



Fakultät für Medizin  
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
Klinikum rechts der Isar

# Molekularbiologische Analyse der Interaktion von Isofluran mit unterschiedlichen beta-Amyloid Subformen im Maushirn

Maximilian Marco Musiol

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Bettina E. Jungwirth
2. apl. Prof. Dr. Timo Grimmer

Die Dissertation wurde am 09.12.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2021 angenommen.

Für Paulina & meine Familie.

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid beta	LTP	Langzeitpotenzierung
A $\beta$ O	A $\beta$ Oligomere	MG	Molekulargewicht
A $\beta$ Nitro	3NTyr10-A $\beta$	mGluR5	Metabotroper Glutamatrezeptor 5
A $\beta$ Pyro	pE3-42-A $\beta$	NFTs	Neurofibrillary tangles
AD	Alzheimer Demenz	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure	NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
ApoE4	Apolipoprotein E4	NO	Stickstoffmonoxid
BACE	$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme	NOS2	Stickstoffmonoxid-Synthase 2
CSF	Cerebrospinal fluid	NR2B	NMDA-Rezeptoruntereinheit 2B
GABA	Gamma-Aminobuttersäure	NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells
ICV	Intracerebroventrikulär	PrP <sup>c</sup>	Zelluläres Prion Protein
IDE	Insulin-Degrading-Enzyme	PTM	Posttranslationale Modifizierung
IFN $\gamma$	Interferon gamma	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
IL	Interleukin	Tg	Transgen
iNOS	Induzierte NO-Synthase	TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
kDa	Kilodalton	TNFR1	Tumornekrosefaktorrezeptor 1
LPS	Lipopolysaccharid	WT	Wildtyp
LTD	Langzeitdepression	ZNS	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Alzheimer Demenz</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epidemiologische, klinische und pathophysiologische Aspekte der Alzheimer Demenz.....	1
1.2 Von der Amyloid Kaskade zur Theorie der Oligomeropathie .....	3
1.3 Amyloid $\beta$ Protein .....	5
1.3.1 Häufige A $\beta$ Subformen.....	6
1.3.2 Posttranslationale Kürzungen und Modifikationen .....	6
1.3.2.1 Nitration .....	7
1.3.2.2 Pyroglutamamylierung.....	8
1.4 Isofluran – Interaktionen mit Amyloid $\beta$ und mögliche Konsequenzen.....	9
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>11</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
3.1 Versuchstiere.....	12
3.2 ICV-Injektion und Isoflurannarkose.....	12
3.3 Kognitions- und Verhaltenstest - Modifizierter Holeboard Test.....	13
3.4 Aufbereitung der Proben und Auswahl der Hirnschnitte .....	14
3.4.1 Aufbereitung der Hirnproben.....	14
3.4.2 Auswahl Hirnschnitte .....	14
3.5 Proteinextraktion.....	16
3.6 Fluoreszenzmikroskopie .....	16
3.6.1 Methoxy-X04-Färbung .....	16
3.6.1.1 Herstellung der Methoxy-X04-Färbelösung .....	16
3.6.1.2 Methoxy-X04-Färbung.....	16
3.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse .....	17
3.6.3 Auswertung der akquirierten Hirnschnitte .....	18
3.7 Western Blot Analyse .....	19
3.7.1 Bradford Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung .....	19

3.7.2	SDS-Gelelektrophorese .....	19
3.7.3	Western Blot – Proteintransfer, Inkubation mit spezifischen Antikörpern und Detektion der Proteinbanden .....	21
3.8	Statistische Auswertung .....	24
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
4.1	Modifizierter Holeboard Test.....	25
4.2	A $\beta$ -Plaque-Bildung.....	25
4.3	Western Blot Analyse .....	27
4.3.1	Expression von proinflammatorischen TNF $\alpha$ in Abhängigkeit von Subform und Narkose .....	27
4.3.2	Expression von pro-apoptotischer Caspase 3 in Abhängigkeit von Subform und Narkose .....	28
4.3.3	Expression von mGluR5 in Abhängigkeit von Subform und Narkose ...	28
4.3.4	Expression von NR2B in Abhängigkeit von Subform und Narkose .....	29
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>31</b>
5.1	Plaquebildung nach ICV-Injektion von Amyloid $\beta$ und Exposition gegenüber Isofluran .....	31
5.2	Neuroinflammation und TNF $\alpha$ . Einfluss von A $\beta$ und Isofluran auf die inflammatorische Kaskade .....	34
5.3	Apoptose nach Exposition gegenüber Amyloid $\beta$ und Isofluran.....	38
5.4	Glutamaterge Rezeptoren und AD .....	40
5.4.1	mGluR5, Amyloid $\beta$ und Isofluran .....	42
5.4.2	NR2B-Expression unter Einfluss von A $\beta$ und Isofluran.....	44
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>67</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>68</b>

11.1	Chemikalien.....	68
11.2	Puffer / Lösungen .....	69
11.3	Kits .....	69
11.4	Verbrauchsmaterialien.....	69
11.5	Software .....	70
11.6	Laborequipment.....	70

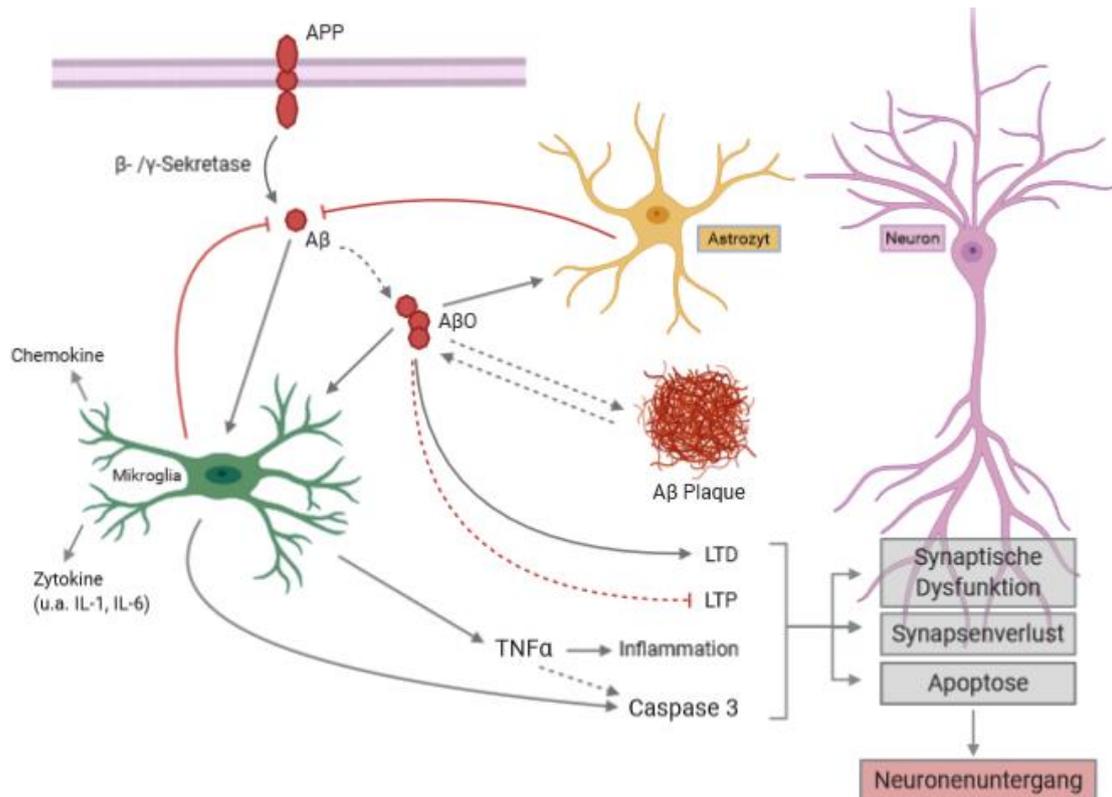
# 1 Alzheimer Demenz

## 1.1 Epidemiologische, klinische und pathophysiologische Aspekte der Alzheimer Demenz

Die Alzheimer Demenz (AD) ist die häufigste Demenzform (50-75% aller Demenzerkrankungen) und betrifft 2017 weltweit rund 44 Millionen Menschen (Lane, Hardy, & Schott, 2017), alleine in Deutschland sind geschätzt 1,6 Mio. (2018) Menschen betroffen (Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V., 2020). Mit dem fortschreitenden demographischen Wandel vergrößert sich auch das Patientenkollektiv der über 65-Jährigen, das mit steigendem Alter eine erhöhte Prävalenz aufweist. Die Alzheimer Erkrankung stellt somit sozioökonomisch eine zunehmende Herausforderung für die Gesellschaft und das Gesundheitswesen dar (Alzheimer's Association, 2020).

Die AD ist eine progrediente, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die sich klinisch durch kognitive Leistungsabnahme, neuropsychiatrische und psychologische Symptome präsentiert. Erste Symptome manifestieren sich mit einer Störung von deklarativen Gedächtnisleistungen (episodisches Gedächtnis mit individuellen, biographischen Inhalten), welche in Hippocampus, Temporal- und Frontallappen lokalisiert sind. Im Verlauf treten weitere kognitive Symptome, wie Einbußen in Planungsvermögen und Problemlösung, auf. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einem erheblichen Verlust an Lebensqualität, zunehmender Abhängigkeit bei alltäglichen Aufgaben und zu sozialem Rückzug der Betroffenen. Neben kognitiven Störungen können auch neuropsychiatrische Probleme, wie eine Veränderung der Persönlichkeit oder der Stimmungslage, auftreten (Alzheimer's Association, 2019; Atri, 2019).

Pathophysiologisch liegen der Alzheimer Krankheit verschiedene Veränderungen zugrunde, die zu einer Hirnatrophie mit zunehmender Funktionseinschränkung führen. Mikroskopische Erscheinungen der AD sind intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (engl. neurofibrillary tangles, NFTs) aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen und extrazelluläre, nicht-lösliche Amyloid beta (A $\beta$ )-Peptid-Aggregate, sogenannte senile Plaques (Lane et al., 2017; Masters et al., 2015). Zudem lassen sich dystrophe Neuriten, reaktive Astroglie und aktivierte Mikroglia in Umgebung der Plaques nachweisen (Lane et al., 2017; Selkoe, 1991). Neben neurotoxischem A $\beta$ , das zu einer Synapsendestruktion und Neuronenuntergang führt, spielt die Mikroglia, als Teil des angeborenen



**Abbildung 1 Pathophysiologische Prozesse der AD.** Durch Prozessierung des transmembranären APP (Amyloid Precursor Protein) durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase werden Amyloid beta ( $A\beta$ ) Monomere sezerniert, die zu  $A\beta$  Oligomeren ( $A\beta O$ ) aggregieren.  $A\beta O$  aktivieren die residenten Gliazellen: Mikroglia und Astrozyten. Diese Zellen sind an der Degradation und Abräumung von  $A\beta$  beteiligt. Bei Dyshomöostase von Produktion und Abräumung der  $A\beta$  Proteine entstehen im weiteren Verlauf  $A\beta$  Plaques.  $A\beta$  führt zur Aktivierung von Mikroglia mit Sekretion proinflammatorischer Zytokine (u.a.  $TNF\alpha$  und Interleukine), Chemokinen und einer Caspasenaktivierung. Resultat ist eine inflammatorische Kaskade mit Neuroinflammation und eine Aktivierung proapoptotischer Prozesse.  $A\beta O$  beeinträchtigen als Neurotoxin auch die synaptische Transmission mit Störung von Langzeitpotenzierung (LTP) und Förderung von Langzeitdepression (LTD). Im Zusammenspiel führen die  $A\beta$ -induzierten Prozesse zu Inflammation, Apoptose, synaptischer Dysfunktion, zunehmendem Synapsen- und letztlich Neuronenverlust (Grafik erstellt mit BioRender.com).

Immunsystems, und eine durch sie induzierte Immunantwort und Neuroinflammation eine große Rolle in der Pathophysiologie der AD (Heneka et al., 2015; Lane et al., 2017; Sarlus & Heneka, 2017). So führen verschiedene  $A\beta$  Spezies, von löslichen  $A\beta$  Oligomere ( $A\beta O$ ) bis hin zu fibrillären Aggregaten der Plaques, zu einer Aktivierung der Mikroglia, die als Immunantwort u.a. proinflammatorische Zytokine (z.B.  $TNF\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) und Chemokine freisetzt und das als Pathogen erkannte  $A\beta$  zusammen mit reaktiven Astrozyten durch Phagozytose abbaut. Neben proinflammatorischen Zytokinen führt auch eine kaskadenartige Aktivierung von proapoptotischen Proteasen, sog. Caspasen, zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und zur Apoptose von

Neuronen (Heneka et al., 2015) (Abb. 1). Dies trägt neben NFTs und A $\beta$  Spezies auch zur Aktivierung des Immunsystems mit chronischer Neuroinflammation und damit zur Pathogenese der AD bei. A $\beta$  Proteine führen zudem zur Beeinträchtigung und Störung der synaptischen Transmission und synaptischen Plastizität. Durch den Verlust von Axonen und Dendriten sowie Neuronenuntergang kommt es v.a. in Hippocampus und Neocortex zu Störungen physiologischer, synaptischer Prozesse, die für Lernen und Gedächtnis essentiell sind (Liu, Chang, Song, Li, & Wu, 2019).

## 1.2 Von der Amyloid Kaskade zur Theorie der Oligomeropathie

In den Überlegungen zur Pathogenese der Alzheimer Krankheit spielt das A $\beta$  Protein eine zentrale Rolle. So werden in der Theorie der Amyloid Kaskade ein gestörter Stoffwechsel und daraus resultierende zerebrale Ablagerungen (sog. senile Plaques) als ursächlich für die Entwicklung einer Alzheimer Demenz angesehen (Selkoe, 1991). Die Ablagerungen entstehen durch Akkumulation fibrillärer A $\beta$  Spezies, die sich durch Organisation und Aggregation löslicher Oligomere zu unlöslichen Protofibrillen ausbilden. Die senilen Plaques, die sich insbesondere im medialen Temporallappen und in neokortikalen Strukturen ablagern, induzieren inflammatorische Prozesse und den Untergang von Synapsen und Neuronen (De-Paula, Radanovic, Diniz, & Forlenza, 2012). In den letzten Jahren ist man von der Theorie der Amyloid Kaskade zunehmend abgekommen und stellt lösliche A $\beta$  Oligomere als neurotoxische A $\beta$  Spezies in den Vordergrund pathologischer Prozesse (Forloni & Balducci, 2018; Kaye & Lasagna-Reeves, 2013; Ono, 2017). Plaques stehen mit den löslichen A $\beta$  Peptiden im Fließgleichgewicht und übernehmen eine Reservoir- und Speicherfunktion (Lane et al., 2017; Murphy & LeVine, 2010).

Der Bildung neurotoxischer Spezies vorausgehend, besteht eine Dyshomöostase im A $\beta$  Stoffwechsel mit einem Ungleichgewicht zwischen Produktion und Abbau der A $\beta$  Peptide (Selkoe & Hardy, 2016). Bei der selteneren, genetischen Form der AD liegen Mutationen im Amyloid Precursor Protein (APP)-Gen sowie in den Genen des Presenilin 1 und 2 (PSEN1 und 2) vor. In diesen ist die Gamma-Sekretase kodiert, ein Enzymkomplex, der an der Prozessierung des Amyloid Peptids beteiligt ist. Die Erkrankung beginnt bereits ab einem Alter von 45 Jahren (Masters et al., 2015). Die Mutationen führen zu einer übermäßigen Produktion von A $\beta$  (Kummer & Heneka, 2014). Bei der später einsetzenden und weitaus häufigeren (>95% der AD-Fälle),

sporadischen AD kommt es durch einen gestörten Abbau des A $\beta$  Proteins, u.a. durch die Metalloproteasen Neprilysin und Insulin-Degrading-Enzyme (IDE), zum Ungleichgewicht (Chen et al., 2017; De-Paula et al., 2012; Murphy & LeVine, 2010). Ebenfalls für eine sporadische AD-Entwicklung prädisponierend ist die genetische Aberration von ApoE4, einem am Abtransport und Degradation von A $\beta$  beteiligten Lipoprotein (Chen et al., 2017; Jahn, 2013).

In der Folge kommt es zur übermäßigen Sekretion und Exposition gegenüber A $\beta$  und zu einer Akkumulation und Plaquebildung in spezifischen Hirnarealen, wie Frontal- und Temporallappen, limbischer Kortex und Hippocampus (Masters et al., 2015).

APP ist ein transmembranäres Protein mit luminalem N-Terminus und zytosolischem C-Terminus, aus welchem durch Prozessierung A $\beta$  freigesetzt wird. Generell ist in der APP-Prozessierung ein nicht-amyloidogener von einem amyloidogenem Weg mit Produktion von A $\beta$  zu unterscheiden (De-Paula et al., 2012). Bei Ersterem schneidet die  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der APP-Domäne, sodass die Produktion von A $\beta$  unterbleibt. Beim amyloidogenem Weg erfolgt die Prozessierung zunächst luminal in juxtamembranärer Position durch die membrangebundene Aspartyl-Protease BACE 1 ( $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1). Der verbleibende C-terminale Rest wird in einem zweiten Schritt transmembranär durch die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten und A $\beta$  nach extrazellulär ins Interstitium, Plasma und den Liquor cerebrospinalis (CSF - cerebrospinal fluid) transportiert (De-Paula et al., 2012; Kummer & Heneka, 2014). Durch eine variable und unpräzise Prozessierung können A $\beta$  Peptide unterschiedlicher Länge (37-43 Aminosäuren) entstehen (Kummer & Heneka, 2014; Murphy & LeVine, 2010). Durch schrittweise ablaufende Endoproteolyse erfolgt das Schneiden an den Positionen 38, 40 und 42, sodass mit A $\beta$  1-40 (ca. 80-90%) (Murphy & LeVine, 2010) und A $\beta$  1-42 (ca.10%) (Kummer & Heneka, 2014; Murphy & LeVine, 2010) die dominanten A $\beta$  Peptide der AD freigesetzt werden. Auch unter pathophysiologischen Gesichtspunkten spielt die Variabilität der Proteolyse eine entscheidende Rolle, da gezeigt werden konnte, dass die Länge des Peptids und die End-Aminosäure die Tendenz zu Aggregation und Oligomerisation beeinflussen und somit auch für die resultierende Pathogenität mitverantwortlich sind (Haass & Selkoe, 2007; Kummer & Heneka, 2014).

### 1.3 Amyloid $\beta$ Protein

Das A $\beta$  Protein variiert in seiner Proteinstruktur durch Prozessierung von APP durch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase mit dem Resultat eines hydrophoben Proteins unterschiedlicher Länge (Gunn, Masters, & Cherny, 2010; Murphy & LeVine, 2010; Schieb et al., 2011). Außerdem ergibt sich eine Heterogenität der A $\beta$  Proteine durch posttranslationale Kürzungen und Modifizierungen (u.a. an N-/C-Terminus) (Gunn et al., 2010). Gemeinsam ist den unterschiedlichen Isoformen die Tendenz aus der monomeren Form zu höher geordneten Strukturen zu aggregieren. So bilden sich durch Aggregation stabile Di-, Tri-, Tetramere, höher geordnete Oligomere, Protofibrillen und letztlich die typischen 8nm Amyloid Fibrillen, die sich in den senilen Plaques nachweisen lassen (De-Paula et al., 2012; Masters & Selkoe, 2012; Ono, 2017).

Lange Zeit wurde angenommen, dass diese fibrillären Formen als Neurotoxin fungieren (Forloni & Balducci, 2018). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Gedächtnisstörungen der AD besser mit dem Level an löslichen Amyloid  $\beta$  (sA $\beta$ =soluble Amyloid  $\beta$ ) korrelieren, als mit der Belastung durch Amyloid  $\beta$  Plaques (Sivanesan, Tan, & Rajadas, 2013).

A $\beta$  Oligomere (A $\beta$ O) sind heterogene, prä-fibrilläre Amyloid  $\beta$  Peptide unterschiedlichen Molekulargewichts (MG; <10 bis >100 kDa) (Sakono & Zako, 2010). Mit zunehmender Größe der Oligomere (von „low-n“, niedriges MG z.B. Di-, Tri-, Tetramere, zu „high-n“, hohes MG wie z.B. Dodecamere oder Protofibrillen) steigt der Anteil von  $\beta$ -Faltblattstrukturen innerhalb der Peptide. Dieser korreliert gut mit der Fähigkeit der Fibrillisation, der Ausbildung von „Seeding“-Kernen sowie der Zytotoxizität (Ono, 2017).

A $\beta$ O führen zur Störung der synaptischen Plastizität mit Reduktion von Langzeitpotenzierung (LTP) und Förderung von Langzeitdepression (LTD), u.a. durch Modulation von Expression und Funktion glutamaterger Rezeptoren wie NR2B und mGluR5. Diese synaptische Dysfunktion sowie eine Anlagerung von löslichen A $\beta$ O an synaptische Dornfortsätze führen zu funktionellen und morphologischen Störungen der Neurone. Es kommt zu einer Schrumpfung und Reduktion der Dornfortsätze sowie zum Synapsen- und später auch Neuronenuntergang. Diese pathophysiologischen Prozesse führen zu einer Beeinträchtigung synaptischer Transmission und Plastizität und damit verbundenen kognitiven Leistungen, wie Gedächtnis und Lernen (Kayed & Lasagna-Reeves, 2013; Klein, 2013; Masters & Selkoe, 2012; Shankar et al., 2008; Sivanesan et al., 2013).

Neben der Interaktion mit Neuronen und einer Störung der neuronalen Membran-/Rezeptor-Integrität initiieren Oligomere über eine Aktivierung von Gliazellen mit Sekretion von Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und anderen Botenstoffen eine proinflammatorische Kaskade. A $\beta$ O führen zudem zu einer mitochondrialen Dysfunktion und erhöhtem oxidativen Stress mit gestörter, zellulärer Homöostase und Aktivierung intrazellulärer Signalwege, die eine neuronale Apoptose durch Caspasen und einen Zelluntergang induzieren (De-Paula et al., 2012).

Gemeinsamer Startpunkt oligomerer A $\beta$  Spezies ist die Proteolyse aus APP und die Aggregation von sezernierten monomeren A $\beta$  Proteinen.

### 1.3.1 Häufige A $\beta$ Subformen

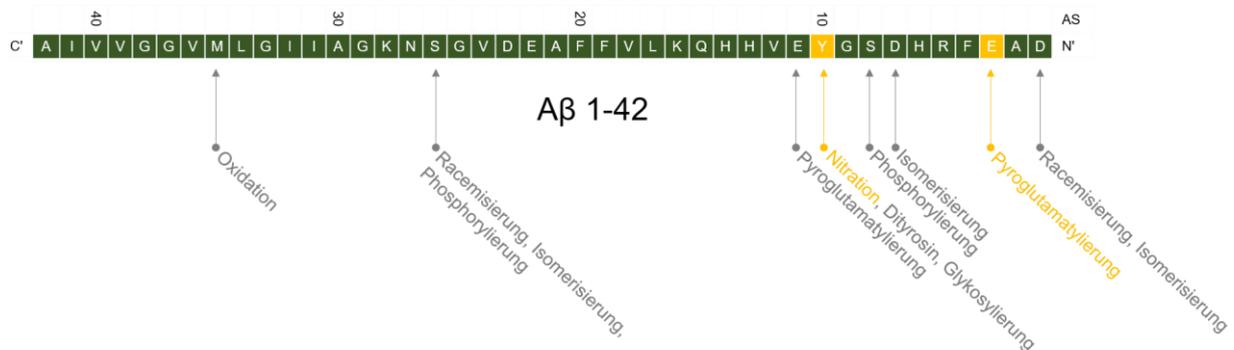
Die häufigsten sezernierten A $\beta$  Proteine sind A $\beta$  1-40 und A $\beta$  1-42 (Murphy & LeVine, 2010). In der AD nimmt das Verhältnis A $\beta$  1-40/1-42 zugunsten von A $\beta$  1-42 zu, damit wird das längere A $\beta$  Protein vermehrt in den interstitiellen Raum sezerniert und kann durch die Tendenz zur schnellen Aggregation (Ono, 2017) und Oligomerisation als „driving factor“ für die pathophysiologischen Prozesse der frühen Alzheimer Erkrankung angesehen werden. Durch die beschriebenen Eigenschaften wird die Plaquetformierung initiiert und es zeigen sich neurotoxische Effekte durch oligomere A $\beta$  1-42 Peptide (Forloni & Balducci, 2018; Haass & Selkoe, 2007; Kummer & Heneka, 2014). Die erhöhte Neigung zur Aggregation wird durch eine niedrigere Löslichkeit und eine erhöhte Hydrophobizität begünstigt. Eine erhöhte Fibrillisationsrate lässt A $\beta$  1-42 im Vergleich zu A $\beta$  1-40 vermehrt parenchymal in Plaques ablagern (Lane et al., 2017; Murphy & LeVine, 2010). Zudem kann A $\beta$  1-42 auch als Nukleationskern die Aggregation des häufigeren A $\beta$  1-40 bzw. von anderen A $\beta$  Subformen initiieren und vorantreiben (Schieb et al., 2011). A $\beta$  1-42 ist somit toxischer als A $\beta$  1-40 (Youssef et al., 2008).

### 1.3.2 Posttranslationale Kürzungen und Modifikationen

Nach abgeschlossener Endoproteolyse aus APP und Freisetzung von A $\beta$  kann es zu Sekretase-unabhängigen Kürzungen sowie zu unterschiedlichen posttranslationalen Modifizierungen (PTMs) der Peptide kommen. Diese Modifizierungen erfolgen an einzelnen Aminosäuren des A $\beta$  Proteins (Abb. 2) und werden u.a. enzymatisch induziert (Barykin, Mitkevich, Kozin, & Makarov, 2017). PTMs können auch nicht-enzymatisch erfolgen, z.B. durch ein inflammatorisches Milieu, welches Oxidation und Nitration erleichtert (Kummer & Heneka, 2014; Kummer et al., 2011).

PTMs durch Nitration und Pyroglutamatylierung rücken insbesondere aufgrund des

häufigen Vorkommens, der erhöhten Aggregationseigenschaften und ihrer neurotoxischen Effekte in den Fokus der Forschung (Rammes et al., 2018).



**Abbildung 2 Posttranslationale Modifizierungen (PTMs) am Aβ Protein.** Aminosäuresequenz des Proteins Aβ 1-42 mit Darstellung möglicher PTMs an unterschiedlichen Aminosäuren. Von besonderem Interesse sind hierbei die Nitration an Tyrosin (Position 10) und die Pyroglutamatylierung an Position 3. Modifizierte Darstellung nach Kummer et al. (2014). AS=Aminosäure, C'=C-terminales Ende, N'=N-terminales Ende.

### 1.3.2.1 Nitration

Nitrat-modifizierte Aβ Peptide entstehen durch Modifizierung mittels Stickstoffmonoxid (NO) oder Peroxynitrit (Guivernau et al., 2016) an Tyrosinresten. Diese NO-verursachten Proteinmodifizierungen werden in der AD gehäuft beobachtet (Butterfield et al., 2007; Kummer & Heneka, 2014). Die PTMs können enzymatisch durch NOS2 (Stickstoffmonoxid-Synthase 2), die in AD Gehirnen vermehrt induziert wird, katalysiert werden (Heneka et al., 2001). Eine Induktion der NOS2 in Neuronen, Mikroglia und Astrozyten erfolgt getriggert durch Inflammation oder nitrosativen und oxidativen Stress (Combs, Karlo, Kao, & Landreth, 2001; Kummer et al., 2011). Die Nitration findet an Position 10 (Tyrosin) der Aminosäuresequenz des Aβ Proteins statt (Abb. 2) (Kummer & Heneka, 2014; Kummer et al., 2011). Das dabei entstehende 3NTyr10-Aβ (Aβ Nitro) zeigt eine gesteigerte Aggregationsneigung und wurde in Amyloid Plaques zentral als Aggregationskern identifiziert, was dem nitrierten Aβ eine Rolle in der Initiierung und Formation von Aβ-Aggregaten und somit in der Frühphase der AD zukommen lässt (Kummer et al., 2011).

Aβ Nitro supprimiert in größerem Ausmaß hippocampale LTP als es nicht-nitrierte Aβ-Formen können (Kummer & Heneka, 2014). Eine selektive Blockade der enzymatischen Aktivität von NOS2 mittels NOS2-Inhibitoren führt zu einer Reduktion von Aβ Nitro und zu einer verringerten Ablagerung von Aβ sowie einer geringeren kognitiven Dysfunktion in APP/PS1 Mäusen (Kummer et al., 2011). Für Nitrat-abhängige

PTMs und somit A $\beta$  Nitro konnte zudem im Zellversuch eine durch Ca<sup>2+</sup>-vermittelte, N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-(NMDAR)-abhängige Exzitotoxizität gezeigt werden (Guivernau et al., 2016). Diese Form der PTMs stabilisiert höchst toxische Oligomere und stört die Formierung von weniger toxischen fibrillären A $\beta$  Spezies (Guivernau et al., 2016).

#### 1.3.2.2 Pyroglutamatylierung

Eine weitere Modifizierung des A $\beta$  Proteins kann durch Bindung von Pyroglutamat an Position 3 oder 11 (Aspartat) erfolgen. An Position 3 Pyroglutamat-modifiziertes A $\beta$ , 3pE-A $\beta$  (A $\beta$  Pyro), kann in A $\beta$  Plaques nachgewiesen werden. Es weist eine geringe Löslichkeit auf (Kummer & Heneka, 2014). In vitro zeigt sich für A $\beta$  Pyro eine hohe Tendenz zur Selbstaggregation (Kummer & Heneka, 2014) und Oligomerisation (Gunn et al., 2010; Harigaya et al., 2000). Diese Eigenschaften machen A $\beta$  Pyro zu einem möglichen Ausgangspunkt für die Nukleation anderer A $\beta$  Subformen, wie z.B. A $\beta$  1-42 (Forloni & Balducci, 2018). Der synergistische Effekt von A $\beta$ /A $\beta$  Pyro-Heterooligomeren resultiert in einem erhöhten Toxizitätslevel und der Stabilisation oligomerer A $\beta$  Peptide (Forloni & Balducci, 2018; Gunn et al., 2010; Schilling et al., 2006). Die häufig vorkommende A $\beta$  Pyro Subform entsteht durch N-terminale Kürzung um zwei Aminosäuren, mittels Aminopeptidasen oder durch direkte endoproteolytische Freisetzung aus APP (Gunn et al., 2010), sodass Glutamat N-terminal freigelegt wird. In einem nächsten Schritt erfolgt eine Dehydratationsreaktion, katalysiert durch die Glutaminyl Cyclase, einem Enzym, das in der AD erhöhte Expressionslevel aufweist (Gunn et al., 2010; Kummer & Heneka, 2014). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der Glutaminyl Cyclase zu reduzierter Bildung von A $\beta$  Pyro, verminderten A $\beta$ 1-40/1-42 Leveln, geringerer Plaquebelastung und Inflammation führt und räumliches Lernen sowie Gedächtnisleistungen verbessert (Kummer & Heneka, 2014).

Die Modifizierung (N-terminale Kürzung, Ladungsverlust) verursacht eine Verstärkung der hydrophoben Eigenschaften und eine gesteigerte Aggregationsneigung (Masters & Selkoe, 2012; Tekirian, Yang, Glabe, & Geddes, 1999). In einigen Studien zeigte sich außerdem eine stark ausgeprägte Neurotoxizität in Mausmodellen, die A $\beta$  Pyro exprimieren. Dies ähnelt den toxischen Effekten von A $\beta$  1-42 (Bouter et al., 2013; Youssef et al., 2008). Tekirian et al. beschreiben zudem eine verstärkte Resistenz gegen den Abbau durch Aminopeptidasen (Tekirian et al., 1999). In vitro und in vivo konnten keine Toxizitätsunterschiede für A $\beta$  Pyro im Vergleich zu A $\beta$  1-40 und 1-42

gezeigt werden (Bouter et al., 2013; Tekirian et al., 1999). Rammes et al. beschreiben allerdings eine um den Faktor 10 geringere neurotoxische Potenz für A $\beta$  Pyro (Rammes et al., 2018).

#### 1.4 Isofluran – Interaktionen mit Amyloid $\beta$ und mögliche Konsequenzen

Die Genese der AD ist multifaktoriell. Neben Risikofaktoren wie fortgeschrittenem Lebensalter, weiblichem Geschlecht, geringem Bildungsniveau, positiver Familienanamnese und genetischen Mutationen, gibt es auch modifizierbare Faktoren, wie z.B. kardiovaskuläre Risikofaktoren (Seitz, Shah, Herrmann, Beyene, & Siddiqui, 2011). Neben den genannten Einflüssen wird auch diskutiert, ob eine Allgemeinanästhesie das Risiko für eine AD erhöht (Perucho et al., 2010). Modifizierende Effekte durch Anästhetika, u.a. volatile Anästhetika wie Isofluran, Sevofluran und Desfluran, werden jedoch kontrovers diskutiert (Seitz et al., 2011; Xie & Xu, 2013).

Isofluran stellt eines der am häufigsten verwendeten volatilen Inhalationsanästhetika dar. Es ist ein volatiles Anästhetikum mit einem MAC-Wert von 1,2 Vol.-% und wirkt über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren hypnotisch, zudem wird über die Modulation von u.a. NMDA- und Glyzinrezeptoren eine Bewegungslosigkeit vermittelt (Eckle, Hucklenbruch, & Todorovic, 2009).

Über Isofluran und dessen Wirkung auf A $\beta$  sowie eine mögliche Modifizierung pathophysiologischer Effekte in der AD liegen gegensätzliche Daten und Erkenntnisse vor. So werden u.a. die Initiierung und Modifikation von inflammatorischen und apoptotischen Prozessen und eine Beeinflussung von synaptischer Transmission über glutamaterge Rezeptoren kontrovers diskutiert (Jiang & Jiang, 2015; Xie & Xu, 2013; Xu et al., 2011).

Einige Arbeiten beschreiben neuroprotektive Effekte von Isofluran, die sich in einer Verbesserung in der kognitiv-behavioristischen Testung sowie einer Abnahme von A $\beta$ O und Plaques im Hippocampus transgener Mäuse äußern (Eckel et al., 2013; Su et al., 2012). Andere Studien wiederum zeigen, dass Isofluran die Neuropathogenese der AD negativ beeinflusst (Jiang & Jiang, 2015) und möglicherweise in Verbindung mit AD-assoziierten Genen das Risiko für eine Anästhetika-induzierte Neurotoxizität erhöht und so an der Entstehung von dystrophen Neuriten, Neuronenverlust und reaktiver Gliose beteiligt ist (Jiang & Jiang, 2015).

Eckenhoff et al. zeigen in einem in vitro Versuch mit Phäochromozytomzellen, dass

Isofluran die A $\beta$  Oligomerisation durch Bindung löslicher, oligomerer Peptide fördert und die Toxizität der A $\beta$  Proteine erhöht (Eckenhoff et al., 2004). Gleiches gelingt in einer weiteren in vitro Studie, die darüber hinaus aufzeigt, dass es durch Isofluran zu einer Aktivierung von Caspasen, zur Induktion von Apoptose sowie zu einem Gesamtanstieg der A $\beta$  Proteinkonzentration kommt (Xie et al., 2006). Die Arbeitsgruppe um Xie zeigt zudem, dass eine Isofluranexposition Apoptose induziert und über eine Caspasenaktivierung die APP-Prozessierung und A $\beta$  Level beeinflusst (Xie et al., 2006). Auch in vivo kann die Isofluran-induzierte Caspasenaktivität mit einer Erhöhung der BACE-Aktivität und A $\beta$  Level in Verbindung gebracht werden. Somit wird ein „circulus vitiosus“ aus Caspasenaktivierung, alterierter APP-Prozessierung, gesteigerter A $\beta$  Produktion und Immunsystem-vermittelter Inflammation und Caspasenaktivierung initiiert und aufrechterhalten, der zur Destruktion von Synapsen und Dendriten, zu Apoptose von Neuronen und zur Neurodegeneration führt (Jiang & Jiang, 2015; Xie, 2008; Xie et al., 2008; Xie et al., 2006). Zudem aktiviert Isofluran über eine NMDAR-vermittelte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung apoptotische Signalwege mit nachgeschaltetem Neuronenuntergang (Zhang et al., 2008) und führt zu Störungen von Lern- und Gedächtnisprozessen in Wildtyp-Mäusen (Bianchi et al., 2008). Während AD Tiermodelle und in vitro Versuche zeigen, dass Isofluran durch eine direkte Interaktion mit A $\beta$  Proteinen und über indirekte Störung der A $\beta$  Homöostase sowie einer Aktivierung inflammatorischer und apoptotischer Signalkaskaden die Progression der AD beeinflussen kann, können Seitz et al. in einer Metaanalyse keine Effekte einer Allgemeinanästhesie auf das AD Risiko für Menschen feststellen (Seitz et al., 2011). Ebenso können Aiello Bowles et al. in einer prospektiven Kohortenstudie keinen Zusammenhang zwischen Narkose und dem Risiko, eine Alzheimer Demenz zu entwickeln, darstellen (Aiello Bowles et al., 2016).

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, potentielle Effekte von verschiedenen löslichen A $\beta$  Subformen und deren Interaktion mit Isofluran in einem murinen AD Tiermodell zu untersuchen. Nach intracerebroventrikulärer Injektion von A $\beta$  (A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42, A $\beta$  Nitro, A $\beta$  Pyro) und Isofluran Exposition erfolgte zunächst eine Verhaltens- und Kognitionstestung mittels modifizierten Holeboard Test (mHBT). Die neurokognitive Testung und Auswertung des mHBT wurde von Finn Stryca durchgeführt und im Rahmen seiner Dissertation „*Analyse von Neurotoxizität verschiedener Amyloid-beta Subformen – Auswirkungen im modifizierten Holeboard Test*“ bei der TUM Graduate School eingereicht.

Ziel des zweiten Teils, der in dieser Arbeit dargestellt wird, war die histochemische und molekularbiologische Analyse der Mäusehirne. Es sollten hierbei grundlegende, pathophysiologische Prozesse der AD beleuchtet werden. Es erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Mäusehirne auf zerebrale Ablagerungen fibrillärer A $\beta$  Strukturen und Plaques. Zudem wurden Inflammation, Apoptose und Expression glutamaterger Rezeptoren, die an Neurotransmission und kognitiven Prozessen beteiligt sind, analysiert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden adulte, 10 Wochen alte, männliche Mäuse (C57Bl6N) verwendet.

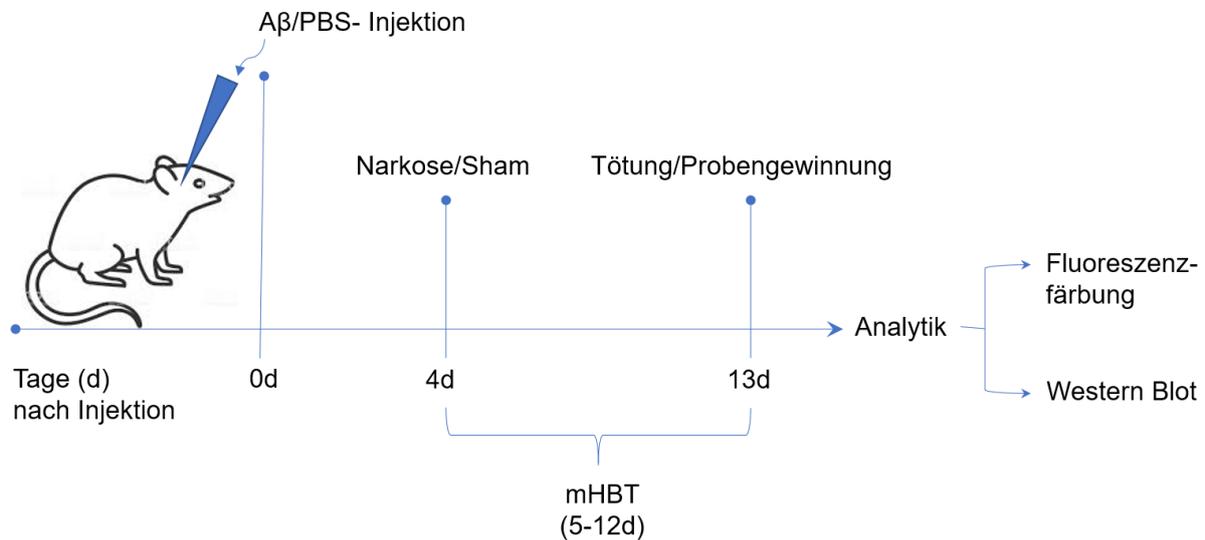
### 3.2 ICV-Injektion und Isoflurannarkose

Zur Applikation der A $\beta$  Proteinsubformen wurde das akute AD-Mausmodell der intracerebroventrikulären (ICV) Injektion gewählt. Bei diesem Modell wird den Black-Six-Mäusen stereotaktisch eine Kanüle in den lateralen Seitenventrikel implantiert, über die eine definierte Menge A $\beta$  appliziert werden kann. Durch dieses ICV-Alzheimer-Mausmodell ist es möglich Amyloid  $\beta$  unter Umgehung der Bluthirnschranke direkt in das Ventrikelsystem einzubringen, von wo aus sich die A $\beta$  Peptide im Hirnparenchym weiterverteilen (Kasza et al., 2017).

An Tag 14 nach erfolgter Kanülenimplantation (in Narkose mit 1,6 Vol.% Isofluran) wurden die verschiedenen A $\beta$  Subformen in den Ventrikel der Mäuse eingebracht. Mittels Hamilton®-Spritze wurden 5 $\mu$ l der jeweilig aufbereiteten A $\beta$  Subform appliziert. Je 12 Mäuse erhielten hierbei eine spezifische Amyloid  $\beta$  Subform - A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42, 3NTyr10-A $\beta$  (A $\beta$  Nitro), pE3-42-A $\beta$  (A $\beta$  Pyro) - oder Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline, PBS). Entsprechend der durch Rammes et al. bestimmten äquipotenten Dosis für Neurotoxizität wurden unterschiedliche Konzentrationen der A $\beta$  Subformen in die Seitenventrikel injiziert (Rammes et al., 2018).

Hierzu wurde monomeres A $\beta$  1-42, in HFIP gelöst und bei -20°C gelagert, bei 37°C im Wasserbad für 10 Minuten erwärmt, dann für 30 Sekunden im Ultraschallbad behandelt und mit NaOH (20mmol/l, pH 12,2) gelöst sowie mit PBS verdünnt, um den Oligomerisationsprozess zu starten. Es folgte die zweimalige Behandlung im Ultraschallbad für 30 Sekunden und das Vermischen für je 30 Sekunden, bevor die Lösung auf Eiswasser kaltgestellt wurde. Die A $\beta$  Lösung wurde 15 bis 45 min nach Herstellung durch Einbringen in die Kanüle auf Raumtemperatur gebracht, bevor sie den Mäusen intracerebroventrikulär appliziert wird. Die Konzentration für A $\beta$  1-42 beträgt 700nmol/L, die 5 $\mu$ l der injizierten Lösung erzeugen im CSF eine Endkonzentration von 100nmol/l. A $\beta$  1-40, A $\beta$  Nitro und A $\beta$  Pyro wurden in PBS gelöst und auf 3200, 700 bzw. 11900nmol/L verdünnt. Somit erzeugen die Lösungen nach Injektion im Liquor Konzentrationen von 450, 100 und 1700nmol/l. Nach Einbringen der Subformen und PBS

ins Ventrikelsystem, erfolgte nach vier Tagen entweder eine Isofluran-Narkose über 2 Stunden bzw. in der Sham-Gruppe alleine das Handling und der Transport der Tiere ohne Anästhesie (Abb. 3). Die Sham/PBS-Gruppe fungiert ohne Exposition gegenüber potentiell neuroprotektiven oder -toxischen Stoffen als Kontrollgruppe.



**Abbildung 3 Versuchsablauf.** Nach erfolgter Kanülenimplantation erfolgte die Injektion von A $\beta$  Subformen bzw. PBS in das Ventrikelsystem der Maus (ICV-Injektion an Tag 0). Nach Applikation erfolgte an Tag 4 die Narkose mit Isofluran bzw. in der Kontrollgruppe das Sham-Prozedere. Es folgte die kognitive und behaviorale Testung im mHBT (Tag 5-12). Nach Abschluss des mHBT wurden die Versuchstiere getötet, es schloss sich die Probengewinnung (Tag 13) zur Fluoreszenzmikroskopie und molekularbiologischen Analyse mittels Western Blot Verfahren an.

### 3.3 Kognitions- und Verhaltenstest - Modifizierter Holeboard Test

Nach erfolgter Kanülenimplantation, A $\beta$ -Injektion sowie Narkose bzw. Sham-Prozedur fanden kognitive und behaviorale Testungen der Mäuse mittels modifiziertem Holeboard Test (mHBT) statt. Bei diesem Test handelt es sich um eine v.a. für Mäuse und Ratten konzipierte Testbatterie, mit derer verschiedene Testparameter untersucht werden (Eckel et al., 2013; Ohl, Holsboer, & Landgraf, 2001).

So können sowohl behaviorale als auch kognitive Parameter getestet werden. Unter anderem werden Kognition (deklaratives Gedächtnis, visospatales Kurzzeitgedächtnis), Vermeidungsverhalten im Sinne von Angstverhalten sowie verhaltenstypische Aspekte wie lokomotorische Aktivität und physiologisches „Arousal“ (Erregung; Grooming=Pflege) der Mäuse getestet.

Die Untersuchung erfolgte an acht aufeinander folgenden Tagen (Tag 5-12). Nach

Testende erfolgte die Dekapitation der Versuchstiere an Tag 13 (Abb. 3), die Proben-gewinnung und anschließend die Lagerung der Mäusehirne zur weiteren Aufbereitung bei -80°C.

### 3.4 Aufbereitung der Proben und Auswahl der Hirnschnitte

#### 3.4.1 Aufbereitung der Hirnproben

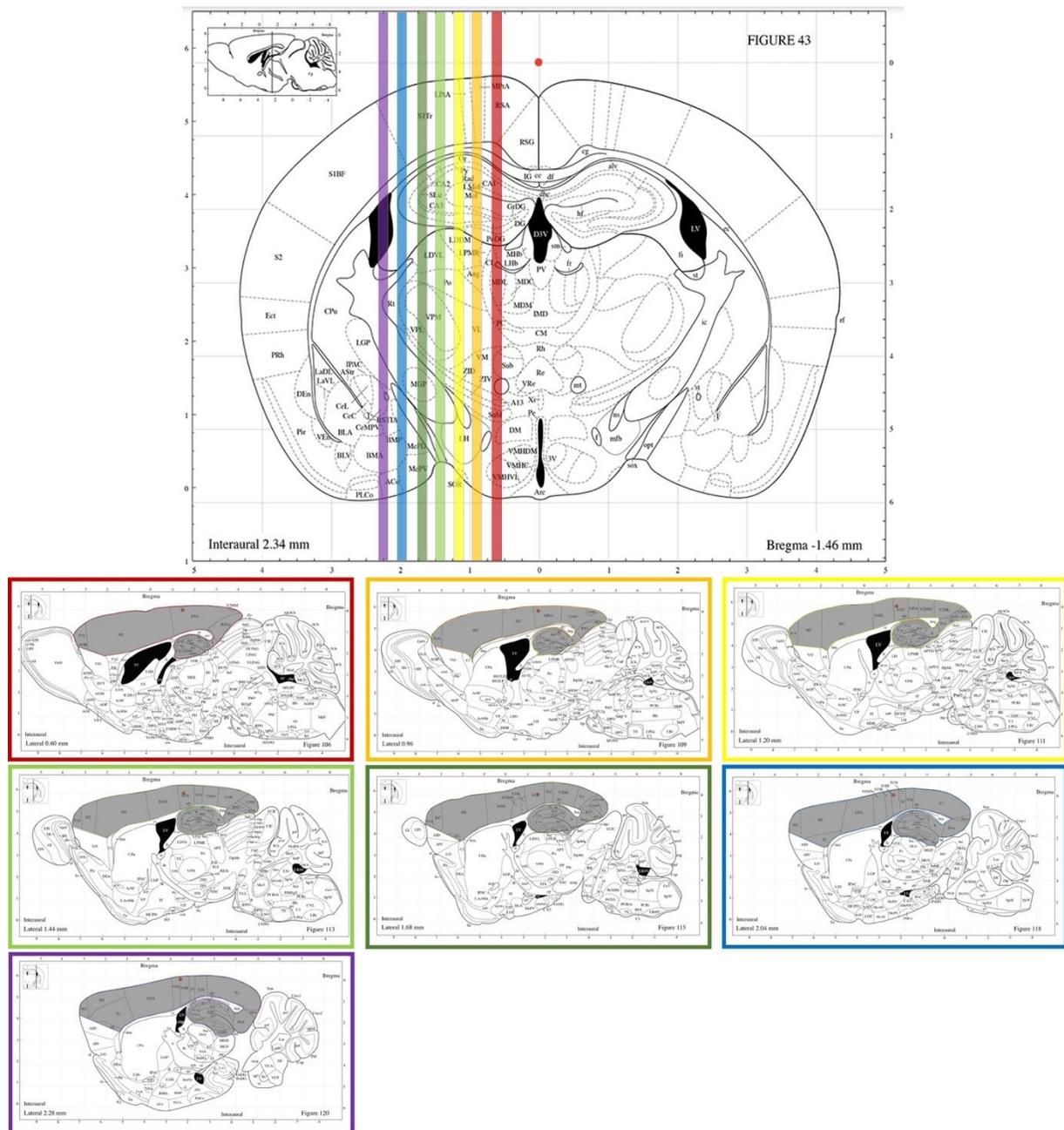
Für die histochemische-mikroskopische Untersuchung der gefrorenen Mäusehirne wurden sagittale Gewebeschnitte in unterschiedlicher Stärke am Kryomikrotom ange-fertigt. Die Schnittfolge erfolgte dabei nach einem festen Schema: neun Schnitte á 10µm folgen neun Schnitte á 50µm. Nach dieser festen Abfolge wurde jeweils eine Hemisphäre des Mäusehirns geschnitten und bei -80°C gelagert.

#### 3.4.2 Auswahl Hirnschnitte

Die Auswahl der Schnitte für die Fluoreszenzfärbung orientierte sich zur Vergleichbar-keit an einem standardisierten Schema, das anhand von Paxinos` *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* entwickelt wurde (Paxinos & Franklin, 2004).

Aufgrund der bevorzugten Ablagerung von Aβ Plaques in Frontal- und Temporallap-pen, inklusive Sensorischem Kortex (SC) sowie Hippocampus (HC), erfolgte die Selektion repräsentativer, sagittaler Hirnschnitte in regelmäßigen Abständen, die diese Areale inkludieren. Hierzu wurden aus der aufbereiteten und geschnittenen Hemisphäre insgesamt 7 Objektträger á 3 Hirnschnitten mit 50µm Schnittstärke aus-gewählt (Abb. 4).

Diese Hirnschnitte mit Hippocampus und Sensorischem Kortex wurden gefärbt und mikroskopisch untersucht. Bei positivem Nachweis von Aβ Plaques werden die Hirn-schnitte gescannt.



**Abbildung 4 Auswahl der Hirnschnitte der Black-Six-Mäuse (C57Bl6N) für Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie, Maushirn in Koronar- und Sagittalebene. Farbige Hervorhebung der selektieren Schnittebenen in koronarer Ansicht (oben). Im Sagittalschnitt (unten), beispielhafte Auswahl an Schnitten für die Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie. Alle ausgewählten Schnitte beinhalten die für die Analyse vorgesehenen Areale, Region of Interest (ROI), Hippocampus und Sensorsicher Kortex, grau gefärbt. Modifizierte Darstellung nach Paxinos´ „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“.**

### 3.5 Proteinextraktion

Für die molekularbiologische Aufbereitung und Proteinanalytik wurde die zweite Gehirnhemisphäre in Koronarebene mit einer Schnittdicke von 100µm geschnitten. Dabei wurden die Gehirne nach einem festen Schnittprotokoll aufbereitet: 1000µm Rest; 400µm medialer präfrontaler Kortex (MPFC); 100µm Rest; 500µm Motorischer Kortex; 400µm Rest; 2000µm sensorischer Kortex (SC); ca. 500-1200µm Rest bis zur Darstellung des Hippocampus (HC). Es folgte die Präparation des HC aus dem restlichen Gehirnparenchym.

Zur weiteren Lagerung und Aufbereitung wurden die Hirnschnitte und der HC anschließend in Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf AG) gesammelt und bei -80°C gelagert. Zur Proteinextraktion wurde das Hirngewebe auf Eiswasser mechanisch mit dem Amersham Sample Grinding Kit (GE Healthcare) zerkleinert und mit einer Extraktionslösung [1ml: 970µl RIPA Buffer (Sigma Aldrich), 20µl 50x konzentriertes Complete (Roche), 10µl 100 x PMSF (Sigma Aldrich), 1µl Pepstatin A (Sigma Aldrich)] zur Zellyse und Lösung von Proteinen homogenisiert und bei 12000rpm und +4°C für 30 min zentrifugiert, um die löslichen Proteine zu isolieren. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde abpipettiert und bei -80°C gelagert.

### 3.6 Fluoreszenzmikroskopie

#### 3.6.1 Methoxy-X04-Färbung

##### 3.6.1.1 Herstellung der Methoxy-X04-Färbelösung

Zur Herstellung der Methoxy-X04-Färbelösung für die Fluoreszenzfärbung wurden 10mg Methoxy-X04 Pulver (Tocris Bioscience) in 100µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich) gelöst. Es folgte die Durchmischung auf einem Vortexmischer. Im Anschluss wurden jeweils 450µl 1,2-Propandiol, 1-fach konzentrierte PBS-Lösung sowie 50µl 1N NaOH zugegeben. 800µl dieser Standardlösung (c=10mg/ml) wurden in 200ml einer 1:1-PBS/EtOH-Mischung gelöst und auf eine Konzentration von 0,04mg/ml verdünnt. Nach erneuter Durchmischung wurde die Färbelösung bei +4°C im Kühlschrank und aufgrund von Fotolabilität des Farbstoffs lichtgeschützt gelagert.

##### 3.6.1.2 Methoxy-X04-Färbung

Zunächst erfolgte die Fixierung der ausgewählten Hirnschnitte in gekühltem Aceton (-20°C) in einer Glasküvette für 20 min unter dem Abzug. Nach dem Trocknen der fixierten Schnitte für ca. 30 min bei Raumtemperatur folgte das zweimalige Waschen

der Schnitte mit einer Waschlösung aus 1-fach konzentrierter PBS und Ethanol mit MEK (Methylethylketon) im Verhältnis 1:1 für jeweils 10 min. Für die Färbung wurden die Schnitte für 30 min auf einem 3D-Schüttler mit der Methoxy-X04-Färbelösung inkubiert. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten aufgrund der Fotolabilität des Farbstoffs unter möglichst geringer Lichtexposition. Es folgte dreimaliges Waschen der Schnitte mit der Waschlösung für jeweils 10 min und zweimaliges Waschen mit destilliertem MilliQ-Wasser für jeweils 10 min, um ungebundenes Methoxy-X04 und Salzkristalle abzuwaschen, die im PBS-Puffer enthalten sind. Nach Trocknung der Schnitte für ca. 45 min wurden die Hirnschnitte mit dem Fluorescence Mounting Medium (DAKO) eingedeckelt, im Dunkeln getrocknet und lichtgeschützt bei +4°C gelagert.

### 3.6.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Hirnschnitte beruht auf dem Prinzip, dass der Fluoreszenzfarbstoff spezifisch an ein bestimmtes Protein bindet und durch eine bestimmte Lichtwellenlänge angeregt wird und daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Dieses Licht kann mittels Filter detektiert werden. Methoxy-X04 (4,4'-[(2-methoxy-1,4-phenylene)di-(1E)-2,1-ethenediyl]bisphenol), ein Kongo Rot Derivat, bindet selektiv an fibrilläre  $\beta$ -Faltblattablagerungen und dient der spezifischen Detektion von A $\beta$ -Ablagerungen in Form von Plaques, Tangles und cerebrovaskulärem Amyloid.

Zur Mikroskopie der Gewebeschnitte sowie zur Akquirierung von 3D-Bildstapeln wurde ein Epifluoreszenz Mikroskop (Axio Imager.M2 mit ApoTome.2, Carl Zeiss Microscopy) mit 10x Objektiv verwendet. Die Beleuchtungseinrichtung HXP 120 C stellt als Fluoreszenzlichtquelle Licht mit der notwendigen Wellenlänge zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes bereit.

Methoxy-X04 wurde mit dem Zeiss DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol-(DAPI)-Reflektor) Filter Set bei einer Wellenlänge von 358nm zur Fluoreszenz angeregt, die Emission wird bei 463nm detektiert.

Ziel der Fluoreszenzmikroskopie ist die Identifikation amyloidogener Strukturen innerhalb zerebraler Areale und die anschließende Gewinnung eines optischen Schnitts der „Region of Interest“ (ROI) - Hippocampus und Sensorischer Kortex - mit verbessertem Kontrast und hoher Auflösung unter Ausblendung von Streulicht. Dies soll eine optimale Analyse von A $\beta$ -positiven Hirnschnitten ermöglichen. Durch die Aufnahme von mosaikartigen Einzelbildern im *Tile Scan Mode* in der X-Y-Ebene, ergänzt durch lichtstreuungsfreie Aufnahmen in mehreren Fokusebenen in der Z-Achse (Z-Stack), kann

ein 3D-Gesamtbild des Präparats generiert werden. Dies ermöglicht, neben einer oberflächlichen Beurteilung des Hirnschnitts, durch Integration von optischen Informationen aus der Tiefe der Hirnschnitte, eine Bestimmung der A $\beta$  Belastung (Plaque Load) in drei Ebenen vornehmen zu können.

Nach initialer mikroskopischer Analyse der gefärbten Hirnschnitte und Screening auf A $\beta$ , erfolgte nur bei positivem Nachweis amyloidogener Strukturen in der Fluoreszenzmikroskopie die Akquisition der Aufnahmen mit dem Zusatzmodul ApoTome.2 (Carl Zeiss Microscopy) und Zen Blue (Carl Zeiss Microscopy).

Über den Akquisition Modus und durch das ApoTome.2-Modul können die ROIs manuell über *Tiles Region Setup - Contour* ausgewählt, die Präparate im DAPI-Channel angeregt und aufgenommen werden. Hierzu werden die 50 $\mu$ m Schnitte in sechs Schichten (*Z-Stack*) mit einem Intervall von 8,3 $\mu$ m abgebildet. Die kachelartigen Einzelbilder jeder Aufnahme werden zu einer Gesamtaufnahme der ausgewählten Hirnareale in sechs Ebenen fusioniert. Die Bearbeitung der erzeugten Dateien erfolgt mit Zen Blue und Zen Black (Carl Zeiss Microscopy). Mittels *Normalization, Local Bleaching, Phase Correction* und *Fourier Filter - Medium* können Gitterartefakte reduziert und mit dem *Stitching*-Tool, über eine Korrektur des Versatzes einzelner Kacheln zueinander, eine Übersichtsaufnahme generiert werden. Zen Black ermöglicht es mit der *Maximum Intensity Projection* die sechs einzelnen Ebenen der Aufnahme aufeinander zu projizieren, die Farbintensitäten von fluoreszierenden Strukturen aufzuaddieren und somit einen Gesamtüberblick über die  $\beta$ -Faltblattstrukturen der A $\beta$  Peptide im Gewebeschnitt zu geben.

### 3.6.3 Auswertung der akquirierten Hirnschnitte

Bei positivem Nachweis von A $\beta$  erfolgt die Auswertung der Plaque Load mittels Fiji (ImageJ 1.51h; National Institutes of Health, USA) nach gegebenenfalls nötiger Anpassung von Helligkeit und Kontrast sowie einer manuellen Bearbeitung mit GNU Image Manipulation Program (GIMP) zur Beseitigung von Artefakten in der generierten Bilddatei..

Zunächst können die ROIs manuell mit dem *Polygonale Selection Tool* selektiert werden. Nach Beseitigen der nicht-selektierten Areale (*Clear Outside*) und Hintergrundsubtraktion (*Subtract Background - Sliding paraboloid 5.0px-10.0px*) wird ein individueller Schwellenwert für die Plaquedetektion im Gewebepräparat definiert.

## 3.7 Western Blot Analyse

### 3.7.1 Bradford Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

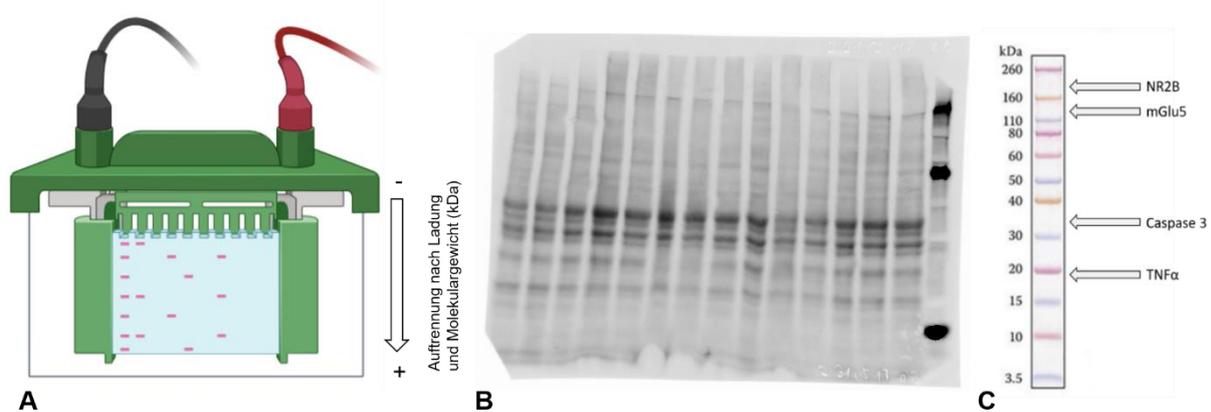
Die zur Proteinanalytik notwendige, exakte Proteinkonzentrationsbestimmung der Gewebeproben aus HC und SC erfolgte mittels Bradford Assay. Dieses Verfahren beruht auf der photometrischen Analyse des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250. Dieser unter sauren Bedingungen kationische, rote Farbstoff gibt für eine stabile Bindung mit Proteinen Elektronen an positiv geladene Seitengruppen ab und wird so in neu entstehenden hydrophobischen Taschen der Proteine gebunden. Dieses stabile und gebundene Coomassie G-250 ist die blaue, unprotonierte Form. Der Farbumschlag wird photometrisch quantifiziert und ist proportional zum Proteingehalt im Probenlysat. Somit ist eine direkte Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteingehalts über die photometrisch gemessene Absorption von Coomassie G-250 möglich.

Zunächst wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:5 (4µl Protein und 16µl Aqua dest.) und 1:10 (2µl Protein und 18µl Aqua dest.) verdünnt, auf dem Vortex vermischt und in eine 96-Wellplatte pipettiert. Hierbei wurden für Nullwert, Standard (=Probe aus Restgehirn der Mäuse) und die Verdünnungen jeweils dreimal 5µl in sogenannte „Triplets“ pipettiert. Zur Konzentrationsmessung wurden anschließend 25µl Reagenz A und 200µl Reagenz B des DC Protein Assay (BioRad) in jeden Slot der Mikrofilterplatte gegeben. Zur Vermischung der Reagenzien folgte eine zehnmündige Inkubation auf einer Rüttelplatte. Zuletzt wurde im Sunrise™ Reader (Tecan Trading AG) bei einer Wellenlänge von 620nm die photometrische Konzentrationsbestimmung anhand der Absorption nach Farbumschlag durchgeführt. Nach Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Lysat, wurden alle Proben für das Western Blot Verfahren mit einem (Laemmli-)Probenpuffer (1ml NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen NP0007); 400µl NuPage Sample Reducing Agent (Invitrogen NP0009)) auf eine Gesamtproteinmenge von 2µg/µl eingestellt.

### 3.7.2 SDS-Gelelektrophorese

Das Prinzip des SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamid Gel Electrophoresis) besteht in der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und Molekülmasse (kDa). Damit die Auftrennung der Proteine nicht durch unterschiedliche Ladungen und spezifische Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen gestört wird, erfolgt zunächst eine Denaturierung und Linealisierung sowie eine „elektrische Neutralisierung“ der Proteine. Die Proben und Standards wurden deshalb auf eine Gesamtproteinmenge von 2µg/µl mit einem (Laemmli-)Probenpuffer eingestellt.

Dieser Puffer beinhaltet Coomassie G250, Phenolrot, Glycerol, DDT, SDS und Tris-Puffer. Die einzelnen Bestandteile übernehmen unterschiedliche Aufgaben: SDS, ein anionisches Tensid überlagert die Eigenladung der Proteine und verleiht diesen, durch Bindung an bestimmte Aminosäuren, eine negative Ladung, welche zur gegenseitigen Abstoßung führt und die Auftrennung im elektrischen Feld ermöglicht. Glycerol erhöht das spezifische Gewicht der Lösung, sodass diese in die Geltaschen des Sammelgels absinkt. Coomassie G250 und Phenolrot dienen als Farbstoff zur Sichtbarmachung der Fließgrenze. Zur Reduktion der Disulfidbrücken und somit zum Aufbrechen dieser wird 1,4-Dithiothreitol (DDT) beigefügt. Die Denaturierung zum Auflösen von Sekundär- und Tertiärstrukturen sowie die Linearisierung der Proteine erfolgte bei 95°C für fünf Minuten und 800rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf).



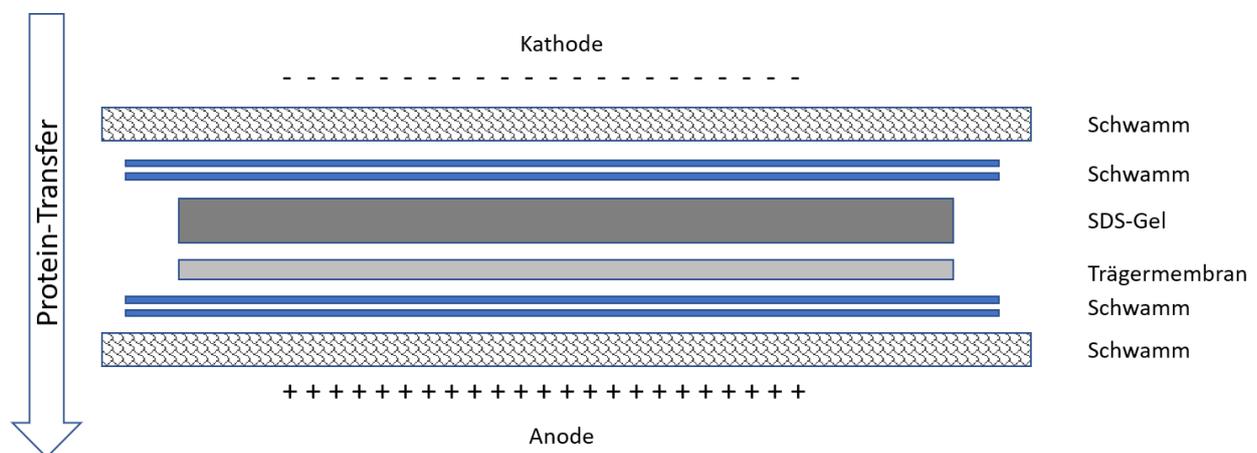
**Abbildung 5 Schematischer Aufbau der SDS-Gelelektrophorese, aktiviertes Gel und Protein Marker.** (A) Elektrophoresekammer mit Gel und Proteinauftrennung im elektrischen Feld nach Ladung und Molekulargewicht (kDa). (B) Durch UV-Licht aktiviertes Gel zeigt die verschiedenen Banden mit aufgetrennten Proteinen. Rechts außen erfolgt die Auftrennung des mitgelaufenen Proteinstandards (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard). (C) Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard – Lokalisation der Zielproteine nach Auftrennung mittels Western Blot. Elektrophoretische Separation anhand des Molekulargewichts: NR2B (190kDa), mGlu5 (132kDa), Caspase 3 (35kDa) und TNFα (17/26kDa). Modifiziert nach Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard Protocol, [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/NovexSharpPreStainedProteinStnd\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/NovexSharpPreStainedProteinStnd_man.pdf), besucht am 25.08.2019. (Grafik erstellt mit BioRender.com).

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Anschluss in einer SDS-Gelkammer (Abb.5). Das selbstgegossene Gel (TGX Stain Free™ Fast Cast™ Acrylamide Kit 10%, Bio-Rad) aus 10%igem Trenngel und einem Sammelgel zum Probeneinlaufen wurde im Elektrophorese-Puffer eingelegt. Die Proben wurden zum

Einlaufen in die Geltaschen für 20 min bei 100V in die Slots des Sammelgels gefüllt. Zur Visualisierung der Proteinlauffront und zur späteren Beurteilung der Molekülmasse der aufgetrennten Proteine, lief ein gefärbter Proteinmarker (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards, Thermo Fisher Scientific) mit den Proben mit (Abb. 5). Die anschließende Auftrennung der Proteine erfolgte für 30 bis 45 min bei 200V. Anschließend wurden die Gele durch eine UV-Kamera aktiviert (Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+; Bio-Rad). Dies ermöglicht nach dem Blotting-Verfahren die Bestimmung der Proteingesamtmenge auf den Membranen.

### 3.7.3 Western Blot – Proteintransfer, Inkubation mit spezifischen Antikörpern und Detektion der Proteinbanden

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran (Blotting) erfolgt im Tank Blot Verfahren. Hierzu wird das Trenngel mit der anodenseitig ausgerichteten Blotting Membran in einer mit (Elektrophorese-)Transferpuffer-gefüllten Blotting-Kammer (Bio-Rad) eingelegt. Der Transfer der negativ-geladenen und mit SDS beladenen Proteine erfolgt mittels Elektrotransfer im elektrischen Feld zwischen Kathode und Anode (Abb. 6).



**Abbildung 6 Prinzip des Western Blot Verfahrens, schematischer Aufbau.** Der Proteintransfer erfolgt im elektrischen Feld von Kathode zu Anode. Hierzu wurden SDS-Gel und Trägermembran im Transferpuffer eingelegt und aufeinander fixiert. Bei 80V für eine Stunde erfolgte das Blotting der Proteine.

Der Probentransfer vom SDS-Gel auf die Trägermembran (Amersham™ Hybond™ Low Fluorescence 0.2µm Polyvinylidenfluorid-Membrane (PVDF Blotting Membrane), GE Healthcare) erfolgte hierbei gekühlt für eine Stunde bei 80V. Nach Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die Membran, wurde diese für eine Stunde mit 5% BSA (bovine serum albumine, 2,5g in 50ml TBS/T) auf einem 3D Schüttler inkubiert. Die

Inkubation mit BSA bewirkt ein Besetzen aller freien möglichen Bindungsstellen der Proteine für Antikörper. Dreimaliges Waschen mit 10ml TBS/T für je 5 min führt zum Abwaschen des ungebundenen BSA (24,8mM Tris, 190mM NaCl, 0,1% Tween 20).

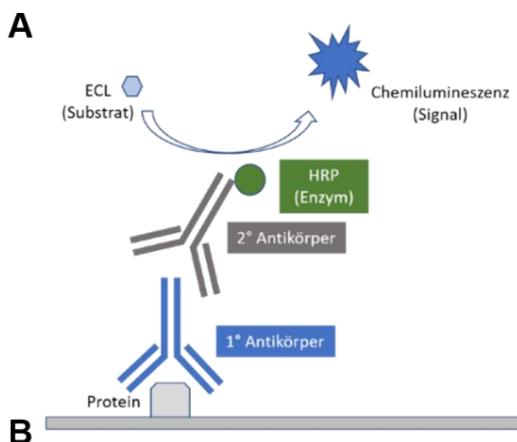
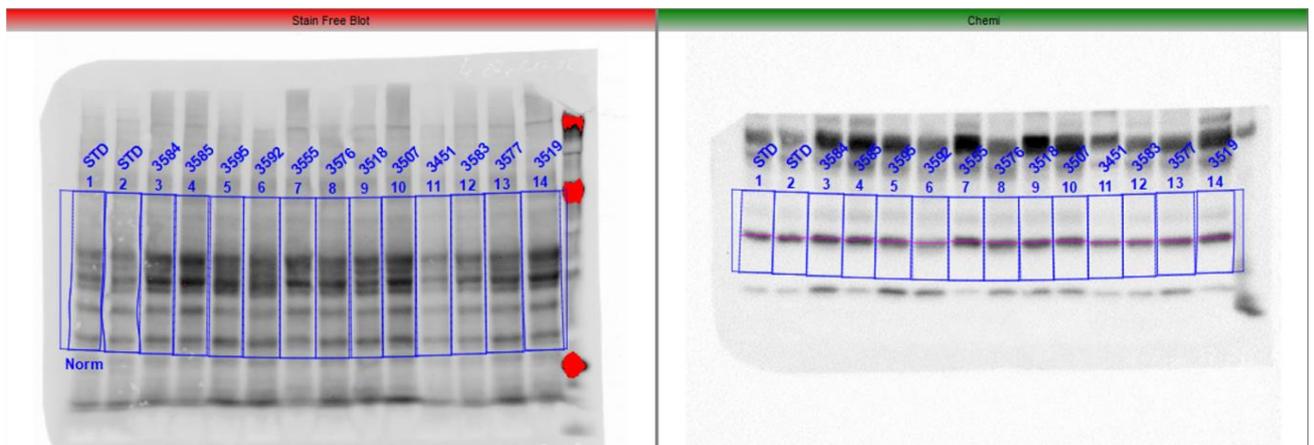
Zur Detektion der transferierten Proteinbanden wurden die Membranen über Nacht bei +4°C mit den primären anti-Rabbit-Antikörpern gegen Caspase 3, TNF $\alpha$ , mGluR5 und NR2B (1:1000-Verdünnung mit TBS/T, Tab. 1), die spezifisch an ihre Zielproteine binden, inkubiert.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
<b>Primäre Antikörper</b>		
Anti-Metabotropic Glutamate Receptor 5 Antibody ab53090 – polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen metabotropen Glutamatrezeptor 5	1:1000	Abcam (Cambridge, UK)
TNF $\alpha$ Antibody – polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen TNF $\alpha$	1:1000	ProSci (Poway, CA, USA)
NMDAR2B Rabbit Antibody #4207 – polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen NMDAR2B	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)
Caspase-3 Rabbit Antibody #9662– polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Caspase 3	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)
<b>Sekundärer Antikörper</b>		
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074 – sekundärer IgG-Antikörper aus der Ziege zur Detektion primärer Kaninchen-Antikörper, Konjugation mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) zur Detektion von Chemilumineszenz	1:10000	Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)

**Tabelle 1 Antikörper.** *Verwendete Antikörper zur Detektion der Zielproteine im Western Blot Verfahren.*

Es folgte das Waschen der Membranen mit TBS/T für dreimal 5 min, bevor diese bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem sekundären IgG-Antikörper (1:10000-Verdünnung mit TBS/T, Tab.1) zur Bindung an die primären Antikörper inkubiert wurden. Nach erneuten dreimaligem Waschen mit TBS/T für je 5 min wurden die spezifisch gebundenen Proteine mit dem Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) detektiert. Die Chemilumineszenz des mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase,

HRP) konjugierten IgG-Antikörpers wurde durch ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Reagenz verstärkt und mittels ChemiDoc XRS+ ermittelt (Abb. 7, B). Die quantitative Analyse der spezifischen Proteine erfolgte anhand von Fläche und Chemilumineszenz-Intensität (Grauwert) mit Image Lab™ (Bio-Rad) (Abb.7, A). Alle Proteinbanden wurden gegen die mitgelaufenen Standards normalisiert. Als Korrelat zur exprimierten Proteinmenge wurden die normalisierten Volumina durch ImageLab™ ausgegeben und in Excel dokumentiert.



**Abbildung 7 Auswertung in Image Lab und Prinzip der Antikörperbindung und Chemilumineszenz.** (A) Aktiviertes SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinbanden. In Image Lab werden die Banden manuell selektiert (links). Nach dem Blotting erfolgt eine Normalisierung aller Proteinmengen gegen die mitgelaufenen Standards (STD) und die Bestimmung der Intensitäten für die Proteinmarker, hier am Beispiel von TNF $\alpha$  (rechts). (B) Das an die Membran gebundene Protein wird von selektiven, primären anti-Rabbit-Antikörper gebunden. Es folgt die Inkubation mit einem sekundären IgG-Antikörper gegen den primären Antikörper. Durch HRP und ECL-verstärkte Chemilumineszenz kann das, durch die Antikörper gebundene, Protein detektiert und quantitativ gemessen werden.

### 3.8 Statistische Auswertung

Die normalisierten Volumina der Western Blots wurden bei fehlender Normalverteilung der Daten logarithmiert. Unterschiede in der Expression der Zielproteine TNF $\alpha$ , Caspase 3, mGluR5 und NR2B wurden mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Es wurden die einzelnen *Subformen* (A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42, 3NTyr10-A $\beta$ , pE3-42-A $\beta$ ) mit der PBS-Gruppe verglichen. Zusätzlich wurden die Faktoren *Narkose* (Isofluran vs. Sham-Prozedur) und der Interaktionsterm aus Narkose und A $\beta$  Subform (*Narkose\*Subform*) analysiert. Die Daten für Hippocampus und Sensorischen Cortex wurden getrennt analysiert. Das Signifikanzniveau wurde bei  $\alpha=0.05$  festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Statistics Version 24.0 (IBM).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Modifizierter Holeboard Test

Die kognitive Testung der Mäuse im mHBT zeigt für A $\beta$  Pyro eine verbesserte kognitive Gesamtleistung (reduzierte Time Trial,  $p=0.038$ ), die sich am ehesten durch eine Ent-hemmung der Versuchstiere erklären lässt. Isofluran führt bei der A $\beta$  Pyro-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe zu vermehrter Angst, es kommt zur Hemmung und Ab-nahme der kognitiven Leistung ( $p=0.007$ ). Für A $\beta$  1-42 zeigt sich im Gegensatz zu den anderen Subformen ein vermehrtes Angstverhalten, die Kognition bleibt unverändert. Für A $\beta$  1-40 und A $\beta$  Nitro können keine Effekte auf die kognitive Leistungsfähigkeit oder Verhalten gezeigt werden. Auch Isofluran zeigt sonst keine messbaren Effekte im mHBT.

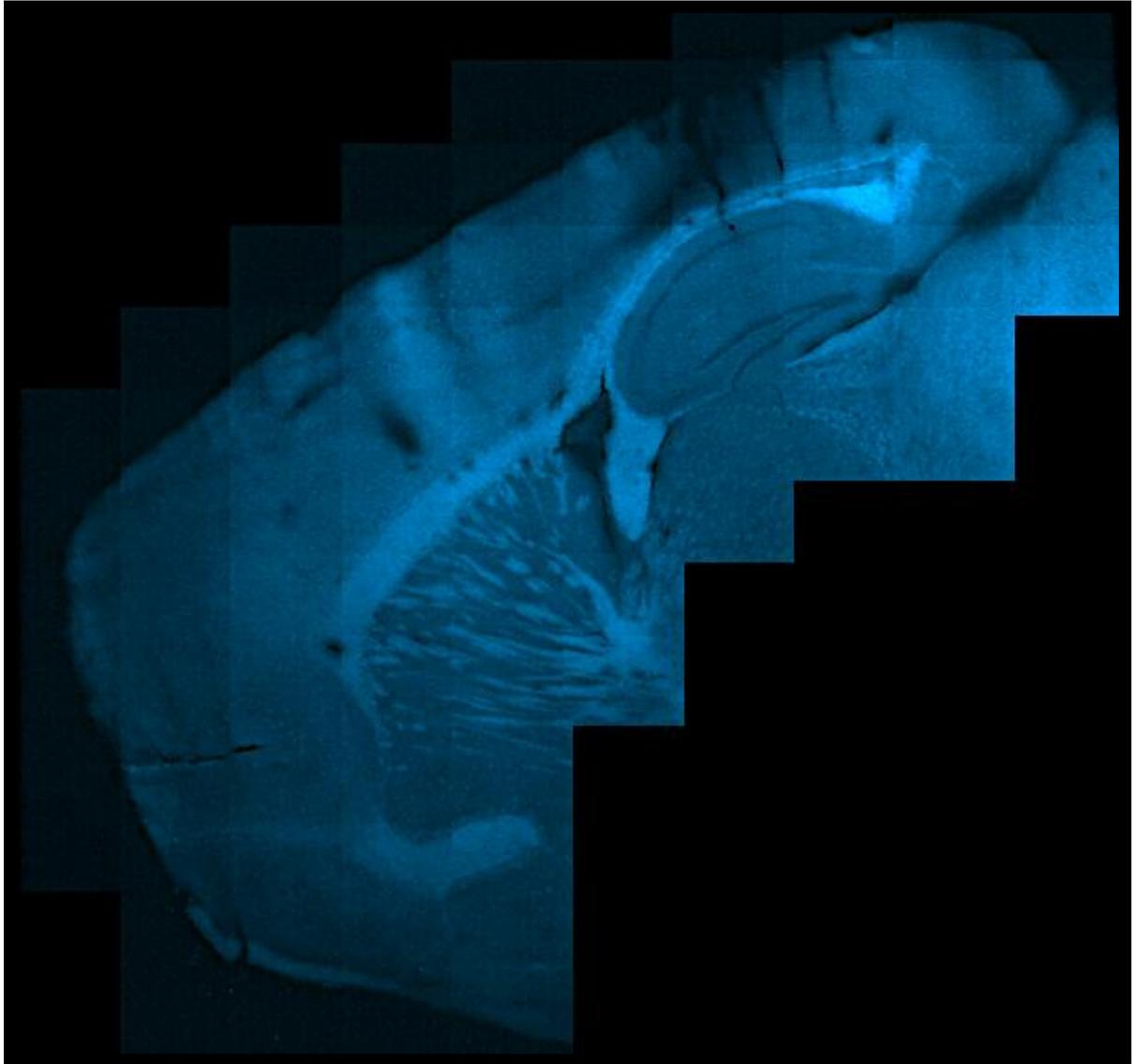
### 4.2 A $\beta$ -Plaque-Bildung

Es können in der Sham-Gruppe nach Injektion von PBS, A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42, A $\beta$  Nitro und A $\beta$  Pyro durch die spezifische Färbung mittels Methoxy-X04 keine  $\beta$  Amyloid-Strukturen angefärbt und mikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 8). Gleiches gilt für die Isoflurangruppe (Tab. 2). Eine Akquise der Bilder mithilfe des ApoTome und eine damit verbundene Auswertung und statistische Analyse war somit nicht möglich.

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von A $\beta$  Plaques (negativ = [-]; positiv = [+])

		Subform				
		A $\beta$ 1-40	A $\beta$ 1-42	A $\beta$ Nitro	A $\beta$ Pyro	PBS
Narkose	Sham	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]
	Isofluran	[-]	[-]	[-]	[-]	[-]

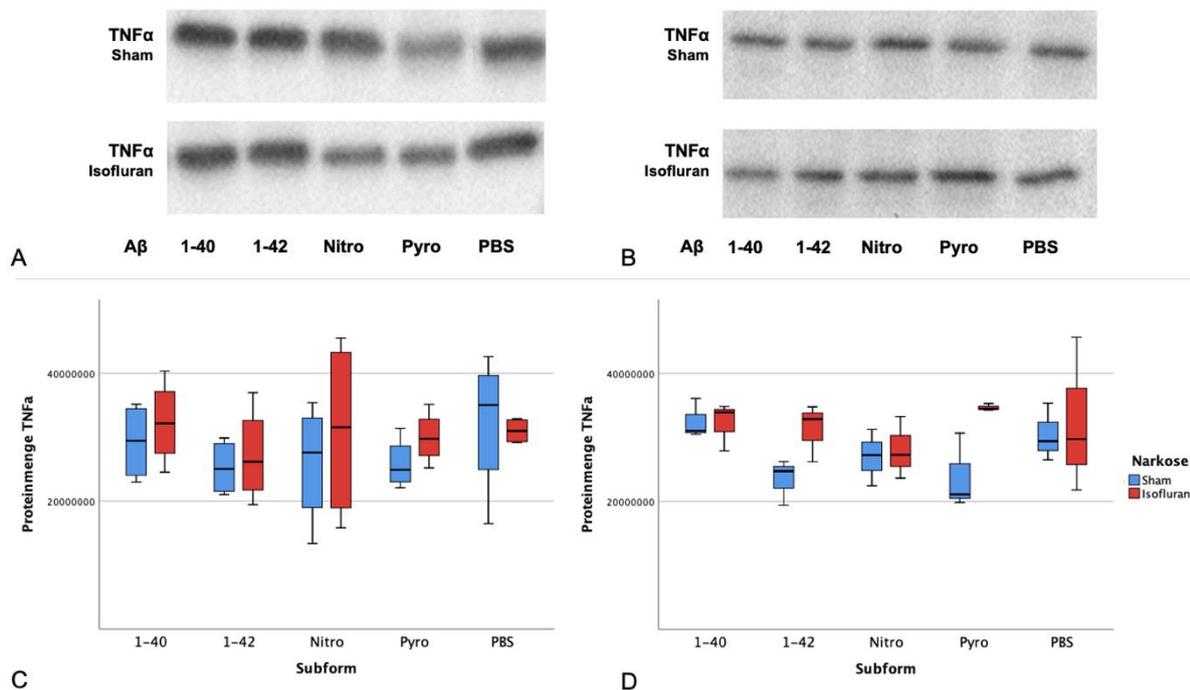
**Tabelle 2 Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse zur Untersuchung auf A $\beta$  Plaques.** Über alle A $\beta$  Subformen und PBS hinweg, sowohl für die Versuchstiere in der Sham- als auch für die Isoflurangruppe, zeigen sich nach Methoxy-X04 Färbung keine amyloidogenen Proteinstrukturen.



**Abbildung 8** *Repräsentativer sagittaler Hirnschnitt nach Methoxy-X04-Färbung und Imaging mittels ApoTome-Fluoreszenzmikroskopie. Beispielhafter fluoreszenz-gefärbter sagittaler Hirnschnitt nach Injektion von A $\beta$  1-42 ohne Nachweis angefärbter, fluoreszierender Strukturen.*

## 4.3 Western Blot Analyse

### 4.3.1 Expression von proinflammatorischen TNF $\alpha$ in Abhängigkeit von Subform und Narkose



**Abbildung 9 Expression von TNF $\alpha$  in der Western Blot Analyse hippocampaler (HC) und kortikaler (SC) Gewebeproben.** (A) Repräsentativer Western Blot für TNF $\alpha$  im HC. TNF $\alpha$  Banden für das Sham-Prozedere (oben) sowie für die Isofluran Narkose (unten) ohne signifikante Expressionsunterschieden für verschiedene Amyloid  $\beta$  Subformen und PBS. (B) Repräsentativer Western Blot für TNF $\alpha$  im SC. Unterscheidung in Sham- (oben) und Isofluran-Narkose (unten). (C) Boxplots für die ICV-Subgruppen im Hippocampus. Proteinmenge von TNF $\alpha$  im Western Blot für A $\beta$  1-40, 1-42, Nitro, Pyro sowie für PBS in Abhängigkeit der Narkosegruppe (Sham vs. Isofluran). (D) Boxplots für die ICV-Subgruppen im Sensorischen Kortex. Proteinmenge für TNF $\alpha$  im Western Blot in Abhängigkeit des durchgeführten Narkoseprozedere. Wie im HC zeigen sich keine Unterschiede für die Proteinmenge.

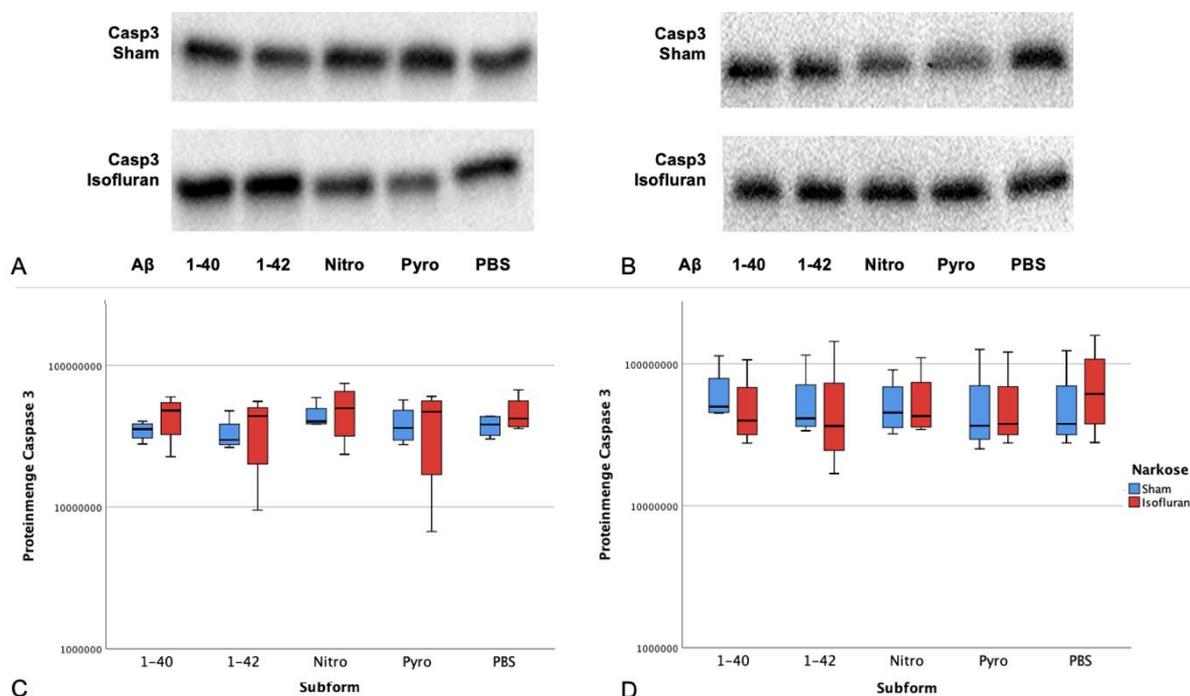
Die hippocampale TNF $\alpha$  Expression zeigt in der Sham-Gruppe für alle Amyloid  $\beta$  Subformen keinen Unterschied zu PBS (Abb. 9). In der Gruppe der Versuchstiere mit Isofluran Narkose zeigen sich ebenfalls keine Veränderungen der TNF $\alpha$  Expression für die verschiedenen A $\beta$  Subformen.

Auch die kortikale Expression von TNF $\alpha$  ist durch Injektion von A $\beta$  1-40, A $\beta$  1-42, A $\beta$  Nitro und A $\beta$  Pyro im Vergleich zu PBS unverändert geblieben (Abb. 9). Die Narkose mit Isofluran zeigt keinen Effekt auf die Proteinexpression von TNF $\alpha$  ( $p > 0.05$ ).

Statistisch konnten somit keine signifikanten Effekte für die verschiedenen Subformen in HC und SC ( $p > 0.05$ ) festgestellt werden. Gleiches gilt für die Faktoren *Narkose* und die Interaktion zwischen *Narkose* und den einzelnen Subformen, *Narkose\*Subform* ( $p > 0.05$ ).

#### 4.3.2 Expression von pro-apoptotischer Caspase 3 in Abhängigkeit von Subform und Narkose

Hippocampal zeigen sich in der Sham-Gruppe vergleichbare Expressionslevel für Caspase 3 für alle A $\beta$  Subformen und PBS. Isofluran zeigt keinen Effekt auf die exprimierte Proteinmenge im Hippocampus ( $p > 0.05$ ). Auch kortikal zeigt sich ein ähnliches Expressionsniveau, wobei auch in diesem Hirnareal Isofluran zu keinen signifikanten Expressionsänderungen führt ( $p > 0.05$ ) (Abb.10). Ein signifikanter Effekt auf die Expression von Caspase 3 durch die *Narkose* kann für keine Subgruppe gezeigt werden, weder im HC noch im SC. Gleiches gilt für die Faktoren *Subform* sowie die wechselseitige Beziehung zwischen beiden Faktoren *Narkose\*Subform* ( $p > 0.05$ ).



**Abbildung 10 Expression von Caspase 3 in der Western Blot Analyse hippocampaler (HC) und kortikaler (SC) Gewebeproben.** (A) Repräsentativer Western Blot für Caspase 3 im HC. Caspase 3 Banden für das Sham-Prozedere (oben) sowie für die Isofluran Narkose (unten) ohne Intensitätsunterschiede für unterschiedliche Amyloid  $\beta$  Subformen und PBS. (B) Repräsentativer Western Blot für Caspase 3 im SC. Unterscheidung in Sham- (oben) und Isofluran-Narkose (unten). (C) Boxplots für die ICV-Subgruppen im Hippocampus. Proteinmenge für Caspase 3 für A $\beta$  1-40, 1-42, Nitro, Pyro und PBS in Abhängigkeit der Narkosegruppe (Sham vs. Isofluran). (D) Boxplots für die ICV-Subgruppen im sensorischen Kortex. Wie im HC zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Caspase 3 Expression.

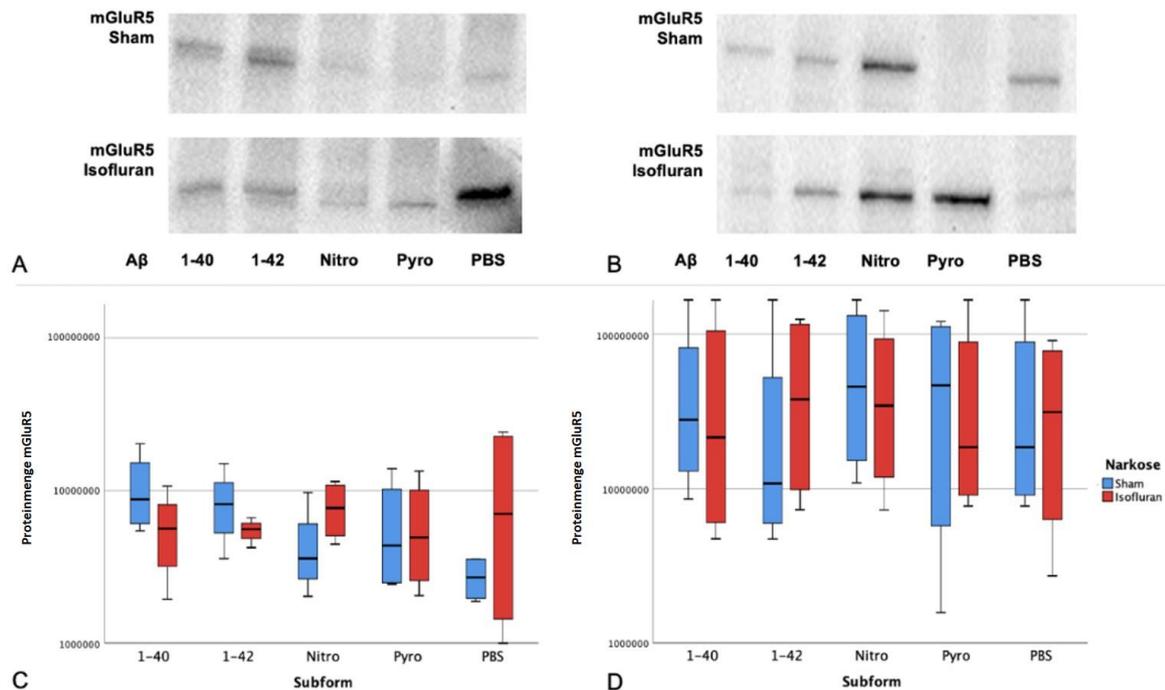
#### 4.3.3 Expression von mGluR5 in Abhängigkeit von Subform und Narkose

Für mGluR5 lassen sich hippocampal vergleichbare Proteinlevel für die A $\beta$  Subgruppen und PBS darstellen. In der Isofluran-Gruppe kommt es zu keinen signifikanten Veränderungen der Expression ( $p > 0.05$ ) (Abb. 11).

Die basale Expression im SC ist vergleichbar mit der im HC. Wie im Hippocampus

zeigt sich auch kortikal kein Effekt durch eine Isoflurannarkose ( $p>0.05$ ) auf die mGluR5-Expression innerhalb der verschiedenen A $\beta$  Subform- und PBS-Gruppen (Abb. 11).

Für mGluR5 zeigen weder der Faktor *Subform* ( $p>0.05$ ), noch der Faktor *Narkose* ( $p>0.05$ ) signifikante Effekte auf die Proteinexpression in HC und SC. Auch eine Interaktion *Narkose\*Subform* weist keinen statistisch signifikanten Effekt auf ( $p>0.05$ ).



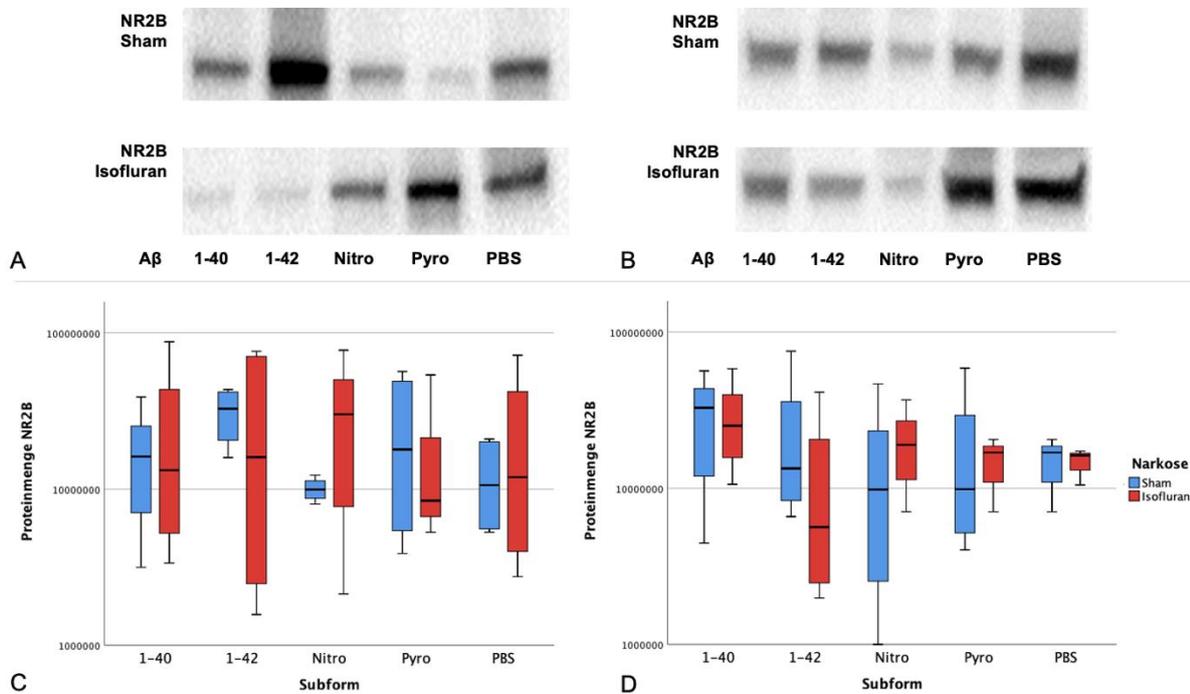
**Abbildung 11 Expression von mGluR5 in der Western Blot Analyse hippocampaler (HC) und kortikaler (SC) Gewebeproben.** (A) Repräsentativer Western Blot für mGluR5 im HC. mGluR5 Banden für das Sham-Prozedere (oben) sowie für die Isoflurannarkose (unten) mit nicht signifikanten Intensitätsunterschieden für A $\beta$  Subformen und PBS. (B) Repräsentativer Western Blot für mGluR5 im SC. Unterscheidung in Sham- (oben) und Isoflurannarkose (unten). Wie im HC zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Proteinexpression. (C) Boxplots für die ICV-Subgruppen im Hippocampus. Proteinmengen für mGluR5 der Western Blot Bande in Abhängigkeit von applizierten A $\beta$  Subformen und PBS und Narkose. (D) Boxplots für die ICV-Subgruppen im Sensorischen Kortex. Proteinexpression für mGluR5 im SC für verschiedene Subformen und Narkose.

#### 4.3.4 Expression von NR2B in Abhängigkeit von Subform und Narkose

Die Expression von NR2B kann sowohl im Hippocampus als auch in kortikalen Proben nachgewiesen werden (Abb. 12). Alle ICV-applizierten Substanzen zeigen in der Sham-Gruppe eine ähnliche Banden-Intensität.

Ähnliches gilt für den SC. Die Subgruppen zeigen ein ähnliches Expressionslevel von NR2B für die Shamgruppe. Auch mit Isoflurannarkose bleiben Veränderungen in der Expression von NR2B in HC und SC aus ( $p>0.05$ ).

Bei ähnlichen Expressionsniveaus von NR2B in HC und SC lassen sich für die A $\beta$  Subformen keine statistisch signifikanten Effekte nachweisen ( $p > 0.05$ ). Gleiches gilt für den Faktor *Narkose* ( $p > 0.05$ ) bzw. die Interaktion zwischen beiden genannten Faktoren *Narkose*\**Subform* ( $p > 0.05$ ) in beiden Hirnarealen.



**Abbildung 12 Expression von NR2B in der Western Blot Analyse hippocampaler (HC) und kortikaler (SC) Gewebeproben.** (A) Repräsentativer Western Blot für NR2B im HC. NR2B Banden für das Sham-Prozedere (oben) sowie für die Isofluran Narkose (unten) für die unterschiedlichen Amyloid  $\beta$  Subformen und PBS. (B) Repräsentativer Western Blot für NR2B im SC. Unterscheidung in Sham- (oben) und Isofluran-Narkose (unten). (C) Boxplots für die ICV-Subgruppen im Hippocampus. Exprimierte Proteinmenge von NR2B für A $\beta$  1-40, 1-42, Nitro, Pyro sowie für PBS in Abhängigkeit der Narkosegruppe ohne signifikante Unterschiede. (D) Boxplots für die ICV-Subgruppen im Sensorischen Kortex. Auch hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Narkosegruppen und Subformen.

## 5 Diskussion

Die neurokognitive Testung im mHBT zeigt für A $\beta$  Pyro eine signifikant verbesserte kognitive Gesamtleistung. Isofluran hebt diesen Effekt auf und reduziert die kognitive Leistung der Tiere auf Normalmaß. Die A $\beta$  1-42 - Gruppe zeigt ein vermehrtes Angstverhalten bei unveränderter Kognition. Für die anderen Subformen und Isofluran lassen sich ansonsten keine Effekte im mHBT nachweisen.

In der histochemischen Analyse der murinen Hirne finden sich keine zerebralen, amyloidogenen Ablagerungen höher geordneter A $\beta$  Spezies nach ICV-Injektion verschiedener A $\beta$  Subformen. Molekularbiologisch können außerdem keine signifikanten Veränderungen bezüglich Inflammation, Apoptose und Expression glutamaterger Rezeptoren durch die Applikation von A $\beta$  und Narkose mit Isofluran gezeigt werden.

Auf molekularbiologischer Ebene lassen sich in dieser Arbeit keine pathophysiologischen Prozesse, die für die Frühphase einer Alzheimer Krankheit beschrieben werden, nachweisen.

### 5.1 Plaquebildung nach ICV-Injektion von Amyloid $\beta$ und Exposition gegenüber Isofluran

Die Methoxy-X04-Färbung dient der spezifischen Detektion von  $\beta$ -Faltblattstrukturen des A $\beta$  Proteins. Es handelt sich um eine etablierte Methode zur Färbung von Plaquestrukturen (McCarter et al., 2013). In den untersuchten Hirnschnitten der C57Bl6N-Mäuse können nach Methoxy-X04-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie keine A $\beta$  Faltblattstrukturen oder Plaques im Maushirn nachgewiesen werden.

Gupta et al. hingegen weisen mittels Kongo Rot Färbung am 25. Tag nach ICV-Injektion von insgesamt 10 $\mu$ l A $\beta$  1-42 (1 $\mu$ g/1 $\mu$ l) hippocampale Plaques im Rattenmodell nach (Gupta, Sil, Ghosh, Ghosh, & Ghosh, 2018). In besagter Arbeit werden jedoch für 7 Tage inkubiertes und fibrillär, aggregiertes A $\beta$  injiziert. Auch Cioanca et al. können in einem ICV-Rattenmodell A $\beta$  Plaques im Hippocampus der Tiere dokumentieren (Tag 21 nach Injektion von 400pmol A $\beta$  1-42, 4 $\mu$ l) (Cioanca, Hritcu, Mihasan, & Hancianu, 2013).

In dieser Arbeit erfolgt die Dekapitation bereits an Tag 13 nach Injektion, dies ist bei einmaliger Gabe von A $\beta$  trotz möglichem pro-aggregatorischen Effekten von Isofluran (Eckenhoff et al., 2004) möglicherweise ein zu kurzer Zeitraum für die Aggregation von oligomeren Formen hin zu höhergeordneten A $\beta$  Spezies.

Der fehlende Nachweis von fibrillären  $\beta$ -Faltblattstrukturen spricht dafür, dass es durch das ICV-injizierte, lösliche A $\beta$  zu keiner weiteren Oligomerisation und Aggregation zu höher geordneten Spezies des A $\beta$  Proteins gekommen ist. Die ausbleibende Konsolidierung und Aggregation zu Plaques spiegelt eine Frühphase der AD wider und bestätigt die ICV-Methode indirekt als akutes AD-Mausmodell, in dem nur lösliche A $\beta$ O auf neuronale Zellen wirken und die Aggregation zu höhergeordneten A $\beta$  Spezies und eine Plauebildung noch nicht einsetzt.

Zwischen Injektion der verschiedenen A $\beta$  Subformen und Konservierung der Mäusehirne liegen in dem angewandten Versuchsaufbau 13 Tage. Diese kurze Zeit zwischen Applikation und Hirnpräparation reicht vermutlich nicht aus, dass es zur nachweisbaren Aggregation von Oligomeren und zur Ausbildung von Plaques kommt. In transgenen Mausmodellen mit APP-Überexpression (z.B. Tg2576) setzt die Aggregation zu unlöslichen A $\beta$  Formen ab einem Alter von ca. 6-7 Monaten ein, sodass zwischen 6-10 Monaten das Verhältnis von unlöslichen zu löslichen A $\beta$  ansteigt und einzelne „cored“ Plaques auftreten. Im Alter von rund 12 Monaten können zahlreiche diffuse Plaques nachgewiesen werden (Kawarabayashi et al., 2001). Das Wachstum der Plaques verläuft dabei sigmoidal, bis eine Plateauphase ohne weitere Größenzunahme erreicht wird (Burgold, Filser, Dorostkar, Schmidt, & Herms, 2014). Aufgrund der Annahme, dass von den verschiedenen A $\beta$  Spezies v.a. lösliche A $\beta$ O neurotoxische Wirkungen entfalten, gelten Plaques als Reservoir, die im Austausch mit extrazellulären, löslichen A $\beta$  Formen stehen und als Zeichen einer fortgeschrittenen AD zu werten sind (Haass & Selkoe, 2007).

Trotz fehlendem Nachweis von A $\beta$  Strukturen durch die Methoxy-X04 Färbung im Hirnparenchym ist von einer generellen zerebralen Verteilung auszugehen. Kasza et al. können in einem Rattenmodell zeigen, dass die ICV-Applikation von oligomeren A $\beta$  1-42 unter Umgehung der Bluthirnschranke möglich ist (Kasza et al., 2017). Es kann gezeigt werden, dass intracerebroventrikulär injiziertes, Aminomethylcoumarinacetat-(AMCA)-konjugiertes A $\beta$  1-42 hierbei entweder das Ependym penetriert oder über das Glymphatische System aufgenommen wird und sich in allen Hirnarealen verteilt (Kasza et al., 2017).

Die ICV-Injektion von A $\beta$  stellt eine etablierte Methode zur Simulation eines akuten AD-Modells dar. Neben dieser zeitlichen Komponente und einer panzerebralen Verteilung löslicher A $\beta$ O (Kasza et al., 2017), zeichnet sich das ICV-Model gegenüber transgenen Modellen auch dadurch aus, dass der Effekt definierter A $\beta$  Subformen und

Spezies (A $\beta$ O, Protofibrillen, Fibrillen) in der AD bestimmt werden kann (Cho et al., 2014; Kasza et al., 2017). Zudem können Effekte von A $\beta$  Subformen untersucht werden, die in transgenen Modellen unterrepräsentiert sind (Gunn et al., 2010).

A $\beta$  Oligomerisation und Plaqueaggregation gehen mit einer Anlaufphase („lag phase“) einher, in der sich ein Kern („seed“) bildet. Durch Aufnahme weiterer Oligomere kommt es zum Wachstum und zur Aggregation zu Protofibrillen und Fibrillen, die Plaques ausbilden (Finder & Glockshuber, 2007). Zur Ausbildung eines „seed“ muss dabei eine kritische minimale Konzentration überschritten werden, die dabei für A $\beta$  1-42 aufgrund der höheren Aggregationstendenz fünffach niedriger ist als für A $\beta$  1-40 (Finder & Glockshuber, 2007). Das Plaquewachstum erfolgt dann sigmoidal (Burgold et al., 2014). Zudem sind A $\beta$  Produktion und, im Falle dieser Arbeit, die externe Bereitstellung, wachstumslimitierend („rate limiting“). Außerdem kommt es zur Dissoziation von Oligomeren aus dem Plaque und durch umgebende aktivierte Mikroglia zur Abräumung und zu negativen Wachstumsraten (Burgold et al., 2014). Somit führt eine „Single-shot“-ICV-Injektion von oligomeren A $\beta$  Subformen wahrscheinlich aufgrund erhaltener Immunantwort und Kompensationsfähigkeiten zur Beseitigung der Neurotoxine. Die Aggregation und daher auch ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von A $\beta$  bleiben bei fehlender Zufuhr von Oligomeren aus.

Der fehlende fluoreszenzmikroskopische Nachweis von  $\beta$ -Faltblattstrukturen und Plaques bestätigt zwar das ICV-Modell als Akutmodell, allerdings konnte auch das Vorhandensein oligomerer Formen von A $\beta$  nicht nachgewiesen werden. Prinzipiell ist somit eine ausbleibende Verteilung der ICV-injizierten oligomeren Formen im Maushirn möglich, wobei, wie oben bereits beschrieben, die parenchymale Verteilung gezeigt werden konnte (Kasza et al., 2017).

In zukünftigen Studien wäre es daher sinnvoll, den immunologischen und somit direkten Nachweis von A $\beta$  Oligomeren anzustreben und somit mögliche Effekte im ICV-Modell A $\beta$  Oligomeren zuordnen zu können. Sinnvoll wäre zudem der Proteinnachweis von A $\beta$  im zeitlichen Verlauf. Dies würde ermöglichen, Effekte in kognitiv-behavioristischen als auch molekularbiologischen Untersuchungen bestimmten A $\beta$  Konzentrationen zuzuordnen.

## 5.2 Neuroinflammation und TNF $\alpha$ . Einfluss von A $\beta$ und Isofluran auf die inflammatorische Kaskade

Neuroinflammation, als chronische Inflamationsreaktion des ZNS, spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der AD (Morales, Guzmán-Martínez et al. 2014, Walters, Phillips et al. 2016). Quellen zerebraler pro- oder antiinflammatorische Zytokine sind gliale Zellen des ZNS: Astrozyten und Mikroglia. Beide Zelltypen besitzen neben spezifischen Aufgaben im ZNS (Astroglia: u.a. metabolische Funktionen, Teil der „triparten Synapse“; Mikroglia: Phagozytose, Antigenpräsentation) eine Schutzfunktion als Teil des angeborenen Immunsystems (Heneka et al., 2015). Dieses erhält physiologisch eine Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen sowie neurotoxischen und -protektiven Faktoren.

Es kann in vitro gezeigt werden, dass Mikroglia an der Abräumung von A $\beta$  beteiligt ist (Heneka et al., 2015; Tang, Eckenhoff, & Eckenhoff, 2011) und die Homöostase aufrecht erhält. In der AD werden die glialen Zellen durch A $\beta$  via damage-associated molecular patterns (DAMPs) aktiviert (Walters, Phillips, Zheng, Biju, & Kuruvilla, 2016). Es kommt zur Sekretion proinflammatorischer, potentiell zytotoxischer Zytokine, u.a. von TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6 (Morales, Guzmán-Martínez, Cerda-Troncoso, Farías, & Maccioni, 2014; Walters et al., 2016; Zhang & Jiang, 2015). Die akute Immunantwort dient in erster Linie der Produktion proteolytischer Enzyme zur A $\beta$ -Degradation und Wiederherstellung der Homöostase (McGeer & McGeer, 2001; Morales et al., 2014; Zhang & Jiang, 2015). Durch verlängerte Exposition gegenüber den pathogenen Strukturen und Priming (Heneka et al., 2015; Walters et al., 2016) kommt es im Sinne eines „circulus vitiosus“ zur Überaktivierung der Mikroglia und einer stetigen Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine sowie weiterer zytotoxischer Faktoren (Superoxid Radikale, NO, ROS), die zur neuronalen Dysfunktion, Degeneration und Apoptose von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen führen (Morales et al., 2014). Resultat der synaptischen Dysfunktion und des neuronalen Untergangs sind Störungen kognitiver Leistungen und weitere Symptome der AD (Morales et al., 2014; Walters et al., 2016). Als eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine spielt TNF $\alpha$ , das im ZNS durch Mikroglia, Astrozyten und Neurone gebildet werden kann, eine essentielle Rolle (Chang, Yee, & Sumbria, 2017). Über TNFR1 induziert TNF $\alpha$  Zytotoxizität und Apoptose (Chang et al., 2017). Zudem kann es zu TNF $\alpha$ -vermittelten Störungen der A $\beta$ -Degradation, Abräumung und der Synapsenfunktion sowie zu kognitiven Störungen kommen (Chang et al., 2017).

Die Western Blot Untersuchungen zeigen keine signifikante Erhöhung oder Reduktion von TNF $\alpha$  durch verschiedene Subformen des A $\beta$  Proteins oder eine Narkose mit Isofluran. In dieser Arbeit ist es somit weder möglich A $\beta$  als neuroinflammatorischen Trigger auszumachen, noch kann für Isofluran ein neuroprotektives oder -toxisches Potential in Bezug auf neuroinflammatorische Prozesse gezeigt werden. A $\beta$  wird in anderen Arbeiten jedoch als Trigger einer neuroinflammatorischen Antwort identifiziert. So können in transgenen AD-Tiermodellen (TgAPPsw und PS1/APPsw), mit Überexpression von APP und vermehrter A $\beta$  Produktion, erhöhte proinflammatorische Zytokinkonzentrationen nachgewiesen werden (Heneka et al., 2015; Patel et al., 2005). Hierbei korrelieren die Zytokinlevel mit denen der A $\beta$  Peptide und steigen signifikant durch A $\beta$  an, dies gilt für A $\beta$  1-40 und A $\beta$  1-42 (Patel et al., 2005).

Neben transgenen Tiermodellen können Gupta et al. in einem ICV-AD-Modell mit Ratten zeigen, dass es durch intracerebroventrikuläre Injektion von A $\beta$  1-42 neben einer Störung des Gedächtnisses, auch zu einem Anstieg von TNF $\alpha$  sowie anderer proinflammatorischer und zytotoxischer Faktoren, wie ROS, Nitrit und IL-1 $\beta$ , kommt (Gupta et al., 2018). Am ehesten entspricht dies einer frühen neuroinflammatorischen Reaktion des Immunsystems auf A $\beta$ . Ähnliche Ergebnisse können auch in anderen Arbeiten für A $\beta$  1-42 gezeigt werden. Sachdeva et al. induzieren mit einer ICV-Injektion von A $\beta$  1-42 einen signifikanten Anstieg proinflammatorischer Zytokine (u.a. TNF $\alpha$ ) sowie von pro-apoptotischer Caspase 3. Dies ist als Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade durch A $\beta$  zu werten, die in Folge auch zu kognitiven Defiziten, in räumlichem Lernen und Gedächtnis, beiträgt. Durch Lycopene, einem potenten Antioxidans und anti-inflammatorischen Carotenoid, kommt es zur Verbesserung der kognitiven Parameter (Sachdeva & Chopra, 2015). Dies impliziert, dass neuroinflammatorische Prozesse durch A $\beta$  ausgelöst werden können, dies zur Entwicklung und Progression einer AD beiträgt und eine antiinflammatorische Therapie diesen Prozessen entgegenwirken kann.

Auch Chen et al. sowie Singh & Kumar können mittels intrahippocampal injiziertem A $\beta$  1-42 eine TNF $\alpha$  Expressionssteigerung und somit eine inflammatorische Antwort auf A $\beta$  zeigen (Chen, Ke, Lu, Qiu, & Peng, 2015; Singh & Kumar, 2016). Auch für die ICV-Applikation von A $\beta$  1-40 ins murine Ventrikelsystem zeigt sich ein schneller Anstieg von TNF $\alpha$ -mRNA innerhalb weniger Stunden, der sich nach 7 Tagen post-injectionem, sowohl im Hippocampus als auch im präfrontalem Kortex, normalisiert (Medeiros et al., 2007).

Diesen Untersuchungen, die ein inflammatorisches Potential für A $\beta$  zeigen, stehen Ergebnisse ohne Veränderung des TNF $\alpha$  Level gegenüber (Schmid et al., 2017). Hierbei erfolgt die Bestimmung zerebraler TNF $\alpha$  Expression allerdings erst 10, 12 bzw. 16 Tage nach Injektion. Eine mögliche Immunantwort kann also bereits abgeklungen sein. Für posttranslational modifizierte A $\beta$  Peptide, A $\beta$  Nitro und A $\beta$  Pyro, gibt es keine Untersuchungen zum inflammatorischen Potential.

Inhalationsanästhetika haben sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte. Diese sind stoffspezifisch, konzentrations- und zeitabhängig (Xie & Xu, 2013). Insgesamt spielen Anästhetika aber nur eine geringe Rolle im Prozess der Neuroinflammation (Tang et al., 2011).

Volatile Anästhetika (Isofluran, Sevofluran) besitzen keinen, oder nur einen geringen, Effekt auf die Zytokinproduktion in murinen Zellkulturen nicht-stimulierter, ruhender Mikroglia. In den Zelllysaten, der mit Isofluran (1.2% und 2.4%) begasteten Zellen, zeigt sich eine geringe, aber signifikante TNF $\alpha$  Reduktion (Ye, Lian, Eckenhoff, Eckenhoff, & Pan, 2013). Eine teilweise Reduktion von inflammatorischen Zytokinen, u.a. von TNF $\alpha$ , kann im Zellversuch (Mikroglia von C8-B4 Mäuse) gezeigt werden. Isofluran reduziert hier die mikrogliale Antwort, sowie die Freisetzung von NO und Glutamat, nach inflammatorischem Reiz mit LPS/IFN $\gamma$  (Xu, Kim, & Zuo, 2008). Zudem reduziert Isofluran auch die iNOS Expression (Kim, Li, & Zuo, 2009). Eine Aktivierung mikroglialer Zellen und folglich die Freisetzung von proinflammatorischen Signalen und Zytokinen kann durch Isofluran inhibiert werden. Diese Daten legen einen antiinflammatorischen Effekt von Isofluran nahe.

Gegensätzliche Daten liefern Wu et al.: sie zeigen in vitro und in vivo, dass es durch Isofluran zu einer gesteigerten mRNA- und Proteinexpression der Zytokine TNF $\alpha$ , IL 6 und IL-1 $\beta$  im murinen Hirngewebe kommt (Wu et al., 2012). Auch aktivierte, TNF $\alpha$ -positive Zellen können im Gewebe durch immunhistochemische Methoden nachgewiesen werden. Zudem zeigt die Arbeit von Wu et al., dass sich die TNF $\alpha$  Erhöhung ausgeprägter in transgenen AD Tieren präsentiert. Wildtyp-Mäuse zeigen eine geringere Expressionssteigerung durch Isofluran. Isofluran wirkt als proinflammatorischer Trigger und führt besonders bei bereits mit A $\beta$  belasteten Geweben aufgrund einer erhöhten Suszeptibilität zu einer gesteigerten proinflammatorischen Antwort. Auch die Untersuchung von Yang, Liang et al. zeigt für Ratten, die für 4h eine Narkose mit 1,3 Vol.% Isofluran erhalten, eine kognitive Störung im Morris Water Maze Test und eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, u.a. von TNF $\alpha$ . Diese Effekte

können durch intraperitoneale Gabe eines TNF $\alpha$  Rezeptorantagonist (R-7050) abgemildert werden (Yang et al., 2016). Perucho et al. zeigen eine Erhöhung des Verhältnisses von pro- zu anti-apoptischen Bax/Bcl-2 im Hippocampus, eine Aktivierung von Mikroglia und apoptotischen (TUNEL +) Zellen für transgene APPSwe Mäuse. Für Wildtyp Mäuse lassen sich durch Isofluran keine signifikanten Veränderungen nachweisen (Perucho et al., 2010).

Die mikrogliale Aktivierung führt generell zur Induktion von iNOS und zur NO-Synthese. Dies wiederum kann zur gesteigerten Produktion von Interleukinen, Interferon und TNF $\alpha$  führen. TNF $\alpha$  initiiert die apoptotische Kaskade mit Aktivierung von Caspasen (Blum & Zuo, 2013).

A $\beta$  kann in unterschiedlichen Mausmodellen als inflammatorischer Stimulus gezeigt werden, der diese kaskadenartige Aktivierung proinflammatorischer und -apoptotischer Prozesse initiiert. Für Isofluran existieren unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des inflammatorischen Potentials. Insgesamt begünstigt ein proinflammatorisches Milieu durch direkte, negative Effekte der Zytokine und durch die Induktion und Aktivierung apoptotischer Vorgänge die Progredienz der AD.

Inflammatorische Zytokine, wie TNF $\alpha$ , sind vermutlich in der Lage funktionale Störungen hervorzurufen, bevor es zu strukturellen Veränderungen kommt (Heneka et al., 2015). Löst A $\beta$  eine Produktion und Freisetzung von TNF $\alpha$  aus, kann diese proinflammatorische Reaktion über NF $\kappa$ B zur Aufrechterhaltung der TNF $\alpha$ -Sekretion sowie anderer proinflammatorischer Zytokine, Chemokine etc. und damit zu Inflammation führen (Rubio-Perez & Morillas-Ruiz, 2012; Sedger & McDermott, 2014). Eine chronische Aktivierung führt schließlich über die Induktion einer inflammatorischen Kaskade, u.a. über Caspase 8 (ProCaspase) bis hin zu den Effektorcaspasen (inkl. Caspase 3), zur Apoptoseeinleitung und zum Neuronenverlust (Sedger & McDermott, 2014).

In dieser Arbeit kann keine inflammatorische Antwort auf A $\beta$  Peptide gezeigt werden. Eine akute Reaktion des Immunsystem bleibt hierbei wahrscheinlich aufgrund einer nur einmaligen Injektion von, potentiell neurotoxischen, A $\beta$  bei erhaltenen Kompensationsmechanismen aus. Ebenso verhält es sich mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran, für das hier kein Effekt auf inflammatorische Prozesse gezeigt werden kann. Es scheint, dass der Faktor „Zeit“ eine entscheidende Rolle spielt. Sind Kompensationskapazitäten erhalten, so bleiben nachweisbare Expressionsveränderungen aus. A $\beta$  und Isofluran, insbesondere bei erhöhter Suszeptibilität, verlängerter Exposition sowie eingeschränkter Kompensationsmöglichkeiten, sind als neurotoxische und pro-

inflammatorische Trigger zu sehen, auch, wenn dies in dieser Arbeit aufgrund von „Single-shot“-Exposition und einmaliger Narkose sowie Untersuchungen 13 Tage nach Exposition, nicht gezeigt werden kann. Eine fehlende inflammatorische Antwort auf A $\beta$  und Isofluran kann zudem aufgrund des jungen Versuchstieralters ausgeblieben sein. In jungen, gesunden Mäusen sind Kompensationsfähigkeiten möglicherweise besser erhalten und Interaktionen zwischen A $\beta$  und zerebralen Strukturen geringer ausgeprägt.

Um mögliche proinflammatorische Effekte für die verschiedenen A $\beta$  Subformen zeigen und den Einfluss von Isofluran auf das inflammatorische System in der AD darstellen zu können, wäre eine, über den gesamten Testverlauf, kontinuierliche Bestimmung von TNF $\alpha$  sinnvoll. Expressionsveränderungen, die bei erhaltener Immunantwort nach Beendigung der kognitiven Testung nicht mehr nachweisbar sind, können somit detektiert werden. Zudem ist der Vergleich unterschiedlicher Altersgruppen bei identischem Versuchs- und Testaufbau von Interesse. So lässt sich eine gegebenenfalls erhöhte Suszeptibilität bei älteren Tieren nachweisen.

### 5.3 Apoptose nach Exposition gegenüber Amyloid $\beta$ und Isofluran

Zelluntergang und Neuronenverlust erfolgt in der AD nicht über den Weg der Nekrose, sondern über apoptotische Vorgänge (D'Amelio, Cavallucci, & Cecconi, 2010). Apoptose ist der programmierte Untergang einer Zelle. Dem Zelluntergang vorausgehend erfolgt die Aktivierung einer Caspasen-Kaskade. Caspasen sind Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen, die über einen intrinsischen (mitochondrial, BAX, Bcl-2, Cytochrom C -> Effektorcaspasen) oder extrinsischen (FAS-FASL-proapoptotische Bcl-2 Proteine) Aktivierungsweg die Apoptose einleiten und ausführen (Bredesen, 2009; D'Amelio et al., 2010). Ein Hauptvertreter dieser Enzymgruppe ist Caspase 3 – als Effektorprotease führt sie zur Spaltung spezifischer Substrate und zur Apoptose der Zelle (D'Amelio et al., 2010).

Ausgelöst wird die Apoptose in der AD durch inflammatorische Stimuli (Sachdeva & Chopra, 2015). Hierbei zählt A $\beta$  als Trigger, der eine inflammatorische Kaskade mit NF $\kappa$ B-Aktivierung, Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Sachdeva & Chopra, 2015) und Erhöhung der NO-Synthese initiiert und zu ROS Erhöhungen führt. Damit kommt es, neben Proteinmodifizierungen, zur DNA- und Mitochondrienschädigung sowie zur Aktivierung von Caspase 3 (Cetin, Yazihan, Dincer, & Akbulut, 2013).

Cetin et al. zeigen in ihrer ICV-Studie mit Ratten A $\beta$  1-42 als Trigger für eine Caspase 3-Aktivierung in Hippocampus und temporoparietalem Cortex (Cetin et al., 2013). Auch Schmid et al. können im ICV-Mausmodell einen signifikanten Anstieg von Caspase 3 nach der Applikation von A $\beta$  1-42 nachweisen (Schmid et al., 2017). Louneva et al. weisen bei menschlichen AD-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Anreicherung von Caspase 3 postsynaptisch nach (Louneva et al., 2008). Diese Daten können als Hinweis für eine lokale, synaptische Degeneration durch apoptotische Vorgänge gedeutet werden, die dem Synapsenverlust vorausgeht (Louneva et al., 2008). Der Verlust von Synapsen korreliert am besten mit den kognitiven Einbußen im Rahmen der AD (D'Amelio et al., 2010).

Es gibt somit Hinweise darauf, dass A $\beta$  über eine Induktion von Neuroinflammation und intraneuronaler Dyshomöostase zur Initiierung apoptotischer Vorgänge mit Erhöhung von Caspase 3 führt (Cetin et al., 2013; Sachdeva & Chopra, 2015). Eine Kombination von A $\beta$  mit volatilen Anästhetika wird in diesen Studien nicht untersucht. Für Isofluran werden duale Effekte in Bezug auf Inflammation und Apoptose beschrieben (Xu, Dong et al. 2011). Isofluran fördert die Oligomerisation von A $\beta$  Proteinen und erhöht deren Zytotoxizität (Eckenhoff et al., 2004). In vitro kann für humane H4 Neuroglioma Zellen, die menschliches APP exprimieren, nach 6 stündiger 2 Vol.% Isofluran Narkose eine Caspase 3 Aktivierung gezeigt sowie Zelltod detektiert werden (Xie et al., 2006). Im Zellmodell führt eine Isofluran Exposition zu einer gesteigerten A $\beta$  Sekretion und Aggregation. A $\beta$  wiederum fördert die Isofluran-abhängige Caspaseaktivierung. Somit kommt es im Sinne eines Teufelskreislaufs zur Generierung und Aggregation von A $\beta$ , welches die Isofluran-induzierte Apoptose verstärkt und aufrechterhält (Xie et al., 2007).

Im in vivo Modell mit fünf Monate alten, naiven WT Mäusen können Xie et al. eine Isofluran-induzierte Caspase 3-Aktivierung (2-stündige Narkose mit 1,4 Vol.% Isofluran) und einen „zeitabhängigen“ Anstieg von BACE und A $\beta$  nach Beendigung der Narkose zeigen. Die Aktivierung von Caspase 3 nimmt im Verlauf nach der Narkose ab und ist 24 Stunden post-Narkose nicht mehr nachweisbar (Xie et al., 2008).

Dies spricht für eine transiente Aktivierung apoptotischer Prozesse, die nach Kompensation toxischer Stimuli, eingestellt wird. Perucho et al. untersuchen in einem anderen in vivo Modell sieben Monate alte WT und Tg APP/Swe Mäuse, die für 3 Monate zweimal wöchentlich eine 2 Vol.% Isofluran Narkose für 20 Minuten erhalten. Sie stellen für die transgenen Tiere eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber neurotoxischen Effekte

durch A $\beta$  im Rahmen der Isofluran Narkose fest. Dies äußert sich in vermehrter Apoptose, pro-apoptotischer Proteinen, einer mikroglialen Aktivierung sowie erhöhten Leveln aggregierter A $\beta$  Peptide, ohne dass es dabei zur Erhöhung von A $\beta$ -Plaques oder allgemeinen A $\beta$  Leveln kommt (Perucho et al., 2010).

Erkennen lässt sich, dass klinisch relevante Vol.-%-Konzentrationen von Isofluran und eine verlängerte Exposition, einmalig oder über ein längeres Zeitintervall, zur Apoptoseinduktion führen. Diese zeit- und konzentrationsabhängigen Effekte (Xu et al., 2011) finden sich ausgeprägter bei erhöhter Suszeptibilität, die sich durch Exposition gegenüber pro-apoptotischen A $\beta$  erklären lässt.

In dieser Arbeit können keine Expressionsveränderungen für Caspase 3 durch die ICV-Injektion von verschiedenen A $\beta$  Subformen in hippocampalen oder kortikalen, murinen Gewebeproben gezeigt werden. Auch die Exposition gegenüber Isofluran führt zu keiner Änderung der Expression. Apoptotische Vorgänge werden vermutlich, wie im Falle der ausbleibenden Inflammationsreaktion, nicht durch die einmalige ICV-Injektion mit A $\beta$ , auch in Verbindung mit einer Isofluranexposition, induziert bzw. sind inflammatorische und apoptotische Prozesse bei Aufbereitung der Mäusehirne bereits, durch die residenten Gliazellen mit Beseitigung neurotoxischer Triggersubstanzen, abgeschlossen.

Wie für TNF $\alpha$  gilt auch für Caspase 3, da Inflammation und Apoptose in Form der inflammatorischen Kaskade verschaltet sind, dass wahrscheinlich bei erhaltener Fähigkeit zur Kompensation neurotoxische Stimuli schnell beseitigt werden und die Immunantwort gering ausfällt bzw. bei Aufbereitung der Hirne nicht mehr detektierbar ist. Es empfiehlt sich auch hier die Effekte von A $\beta$  und Isofluran auf Caspase 3 und das apoptotische System bereits kurz nach Exposition und kontinuierlich über die gesamte Versuchsdauer zu verfolgen. Auch der Aspekt, dass ältere Tiere eine erhöhte Suszeptibilität sowie eine stärkere und länger anhaltende, apoptotische Antwort aufweisen können, sollte in Zukunft berücksichtigt werden.

## 5.4 Glutamaterge Rezeptoren und AD

Die Alzheimer Krankheit geht, neben inflammatorischen und apoptotischen Prozessen, auch auf der Ebene der Neurotransmission mit Veränderungen und Störungen einher, die eine Beeinträchtigung der synaptischen Transmission mit Hemmung von Langzeitpotenzierung (LTP) und Förderung von Langzeitdepression (LTD) zur Folge haben. Zudem kommt es zu strukturellen Veränderungen, die sich in der

Dichteabnahme von Dornfortsätzen äußern, zu einer veränderten Morphologie und zum Verlust von Dendriten führen (Lacor et al., 2007). Die synaptische Dysfunktion, die mit oligomeren A $\beta$  Peptiden vergesellschaftet ist, stellt ein frühes Korrelat pathophysiologischer Prozesse der AD dar. Sie äußert sich u.a. in einer N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-(NMDAR)-abhängigen, synaptischen Depression und im Verlust von Dornfortsätzen (Liu et al., 2019).

Die Einheit der Synapse, grob bestehend aus Prä- und Postsynapse, getrennt durch den synaptischen Spalt, sowie Neurotransmittern ist in ihrer exzitatorischen Form an Denkprozessen und weiteren kognitiven Leistungen, wie Lernen und Gedächtnis beteiligt. Prä- und postsynaptisch werden Impulse elektrochemisch über Depolarisation und folgende Neurotransmitterausschüttung gekoppelt. An exzitatorischen Synapsen wird bei der Depolarisation Glutamat in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, das postsynaptisch an Glutamatrezeptoren bindet, welche in drei Gruppen unterteilt werden können: AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren. Letztere können hierbei wiederum in iono- und metabotrope Rezeptoren unterschieden werden.

Ionotrope NMDAR sind direkt an LTP, LTD und synaptischer Plastizität beteiligt, metabotrope NMDAR wirken modulierend auf diese Prozesse (Kumar, Dhull, & Mishra, 2015; Lee et al., 2004). Beiden Rezeptortypen wird eine Rolle an pathologischen Prozessen der AD zugeschrieben. Es wird angenommen, dass dies durch Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Exzitotoxizität und Förderung des neuronalen Zelltods durch Aktivierung pro-apoptotischer intrazellulärer Signalwege erfolgt (Liu et al., 2019).

Eine gestörte Glutamathomöostase, die auch in der AD nachweisbar ist, führt über NMDAR zur akuten Exzitotoxizität. Im Verlauf kommt es bei chronischer Aktivierung zur Förderung von Neuronenverlust und zum Zelluntergang von Neuronen (Paoletti, Bellone, & Zhou, 2013; Wang & Reddy, 2017).

Induziert eine synaptische NMDAR-Aktivierung LTP und Überlebenssignale für die Zelle - über eine Aktivierung der Expression von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen „pro-survival“ Transkriptionsfaktoren und der Inhibition von Apoptose über Suppression von Caspasen und apoptotischen Signalwegen - so fördert eine extrasynaptische Aktivierung LTD, apoptotische Signalwege und neuronalen Zelluntergang (Hardingham & Bading, 2010; Wang & Reddy, 2017).

Neben der Lokalisation spielen auch Subtypen der glutamatergen Rezeptorfamilie eine Rolle. Im Fokus stehen dabei NR2B (ionotrop) (Paoletti, Bellone et al. 2013, Hardingham und Bading 2010, Liu 2019) und mGluR5 (metabotrop) (Liu 2019, Um, Kaufman

et al 2013, Haas 2016, Renner 2010). Beiden Rezeptoren wird eine Rolle in pathophysiologischen Signalkaskaden in der AD zugeschrieben.

#### 5.4.1 mGluR5, Amyloid $\beta$ und Isofluran

Metabotrope NMDAR können in die drei Gruppen I (mGluR1 und mGluR5), II und III unterteilt werden.

Es kann gezeigt werden, dass der metabotrope mGluR5 löslichen A $\beta$ O als Ko-Rezeptor dient. Über mGluR5 erfolgt nachgeschaltet eine Aktivierung der Fyn-Kinase und von Signalwegen, die zur synaptischen Dysfunktion führen (Nygaard, Dyck, & Strittmatter, 2014). Die Interaktion von A $\beta$ O mit dem plasmamembranären PrP<sup>c</sup> generiert zudem erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen durch die Aktivierung von mGluR5 (Liu et al., 2019) über G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub> und Inositoltriphosphat (IP3). Zudem vermitteln A $\beta$ O-PrP<sup>c</sup>-mGluR5-Komplexe eine eEF2-Phosphorylierung und darüber einen Verlust von dendritischen Dornfortsätzen (Um et al., 2013). In transgenen Tieren kann gezeigt werden, dass eine Antagonisierung von mGluR5 Defizite in Lernen, Gedächtnis und eine Reduktion der Synapsendichte aufhebt (Um et al., 2013).

Renner et al. zeigen, dass Plasmamembran-gebundenes A $\beta$ O zu einer abnormalen synaptischen Akkumulation von mGluR5 Rezeptoren führt. Zudem kommt es zu einer Stabilisierung der Rezeptoren an Synapsen (Renner et al., 2010). Postsynaptisch, pathologisch vermehrt vorkommende mGluR5 können neurotoxische Signalwege triggern und induzieren. Diese wiederum können zur Dysfunktion und Verlust von Synapsen und letztlich zum Zelltod führen (Kumar et al., 2015).

A $\beta$ O supprimiert LTP und fördert LTD. mGluR5 Agonisten induzieren verstärkt LTD, eine Blockade der Rezeptoren durch Antagonisten inhibiert die LTD-Induktion, somit kommt mGluR5 eine vermittelnde Rolle in der synaptischen Plastizität zu (Hamilton et al., 2016; Shankar et al., 2008). mGluR5 induziert so möglicherweise Signalwege, die downstream neurotoxische Signale vermitteln, die synaptische Plastizität negativ beeinflussen und zu morphologischen sowie strukturellen Veränderungen der Dendriten und letztlich zur Apoptose der Neurone führen. Eine Blockade von mGluR5 könnte somit A $\beta$ O-vermittelten Prozessen vorbeugen.

In transgenen ArcSwe Mäusen (16 Monate alt) nimmt die Expression von mGluR5 mit zunehmendem Tieralter ab und ist in transgenen Tieren im Vergleich zu Wildtypen erhöht nachweisbar (Fang et al., 2017). Dies kann darauf hindeuten, dass mit zunehmendem Tieralter spezifische, an synaptischer Transmission beteiligte NMDAR

abnehmen, wobei eine A $\beta$  Exposition eine synaptische Stabilisierung und Clustering von mGluR5 fördert.

In einem weiteren transgenen Mausmodell zeigen Lee et al. für 5xFAD Mäuse in PET-Untersuchungen und mittels Immunoblotting von Hippocampus und Striatum eine reduzierte Expression von mGluR5-Proteinen (Lee et al., 2018). Die Ergebnisse dieses aggressiven AD-Modells mit früher Plaque-Bildung können als Hinweis auf ein AD-Endstadium mit Verlust von Neuronen und damit Reduktion von mGluR5-Expression interpretiert werden. Schmid et al. zeigen für männliche Tg2576 Mäuse keine Unterschiede in der Expression von mGluR5 in Abhängigkeit vom Alter. Bei weiblichen Tieren hingegen kommt es im höheren Alter zur Expressionszunahme (Schmid et al., 2019). Abd-Elrahman et al. weisen für APPSwe und 3xTg Tiere, im Vergleich zu nativen Kontrolltieren, eine erhöhte Expression von Zelloberflächen-mGluR5 nach, ohne jedoch signifikante Veränderung der totalen mGluR5-Expression in allen Tiergruppen aufzeigen zu können (Abd-Elrahman, Hamilton, Vasefi, & Ferguson, 2018).

Eine Stabilisierung von membranären mGluR5 durch A $\beta$  mit Störung der synaptischen Transmission erscheint plausibel. Mit Progredienz der AD und zunehmenden Neuronenverlusten kann es zur Reduktion der absoluten mGluR5-Level kommen.

Diesen Modellen liegen genetische Veränderungen mit erhöhter A $\beta$  Expression zugrunde. Im hier angewandten ICV-Modell kann, zumindest im Einklang mit einigen Studien, keine Erhöhung der Gesamt-mGluR5 Expression gezeigt werden. Anzunehmen ist, dass die injizierten A $\beta$  Subformen keine Wirkung auf synaptische und extrasynaptische mGluR5 haben oder diese Effekte zum Zeitpunkt der Probenaufbereitung nicht mehr nachweisbar sind. Es ist möglich, dass es bei unveränderter Gesamtproteinmenge von mGluR5 durch eine fehlende Diskriminierung zwischen membranären und internalisierten, nicht aktiven mGluR5 verpasst wird, Veränderungen zu detektieren, die mögliche Auffälligkeiten in der kognitiven und behavioralen Testung erklären können. In nachfolgenden Arbeiten ist es empfehlenswert eine solche Diskrimination der exprimierten mGluR5 nach Lokalisation vorzunehmen.

A $\beta$ O binden über Komplexe mGluR5 postsynaptisch und modulieren über diesen Weg synaptische Transmission mit Verschiebung hin zu LTD, zudem erfolgt die Förderung pro-apoptotischer Signalwege. A $\beta$ O, die an Plasmamembran gebunden sind, führen zur Akkumulation von mGluR5 (Renner et al., 2010). Kommt es, wie von Eckenhoff et al. (2004) beschrieben, zu einer Stabilisierung von oligomeren A $\beta$  Peptiden durch

Isofluran und zu einer gesteigerten Neurotoxizität (Eckenhoff et al., 2004), so kann diese auch durch eine Akkumulation und Aktivierung von mGluR5 vermittelt werden. Solche möglichen Effekte durch Isofluran können in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Weder kommt es zur Expressionsveränderungen von mGluR5, noch können durch Isofluran-getriggerte, kognitive und behaviorale Effekte im mHBT gezeigt werden. Auch lassen sich, wie bereits beschrieben, keine inflammatorischen und apoptotischen Prozesse nachweisen, die eine Isofluran-vermittelte Exzitotoxizität widerspiegeln würden.

#### 5.4.2 NR2B-Expression unter Einfluss von A $\beta$ und Isofluran

Ionotrope NMDAR spielen eine essentielle Rolle in der synaptischen Transmission und Plastizität. Eine Aktivierung kann zu strukturellen und funktionellen Langzeitveränderungen führen, die Grundlage für Gedächtnis- und Lernprozesse darstellen (Hardingham & Bading, 2010; Liu et al., 2019). Die ionotropen NMDAR sind heterotetramere Rezeptoren mit unterschiedlichen Untereinheiten (UE). Das Tetramer setzt sich aus zwei NR1-UE und zwei weiteren UE zusammen, zumeist aus zwei NR2-UE mit den Subtypen A-D (Liu et al., 2019). Die häufigsten NMDAR bestehen v.a. aus NR1 und NR2A bzw. NR2B. Sie kommen insbesondere im Hippocampus und Neocortex, den in der AD betroffenen Arealen, vor. Ionotrope NMDAR befinden sich in der synaptischen Zellmembran lokalisiert, wobei extrasynaptische NR2B-haltige NMDAR in der AD-Forschung in den Fokus rücken, da ihnen die Vermittlung von Exzitotoxizität zugeschrieben wird (Liu et al., 2019).

A $\beta$ O können einen akuten Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, über die Aktivierung von NR2B-NMDAR, in kultivierten, hippocampalen Neuronen induzieren (Liu et al., 2019). Diese Steigerung von synaptischen Ca<sup>2+</sup>-Strömen durch A $\beta$ -vermittelte Rezeptoraktivierung und synaptische Glutamatfreisetzung (Wang, Zhao, & Li, 2013) führen im Verlauf zu einer synaptischen Depression, NMDAR-Internalisierung und zur Aktivierung extrasynaptischer und perisynaptischer NR2B-NMDAR. Diesen kommt in der Induktion von LTD eine führende Rolle zu (Palop & Mucke, 2010) und sie lösen eine Signalinduktion für pro-apoptotische Prozesse aus, die zur mitochondrialen Dysfunktion und Zelltod führen (Hardingham & Bading, 2010).

Auch die, durch A $\beta$  ausgelöste, Internalisierung von synaptischen, membranständigen NMDAR (Dewachter et al., 2009; Snyder et al., 2005) trägt zu einer Verschiebung im Verhältnis von synaptischen zu extrasynaptischen NMDAR bei, wobei vielfältige und

unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der NMDAR-Expression in der AD vorliegen (Liu et al., 2019).

A $\beta$  führt zu Veränderungen in Funktionalität und Distribution von NMDAR. Dies wird unterstützt durch die Erkenntnis, dass A $\beta$  v.a. an NR2B-haltigen exzitatorischen Synapsen akkumuliert (Liu et al., 2019). Durch Glutamat-Spillover und A $\beta$  werden extrasynaptische NR2B-NMDAR aktiviert (Wang et al., 2013). Dies führt zu LTD, welche wiederum zur Schrumpfung von Dornfortsätzen und zum Verlust von Synapsen führt (Liu et al., 2019). A $\beta$  1-42 Oligomere führen über PrP<sup>C</sup>-mGluR5-Fyn-Aktivierung zu einer initialen Expressionssteigerung, gefolgt von einer Reduktion von Oberflächen-NR2B-NMDAR ohne Veränderung der Gesamt-NR2B-Expression (Um et al., 2012). Auch Lacor et al. zeigen, dass ADDLs (soluble A $\beta$ -derived oligomers, A $\beta$  1-40 und A $\beta$  1-42) in vitro in hippocampalen Neuronen zu einer Reduktion von Zelloberflächen-NMDAR (NR1 und NR2B) führen, ohne die Gesamtmenge der Rezeptoren zu verändern (Lacor et al., 2007). Eine kontinuierliche Exposition gegenüber A $\beta$  führt in Folge auch zu morphologischen Veränderungen der NMDAR-tragenden Dornfortsätzen und Dendriten, die letztlich in einer Reduktion der Dornfortsatzdichte mündet (Lacor et al., 2007).

Wie bereits beschrieben, werden extrasynaptische NR2B mit Exzitotoxizität in Verbindung gebracht. Eine exzessive NMDAR-Aktivität durch vermehrte extrasynaptische Expression, A $\beta$  und Glutamatexzess führt zu einer erhöhten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen, die den Zelltod fördert.

In vitro können Snyder et al. für kultivierte und von transgenen APPSwe Mäusen gewonnene, kortikale Neuronen, die für eine Stunde mit A $\beta$  behandelt werden, eine Reduktion der synaptischen Oberflächenexpression von NR2B zeigen. Eine extrasynaptische Expressionssteigerung ist nicht nachzuweisen (Snyder et al., 2005). Auch Dewachter et al. zeigen in kultivierten, hippocampalen und kortikalen Neuronen von transgenen APP[V717I] Mäusen eine Reduktion von NR2B-immunoreaktiven synaptischen Dornfortsätzen und eine reduzierte Oberflächenexpression von synaptischem NR2B durch A $\beta$ O (Dewachter et al., 2009). Zudem können Li et al. für verschiedene lösliche A $\beta$ O (synthetisch hergestellt, aus AD Gehirnen oder kultivierten Zellen) zeigen, dass in hippocampalen WT-Gehirnschnitten, eine Reduktion von LTP induziert wird, welche durch die selektiven NR2B-Inhibitoren Ifenprodil und Ro25-6981 verhindert werden kann. Zudem werden NMDA-Ströme und extrasynaptische Antworten durch lösliche A $\beta$ O gefördert (Li et al., 2011).

In Zusammenschau lässt sich schließen, dass A $\beta$  die extrasynaptische NR2B-Endozytose nicht fördert und hingegen eine Internalisierung synaptischer NR2B-NMDAR begünstigt und somit neben einer A $\beta$ -vermittelten, exzessiven Glutamatüberladung, auch selbst durch lösliche Oligomere zu einer übermäßigen Aktivierung extrasynaptischer NR2B-NMDARs führt. Es resultiert daraus eine Reduktion von LTP und Förderung von LTD, die in einer reduzierten synaptischen Plastizität münden (Hardingham & Bading, 2010; Wang et al., 2013).

In einigen Arbeiten wird, neben den Einflüssen von A $\beta$  auf die Expression von NR2B-NMDAR, auch die Auswirkungen einer Isofluran Exposition untersucht. Rammes et al. können für männliche C57BL6/J Mäuse (4–5 Monate) zeigen, dass eine 2-stündige Narkose mit Isofluran im Vergleich zur Sham-Kontrollgruppe 24 Stunden nach Narkose zu einer Hochregulierung von hippocampalem NR2B führt. Zudem lässt sich eine verbesserte kognitive Leistung und eine verstärkte LTP nachweisen. Eine selektive Blockade der NR2B-NMDAR hebt diese Anästhesie-assoziierten Veränderungen auf (Rammes et al., 2009). Eine synaptisch erhöhte Dichte von NR2B-NMDAR an CA1-Neuronen zeigt sich als Korrelat der vermehrten Expression. Dies beruht vermutlich auf dem Phänomen, dass ein Rezeptorantagonismus, Isofluran bindet selektiv an NR2B, zu einer kompensatorischen Hochregulation der Expression des blockierten Rezeptors führt. Diese Veränderungen sind reversibel (Rammes et al., 2009).

In vitro zeigen Dong et al. bei der Exposition von Primären Neuronen von WT- und transgenen APP<sup>swe</sup>/PSEN2<sup>dE9</sup>-Tieren gegenüber 2 Vol.% Isofluran für 6 Stunden eine Abnahme synaptischer NR2B-Rezeptoren mit Internalisation selbiger für beide Tiergruppen. Die Gesamtlevel an NR2B verändern sich für WT und transgene Tiere nicht (Dong et al., 2013). Isofluran verschiebt über eine Modifizierung der synaptischen NR2B-haltigen NMDARs das Verhältnis von synaptischen zu extrasynaptischen NR2B zugunsten extrasynaptischer NR2B-Rezeptoren. Über diese extrasynaptischen NR2B-Rezeptoren beeinflusst Isofluran somit die synaptische Transmission negativ und kann eine synaptische Dysfunktion initiieren. Li et al. bestätigen in einer weiteren Untersuchung die Ergebnisse zum Einfluss von Isofluran auf Kognition (räumliches Lernen und Gedächtnis im Morris Water Maze Test) und Expression von synaptischen und extrasynaptischen NR2B-Rezeptoren in männlichen (20 Monate alten) Sprague-Dawley Ratten. Die Narkose erfolgt mit 1,5 Vol.% Isofluran für 4 Stunden. Kognitive Testungen erfolgen an Tag 1, 7 und 30 nach der Narkose. Hierbei zeigt sich eine transiente Verminderung der kognitiven Leistung durch Isofluran. Die Gesamt-NR2B

Expression auf Rezeptorebene bleibt unverändert, wobei es zu einer transienten Erhöhung extrasynaptischer NR2B, ohne Veränderung der synaptischen Expression, kommt (Li et al., 2016). Eine NR2B-selektive Blockade mit dem Antagonisten Ro25-6981 vermindert die durch Isofluran hervorgerufene Störung im räumlichen Denken und Gedächtnis. Dies spricht dafür, dass die Effekte über eine Isofluran-induzierte extrasynaptische NR2B-Expressionsteigerung und dementsprechend über NR2B-aktivierte Signalwege hervorgerufen wird.

In dieser Arbeit erfolgt die Analyse der Gesamtexpression von NR2B. Eine Differenzierung, in synaptische oder extrasynaptische NR2B, erfolgt nicht. Die Gesamtproteinmenge von NR2B zeigt sich, anderen Ergebnissen entsprechend, unverändert. Eine abschließende Beurteilung, ob A $\beta$  und/oder Isofluran keinen oder einen nur transienten Effekt auf die NR2B-Expression haben, ist somit nicht möglich. Aus diesem Grund erscheint in zukünftigen Arbeiten, mit dem ICV-Modell als AD-Tiermodell, eine differenzierte Analyse von synaptischen und extrasynaptischen NR2B sinnvoll. Eine Differenzierung mittels Trennung von synaptischen und extrasynaptischen Membranabschnitten und Detektion über NR2B-Antikörper ließe Rückschlüsse auf die Beeinflussung der Proteinexpression und Verteilung von NR2B durch A $\beta$  und Isofluran zu. Dies wiederum könnte etwaige kognitiv-behavioristisch Symptome der AD erklären.

## 6 Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz (AD) ist die häufigste Demenzform und betrifft bereits heutzutage Millionen von Menschen. Durch den demographischen Wandel ist sie für die Zukunft eine wachsende gesundheitspolitische und gesamtgesellschaftliche Herausforderung.

Die AD präsentiert sich mit Verhaltensstörungen und neurokognitiven Symptomen, denen eine synaptische Dysfunktion, reduzierte synaptische Plastizität, Verlust von Synapsen und Neuronen zu Grunde liegt. Es wird vermutet, dass oligomere Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) Peptide diese Veränderungen über eine Induktion von Inflammation, Apoptose und Störung der synaptischen Transmission über glutamaterge N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) verursachen. Es wird zudem diskutiert, ob das volatile Anästhetikum Isofluran die pathophysiologischen Prozesse der AD beeinflusst.

In dieser Arbeit sollen im Tierversuch die Wirkung verschiedener  $A\beta$  Subformen und Isofluran auf die genannten Prozesse und Signalwege untersucht werden. C57Bl6N-Mäusen wurde über eine intracerebroventrikuläre (ICV) Injektion oligomeres  $A\beta$  ( $A\beta$  1-40,  $A\beta$  1-42,  $A\beta$  Nitro,  $A\beta$  Pyro) oder PBS injiziert. Nach einer Isoflurannarkose bzw. Shamprozedur erfolgte zunächst, im Rahmen einer anderen Dissertation, die neurokognitive und behavioristische Testung der Versuchstiere im modifizierten Holeboard Test (mHBT). In der  $A\beta$  Pyro - Gruppe zeigte sich eine signifikant verbesserte kognitive Gesamtleistung. Dieser Effekt wurde durch Isofluran aufgehoben und die kognitive Leistung auf Normalmaß reduziert. Für  $A\beta$  1-42 zeigt sich ein vermehrtes Angstverhalten bei unveränderter Kognition.

Die, in dieser Arbeit durchgeführte, fluoreszenzenmikroskopische Untersuchung auf amyloidogene Ablagerungen in den Hirnschnitten konnte in keiner Versuchstiergruppe AD-typische Ablagerungen in Form von höher geordneten  $A\beta$  Faltblattstrukturen oder Plaques nachweisen. Die molekularbiologische Analyse der  $TNF\alpha$ -, Caspase 3-, mGluR5- und NR2B-Expression in Hippocampus und Sensorischen Cortex zeigt keine signifikanten Veränderungen durch die verschiedenen  $A\beta$  Subformen. Auch für Isofluran lässt sich kein neurotoxischer oder -protektiver Effekt darstellen. Gründe hierfür könnten die nur einmalige Injektion von  $A\beta$ , der frühe Zeitpunkt der Analyse und/ oder das geringe Alter der Versuchstiere sein.

Insgesamt lassen die vorgestellten Ergebnisse darauf schließen, dass das ICV-Modell in der angewandten Form nicht geeignet ist, die komplexen AD-typischen,

molekularbiologischen Veränderungen durch A $\beta$  nachzubilden. Es zeigen sich keine Effekte einer Exposition gegenüber Isofluran.

## 7 Summary

Alzheimer's Dementia (AD) is the most common form of dementia and affects millions of patients. Due to demographic change, it represents a growing challenge for health policy and for society as a whole.

AD manifests with behavioral and neurocognitive symptoms based on synaptic dysfunction, reduced synaptic plasticity, and loss of synapses and neurons. It is assumed that oligomeric amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) peptides cause these changes by induction of inflammation, apoptosis and impairment of synaptic transmission via glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR). It is also discussed whether the volatile anesthetic isoflurane influences the pathophysiological processes of AD. This thesis investigates the effect of different  $A\beta$  subforms and isoflurane on the aforementioned pathways. C57Bl6N mice were intracerebroventricularly (ICV) injected with oligomeric  $A\beta$  ( $A\beta$  1-40,  $A\beta$  1-42,  $A\beta$  Nitro,  $A\beta$  Pyro) or PBS.

As part of another thesis neurocognitive and behavioral testing was performed using the modified holeboard test (mHBT) after receiving either isoflurane anesthesia or a sham procedure. The  $A\beta$  Pyro group showed a significantly improved overall cognition. This effect was reversed by isoflurane, and cognitive performance was reduced to normal level. For  $A\beta$  1-42, increased anxiety could be shown without altered cognition. In this work, analysis for amyloidogenic deposits in brain slices with fluorescence microscopy could not demonstrate any AD-typical deposits such as high-order  $A\beta$  sheet structures or plaques. Molecular biological assay for  $TNF\alpha$ , Caspase 3, mGluR5 and NR2B expression in the hippocampus and sensory cortex was not different among various  $A\beta$  subforms. Isoflurane did not show neurotoxic or neuroprotective effects. Reasons for these results could be the single-shot injection of  $A\beta$ , the early timepoint of analysis and/or the young age of the mice.

In conclusion, these results suggest that the ICV model of AD is not suitable to induce complex AD typical, molecular biological changes. There is no effect from exposure to isoflurane.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abd-Elrahman, K. S., Hamilton, A., Vasefi, M., & Ferguson, S. S. G. (2018). Autophagy is increased following either pharmacological or genetic silencing of mGluR5 signaling in Alzheimer's disease mouse models. *Molecular Brain*, 11(1), 19. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13041-018-0364-9>
- Aiello Bowles, E. J., Larson, E. B., Pong, R. P., Walker, R. L., Anderson, M. L., Yu, O., . . . Dublin, S. (2016). Anesthesia Exposure and Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Prospective Study. *J Am Geriatr Soc*, 64(3), 602-607. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/jgs.14024>
- Alzheimer's Association. (2019). 2019 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement* 2019, 15(3):321-87. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2019.01.010>
- Alzheimer's Association. (2020). 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/alz.12068>
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 263-293. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Barykin, E. P., Mitkevich, V. A., Kozin, S. A., & Makarov, A. A. (2017). Amyloid  $\beta$  Modification: A Key to the Sporadic Alzheimer's Disease? *Front Genet*, 8, 58. doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fgene.2017.00058>
- Bianchi, S. L., Tran, T., Liu, C., Lin, S., Li, Y., Keller, J. M., . . . Eckenhoff, M. F. (2008). Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics. *Neurobiol Aging*, 29(7), 1002-1010. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.009>
- Blum, F. E., & Zuo, Z. (2013). Volatile anesthetics-induced neuroinflammatory and anti-inflammatory responses. *Medical Gas Research*, 3(1), 16. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/2045-9912-3-16>

- Bouter, Y., Dietrich, K., Wittnam, J. L., Rezaei-Ghaleh, N., Pillot, T., Papot-Couturier, S., . . . Bayer, T. A. (2013). N-truncated amyloid beta (Abeta) 4-42 forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol*, 126(2), 189-205. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1129-2>
- Bredesen, D. E. (2009). Neurodegeneration in Alzheimer's disease: caspases and synaptic element interdependence. *Molecular Neurodegeneration*, 4(1), 27. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/1750-1326-4-27>
- Burgold, S., Filser, S., Dorostkar, M. M., Schmidt, B., & Herms, J. (2014). In vivo imaging reveals sigmoidal growth kinetic of  $\beta$ -amyloid plaques. *Acta Neuropathol Commun*, 2(1), 30. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/2051-5960-2-30>
- Butterfield, D. A., Reed, T. T., Perluigi, M., De Marco, C., Coccia, R., Keller, J. N., . . . Sultana, R. (2007). Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: implications for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Res*, 1148, 243-248. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.084>
- Cetin, F., Yazihan, N., Dincer, S., & Akbulut, G. (2013). The effect of intracerebroventricular injection of beta amyloid peptide (1-42) on caspase-3 activity, lipid peroxidation, nitric oxide and NOS expression in young adult and aged rat brain. *Turk Neurosurg*, 23(2), 144-150. doi: <https://dx.doi.org/10.5137/1019-5149.Jtn.5855-12.1>
- Chang, R., Yee, K. L., & Sumbria, R. K. (2017). Tumor necrosis factor alpha Inhibition for Alzheimer's Disease. *J Cent Nerv Syst Dis*, 9, 1179573517709278. doi: <https://dx.doi.org/10.1177/1179573517709278>
- Chen, G.-f., Xu, T.-h., Yan, Y., Zhou, Y.-r., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*, 38(9), 1205-1235. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/aps.2017.28>

- Chen, J. H., Ke, K. F., Lu, J. H., Qiu, Y. H., & Peng, Y. P. (2015). Protection of TGF- $\beta$ 1 against neuroinflammation and neurodegeneration in A $\beta$ 1-42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS One*, *10*(2), e0116549. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116549>
- Cho, S. M., Kim, H. V., Lee, S., Kim, H. Y., Kim, W., Kim, T. S., . . . Kim, Y. (2014). Correlations of amyloid- $\beta$  concentrations between CSF and plasma in acute Alzheimer mouse model. *Scientific Reports*, *4*, 6777. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/srep06777>
- Cioanca, O., Hritcu, L., Mihasan, M., & Hancianu, M. (2013). Cognitive-enhancing and antioxidant activities of inhaled coriander volatile oil in amyloid beta(1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav*, *120*, 193-202. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.08.006>
- Combs, C. K., Karlo, J. C., Kao, S. C., & Landreth, G. E. (2001). beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF $\alpha$ -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci*, *21*(4), 1179-1188. doi: <https://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.21-04-01179.2001>
- D'Amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ*, *17*(7), 1104-1114. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.180>
- De-Paula, V. J., Radanovic, M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. V. (2012). Alzheimer's disease. *Subcell Biochem*, *65*, 329-352. doi: [https://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4\\_14](https://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_14)
- Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. (2020). Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. [https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1\\_haeufigkeit\\_demenzerkrankungen\\_dalzg.pdf](https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf), Zugriff am 30.07.2020.

- Dewachter, I., Filipkowski, R. K., Priller, C., Ris, L., Neyton, J., Croes, S., . . . Van Leuven, F. (2009). Deregulation of NMDA-receptor function and down-stream signaling in APP[V717I] transgenic mice. *Neurobiol Aging*, *30*(2), 241-256. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.011>
- Dong, Y., Wu, X., Zhang, G., Xu, Z., Zhang, Y., Gautam, V., . . . Xie, Z. (2013). Isoflurane facilitates synaptic NMDA receptor endocytosis in mice primary neurons. *Curr Mol Med*, *13*(4), 488-498. doi: <https://dx.doi.org/10.2174/1566524011313040003>
- Eckel, B., Ohl, F., Starker, L., Rammes, G., Bogdanski, R., Kochs, E., & Blobner, M. (2013). Effects of isoflurane-induced anaesthesia on cognitive performance in a mouse model of Alzheimer's disease: A randomised trial in transgenic APP23 mice. *Eur J Anaesthesiol*, *30*(10), 605-611. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/EJA.0b013e32835b824b>
- Eckenhoff, R. G., Johansson, J. S., Wei, H., Carnini, A., Kang, B., Wei, W., . . . Eckenhoff, M. F. (2004). Inhaled anesthetic enhancement of amyloid-beta oligomerization and cytotoxicity. *Anesthesiology*, *101*(3), 703-709. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/00000542-200409000-00019>
- Eckle, V. S., Hucklenbruch, C., & Todorovic, S. M. (2009). [What do we know about anesthetic mechanisms?: hypnosis, unresponsiveness to surgical incision and amnesia]. *Anaesthetist*, *58*(11), 1144-1149. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00101-009-1618-9>
- Fang, X. T., Eriksson, J., Antoni, G., Yngve, U., Cato, L., Lannfelt, L., . . . Syvanen, S. (2017). Brain mGluR5 in mice with amyloid beta pathology studied with in vivo [(11)C]ABP688 PET imaging and ex vivo immunoblotting. *Neuropharmacology*, *113*(Pt A), 293-300. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.10.009>
- Finder, V. H., & Glockshuber, R. (2007). Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis*, *4*(1), 13-27. doi: <https://dx.doi.org/10.1159/000100355>

- Forloni, G., & Balducci, C. (2018). Alzheimer's Disease, Oligomers, and Inflammation. *J Alzheimers Dis*, 62(3), 1261-1276. doi: <https://dx.doi.org/10.3233/jad-170819>
- Guivernau, B., Bonet, J., Valls-Comamala, V., Bosch-Morato, M., Godoy, J. A., Inestrosa, N. C., . . . Munoz, F. J. (2016). Amyloid-beta Peptide Nitrotyrosination Stabilizes Oligomers and Enhances NMDAR-Mediated Toxicity. *J Neurosci*, 36(46), 11693-11703. doi: <https://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1081-16.2016>
- Gunn, A. P., Masters, C. L., & Cherny, R. A. (2010). Pyroglutamate-Abeta: role in the natural history of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(12), 1915-1918. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2010.08.015>
- Gupta, P., Sil, S., Ghosh, R., Ghosh, A., & Ghosh, T. (2018). Intracerebroventricular Abeta-Induced Neuroinflammation Alters Peripheral Immune Responses in Rats. *J Mol Neurosci*, 66(4), 572-586. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s12031-018-1189-9>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2), 101-112. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nrm2101>
- Hamilton, A., Vasefi, M., Vander Tuin, C., McQuaid, R. J., Anisman, H., & Ferguson, S. S. (2016). Chronic Pharmacological mGluR5 Inhibition Prevents Cognitive Impairment and Reduces Pathogenesis in an Alzheimer Disease Mouse Model. *Cell Rep*, 15(9), 1859-1865. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.077>
- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, 11(10), 682-696. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nrn2911>
- Harigaya, Y., Saido, T. C., Eckman, C. B., Prada, C. M., Shoji, M., & Younkin, S. G. (2000). Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's

- disease brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 276(2), 422-427.  
doi: <https://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3490>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., . . . Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14(4), 388-405. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(15\)70016-5](https://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Wiesinger, H., Dumitrescu-Ozimek, L., Riederer, P., Feinstein, D. L., & Klockgether, T. (2001). Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(9), 906-916. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/jnen/60.9.906>
- Jahn, H. (2013). Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci*, 15(4), 445-454. doi: <https://dx.doi.org/10.31887/DCNS.2013.15.4/hjahn>
- Jiang, J., & Jiang, H. (2015). Effect of the inhaled anesthetics isoflurane, sevoflurane and desflurane on the neuropathogenesis of Alzheimer's disease (review). *Mol Med Rep*, 12(1), 3-12. doi: <https://dx.doi.org/10.3892/mmr.2015.3424>
- Kasza, Á., Penke, B., Frank, Z., Bozsó, Z., Szegedi, V., Hunya, Á., . . . Fülöp, L. (2017). Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized  $\beta$ -Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory. *Molecules*, 22(11). doi: <https://dx.doi.org/10.3390/molecules22112007>
- Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, K. H., & Younkin, S. G. (2001). Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 21(2), 372-381. doi: <https://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.21-02-00372.2001>

- Kayed, R., & Lasagna-Reeves, C. A. (2013). Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis*, *33 Suppl 1*, S67-78. doi: <https://dx.doi.org/10.3233/jad-2012-129001>
- Kim, J. A., Li, L., & Zuo, Z. (2009). Delayed treatment with isoflurane attenuates lipopolysaccharide and interferon gamma-induced activation and injury of mouse microglial cells. *Anesthesiology*, *111*(3), 566-573. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181af5b3d>
- Klein, W. L. (2013). Synaptotoxic amyloid-beta oligomers: a molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*, *33 Suppl 1*, S49-65. doi: <https://dx.doi.org/10.3233/jad-2012-129039>.
- Kumar, A., Dhull, D. K., & Mishra, P. S. (2015). Therapeutic potential of mGluR5 targeting in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*, *9*, 215. doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fnins.2015.00215>
- Kummer, M. P., & Heneka, M. T. (2014). Truncated and modified amyloid-beta species. *Alzheimers Res Ther*, *6*(3), 28. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/alzrt258>
- Kummer, M. P., Hermes, M., Delekarte, A., Hammerschmidt, T., Kumar, S., Terwel, D., . . . Heneka, M. T. (2011). Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron*, *71*(5), 833-844. doi:10.1016/j.neuron.2011.07.001
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Sanz Clemente, A., Velasco, P. T., Wood, M., . . . Klein, W. L. (2007). A $\beta$  Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, *27*(4), 796-807. doi: <https://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3501-06.2007>
- Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2017). Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/ene.13439>

- Lee, H. G., Zhu, X., O'Neill, M. J., Webber, K., Casadesus, G., Marlatt, M., . . . Smith, M. A. (2004). The role of metabotropic glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *64*(1), 89-98. PMID:15190683
- Lee, M., Lee, H. J., Park, I. S., Park, J. A., Kwon, Y. J., Ryu, Y. H., . . . Choi, J. Y. (2018). Abeta pathology downregulates brain mGluR5 density in a mouse model of Alzheimer. *Neuropharmacology*, *133*, 512-517. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.02.003>
- Li, L., Li, Z., Cao, Y., Fan, D., Chui, D., & Guo, X. (2016). Increased extrasynaptic GluN2B expression is involved in cognitive impairment after isoflurane anesthesia. *Exp Ther Med*, *12*(1), 161-168. doi: <https://dx.doi.org/10.3892/etm.2016.3306>
- Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N. E., Shankar, G. M., & Selkoe, D. J. (2011). Soluble A $\beta$  oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci*, *31*. doi: <https://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0203-11.2011>
- Liu, J., Chang, L., Song, Y., Li, H., & Wu, Y. (2019). The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, *13*, 43. doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.00043>
- Louneva, N., Cohen, J. W., Han, L. Y., Talbot, K., Wilson, R. S., Bennett, D. A., . . . Arnold, S. E. (2008). Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, *173*. doi: <https://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2008.080434>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*, *1*, 15056. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>

- Masters, C. L., & Selkoe, D. J. (2012). Biochemistry of amyloid  $\beta$ -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(6), a006262. doi: <https://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a006262>
- McCarter, J. F., Liebscher, S., Bachhuber, T., Abou-Ajram, C., Hübener, M., Hyman, B. T., . . . Meyer-Luehmann, M. (2013). Clustering of plaques contributes to plaque growth in a mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 126(2), 179-188. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00401-013-1137-2>
- McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2001). Innate immunity in Alzheimer's disease: a model for local inflammatory reactions. *Mol Interv*, 1(1), 22-29. doi: <https://dx.doi.org/10.1126/sageke.2002.29.re3>
- Medeiros, R., Prediger, R. D., Passos, G. F., Pandolfo, P., Duarte, F. S., Franco, J. L., . . . Calixto, J. B. (2007). Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *J Neurosci*, 27(20), 5394-5404. doi: <https://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5047-06.2007>
- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G. A., & Maccioni, R. B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci*, 8. doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fncel.2014.00112>
- Murphy, M. P., & LeVine, H., 3rd. (2010). Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis*, 19(1), 311-323. doi: <https://dx.doi.org/10.3233/jad-2010-1221>
- Nygaard, H., Dyck, C., & Strittmatter, S. (2014). Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 6, 8. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/alzrt238>

- Ohl, F., Holsboer, F., & Landgraf, R. (2001). The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents. *Behav Res Methods Instrum Comput*, *33*(3), 392-397. doi: <https://dx.doi.org/10.3758/bf03195393>.
- Ono, K. (2017). Alzheimer's disease as oligomeropathy. *Neurochem Int*. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2017.08.010>
- Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid- $\beta$ -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci*, *13*. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nn.2583>
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci*, *14*(6), 383-400. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nrn3504>
- Patel, N. S., Paris, D., Mathura, V., Quadros, A. N., Crawford, F. C., & Mullan, M. J. (2005). Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, *2*(1), 9. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-2-9>
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2004). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier.
- Perucho, J., Rubio, I., Casarejos, M. J., Gomez, A., Rodriguez-Navarro, J. A., Solano, R. M., . . . Mena, M. A. (2010). Anesthesia with isoflurane increases amyloid pathology in mice models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, *19*(4), 1245-1257. doi: <https://dx.doi.org/10.3233/jad-2010-1318>
- Rammes, G., Seeser, F., Mattusch, K., Zhu, K., Haas, L., Kummer, M., . . . Parsons, C. G. (2018). The NMDA receptor antagonist Radiprodil reverses the synaptotoxic effects of different amyloid-beta (A $\beta$ ) species on long-term potentiation (LTP). *Neuropharmacology*, *140*, 184-192. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.07.021>

- Rammes, G., Starker, L. K., Haseneder, R., Berkmann, J., Plack, A., Zieglgansberger, W., . . . Blobner, M. (2009). Isoflurane anaesthesia reversibly improves cognitive function and long-term potentiation (LTP) via an up-regulation in NMDA receptor 2B subunit expression. *Neuropharmacology*, *56*(3), 626-636. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.11.002>
- Renner, M., Lacor, P. N., Velasco, P. T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W. L., & Triller, A. (2010). Deleterious effects of amyloid  $\beta$  oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron*, *66*. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.029>
- Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*, *2012*, 756357. doi: <https://dx.doi.org/10.1100/2012/756357>
- Sachdeva, A. K., & Chopra, K. (2015). Lycopene abrogates Abeta(1-42)-mediated neuroinflammatory cascade in an experimental model of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, *26*(7), 736-744. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.01.012>
- Sakono, M., & Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A $\beta$  oligomers. *The FEBS Journal*, *277*(6), 1348-1358. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x>
- Sarlus, H., & Heneka, M. T. (2017). Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, *127*(9), 3240-3249. doi: <https://dx.doi.org/10.1172/jci90606>
- Schieb, H., Kratzin, H., Jahn, O., Mobius, W., Rabe, S., Staufenbiel, M., . . . Klafki, H. W. (2011). Beta-amyloid peptide variants in brains and cerebrospinal fluid from amyloid precursor protein (APP) transgenic mice: comparison with human Alzheimer amyloid. *J Biol Chem*, *286*(39), 33747-33758. doi: <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.246561>

- Schilling, S., Lauber, T., Schaupp, M., Manhart, S., Scheel, E., Bohm, G., & Demuth, H. U. (2006). On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry*, *45*(41), 12393-12399. doi: <https://dx.doi.org/10.1021/bi0612667>
- Schmid, S., Jungwirth, B., Gehlert, V., Blobner, M., Schneider, G., Kratzer, S., . . . Rammes, G. (2017). Intracerebroventricular injection of beta-amyloid in mice is associated with long-term cognitive impairment in the modified hole-board test. *Behav Brain Res*, *324*, 15-20. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.02.007>
- Schmid, S., Rammes, G., Blobner, M., Kellermann, K., Bratke, S., Fendl, D., . . . Jungwirth, B. (2019). Cognitive decline in Tg2576 mice shows sex-specific differences and correlates with cerebral amyloid-beta. *Behav Brain Res*, *359*, 408-417. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2018.11.022>
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *25*(4), 453-472. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
- Seitz, D. P., Shah, P. S., Herrmann, N., Beyene, J., & Siddiqui, N. (2011). Exposure to general anesthesia and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr*, *11*, 83. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/1471-2318-11-83>
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, *6*(4), 487-498. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90052-2](https://dx.doi.org/10.1016/0896-6273(91)90052-2)
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, *8*(6), 595-608. doi: <https://dx.doi.org/10.15252/emmm.201606210>
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., . . . Selkoe, D. J. (2008). Amyloid  $\beta$ -Protein Dimers Isolated Directly from

- Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat Med*, 14(8), 837-842. <https://dx.doi.org/doi:10.1038/nm1782>
- Singh, A., & Kumar, A. (2016). Comparative Analysis of Intrahippocampal Amyloid Beta (1-42) and Intracerebroventricular Streptozotocin Models of Alzheimer's Disease: Possible Behavioral, Biochemical, Mitochondrial, Cellular and Histopathological Evidences. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 6(208). doi: <https://dx.doi.org/10.4172/2161-0460.1000208>
- Sivanesan, S., Tan, A., & Rajadas, J. (2013). Pathogenesis of Abeta oligomers in synaptic failure. *Curr Alzheimer Res*, 10(3), 316-323. doi: <https://dx.doi.org/10.2174/1567205011310030011>
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., . . . Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nat Neurosci*, 8. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nn1503>
- Su, D., Zhao, Y., Xu, H., Wang, B., Chen, X., Chen, J., & Wang, X. (2012). Isoflurane exposure during mid-adulthood attenuates age-related spatial memory impairment in APP/PS1 transgenic mice. *PLoS One*, 7(11), e50172. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050172>
- Tang, J. X., Eckenhoff, M. F., & Eckenhoff, R. G. (2011). Anesthetic modulation of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Curr Opin Anaesthesiol*, 24(4), 389-394. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/ACO.0b013e32834871c5>
- Tekirian, T. L., Yang, A. Y., Glabe, C., & Geddes, J. W. (1999). Toxicity of pyroglutaminated amyloid beta-peptides 3(pE)-40 and -42 is similar to that of A beta1-40 and -42. *J Neurochem*, 73(4), 1584-1589. doi: <https://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731584.x>
- Um, J. W., Kaufman, A. C., Kostylev, M., Heiss, J. K., Stagi, M., Takahashi, H., . . . Strittmatter, S. M. (2013). Metabotropic Glutamate Receptor 5 is a Co-Receptor

- for Alzheimer A $\beta$  Oligomer Bound to Cellular Prion Protein. *Neuron*, 79(5), 887-902. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.036>
- Um, J. W., Nygaard, H. B., Heiss, J. K., Kostylev, M. A., Stagi, M., Vortmeyer, A., . . . Strittmatter, S. M. (2012). Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci*, 15(9), 1227-1235. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nn.3178>
- Walters, A., Phillips, E., Zheng, R., Biju, M., & Kuruvilla, T. (2016). Evidence for neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Progress in Neurology and Psychiatry*, 20(5), 25-31. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/pnp.444>
- Wang, R., & Reddy, P. H. (2017). Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 57(4), 1041-1048. doi: <https://dx.doi.org/10.3233/jad-160763>
- Wang, Z. C., Zhao, J., & Li, S. (2013). Dysregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors induced by amyloid- $\beta$ . *Neurosci Bull*, 29(6), 752-760. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s12264-013-1383-2>
- Wu, X., Lu, Y., Dong, Y., Zhang, G., Zhang, Y., Xu, Z., . . . Xie, Z. (2012). The inhalation anesthetic isoflurane increases levels of proinflammatory TNF-alpha, IL-6, and IL-1beta. *Neurobiol Aging*, 33(7), 1364-1378. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.002>
- Xie, Z. (2008). The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases A $\beta$  level in vivo. 64(6), 618-627. doi:10.1002/ana.21548
- Xie, Z., Culley, D. J., Dong, Y., Zhang, G., Zhang, B., Moir, R. D., . . . Tanzi, R. E. (2008). The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid beta-protein level in vivo. *Ann Neurol*, 64(6), 618-627. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/ana.21548>

- Xie, Z., Dong, Y., Maeda, U., Alfillle, P., Culley, D. J., Crosby, G., & Tanzi, R. E. (2006). The common inhalation anesthetic isoflurane induces apoptosis and increases amyloid beta protein levels. *Anesthesiology*, *104*(5), 988-994. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/00000542-200605000-00015>
- Xie, Z., Dong, Y., Maeda, U., Moir, R. D., Xia, W., Culley, D. J., . . . Tanzi, R. E. (2007). The inhalation anesthetic isoflurane induces a vicious cycle of apoptosis and amyloid beta-protein accumulation. *J Neurosci*, *27*(6), 1247-1254. doi: <https://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5320-06.2007>
- Xie, Z., & Xu, Z. (2013). General anesthetics and  $\beta$ -amyloid protein. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *47*, 140-146. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.08.002>
- Xu, X., Kim, J. A., & Zuo, Z. (2008). Isoflurane preconditioning reduces mouse microglial activation and injury induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Neuroscience*, *154*(3), 1002-1008. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.013>
- Xu, Z., Dong, Y., Wu, X., Zhang, J., McAuliffe, S., Pan, C., . . . Xie, Z. (2011). The Potential Dual Effects of Anesthetic Isoflurane on A $\beta$ -Induced Apoptosis. *Curr Alzheimer Res*, *8*(7), 741-752. doi: <https://dx.doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182185fee>
- Yang, N., Liang, Y., Yang, P., Wang, W., Zhang, X., & Wang, J. (2016). TNF- $\alpha$  receptor antagonist attenuates isoflurane-induced cognitive impairment in aged rats. *Exp Ther Med*, *12*(1), 463-468. doi: <https://dx.doi.org/10.3892/etm.2016.3262>
- Ye, X., Lian, Q., Eckenhoff, M. F., Eckenhoff, R. G., & Pan, J. Z. (2013). Differential general anesthetic effects on microglial cytokine expression. *PLoS One*, *8*(1), e52887. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052887>
- Youssef, I., Florent-Bechard, S., Malaplate-Armand, C., Koziel, V., Bihain, B., Olivier, J. L., . . . Pillot, T. (2008). N-truncated amyloid-beta oligomers induce learning

impairment and neuronal apoptosis. *Neurobiol Aging*, 29(9), 1319-1333.  
doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.005>

Zhang, F., & Jiang, L. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 11, 243-256.  
doi: <https://dx.doi.org/10.2147/ndt.S75546>

Zhang, G., Dong, Y., Zhang, B., Ichinose, F., Wu, X., Culley, D. J., . . . Xie, Z. (2008). Isoflurane-induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine. *J Neurosci*, 28(17), 4551-4560. doi: <https://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.5694-07.2008>

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	<i>Pathophysiologische Prozesse der AD. Eigene Darstellung.</i> .....	2
Abb. 2	<i>Posttranslationale Modifizierungen (PTMs) am A<math>\beta</math> Protein. Modifizierte Darstellung nach Kummer et al. (2014).</i> .....	7
Abb. 3	<i>Versuchsablauf. Eigene Darstellung.</i> .....	13
Abb. 4	<i>Auswahl der Hirnschnitte der Black-Six-Mäuse (C57Bl6N) für Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie, Maushirn in Koronar- und Sagittalebene. Modifizierte Darstellung nach Paxinos &amp; Franklin (2004).</i> .....	15
Abb. 5	<i>Schematischer Aufbau der SDS-Gelelektrophorese, aktiviertes Gel und Protein Marker. Eigene Darstellung.</i> .....	20
Abb. 6	<i>Prinzip des Western Blot Verfahrens, schematischer Aufbau. Eigene Darstellung</i> .....	21
Abb. 7	<i>Auswertung in Image Lab und Prinzip der Antikörperbindung und Chemilumineszenz. Eigene Darstellung.</i> .....	23
Abb. 8	<i>Repräsentativer sagittaler Hirnschnitt nach Methoxy-X04-Färbung und Imaging mittels ApoTome-Fluoreszenzmikroskopie. Eigene Darstellung.</i> .....	26
Abb. 9	<i>Expression von TNF<math>\alpha</math> in der Western Blot Analyse hippocampaler (HC) und kortikaler (SC) Gewebeproben. Eigene Darstellung.</i> .....	27
Abb. 10	<i>Expression von Caspase 3 in der Western Blot Analyse hippocampaler (HC) und kortikaler (SC) Gewebeproben. Eigene Darstellung....</i>	28
Abb. 11	<i>Expression von mGluR5 in der Western Blot Analyse hippocampaler (HC) und kortikaler (SC) Gewebeproben. Eigene Darstellung.</i> .....	29
Abb. 12	<i>Expression von NR2B in der Western Blot Analyse hippocampaler (HC) und kortikaler (SC) Gewebeproben. Eigene Darstellung.</i> .....	30

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	<i>Antikörper. Eigene Tabelle.</i> .....	22
Tab. 2	<i>Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse zur Untersuchung auf A<math>\beta</math> Plaques. Eigene Tabelle.</i> .....	25

# 11 Anhang

## 11.1 Chemikalien

- 100 x PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid - Protease Inhibitor) - Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
- 1,2-Propandiol - Krankenhausapotheke Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)
- 50 x Complete – Roche (Mannheim, Deutschland)
- Aceton – Merck (Darmstadt, Deutschland)
- BSA – Albumin Fraktion V,  $\geq 98\%$  pulv., 2,5g + 50ml TBS/T; pH 7,7 – Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
- Dako Fluorescence Mounting Medium S3023– DAKO (Glostrup, Dänemark)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)  $>99\%$  - Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
- Clarity™ Western ECL Substrate – Bio-Rad (Hercules, CA, USA)  
(18 ml H<sub>2</sub>O, 2 ml Tris (1M), 89  $\mu$ l Cumarsäure, 200  $\mu$ l Luminol, 0,1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Ethanol 100% - Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol vergällt,  $\geq 99,8\%$ , mit ca. 1 % MEK – Fischar (Saarbrücken, Deutschland)
- Methoxy-X04 Pulver - Tocris Bioscience (Bristol, UK)
- Milli Q® Wasser – Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards - Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
- Pepstatin P 5318 - Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
- Tris – Roche (Mannheim, Deutschland)
- Tween 20 – Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)
- SDS - Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
- Glycin – Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)

## 11.2 Puffer / Lösungen

- PBS-Puffer (10xDulbecco's) Pulver (Phosphat gepufferte Salzlösung, 10-fach konzentriert) - AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei	Kaliumchlorid	Kaliumdihydrogenphosphat	Natriumchlorid
11,50g/L	2,00g/L	2,00g/L	80,00g/L

- Natriumhydroxid Lösung 1N – Honeywell Fluka™ (Seelze, Deutschland)
- RIPA Puffer (Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer) - Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA)  
50 mM Tris-HCl, pH 8.0 mit 150 mM Natriumchlorid, 1.0% IGEPAL CA-630 (NP-40), 0.5% Natrium Desoxycholat und 0.1% SDS
- (Laemmli-)Probenpuffer (1.4ml, 4times: 1ml NuPage LDS Sample Buffer (Invitrogen NP0007); 400µl NuPage Sample Reducing Agent (Invitrogen NP0009) – Invitrogen AG (Carlsbad, CA, USA))
- Transfer-Puffer (Blottingpuffer 10x: 247,93mM Tris, 920mM Glycin)
- TBS/T (pH 7,7: 24,8 mM Tris, 190 mM NaCl, 0,1% Tween 20)
- BioRad DC Protein Assay - Reagenz A & B – Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

## 11.3 Kits

- Amersham Sample Grinding Kit mit Pestles - GE Healthcare (München, Deutschland)
- TGX Stain Free Fast Cast Acrylamide Kit 10% - Bio-Rad (Hercules, CA, USA)

## 11.4 Verbrauchsmaterialien

- 96 Wellplatte / Mikrotiterplatte - Brand GmbH und Co. KG (Wertheim, Deutschland)
- Amersham™ Hybond™ PVDF Blotting Membrane, 0,2 µm, Low Fluorescence 0,2 µm PVDF - GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
- Blotting-Kammer - Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Eppendorf Pipette - Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf-Röhrchen - Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Gelkammer - Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Glaskolben

- Glasküvetten (mit Glas-Schlitten)
- Magnetfisch
- Mikroskop-Deckelglas – Thermo Scientific Menzel
- Objektträger – Thermo Scientific Menzel
- Pinzette

## 11.5 Software

- BioRender - BioRender.com
- Fiji (ImageJ 1.51h) - Rasband, W., National Institutes of Health, USA
- GIMP 2.8.18 GNU Image Manipulation Program - Kimball S., Mattis P. et al.
- GNU PSPP Statistical Analysis Software - Release 1.2.0-g0fb4db - Free Software Foundation, Inc.
- Image Lab <sup>TM</sup> Version 6.0.0 build 25 - Bio-Rad Laboratories, Inc. 2017 (Hercules, CA, USA)
- Microsoft Excel - Microsoft (Redmond, WA, USA)
- Microsoft Word - Microsoft (Redmond, WA, USA)
- SPSS Statistics Version 24.0 - IBM (New York, USA)
- Zen 2012 Black - Carl Zeiss Microscopy Carl (Oberkochen, Deutschland)
- Zen 2012 Blue - Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
- Zen 2012 Blue lite - Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)

## 11.6 Laborequipment

- 3D-Schüttler
- ApoTome.2 (Fluoreszenz-Imaging-System) - Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
- Axio Imager (M)2 Mikroskop - Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
- AxioCam MRm/MRc (digitale Mikroskopkameras) - Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
- Beleuchtungseinrichtung HXP 120 C - Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
- Biofuge fresco - Heraeus (Hanau, Deutschland)
- Blotting-Kammer - Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
- ChemiDoc <sup>TM</sup> XRS+ - Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)

- Gefrierschrank -80°C (Herafreeze) - Thermo Scientific
- Gelkammer – Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
- Kühlschrank 4°C - Bosch
- Magnetrührer - RCT Basic - IKA
- Power Supply 232 - Carl Zeiss Microscopy (Oberkochen, Deutschland)
- Sunrise™ Reader - Tecan Trading AG (Männedorf, Schweiz)
- Thermomixer comfort - Eppendorf (Deutschland)
- Vortex-Genie 2 - Scientific Industries