging*. 31(8):1463-80 (2010).

Huerta PT, Sun LD, Wilson MA, Tonegawa S. Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron*. 25(2):473-80 (2000).

Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, Parsons TD, Lynch DR, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci*. 28;30(17):5866-75 (2010).

Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate(NMDA) receptor NR1 subunit mRNA expression in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 78(1):175-82 (2001).

Ingham NJ, Thornton SK, McCrossan D, Withington DJ. Neurotransmitter involvement in development and maintenance of the auditory space map in the guinea pig superior colliculus. *J Neurophysiol*. 80(6):2941-53 (1998).

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*. 1;283(5398):70-4 (1999).

Ikonomovic MD, Uryu K, Abrahamson EE, Ciallella JR, Trojanowski JQ, Lee VM, Clark RS, Marion DW, Wisniewski SR, DeKosky ST. Alzheimer's pathology in human temporal cortex surgically excised after severe brain injury. *Exp Neurol*. 190(1):192-203 (2004).

Ishida A, Furukawa K, Keller JN, Mattson MP. Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport*. 7;8(9-10):2133-7 (1997).

Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufienbiel M, Hardeman E, Götz J. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*. 2010 142(3):387-397 (2010).

Ittner LM, Götz J. Amyloid- $\beta$  and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 12(2):65-72 (2011).

Ittner A, Chua SW, Bertz J, Volkerling A, van der Hoven J, Gladbach A, Przybyla M, Bi M, van Hummel A, Stevens CH, Ippati S, Suh LS, Macmillan A, Sutherland G, Kril JJ, Silva AP, Mackay JP, Poljak A, Delerue F, Ke YD, Ittner LM. Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid- $\beta$  toxicity in Alzheimer's mice. *Science*. 18;354(6314):904-908 (2016).

Itzhaki RF, Lathe R, Balin BJ, Ball MJ, Bearer EL, Braak H, Bullido MJ, Carter C, Clerici M, Cosby SL, Del Tredici K, Field H, Fulop T, Grassi C, Griffin WS, Haas J, Hudson AP, Kamer AR, Kell DB, Licastro F,

- Letenneur L, Lövheim H, Mancuso R, Miklossy J, Otth C, Palamara AT, Perry G, Preston C, Pretorius E, Strandberg T, Tabet N, Taylor-Robinson SD, Whittum-Hudson JA. Microbes and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 51(4):979-84 (2016).
- Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;103(13):5161-6. (2006).
- Jacobsen KT, Iverfeldt K. Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci.* 66(14):2299-318 (2009).
- Jagust W. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 19(11):687-700 (2018).
- Jellinger KA. Head injury and dementia. *Curr Opin Neurol.* 17(6):719-23 (2004).
- Jespersen A, Tajima N, Fernandez-Cuervo G, Garnier-Amblard EC, Furukawa H. Structural insights into competitive antagonism in NMDA receptors. *Neuron.* 22;81(2):366-78 (2014).
- Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature.* 5-11;325(6104):529-31 (1987).
- Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Traumatic brain injury and amyloid- $\beta$  pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci.* 11(5):361-70 (2010).
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of Neuronal Science. *Elsevier Science Publishing Co., Inc.* Third Edition (1991).
- Kang J, Müller-Hill B. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 166(3):1192-200 (1990).
- Kantrowitz JT, Epstein ML, Beggel O, Rohrig S, Lehrfeld JM, Revheim N, Lehrfeld NP, Reep J, Parker E, Silipo G, Ahissar M, Javitt DC. Neurophysiological mechanisms of cortical plasticity impairments in schizophrenia and modulation by the NMDA receptor agonist D-serine. *Brain.* 139(Pt 12):3281-3295 (2016).
- Karakas E, Furukawa H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science.* 30;344(6187):992-7 (2014).
- Katsuki H, Kaneko S, Tajima A, Satoh M. Separate mechanisms of long-term potentiation in two input systems to CA3 pyramidal neurons of rat hippocampal slices as revealed by the whole-cell patch-clamp technique. *Neurosci Res.* 12(3):393-402 (1991).

- Katsumoto A, Takeuchi H, Tanaka F. Tau Pathology in Chronic Traumatic Encephalopathy and Alzheimer's Disease: Similarities and Differences. *Front Neurol.* 10;10:980 (2019).
- Kaur G, Sharma A, Xu W, Gerum S, Alldred MJ, Subbanna S, Basavarajappa BS, Pawlik M, Ohno M, Ginsberg SD, Wilson DA, Guilfoyle DN, Levy E. Glutamatergic transmission aberration: a major cause of behavioral deficits in a murine model of Down's syndrome. *J Neurosci.* 9;34(15):5099-106 (2014).
- Kawai N, Sakai N, Okuro M, Karakawa S, Tsuneyoshi Y, Kawasaki N, Takeda T, Bannai M, Nishino S. The sleep-promoting and hypothermic effects of glycine are mediated by NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus. *Neuropsychopharmacology.* 40(6):1405-16 (2015).
- Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G, Brandt R. Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci.* 15;16(18):5583-92 (1996).
- Kew JN, Koester A, Moreau JL, Jenck F, Ouagazzal AM, Mutel V, Richards JG, Trube G, Fischer G, Montkowski A, Handt W, Reinscheid RK, Pauly-Evers M, Kemp JA, Bluethmann H. Functional consequences of reduction in NMDA receptor glycine affinity in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site. *J Neurosci.* 1;20(11):4037-49 (2000).
- Khalifa BN, Tyteca D, Marinangeli C, Depuydt M, Collet JF, Courtoy PJ, Renauld JC, Constantinescu S, Octave JN, Kienlen-Campard P. Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing. *FASEB J.* 26(2):855-67 (2012).
- Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 197:192-3 (1963).
- Kienlen-Campard P, Tasiaux B, Octave JN. The processing and biological function of the human amyloid precursor protein (APP): lessons from different cellular models. *Exp Gerontol.* 35(6-7):843-50 (2000).
- Kim HS, Kim EM, Lee JP, Park CH, Kim S, Seo JH, Chang KA, Yu E, Jeong SJ, Chong YH, Suh YH. C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 beta expression. *FASEB J.* 17(13):1951-3 (2003).
- Kim DY, Carey BW, Wang H, Ingano LA, Binshtok AM, Wertz MH, Pettingell WH, He P, Lee VM, Woolf CJ, Kovacs DM. BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol.* 9(7):755-64 (2007).
- Kim SH, Price MT, Olney JW, Farber NB. Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by GABAergic and alpha2-adrenergic agonists. *Mol Psychiatry.* 4(4):344-52 (1999).
- Klein C, Kramer EM, Cardine AM, Schraven B, Brandt R, Trotter J. Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neurosci.* 1;22(3):698-707 (2002).

- Klevanski M, Herrmann U, Weyer SW, Fol R, Cartier N, Wolfer DP, Caldwell JH, Korte M, Müller UC. The APP Intracellular Domain Is Required for Normal Synaptic Morphology, Synaptic Plasticity, and Hippocampus-Dependent Behavior. *J Neurosci.* 9;35(49):16018-33 (2015).
- Koepsell TD, Kurland BF, Harel O, Johnson EA, Zhou XH, Kukull WA. Education, cognitive function, and severity of neuropathology in Alzheimer disease. *Neurology.* 70(19 Pt 2):1732-9 (2008).
- Korte M, Herrmann U, Zhang X, Draguhn A. The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: lessons from genetic mouse models. *Exp Brain Res.* 217(3-4):435-40 (2012).
- Korwek KM, Trotter JH, Ladu MJ, Sullivan PM, Weeber EJ. ApoE isoform-dependent changes in hippocampal synaptic function. *Mol Neurodegener.* 27;4:21 (2009).
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(11):4044-8 (1986).
- Kovalchuk Y, Eilers J, Lisman J, Konnerth A. NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1;20(5):1791-9 (2000).
- Kreicher KL, Weir FW, Nguyen SA, Meyer TA. Characteristics and Progression of Hearing Loss in Children with Down Syndrome. *J Pediatr.* 193:27-33.e2 (2018).
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry.* 51(3):199-214 (1994).
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 1;29(17):3020-32 (2010).
- Kunz L, Schröder TN, Lee H, Montag C, Lachmann B, Sariyska R, Reuter M, Stirnberg R, Stöcker T, Messing-Floeter PC, Fell J, Doeller CF, Axmacher N. Reduced grid-cell-like representations in adults at genetic risk for Alzheimer's disease. *Science.* 23;350(6259):430-3 (2015).
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Dierssen M, Flórez J. Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (Ts65Dn) mice. *Brain Res.* 6;858(1):191-7 (2000).
- Kurumaji A, Nehls DG, Park CK, McCulloch J. Effects of NMDA antagonists, MK-801 and CPP, upon local cerebral glucose use. *Brain Res.* 4;496(1-2):268-84 (1989).
- Kurumaji A, Ikeda M, Dewar D, McCormack AG, McCulloch J. Effects of chronic administration of MK-801 upon local cerebral glucose utilisation and ligand binding to the NMDA receptor complex. *Brain Res.* 1;563(1-2):57-65 (1991).



- Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*. 12(6):1291-300 (1994).
- Kutsuwada T, Sakimura K, Manabe T, Takayama C, Katakura N, Kushiya E, Natsume R, Watanabe M, Inoue Y, Yagi T, Aizawa S, Arakawa M, Takahashi T, Nakamura Y, Mori H, Mishina M. Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron*. 16(2):333-44 (1996).
- Laake K, Oeksengaard AR. D-cycloserine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. (2):CD003153 (2002).
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 24;27(4):796-807 (2007).
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15;227(5259):680-5 (1970).
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30;96(7):3922-7 (1999).
- Landau SM, Horng A, Fero A, Jagust WJ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Amyloid negativity in patients with clinically diagnosed Alzheimer disease and MCI. *Neurology*. 12;86(15):1377-1385 (2016).
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron*. 18(3):493-503 (1997).
- Laube B, Kuhse J, Betz H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neurosci*. 15;18(8):2954-61 (1998).
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci*. (21):3167-77 (1998).
- Lee HG, Zhu X, Ghanbari HA, Ogawa O, Raina AK, O'Neill MJ, Perry G, Smith MA. Differential regulation of glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Neurosignals*. 11(5):282-92 (2002).
- Leissring MA, Murphy MP, Mead TR, Akbari Y, Sugarman MC, Jannatipour M, Anliker B, Müller U, Saftig P, De Strooper B, Wolfe MS, Golde TE, LaFerla FM. A physiologic signaling role for the gamma-secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(7):4697-702 (2002).

- Lemere CA, Blusztajn JK, Yamaguchi H, Wisniewski T, Saido TC, Selkoe DJ. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis.* 3(1):16-32 (1996).
- Lester RA, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature.* 9;346(6284):565-7 (1990).
- Li JH, Wang YH, Wolfe BB, Krueger KE, Corsi L, Stocca G, Vicini S. Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. *Eur J Neurosci.* 10(5):1704-15 (1998).
- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron.* 25;62(6):788-801 (2009).
- Li R, Cui J, Shen Y. Brain sex matters: estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol.* 25;389(1-2):13-21 (2014).
- Li C, Götz J. Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation. *EMBO J.* 36(21):3120-3138 (2017).
- Lichtman SW, Seliger G, Tycko B, Marder K. Apolipoprotein E and functional recovery from brain injury following postacute rehabilitation. *Neurology.* 55(10):1536-9 (2000).
- Lin KA, Choudhury KR, Rathakrishnan BG, Marks DM, Petrella JR, Doraiswamy PM; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Marked gender differences in progression of mild cognitive impairment over 8 years. *Alzheimers Dement (N Y).* 1;1(2):103-110 (2015).
- Liraz O, Boehm-Cagan A, Michaelson DM. ApoE4 induces A $\beta$ 42, tau, and neuronal pathology in the hippocampus of young targeted replacement apoE4 mice. *Mol Neurodegener.* 17;8:16 (2013).
- Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci.* 3(3):175-90 (2002).
- Liu P, Smith PF, Darlington CL. Glutamate receptor subunits expression in memory-associated brain structures: regional variations and effects of aging. *Synapse.* 62(11):834-41 (2008).
- Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.* 9(2):106-18 (2013).
- Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Larson EB, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N. Dementia prevention, intervention, and care. *Lancet.* 16;390(10113):2673-2734 (2017).

- Lopes S, Vaz-Silva J, Pinto V, Dalla C, Kokras N, Bedenk B, Mack N, Czisch M, Almeida OF, Sousa N, Sotiropoulos I. Tau protein is essential for stress-induced brain pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113(26):E3755-63 (2016).
- LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 24;92(22):10369-73 (1995).
- Lorent K, Overbergh L, Moechars D, De Strooper B, Van Leuven F, Van den Berghe H. Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience*. 65(4):1009-25 (1995).
- Lourenço FC, Galvan V, Fombonne J, Corset V, Llambi F, Müller U, Bredesen DE, Mehlen P. Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell Death Differ*. 16(5):655-63 (2009).
- Loy CT, Schofield PR, Turner AM, Kwok JB. Genetics of dementia. *Lancet*. 383(9919):828-40 (2014).
- Lucey BP, McCullough A, Landsness EC, Toedebusch CD, McLeland JS, Zaza AM, Fagan AM, McCue L, Xiong C, Morris JC, Benzinger TLS, Holtzman DM. Reduced non-rapid eye movement sleep is associated with tau pathology in early Alzheimer's disease. *Sci Transl Med*. 9;11(474):eaau6550 (2019).
- Ludewig S, Korte M. Novel Insights into the Physiological Function of the APP (Gene) Family and Its Proteolytic Fragments in Synaptic Plasticity. *Front Mol Neurosci*. 20;9:161 (2017).
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci*. 4(3):231-2 (2001).
- Luo Y, Bolon B, Damore MA, Fitzpatrick D, Liu H, Zhang J, Yan Q, Vassar R, Citron M. BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiol Dis*. 14(1):81-8 (2003).
- Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1;4(6) (2012).
- Lyketsos CG, Lopez O, Jones B, Fitzpatrick AL, Breitner J, DeKosky S. Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. *JAMA*. 288(12):1475-83 (2002).
- Lynch G, Larson J, Kelso S, Barrionuevo G, Schottler F. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*. 20-26;305(5936):719-21 (1983).

- Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 84(1):87-136 (2004).
- Lynch DR, Rattelle A, Dong YN, Roslin K, Gleichman AJ, Panzer JA. Anti-NMDA Receptor Encephalitis: Clinical Features and Basic Mechanisms. *Adv Pharmacol.* 82:235-260 (2018).
- Magnoni S, Esparza TJ, Conte V, et al. Tau elevations in the brain extracellular space correlate with reduced amyloid- $\beta$  levels and predict adverse clinical outcomes after severe traumatic brain injury. *Brain.* 135(Pt 4):1268-1280 (2012).
- Mander BA, Marks SM, Vogel JW, Rao V, Lu B, Saletin JM, Ancoli-Israel S, Jagust WJ, Walker MP.  $\beta$ -amyloid disrupts human NREM slow waves and related hippocampus-dependent memory consolidation. *Nat Neurosci.* 18(7):1051-7 (2015).
- Marcello E, Gardoni F, Mauceri D, Romorini S, Jeromin A, Epis R, Borroni B, Cattabeni F, Sala C, Padovani A, Di Luca M. Synapse-associated protein-97 mediates alpha-secretase ADAM10 trafficking and promotes its activity. *J Neurosci.* 14;27(7):1682-91 (2007).
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* 12, 376-389 (1992).
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature.* 17-23;309(5965):261-3 (1984).
- Mayer ML, MacDermott AB, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. Agonist- and voltage-gated calcium entry in cultured mouse spinal cord neurons under voltage clamp measured using arsenazo III. *J Neurosci.* 1987 Oct;7(10):3230-44.
- Mayer ML, Westbrook GL. Permeation und block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol.* 394:501-27 (1987).
- Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.* 26:81-104 (2003).
- McKenzie KJ, McLellan DR, Gentleman SM, Maxwell WL, Gennarelli TA, Graham DI. Is beta-APP a marker of axonal damage in short-surviving head injury? *Acta Neuropathol.* 92(6):608-13 (1996).
- McLamb RL, Williams LR, Nanry KP, Wilson WA, Tilson HA. MK-801 impedes the acquisition of a spatial memory task in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 37(1):41-5 (1990).
- Mellor J, Nicoll RA. Hippocampal mossy fiber LTP is independent of postsynaptic calcium. *Nat Neurosci.* 4(2):125-6 (2001).

- Midthune B, Tyán SH, Walsh JJ, Sarsoza F, Eggert S, Hof PR, Dickstein DL, Koo EH. Deletion of the amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) does not affect hippocampal neuron morphology or function. *Mol Cell Neurosci.* 49(4):448-55 (2012).
- Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fülöp L, Penke B, Zilberter Y, Harkany T, Pitkänen A, Tanila H. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci.* 18;29(11):3453-62 (2009).
- Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis.* 15(1):80-92 (2004).
- Miyamoto S, Leipzig JN, Lieberman JA, Duncan GE. Effects of ketamine, MK-801, and amphetamine on regional brain 2-deoxyglucose uptake in freely moving mice. *Neuropsychopharmacology.* 22(4):400-12 (2000).
- Moechars D, Lorent K, De Strooper B, Dewachter I, Van Leuven F. Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J.* 15;15(6):1265-74 (1996).
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci.* 15;17(8):2921-7 (1997).
- Molnár Z, Soós K, Lengyel I, Penke B, Szegedi V, Budai D. Enhancement of NMDA responses by beta-amyloid peptides in the hippocampus in vivo. *Neuroreport.* 19;15(10):1649-52 (2004).
- Mondadori C, Weiskrantz L, Buerki H, Petschke F, Fagg GE. NMDA receptor antagonists can enhance or impair learning performance in animals. *Exp Brain Res.* 75(3):449-56 (1989).
- Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J. Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem.* 14;287(38):32040-53 (2012).
- Monsell SE, Kukull WA, Roher AE, Maarouf CL, Serrano G, Beach TG, Caselli RJ, Montine TJ, Reiman EM. Characterizing Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 Carriers and Noncarriers with the Clinical Diagnosis of Mild to Moderate Alzheimer Dementia and Minimal  $\beta$ -Amyloid Peptide Plaques. *JAMA Neurol.* 72(10):1124-31 (2015).
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 12(3):529-40 (1994).

- Moosmann B, Behl C. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3;96(16):8867-72 (1999).
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L. A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis.* 19(2):441-9 (2010).
- Moreno L, Rose C, Mohanraj A, Allinquant B, Billard JM, Dutar P. sA $\beta$ PP $\alpha$  Improves Hippocampal NMDA-Dependent Functional Alterations Linked to Healthy Aging. *J Alzheimers Dis.* 48(4):927-35 (2015).
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature.* 5;319(6056):774-6 (1986).
- Morris RG. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci.* 9(9):3040-57 (1989).
- Morris M, Knudsen GM, Maeda S, Trinidad JC, Ioanoviciu A, Burlingame AL, Mucke L. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci.* 18(8):1183-9 (2015).
- Mortimer JA, Snowdon DA, Markesbery WR. Head circumference, education and risk of dementia: findings from the Nun Study. *J Clin Exp Neuropsychol.* 25(5):671-9 (2003).
- Mosconi L, Berti V, Quinn C, McHugh P, Petrongolo G, Varsavsky I, Osorio RS, Pupi A, Vallabhajosula S, Isaacson RS, de Leon MJ, Brinton RD. Sex differences in Alzheimer risk: Brain imaging of endocrine vs chronologic aging. *Neurology.* 26;89(13):1382-1390 (2017a).
- Mosconi L, Berti V, Quinn C, McHugh P, Petrongolo G, Osorio RS, Connaughty C, Pupi A, Vallabhajosula S, Isaacson RS, de Leon MJ, Swerdlow RH, Brinton RD. Perimenopause and emergence of an Alzheimer's bioenergetic phenotype in brain and periphery. *PLoS One.* 10;12(10):e0185926 (2017b).
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO Jr, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25;97(9):4926-31 (2000).
- Moussa-Pacha NM, Abdin SM, Omar HA, Alniss H, Al-Tel TH. BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease. *Med Res Rev.* 40(1):339-384 (2020).
- Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J, Lewczuk P. Cellular Receptors of Amyloid  $\beta$  Oligomers (A $\beta$ Os) in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 27;19(7):1884 (2018).
- Mulkey RM, Herron CE, Malenka RC. An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression. *Science.* 20;261(5124):1051-5 (1993).

Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature*. 9;369(6480):486-8 (1994).

Müller UC, Zheng H. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2(2):a006288 (2012).

Murakami G, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Chambon P, Nakajima K, Ooishi Y, Kimoto T, Kawato S. Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus. *Brain Res*. 24;1621:133-46 (2015).

Murphy-Royal C, Dupuis JP, Varela JA, Panatier A, Pinson B, Baufreton J, Groc L, Oliet SH. Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat Neurosci*. 18(2):219-26 (2015).

Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 71(5):362-81 (2012).

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res*. 387(3):271-80 (1986).

Neve RL, Finch EA, Dawes LR. Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron*. 1(8):669-77 (1988).

Neves G, Cooke SF, Bliss TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 9(1):65-75 (2008).

Newcomer JW, Farber NB, Olney JW. NMDA receptor function, memory, and brain aging. *Dialogues Clin Neurosci*. 2(3):219-32 (2000).

Nicolas M, Hassan BA. Amyloid precursor protein and neural development. *Development*. 141(13):2543-8 (2014).

Nicoll RA, Malenka RC. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 14;377(6545):115-8 (1995).

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbst A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 307:462-465 (1984).

Nuriel T, Angulo SL, Khan U, Ashok A, Chen Q, Figueroa HY, Emrani S, Liu L, Herman M, Barrett G, Savage V, Buitrago L, Cepeda-Prado E, Fung C, Goldberg E, Gross SS, Hussaini SA, Moreno H, Small SA,

- Duff KE. Neuronal hyperactivity due to loss of inhibitory tone in APOE4 mice lacking Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Commun.* 13;8(1):1464 (2017).
- O'Donohue TL, Dorsa DM. The opiomelanotropinergic neuronal and endocrine systems. *Peptides.* 3(3):353-95 (1982).
- Olney JW, Labruyere J, Price MT. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science.* 16;244(4910):1360-2 (1989).
- Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 52(12):998-1007 (1995).
- Olney JW, Wozniak DF, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and Alzheimer's disease. *Restor Neurol Neurosci.* 13(1-2):75-83 (1998).
- Omalu B. Chronic traumatic encephalopathy. *Prog Neurol Surg.* 28:38-49 (2014).
- Pajooohesh-Ganji A, Burns MP, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Hokenbury NG, Stepp MA, Faden AI. Inhibition of amyloid precursor protein secretases reduces recovery after spinal cord injury. *Brain Res.* 29;1560:73-82 (2014).
- Park JH, Gimbel DA, GrandPre T, Lee JK, Kim JE, Li W, Lee DH, Strittmatter SM. Alzheimer precursor protein interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid-beta plaque deposition. *J Neurosci.* 26(5):1386-95 (2006).
- Pan H, Oliveira B, Saher G, Dere E, Tapken D, Mitjans M, Seidel J, Wesolowski J, Wakhloo D, Klein-Schmidt C, Ronnenberg A, Schwabe K, Trippe R, Mätz-Rensing K, Berghoff S, Al-Krinawe Y, Martens H, Begemann M, Stöcker W, Kaup FJ, Mischke R, Boretius S, Nave KA, Krauss JK, Hollmann M, Lühder F, Ehrenreich H. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Mol Psychiatry.* 24(10):1489-1501 (2019).
- Panda D, Goode BL, Feinstein SC, Wilson L. Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry.* 5;34(35):11117-27 (1995).
- Pandis D, Scarmeas N. Seizures in Alzheimer disease: clinical and epidemiological data. *Epilepsy Curr.* 12(5):184-7 (2012).
- Pandit SK, Dundee JW, Bovill JG. Clinical studies of induction agents. Amnesic action of ketamine. *Br J Anaesth.* 43(4):362-4 (1971).
- Papasozomenos SC, Binder LI. Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton.* 8(3):210-26 (1987).



- Patneau DK, Mayer ML. Structure-activity relationships for amino acid transmitter candidates acting at N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *J Neurosci.* 10(7):2385-99 (1990).
- Paxinos G, Franklin KBJ. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press.* Second Edition (2001).
- Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem.* 274(27):18851-6 (1999).
- Planel E, Bretteville A, Liu L, Virag L, Du AL, Yu WH, Dickson DW, Whittington RA, Duff KE. Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *FASEB J.* 23(8):2595-604 (2009).
- Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A. Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 24(10):2401-11 (2004).
- Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, Helms MJ, Newman TN, Drosdick D, Phillips C, Gau BA, Welsh-Bohmer KA, Burke JR, Guralnik JM, Breitner JC. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology.* 55(8):1158-66 (2000).
- Plummer S, Van den Heuvel C, Thornton E, Corrigan F, Cappai R. The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis.* 15;7(2):163-79 (2016).
- Pousinha PA, Mouska X, Raymond EF, Gwizdek C, Dhib G, Poupon G, Zaragosi LE, Giudici C, Bethus I, Pacary E, Willem M, Marie H. Physiological and pathophysiological control of synaptic GluN2B-NMDA receptors by the C-terminal domain of amyloid precursor protein. *Elife.* 6;6:e25659 (2017).
- Potier MC, Braudeau J, Dauphinot L, Delatour B. Reducing GABAergic inhibition restores cognitive functions in a mouse model of Down syndrome. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 13(1):8-15 (2014).
- Prox J, Bernreuther C, Altmepfen H, Grendel J, Glatzel M, D'Hooge R, Stroobants S, Ahmed T, Balschun D, Willem M, Lammich S, Isbrandt D, Schweizer M, Horr  K, De Strooper B, Saftig P. Postnatal disruption of the disintegrin/metalloproteinase ADAM10 in brain causes epileptic seizures, learning deficits, altered spine morphology, and defective synaptic functions. *J Neurosci.* 7;33(32):12915-28, 12928a (2013).
- Pr ss H, Höltje M, Maier N, Gomez A, Buchert R, Harms L, Ahnert-Hilger G, Schmitz D, Terborg C, Kopp U, Klingbeil C, Probst C, Kohler S, Schwab JM, Stoecker W, Dalmau J, Wandinger KP. IgA NMDA receptor antibodies are markers of synaptic immunity in slow cognitive impairment. *Neurology.* 29;78(22):1743-53 (2012a).

Prüss H, Finke C, Höltje M, Hofmann J, Klingbeil C, Probst C, Borowski K, Ahnert-Hilger G, Harms L, Schwab JM, Ploner CJ, Komorowski L, Stoecker W, Dalmau J, Wandinger KP. N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in herpes simplex encephalitis. *Ann Neurol.* 72(6):902-11 (2012b).

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* 31;28(53):14537-45 (2008).

Puzzo D, Privitera L, Fa' M, Staniszewski A, Hashimoto G, Aziz F, Sakurai M, Ribe EM, Troy CM, Mercken M, Jung SS, Palmeri A, Arancio O. Endogenous amyloid- $\beta$  is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol.* 69(5):819-30 (2011).

Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in A $\beta$  physiology. *Neuroscience.* 29;307:26-36 (2015).

Quiroz YT, Budson AE, Celone K, Ruiz A, Newmark R, Castrillón G, Lopera F, Stern CE. Hippocampal hyperactivation in presymptomatic familial Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 68(6):865-75 (2010).

Rabang CF, Lin J, Wu GK. Balance or imbalance: inhibitory circuits for direction selectivity in the auditory system. *Cell Mol Life Sci.* 72(10):1893-906 (2015).

Radzimanowski J, Beyreuther K, Sinning I, Wild K. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of human Fe65-PTB2 in complex with the amyloid precursor protein intracellular domain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 64(Pt 5):409-12 (2008).

Ramos-Cejudo J, Wisniewski T, Marmar C, Zetterberg H, Blennow K, de Leon MJ, Fossati S. Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease: The Cerebrovascular Link. *EBioMedicine.* 28:21-30 (2018).

Redwine JM, Kosofsky B, Jacobs RE, Games D, Reilly JF, Morrison JH, Young WG, Bloom FE. Dentate gyrus volume is reduced before onset of plaque formation in PDAPP mice: a magnetic resonance microscopy and stereologic analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4;100(3):1381-6 (2003).

Regan P, Whitcomb DJ, Cho K. Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau. *Neuroscientist.* 23(2):137-151(2017).

Reiman EM, Quiroz YT, Fleisher AS, Chen K, Velez-Pardo C, Jimenez-Del-Rio M, Fagan AM, Shah AR, Alvarez S, Arbelaez A, Giraldo M, Acosta-Baena N, Sperling RA, Dickerson B, Stern CE, Tirado V, Munoz C, Reiman RA, Huentelman MJ, Alexander GE, Langbaum JB, Kosik KS, Tariot PN, Lopera F. Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *Lancet Neurol.* 11(12):1048-56 (2012).

Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Ghiso J, Frangione B. Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *Brain Pathol.* 12(3):343-57 (2002).

- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Müller UC. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci.* 18;27(29):7817-26 (2007).
- Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, Johnson-Wood K, Kappenman KE, Kawabe TT, Kola I, Kuehn R, Lee M, Liu W, Motter R, Nichols NF, Power M, Robertson DW, Schenk D, Schoor M, Shopp GM, Shuck ME, Sinha S, Svensson KA, Tatsuno G, Tintrup H, Wijsman J, Wright S, McConlogue L. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet.* 1;10(12):1317-24 (2001).
- Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science.* 4;316(5825):750-4 (2007).
- Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, Graham DI. Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 57(4):419-25 (1994).
- Roche KW, Standley S, McCallum J, Dune Ly C, Ehlers MD, Wenthold RJ. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci.* 4(8):794-802 (2001).
- Rodgers SP, Born HA, Das P, Jankowsky JL. Transgenic APP expression during postnatal development causes persistent locomotor hyperactivity in the adult. *Mol Neurodegener.* 18;7:28 (2012).
- Rohrer AE, Maarouf CL, Kokjohn TA, Whiteside CM, Kalback WM, Serrano G, Belden C, Liebsack C, Jacobson SA, Sabbagh MN, Beach TG. Neuropathological and biochemical assessments of an Alzheimer's disease patient treated with the  $\gamma$ -secretase inhibitor semagacestat. *Am J Neurodegener Dis.* 5;3(3):115-33. eCollection (2014).
- Rong Y, Lu X, Bernard A, Khrestchatsky M, Baudry M. Tyrosine phosphorylation of ionotropic glutamate receptors by Fyn or Src differentially modulates their susceptibility to calpain and enhances their binding to spectrin and PSD-95. *J Neurochem.* 79(2):382-390 (2001).
- Rosenthal SL, Kamboh MI. Late-Onset Alzheimer's Disease Genes and the Potentially Implicated Pathways. *Curr Genet Med Rep.* 22;2(2):85-101 (2014).
- Rothman SM, Mattson MP. Sleep disturbances in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med.* 14(3):194-204 (2012).
- Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci.* 10(7):299-302 (1987).

- Rumble B, Retallack R, Hilbich C, Simms G, Multhaup G, Martins R, Hockey A, Montgomery P, Beyreuther K, Masters CL. Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 1;320(22):1446-52 (1989).
- Run X, Liang Z, Zhang L, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Anesthesia induces phosphorylation of tau. *J Alzheimers Dis.* 16(3):619-26 (2009).
- Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H, Mishina M. Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature.* 12;373(6510):151-5 (1995).
- Sanchez JT, Ghelani S, Otto-Meyer S. From development to disease: diverse functions of NMDA-type glutamate receptors in the lower auditory pathway. *Neuroscience.* 29;285:248-59 (2015).
- Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem.* 269(2):1510-7 (1994).
- Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann N Y Acad Sci.* 777:281-7 (1996).
- Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, Campagnole-Santos MJ. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev.* 1;98(1):505-553 (2018).
- Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S, Kelleher RJ 3rd, Kandel ER, Duff K, Kirkwood A, Shen J. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron.* 8;42(1):23-36 (2004).
- Schnupp JW, King AJ, Smith AL, Thompson ID. NMDA-receptor antagonists disrupt the formation of the auditory space map in the mammalian superior colliculus. *J Neurosci.* 15(2):1516-31 (1995).
- Schrenk-Siemens K, Perez-Alcala S, Richter J, Lacroix E, Rahuel J, Korte M, Müller U, Barde YA, Bibel M. Embryonic stem cell-derived neurons as a cellular system to study gene function: lack of amyloid precursor proteins APP and APLP2 leads to defective synaptic transmission. *Stem Cells.* 26(8):2153-63 (2008).
- Schuelert N, Dorner-Ciossek C, Brendel M, Rosenbrock H. A comprehensive analysis of auditory event-related potentials and network oscillations in an NMDA receptor antagonist mouse model using a novel wireless recording technology. *Physiol Rep.* 6(16):e13782 (2018).
- Schulz JM, Knoflach F, Hernandez MC, Bischofberger J. Enhanced Dendritic Inhibition and Impaired NMDAR Activation in a Mouse Model of Down Syndrome. *J Neurosci.* 26;39(26):5210-5221 (2019).

- Scott G, Ramlackhansingh AF, Edison P, Hellyer P, Cole J, Veronese M, Leech R, Greenwood RJ, Turkheimer FE, Gentleman SM, Heckemann RA, Matthews PM, Brooks DJ, Sharp DJ. Amyloid pathology and axonal injury after brain trauma. *Neurology*. 1;86(9):821-8 (2016).
- Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T, Fitzjohn SM, Morton RA, Zheng H, Dawson GR, Sirinathsinghji DJ, Davies CH, Collingridge GL, Hill RG. Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*. 38(3):349-59 (1999).
- Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 1;8(6):595-608 (2016).
- Selkoe DJ. Alzheimer disease and aducanumab: adjusting our approach. *Nat Rev Neurol*. 15(7):365-366 (2019).
- Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 1;537(7618):50-6 (2016).
- Shah S, Lee SF, Tabuchi K, Hao YH, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE 3rd, Südhof T, Yu G. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*. 12;122(3):435-47 (2005).
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 14(8):837-42 (2008).
- Shaw P, Lerch JP, Pruessner JC, Taylor KN, Rose AB, Greenstein D, Clasen L, Evans A, Rapoport JL, Giedd JN. Cortical morphology in children and adolescents with different apolipoprotein E gene polymorphisms: an observational study. *Lancet Neurol*. 6(6):494-500 (2007).
- Shen J, Kelleher RJ 3rd. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9;104(2):403-9 (2007).
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*. 10;368(6467):144-7 (1994).
- Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*. 10;290(5494):1170-4 (2000).
- Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, et al. Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 49(9):1373-1384 (2017).

Sinha UK, Hollen KM, Rodriguez R, Miller CA. Auditory system degeneration in Alzheimer's disease. *Neurology*. 43(4):779-85 (1993).

Sisodia SS. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1;89(13):6075-9 (1992).

Slunt HH, Thinakaran G, Von Koch C, Lo AC, Tanzi RE, Sisodia SS. Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem*. 28;269(4):2637-44 (1994).

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150(1):76-85 (1985).

Snyder HM, Asthana S, Bain L, Brinton R, Craft S, Dubal DB, Espeland MA, Gatz M, Mielke MM, Raber J, Rapp PR, Yaffe K, Carrillo MC. Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease: A think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. *Alzheimers Dement*. 12(11):1186-1196 (2016).

Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Löwer A, Langer A, Merdes G, Paro R, Masters CL, Müller U, Kins S, Beyreuther K. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J*. 24(20):3624-34 (2005).

Song X, Jensen MØ, Jogini V, Stein RA, Lee CH, Mchaourab HS, Shaw DE, Gouaux E. Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine. *Nature*. 556(7702):515-519 (2018).

Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL 3rd, Mumby MC, Bloom GS. Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem*. 274(36):25490-8 (1999).

Spencer JL, Waters EM, Romeo RD, Wood GE, Milner TA, McEwen BS. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol*. 29(2):219-37 (2008).

Spillantini MG, Goedert M, Crowther RA, Murrell JR, Farlow MR, Ghetti B. Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proc Natl Acad Sci* 94(8):4113-8 (1997).

Spira AP, Gamaldo AA, An Y, Wu MN, Simonsick EM, Bilgel M, Zhou Y, Wong DF, Ferrucci L, Resnick SM. Self-reported sleep and  $\beta$ -amyloid deposition in community-dwelling older adults. *JAMA Neurol*. 70(12):1537-43 (2013).

Spitzer NC. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*. 7;444(7120):707-12 (2006).

Stern Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 11(11):1006-12 (2012).

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;90(5):1977-81 (1993).

Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 91(23):11183-6 (1994).

Sugiyama H, Ito I, Hirono C. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature.* 05-11;325(6104):531-3 (1987).

Sun W, Qureshi HY, Cafferty PW, Sobue K, Agarwal-Mawal A, Neufeld KD, Paudel HK. Glycogen synthase kinase-3beta is complexed with tau protein in brain microtubules. *J Biol Chem.* 277(14):11933-40 (2002).

Sun L, Zhou R, Yang G, Shi Y. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides by  $\gamma$ -secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24;114(4):E476-E485 (2017).

Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 14(3):133-150 (2018).

Sze C, Bi H, Kleinschmidt-DeMasters BK, Filley CM, Martin LJ. N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1;182(2):151-9 (2001).

Takahashi Y, Mori H, Mishina M, Watanabe M, Kondo N, Shimomura J, Kubota Y, Matsuda K, Fukushima K, Shiroma N, Akasaka N, Nishida H, Imamura A, Watanabe H, Sugiyama N, Ikezawa M, Fujiwara T. Autoantibodies and cell-mediated autoimmunity to NMDA-type GluRepsilon2 in patients with Rasmussen's encephalitis and chronic progressive epilepsy partialis continua. *Epilepsia.* 46 Suppl 5:152-8 (2005).

Takami K, Terai K, Matsuo A, Walker DG, McGeer PL. Expression of presenilin-1 and -2 mRNAs in rat and Alzheimer's disease brains. *Brain Res.* 14;748(1-2):122-30 (1997).

Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B. Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci* 95(16):9637-41 (1998).

Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol.* 150(5):989-1000 (2000).

Takeuchi T, Duszkiewicz AJ, Morris RG. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2;369(1633):20130288 (2013).

- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*. 2;401(6748):63-9 (1999).
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*. 331(6156):528-30 (1988).
- Tatsuki F, Sunagawa GA, Shi S, Susaki EA, Yukinaga H, Perrin D, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, Fujishima H, Ohno R, Tone D, Ode KL, Matsumoto K, Ueda HR. Involvement of Ca(2+)-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. *Neuron*. 6;90(1):70-85 (2016).
- Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC. Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis*. 31(2):250-60 (2008).
- Teichert T. Loudness- and time-dependence of auditory evoked potentials is blunted by the NMDA channel blocker MK-801. *Psychiatry Res*. 256:202-206 (2017).
- Texidó L, Martín-Satué M, Alberdi E, Solsona C, Matute C. Amyloid  $\beta$  peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium*. 49(3):184-190 (2011).
- Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 25;58(12):1791-800 (2002).
- Tissir F, Goffinet AM. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci*. 4(6):496-505 (2003).
- Tomita J, Ueno T, Mitsuyoshi M, Kume S, Kume K. The NMDA Receptor Promotes Sleep in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 29;10(5):e0128101 (2015).
- Tong H, Zhang X, Meng X, Xu P, Zou X, Qu S. Amyloid-beta peptide decreases expression and function of glutamate transporters in nervous system cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 85:75-84 (2017).
- Tonkiss J, Morris RG, Rawlins JN. Intra-ventricular infusion of the NMDA antagonist AP5 impairs performance on a non-spatial operant DRL task in the rat. *Exp Brain Res*. 73(1):181-8 (1988).
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 66(4):1141 (2014).
- Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VM. Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem*. 37(2):209-15 (1989).
- Tsai GE, Falk WE, Gunther J, Coyle JT. Improved cognition in Alzheimer's disease with short-term D-cycloserine treatment. *Am J Psychiatry*. 156(3):467-9 (1999).



- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. 27;87(7):1327-38 (1996).
- Uhász GJ, Barkóczi B, Vass G, Datki Z, Hunya A, Fülöp L, Budai D, Penke B, Szegedi V. Fibrillar Abeta (1-42) enhances NMDA receptor sensitivity via the integrin signaling pathway. *J Alzheimers Dis*. 19(3):1055-67 (2010).
- van der Kant R, Goldstein LS. Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell*. 23;32(4):502-15 (2015).
- van der Staay FJ, Rutten K, Erb C, Blokland A. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. *Behav Brain Res*. 20;220(1):215-29 (2011).
- Verges DK, Restivo JL, Goebel WD, Holtzman DM, Cirrito JR. Opposing synaptic regulation of amyloid- $\beta$  metabolism by NMDA receptors in vivo. *J Neurosci*. 31(31):11328-11337 (2011).
- Vezzani A, Serafini R, Stasi MA, Caccia S, Conti I, Tridico RV, Samanin R. Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 249(1):278-83 (1989).
- Victoroff J, Lin FV, Coburn KL, Shillcutt SD, Voon V, Ducharme S. Noncognitive Behavioral Changes Associated with Alzheimer's Disease: Implications of Neuroimaging Findings. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 30(1):14-21 (2018).
- Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, Zhao NM, Dominguez B, Lee KF, Gan WB, Zheng H. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci*. 2;25(5):1219-25 (2005).
- Wang X, Wang Z, Chen Y, Huang X, Hu Y, Zhang R, Ho MS, Xue L. FoxO mediates APP-induced AICD-dependent cell death. *Cell Death Dis*. 15;5:e1233 (2014).
- Wang Y, Mandelkew E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci*. 17(1):5-21 (2016).
- Wang X, Zhou X, Li G, Zhang Y, Wu Y, Song W. Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci*. 10:294 (2017).
- Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet*. 5(1):95-100 (1993).
- Wasser CR, Herz J. Reelin: Neurodevelopmental Architect and Homeostatic Regulator of Excitatory Synapses. *J Biol Chem*. 27;292(4):1330-1338 (2017).

- Watanabe H, Xia D, Kanekiyo T, Kelleher RJ 3rd, Shen J. Familial frontotemporal dementia-associated presenilin-1 c.548G>T mutation causes decreased mRNA expression and reduced presenilin function in knock-in mice. *J Neurosci.* 11;32(15):5085-9 (2012).
- Watkins JC, Krosgaard-Larsen P, Honore T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 11:25-33 (1990).
- Watkins JC. L-glutamate as a central neurotransmitter: looking back. *Biochem Soc Trans.* 28(4):297-309. (2000).
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci* 72(5):1858-62 (1975).
- Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem.* 68(2):469-78 (1997).
- Westermarck GT, Fändrich M, Westermarck P. AA amyloidosis: pathogenesis and targeted therapy. *Annu Rev Pathol.* 10:321-44 (2014).
- Weyer SW, Klevanski M, Delekate A, Voikar V, Aydin D, Hick M, Filippov M, Drost N, Schaller KL, Saar M, Vogt MA, Gass P, Samanta A, Jäschke A, Korte M, Wolfer DP, Caldwell JH, Müller UC. APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J.* 1;30(11):2266-80 (2011).
- Weyer SW, Zagrebelsky M, Herrmann U, Hick M, Ganss L, Gobbert J, Gruber M, Altmann C, Korte M, Deller T, Müller UC. Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented by APP $\alpha$  expression. *Acta Neuropathol Commun.* 31;2:36 (2014).
- White AR, Reyes R, Mercer JF, Camakaris J, Zheng H, Bush AI, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R. Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice. *Brain Res.* 25;842(2):439-44 (1999).
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science.* 25;313(5790):1093-7 (2006).
- Whittington RA, Bretteville A, Dickler MF, Planel E. Anesthesia and tau pathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 47:147-55 (2013).
- Wigström H, Gustafsson B. Postsynaptic control of hippocampal long-term potentiation. *J Physiol.* 81(4):228-36 (1986).

- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C. Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science*. 27;314(5799):664-6 (2006).
- Wines-Samuels M, Schulte EC, Smith MJ, Aoki C, Liu X, Kelleher RJ 3rd, Shen J. Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in presenilin conditional mutant mice. *PLoS One*. 15;5(4):e10195 (2010).
- Wischik CM, Novak M, Thøgersen HC, Edwards PC, Runswick MJ, Jakes R, Walker JE, Milstein C, Roth M, Klug A. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(12):4506-10 (1988).
- Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, Tybulewicz VL, Fisher EM, Strydom A. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci*. 16(9):564-74 (2015).
- Wiseman FK, Pulford LJ, Barkus C, Liao F, Portelius E, Webb R, Chávez-Gutiérrez L, Cleverley K, Noy S, Sheppard O, Collins T, Powell C, Sarell CJ, Rickman M, Choong X, Tosh JL, Siganporia C, Whittaker HT, Stewart F, Szaruga M; London Down syndrome consortium, Murphy MP, Blennow K, de Strooper B, Zetterberg H, Bannerman D, Holtzman DM, Tybulewicz VLJ, Fisher EMC; LonDownS Consortium. Trisomy of human chromosome 21 enhances amyloid- $\beta$  deposition independently of an extra copy of APP. *Brain*. 1;141(8):2457-2474 (2018).
- Wiśniewski HM, Narang HK, Terry RD. Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol Sci*. 27(2):173-81 (1976).
- Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci*. 1;17(5):1848-59 (1997).
- World Alzheimer Report. Alzheimer's disease international. (2018)  
<https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>
- Wozniak DF, Olney JW, Kettinger L, Price M, Miller JP. Behavioral effects of MK-801 in the rat. *Psychopharmacol* 101: 47-56 (1990).
- Wozniak DF, Brosnan-Watters G, Nardi A, McEwen M, Corso TD, Olney JW, Fix AS. MK-801 neurotoxicity in male mice: histologic effects and chronic impairment in spatial learning. *Brain Res*. 29;707(2):165-79 (1996).
- Wozniak DF, Dikranian K, Ishimaru MJ, Nardi A, Corso TD, Tenkova T, Olney JW, Fix AS. Disseminated corticolimbic neuronal degeneration induced in rat brain by MK-801: potential relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 5(5):305-22 (1998).

- Wu J, Anwyl R, Rowan MJ. beta-Amyloid-(1-40) increases long-term potentiation in rat hippocampus in vitro. *Eur J Pharmacol.* 25;284(3):R1-3 (1995).
- Wu J, Bie B, Foss JF, Naguib M. Amyloid Fibril-Induced Astrocytic Glutamate Transporter Disruption Contributes to Complement C1q-Mediated Microglial Pruning of Glutamatergic Synapses. *Mol Neurobiol.* 57(5):2290-2300 (2020).
- Xia D, Watanabe H, Wu B, Lee SH, Li Y, Tsvetkov E, Bolshakov VY, Shen J, Kelleher RJ 3rd. Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease. *Neuron.* 4;85(5):967-81 (2015).
- Xian X, Pohlkamp T, Durakoglugil MS, Wong CH, Beck JK, Lane-Donovan C, Plattner F, Herz J. Reversal of ApoE4-induced recycling block as a novel prevention approach for Alzheimer's disease. *Elife.* 30;7:e40048 (2018).
- Ye C, Walsh DM, Selkoe DJ, Hartley DM. Amyloid beta-protein induced electrophysiological changes are dependent on aggregation state: N-methyl-D-aspartate (NMDA) versus non-NMDA receptor/channel activation. *Neurosci Lett.* 19;366(3):320-5 (2004).
- Yeung LY, Wai MS, Fan M, Mak YT, Lam WP, Li Z, Lu G, Yew DT. Hyperphosphorylated tau in the brains of mice and monkeys with long-term administration of ketamine. *Toxicol Lett.* 15;193(2):189-93 (2010).
- Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene.* 87(2):257-63 (1990).
- Yu Y, Run X, Liang Z, et al. Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J Neurochem.* 108(6):1480-1494 (2009).
- Yu JT, Tan L, Hardy J. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. *Annu Rev Neurosci.* 37:79-100 (2014).
- Zanier ER, Bertani I, Sammali E, Pischiutta F, Chiaravalloti MA, Vegliante G, Masone A, Corbelli A, Smith DH, Menon DK, Stocchetti N, Fiordaliso F, De Simoni MG, Stewart W, Chiesa R. Induction of a transmissible tau pathology by traumatic brain injury. *Brain.* 1;141(9):2685-2699 (2018).
- Zempel H, Mandelkow EM. Linking amyloid- $\beta$  and tau: amyloid- $\beta$  induced synaptic dysfunction via local wreckage of the neuronal cytoskeleton. *Neurodegener Dis.* 10(1-4):64-72 (2012).
- Zerche M, Weissenborn K, Ott C, Dere E, Asif AR, Worthmann H, Hassouna I, Rentzsch K, Tryc AB, Dahm L, Steiner J, Binder L, Wiltfang J, Sirén AL, Stöcker W, Ehrenreich H. Preexisting Serum Autoantibodies Against the NMDAR Subunit NR1 Modulate Evolution of Lesion Size in Acute Ischemic Stroke. *Stroke.* 46(5):1180-6 (2015).

- Zhang WB, Ross PJ, Tu Y, et al. Fyn Kinase regulates GluN2B subunit-dominant NMDA receptors in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Sci Rep.* 6:23837 (2016).
- Zhao WQ, Santini F, Breese R, Ross D, Zhang XD, Stone DJ, Ferrer M, Townsend M, Wolfe AL, Seager MA, Kinney GG, Shughrue PJ, Ray WJ. Inhibition of calcineurin-mediated endocytosis and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors prevents amyloid beta oligomer-induced synaptic disruption. *J Biol Chem.* 5;285(10):7619-32 (2010).
- Zhao N, Liu CC, Qiao W, Bu G. Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry.* 15;83(4):347-357 (2018).
- Zhou JY, Dann GP, Shi T, Wang L, Gao X, Su D, Nicora CD, Shukla AK, Moore RJ, Liu T, Camp DG 2nd, Smith RD, Qian WJ. Simple sodium dodecyl sulfate-assisted sample preparation method for LC-MS-based proteomics applications. *Anal Chem.* 20;84(6):2862-7 (2012).
- Zhu JJ, Malinow R. Acute versus chronic NMDA receptor blockade and synaptic AMPA receptor delivery. *Nat Neurosci.* 5(6):513-4 (2002).
- Zito K, Scheuss V. NMDA receptor function and physiological modulation. *L.R. Squire (Ed.), Encyclopedia of neuroscience.* 1157-1164 (2009).
- Zott B, Simon MM, Hong W, Unger F, Chen-Engerer HJ, Frosch MP, Sakmann B, Walsh DM, Konnerth A. A vicious cycle of  $\beta$  amyloid-dependent neuronal hyperactivation. *Science.* 9;365(6453):559-565 (2019).
- Zukin RS, Bennett MV. Alternatively spliced isoforms of the NRI receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18(10):441 (1995).

## 9 Anhang

### 9.1 Statistische Auswertung

Die statistischen Evaluationen für alle Zellkultur-Experimente wurden mittels parametrischer zweifaktorieller ANOVA durchgeführt. Für alle zweifaktoriellen ANOVA gilt, Faktor 1 (markiert durch eine tiefgestellte 1) bezieht sich auf die Behandlung mit einem exzitatorischen Agonisten (NMDA oder Glu) und Faktor 2 (markiert durch eine tiefgestellte 2) bezieht sich auf die Behandlung mit dem exzitatorischen Antagonisten (AP5). Alle *in vivo* Experimente (Mäuse) wurden mittels einfaktorieller ANOVA statistisch evaluiert.

In Fällen, in denen die Annahme der Normalverteilung oder der Varianzgleichheit mit  $p < 0,050$  nicht erfüllt war (Normalitätstest fehlgeschlagen, N.T.f.; Varianzanalyse fehlgeschlagen, V.A.f.), wurden die parametrischen ein- und zweifaktoriellen ANOVA-Ergebnisse mit der Auswertung durch eine ANOVA an Rängen ergänzt. Die Ergebnisse der ANOVA an Rängen sind in eckigen Klammern unterhalb des jeweiligen parametrischen ANOVA angegeben.

#### **S1: Statistische Details Abbildung 15**

Evaluationen mittels zweifaktorieller ANOVA.

#### **B.**

##### **2,5 mM K<sup>+</sup>:**

Anti-AT8:  $F_1 = 1,580$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,246$ ;  $F_2 = 22,825$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 < 0,001$ ;  $n = 3$ ;

Anti-S404:  $F_1 = 1,608$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,241$ ;  $F_2 = 12,531$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,004$ ;  $n = 3$ ;

Anti-S396:  $F_1 = 0,489$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,625$ ;  $F_2 = 7,608$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,017$ ;  $n = 3$ ; N.T.f.;

[Anti-S396:  $H = 7,111$ ,  $f = 5$ ,  $p = 0,212$ ;  $n = 3$ ].

##### **27,5 mM K<sup>+</sup>:**

Anti-AT8:  $F_1 = 0,797$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,473$ ;  $F_2 = 6,660$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,024$ ;  $n = 3$ ;

Anti-S404:  $F_1 = 1,245$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,322$ ;  $F_2 = 40,611$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 < 0,001$ ;  $n = 3$ ;

Anti-S396:  $F_1 = 0,316$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,735$ ;  $F_2 = 7,731$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,017$ ;  $n = 3$ .

**C.****K<sup>+</sup>-Bedingungen zusammengefasst:**

Anti-AT8:  $F_1 = 2,263$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,122$ ;  $F_2 = 26,695$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 < 0,001$ ;  $n = 6$ ;

Anti-S404:  $F_1 = 2,034$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,148$ ;  $F_2 = 43,670$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 < 0,001$ ;  $n = 6$ ; V.A.f.;

[Anti-S404:  $H = 22,100$ ,  $f = 5$ ,  $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ];

Anti-S396:  $F_1 = 0,948$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,399$ ;  $F_2 = 18,806$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 < 0,001$ ;  $n = 6$ ; N.T.f.;

[Anti-S396:  $H = 17,523$ ,  $f = 5$ ,  $p = 0,004$ ;  $n = 6$ ].

**S2: Statistische Details Abbildung 16**

Evaluationen mittels zweifaktorieller ANOVA.

**B.****2,5 mM K<sup>+</sup>:**

$F_1 = 1,787$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,209$ ;  $F_2 = 31,863$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 < 0,001$ ;  $n = 3$ .

**27,5 mM K<sup>+</sup>:**

$F_1 = 0,012$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,988$ ;  $F_2 = 6,438$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 < 0,001$ ;  $n = 3$ .

**S3: Statistische Details Abbildung 17**

Evaluationen mittels zweifaktorieller ANOVA.

**K<sup>+</sup>-Bedingungen zusammengefasst:**

$F_1 = 1,367$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,270$ ;  $F_2 = 89,790$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 < 0,001$ ;  $n = 6$ ; V.A.f.;

[ $H = 28,581$ ,  $f = 5$ ,  $p < 0,001$ ;  $n = 6$ ].

**S4: Statistische Details Abbildung 18**

Evaluationen mittels zweifaktorieller ANOVA.

**K<sup>+</sup>-Bedingungen zusammengefasst:****A $\beta$ <sub>40</sub>:**

$F_1 = 2,493$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,100$ ;  $F_2 = 10,392$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,003$ ;  $n = 6$ ; N.T.f.;

[ $H = 13,533$ ,  $f = 5$ ,  $p = 0,019$ ;  $n = 6$ ].

**A $\beta$ <sub>42</sub>:**

$F_1 = 0,245$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,784$ ;  $F_2 = 0,009$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,925$ ;  $n = 6$ ; N.T.f.;

[ $H = 5,230$ ,  $f = 5$ ,  $p = 0,388$ ;  $n = 6$ ].

**S5: Statistische Details Abbildung 20**

Evaluationen mittels zweifaktorieller ANOVA.

**2,5 mM K<sup>+</sup>:**

$F_1 = 2,506$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,110$ ;  $F_2 = 4,963$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,039$ ;  $n = 4$ .

**27,5 mM K<sup>+</sup>:**

$F_1 = 2,999$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,075$ ;  $F_2 = 0,201$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,659$ ;  $n = 4$ .

**S6: Statistische Details Abbildung 21**

Evaluationen mittels zweifaktorieller ANOVA.

**2,5 mM K<sup>+</sup>:**

$F_1 = 3,784$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,042$ ;  $F_2 = 3,811$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,067$ ;  $n = 4$ ; N.T.f.;

[ $H = 8,306$ ,  $f = 5$ ,  $p = 0,140$ ;  $n = 4$ ].

**27,5 mM K<sup>+</sup>:**

$F_1 = 6,184$ ,  $f = 2$ ,  $p_1 = 0,009$ ;  $F_2 = 3,939$ ,  $f = 1$ ,  $p_2 = 0,063$ ;  $n = 4$ .

**S7: Statistische Details Abbildung 23**

Aufgrund von Toxizitätseffekten wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

**S8: Statistische Details Abbildung 24**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**B.****Hippocampus:**

Anti-AT8:  $F = 2,120$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,163$ ;  $n = 5$ ;

Anti-S404:  $F = 5,327$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,022$ ;  $n = 5$ ; N.T.f.;

[Anti-S404:  $H = 7,220$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,027$ ;  $n = 5$ ];

Anti-S396:  $F = 0,582$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,574$ ;  $n = 5$ .



**S9: Statistische Details Abbildung 25**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**B.**

**Cortex:**

Anti-AT8:  $F = 9,998$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,003$ ;  $n = 5$ ;

Anti-S404:  $F = 5,970$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,016$ ;  $n = 5$ ;

Anti-S396:  $F = 2,388$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,134$ ;  $n = 5$ .

**S10: Statistische Details Abbildung 26**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**B.**

**Thalamus:**

Anti-AT8:  $F = 0,068$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,935$ ;  $n = 5$ ;

Anti-S404:  $F = 1,137$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,353$ ;  $n = 5$ ;

Anti-S396:  $F = 2,470$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,126$ ;  $n = 5$ .

**S11: Statistische Details Abbildung 27**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**Hippocampus:**

$F = 11,945$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,001$ ;  $n = 5$ .

**Cortex:**

$F = 7,635$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,007$ ;  $n = 5$ .

**Thalamus:**

$F = 4,207$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,041$ ;  $n = 5$ .

**S12: Statistische Details Abbildung 28**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**Hippocampus:**

Anti-ADAM10:  $F = 2,621$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,114$ ;  $n = 5$ ;

Anti-BACE1:  $F = 0,334$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,722$ ;  $n = 5$ ;

Anti-PS1:  $F = 5,233$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,023$ ;  $n = 5$ .

**Cortex:**

Anti-ADAM10:  $F = 5,027$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,026$ ;  $n = 5$ ;

Anti-BACE1:  $F = 2,056$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,171$ ;  $n = 5$ ;

Anti-PS1:  $F = 6,826$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,010$ ;  $n = 5$ .

**Thalamus:**

Anti-ADAM10:  $F = 4,132$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,043$ ;  $n = 5$ ;

Anti-BACE1:  $F = 1,735$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,218$ ;  $n = 5$ ;

Anti-PS1:  $F = 0,412$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,671$ ;  $n = 5$ ; N.T.f.;

[Anti-PS1:  $H = 1,460$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,482$ ;  $n = 5$ ].

**S13: Statistische Details Abbildung 29**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**A. Aß40****Hippocampus:**

$F = 4,588$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,029$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Cortex:**

$F = 2,312$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,136$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Thalamus:**

$F = 2,585$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,111$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Entorhinaler Cortex:**

$F = 0,536$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,597$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h; N.T.f.;

[ $H = 1,294$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,524$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h].

**Retrosplenialer Cortex:**

$F = 5,690$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,016$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h; N.T.f.;

[ $H = 7,228$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,027$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h].

**N. Caudatus und Putamen:**

$F = 2,440$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,149$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h; N.T.f.;

[ $H = 2,656$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,106$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h].

**B. Aß<sub>42</sub>****Hippocampus:**

$F = 6,509$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,010$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Cortex:**

$F = 4,355$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,034$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Thalamus:**

$F = 13,313$ ,  $f = 2$ ,  $p < 0,001$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Entorhinaler Cortex:**

$F = 1,460$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,266$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Retrosplenialer Cortex:**

$F = 0,034$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,966$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h; N.T.f.;

[ $H = 0,070$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,966$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h].

**N. Caudatus und Putamen:**

$F = 2,645$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,135$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h; N.T.f.;

[ $H = 1,905$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,202$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h].

**C. Gesamt-Aß****Hippocampus:**

$F = 5,754$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,015$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Cortex:**

$F = 1,168$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,340$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Thalamus:**

$F = 5,924$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,014$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**Entorhinaler Cortex:**

$F = 0,426$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,661$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h; N.T.f.;

[ $H = 1,425$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,490$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h].

**Retrosplenialer Cortex:**

$F = 5,299$ ,  $f = 2$ ,  $p = 0,019$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h und 24 h.

**N. Caudatus und Putamen:**

$F = 5,335$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,044$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h; N.T.f.;

[ $H = 4,121$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,048$ ;  $n = 7$  für Vehikel,  $n = 5$  für 4 h].

**S14: Statistische Details Abbildung 30**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

Anti-AT8:  $F = 0,389$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,544$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S404:  $F = 0,207$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,658$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S396:  $F = 0,0016$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,968$ ;  $n = 7$ .

**S15: Statistische Details Abbildung 31**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

Anti-AT8:  $F = 0,0861$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,774$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S404:  $F = 0,0877$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,384$ ;  $n = 7$ .

**S16: Statistische Details Abbildung 32**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**Hippocampus:**

$F = 0,136$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,718$ ;  $n = 7$ .

**Cortex:**

$F = 0,00793$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,931$ ;  $n = 7$ .

**S17: Statistische Details Abbildung 33**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

Anti-AT8:  $F = 1,011$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,335$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S404:  $F = 0,371$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,554$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S396:  $F = 0,0000267$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,996$ ;  $n = 7$ ; V.A.f.;

[Anti-S396:  $H = 0,00408$ ,  $f = 1$ ,  $p = 1,000$ ;  $n = 7$ ].

**S18: Statistische Details Abbildung 34**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

Anti-AT8:  $F = 5,395$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,039$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S404:  $F = 9,143$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,011$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S396:  $F = 0,0546$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,819$ ;  $n = 7$ .

**S19: Statistische Details Abbildung 35**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**Hippocampus:**

$F = 0,898$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,362$ ;  $n = 7$ ; N.T.f.;

[ $H = 0,102$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,805$ ;  $n = 7$ ].

**Cortex:**

$F = 5,391$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,039$ ;  $n = 7$ .

**S20: Statistische Details Abbildung 36**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

Anti-AT8:  $F = 13,055$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,004$ ;  $n = 7$ ; V.A.f.;

[Anti-AT8:  $H = 6,208$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,011$ ;  $n = 7$ ];

Anti-S404:  $F = 12,466$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,004$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S396:  $F = 1,827$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,201$ ;  $n = 7$ .

**S21: Statistische Details Abbildung 37**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

Anti-AT8:  $F = 1,704$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,216$ ;  $n = 7$ ; V.A.f.;

[Anti-AT8:  $H = 0,918$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,383$ ;  $n = 7$ ];

Anti-S404:  $F = 16,652$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,002$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S396:  $F = 1,445$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,252$ ;  $n = 7$ .

**S22: Statistische Details Abbildung 38**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**Hippocampus:**

$F = 2,066$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,176$ ;  $n = 7$ .

**Cortex:**

$F = 0,704$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,418$ ;  $n = 7$ .

**S23: Statistische Details Abbildung 39**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

**Hippocampus:**

Anti-ADAM10:  $F = 0,004$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,949$ ;  $n = 7$ ;

Anti-BACE1:  $F = 0,654$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,434$ ;  $n = 7$ ;

Anti-PS1:  $F = 6,026$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,030$ ;  $n = 7$ .

**Cortex:**

Anti-ADAM10:  $F = 0,012$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,916$ ;  $n = 7$ ;

Anti-BACE1:  $F = 0,374$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,552$ ;  $n = 7$ ;

Anti-PS1:  $F = 7,437$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,018$ ;  $n = 7$ .

**S24: Statistische Details Abbildung 40**

Evaluationen mittels einfaktorieller ANOVA.

Anti-AT8:  $F = 16,543$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,002$ ;  $n = 7$ ;

Anti-S404:  $F = 12,572$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,004$ ;  $n = 7$ ; N.T.f.;

[Anti-S404:  $H = 8,265$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,002$ ;  $n = 7$ ];

Anti-S396:  $F = 9,747$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,009$ ;  $n = 7$ ; V.A.f.;

[Anti-S396:  $H = 6,208$ ,  $f = 1$ ,  $p = 0,011$ ;  $n = 7$ ].

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Vergleich der post mortem-Gehirnsektion eines gesunden Menschen und eines Alzheimer Patienten.....	2
<b>Abbildung 2</b> Überblick über das <i>MAPT</i> -Gen und die exprimierten Isoformen des Proteins Tau.....	5
<b>Abbildung 3</b> Posttranslationale Modifikation von Tau.....	7
<b>Abbildung 4</b> Hippocampale Tau-Pathologie eines Alzheimer-Patienten.....	8
<b>Abbildung 5</b> Charakteristik der Tauopathie bei Morbus Alzheimer nach Braak.....	10
<b>Abbildung 6</b> Schematischer Überblick des Proteinaufbaus von APP.....	11
<b>Abbildung 7</b> Überblick über die posttranslationale Prozessierung von APP durch verschiedene Sekretasen.....	15
<b>Abbildung 8</b> Färbung von Amyloid $\beta$ -Plaques eines Alzheimer-Patienten.....	20
<b>Abbildung 9</b> Aufbau des heterotetrameren NMDA-Rezeptors.....	28
<b>Abbildung 10</b> mRNA-Expressionsmuster der NMDAR-Untereinheiten in Gehirnschnitten von Ratten.....	29
<b>Abbildung 11</b> Funktion des ionotropen NMDA-Rezeptors.....	31
<b>Abbildung 12</b> Behandlungsschema der 6-Well-Zellkulturschalen für Westernblot-Analysen.....	50
<b>Abbildung 13</b> Präparationsbereiche der Gehirnregionen der einmalig mit MK-801 behandelten Mäuse.....	55
<b>Abbildung 14</b> Gewebepreparation der mehrfach mit MK-801 behandelten Mäuse....	57
<b>Abbildung 15</b> NMDA-Rezeptor-abhängige Tau-Phosphorylierung in kortikalen Neuronen aus der Ratte.....	67
<b>Abbildung 16</b> Modulation der APP-Expression in kortikalen Neuronen nach NMDAR-Inhibition.....	68
<b>Abbildung 17</b> Auswertung der APP-Expression unabhängig von der $K^+$ -Konzentration <i>in vitro</i> .....	69
<b>Abbildung 18</b> Analyse der Amyloid $\beta$ -Sekretion im Zellkulturüberstand nach 4-stündiger Behandlung.....	70
<b>Abbildung 19</b> Mikroskopische Aufnahmen der Zellversuche nach 4 h- Behandlungen.....	71
<b>Abbildung 20</b> Immunfluoreszenz-Färbung für den Neuron-spezifischen Marker MAP-2.....	72

<b>Abbildung 21</b> Messung der metabolischen Rate <i>in vitro</i> durch MTT-Reduktion.....	73
<b>Abbildung 22</b> Mikroskopische Aufnahmen der Zellen nach den 24 h-Experimenten.	74
<b>Abbildung 23</b> Dokumentation des <i>in vitro</i> Zellüberlebens und der metabolischen Rate nach 24 h Behandlung.....	74
<b>Abbildung 24</b> Analyse der <i>in vivo</i> Tauphosphorylierung im Hippocampus männlicher Wildtypmäuse nach einmaliger MK-801-Injektion.....	76
<b>Abbildung 25</b> Analyse der <i>in vivo</i> Tau-Phosphorylierung im Cortex männlicher Wildtyp-Mäuse nach einmaliger MK-801-Injektion.....	77
<b>Abbildung 26</b> Analyse der <i>in vivo</i> Tau-Phosphorylierung im Thalamus männlicher Wildtyp-Mäuse nach einmaliger MK-801-Injektion.....	78
<b>Abbildung 27</b> Messung der gewebsspezifischen APP-Expression in männlichen Mäusen nach einmaliger MK-801 Injektion.....	79
<b>Abbildung 28</b> Analyse der gewebsspezifischen Expression APP-assoziiierter Proteine.....	80
<b>Abbildung 29</b> Messung der gewebsspezifischen Amyloid $\beta$ -Sekretion in männlichen Mäusen nach einmaliger MK-801-Injektion.....	82
<b>Abbildung 30</b> Hippocampale Phosphorylierung von Tau <i>in vivo</i> nach 6-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.....	84
<b>Abbildung 31</b> Kortikale Phosphorylierung von Tau <i>in vivo</i> nach 6-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.....	85
<b>Abbildung 32</b> <i>In vivo</i> APP-Expression nach 6-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.....	85
<b>Abbildung 33</b> Hippocampale <i>in vivo</i> Phosphorylierung von Tau nach 12-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.....	86
<b>Abbildung 34</b> Kortikale <i>in vivo</i> Tau-Phosphorylierung nach 12-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.....	87
<b>Abbildung 35</b> <i>In vivo</i> APP-Expression nach 12-wöchiger MK-801-Behandlung in männlichen Mäusen.....	88
<b>Abbildung 36</b> Auswirkung subchronischer NMDA-Rezeptor Inhibition auf die Phosphorylierung von Tau im Hippocampus weiblicher Mäuse.....	89
<b>Abbildung 37</b> Auswirkung subchronischer NMDA-Rezeptor Inhibition auf die Phosphorylierung von Tau im Cortex weiblicher Mäuse.....	90



<b>Abbildung 38</b> Auswirkungen subchronischer NMDA-Rezeptor-Inhibition auf die gewebsspezifische APP-Expression in weiblichen Mäusen.....	91
<b>Abbildung 39</b> Einfluss von subchronischer NMDA-Rezeptor-Inhibition auf die gewebsspezifische Sekretase-Expression in weiblichen Mäusen.....	91
<b>Abbildung 40</b> Tau-Phosphorylierung nach niedrigdosierter, subchronischer MK-801-Behandlung in weiblichen Mäusen.....	92
<b>Abbildung 41</b> Exzitatorische Insuffizienz als Ursachen der Alzheimerschen Krankheit.....	105

### 9.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Auswirkungen von experimenteller NMDA-Rezeptor-Manipulation.....	34
<b>Tabelle 2</b> Liste der speziellen Chemikalien.....	40
<b>Tabelle 3</b> Liste der primären und sekundären Antikörper.....	40
<b>Tabelle 4</b> Liste von Verbrauchsmaterialien und Kits.....	41
<b>Tabelle 5</b> Zusammenfassung der Versuchsdurchführungen in primärer kortikaler Zellkultur.....	51
<b>Tabelle 6</b> Behandlungsübersicht der MK-801-Einmalbehandlung.....	54
<b>Tabelle 7</b> Behandlungsübersicht der MK-801-Mehrfachbehandlung.....	56

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Selina Sohre  
Geburtsdatum: 23.12.1990  
Geburtsort: Hanau  
Staatsangehörigkeit:

### Ausbildung

10/2015 – 09/2020

#### **Doktorarbeit**

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Institut für Pathobiochemie

Thema: NMDA-Rezeptor-Insuffizienz als Auslöser von Morbus Alzheimer

08/2015

#### **Master of Science Biologie (M. Sc. Biologie)**

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Thema: Metabolische Regulation der Selenoprotein-Expression.

Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin Mainz

09/2013

#### **Bachelor of Science Biologie (B. Sc. Biologie)**

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Thema: Entwicklung der forensisch-relevanten Schmeißfliege *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) auf mit Paracetamol versetzter Rinderleber.

Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum, Frankfurt a. M.

06/2010

#### **Allgemeine Hochschulreife**

## 11 Eigene Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits in wissenschaftlichen Artikeln und auf internationalen Kongressen veröffentlicht, die im folgenden mitaufgelistet sind.

### **Abstracts und Poster:**

Konferenz *Tagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin*  
September 2013, Saarbrücken

**Abstract + Poster** *Entwicklung der forensisch relevanten Schmeißfliegen *Calliphora vicina* und *Lucilia sericata* auf mit Paracetamol angereichertem Nährgewebe.*

Internationale Konferenz *Beyond Amyloid – Widening the View on Alzheimer’s Disease*  
Oktober 2016, Hannover

**Abstract** *An inverted hierarchies' model of Alzheimer’s disease.*

Internationale Konferenz *Neurodegenerative Diseases: Biology and Therapeutics*  
November 2018, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (USA)

**Abstract + Poster** *NMDA Receptor Insufficiency as Trigger for Alzheimer’s Disease.*

Internationale Konferenz *Alzheimer’s and Parkinson’s Disease (ADPD)*  
März 2019, Lisbon (Portugal)

**Abstract + Poster** *NMDA Receptor Insufficiency as Trigger for Alzheimer’s Disease.*

### **Publikation:**

Ohlow M. J., **Sohre S.**, Granold M., Schreckenberger M., Moosmann B.  
*Why Have Clinical Trials of Antioxidants to Prevent Neurodegeneration Failed? - A Cellular Investigation of Novel Phenothiazine-Type Antioxidants Reveals Competing Objectives for Pharmaceutical Neuroprotection.*  
*PharmRes* 34:378-393 (2017).

Kunath S., Schindeldecker M., De Giacomo A., Meyer T., **Sohre S.**, Hajieva P., von Schaky C., Urban J., Moosmann B.  
*Chain transfer activity by thiol groups in biological systems.*  
*Redox Biol.* 2020 Sep;36:101628.

### **Vorpublikation:**

**Sohre S.**, Moosmann B.  
*The pathological hallmarks of Alzheimer’s Disease derive from compensatory responses to NMDA receptor insufficiency.*  
*bioRxiv* 418566 (2018).



