

Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während  
degenerativer Prozesse des Gehirns  
- Erweiterte Charakterisierung Drebrin-defizienter Zellen

Analysis of protective cytoskeletal reactions during degenerative processes  
in the brain  
- extended characterization of Drebrin-deficient cells

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Isabell Battke

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung/ Fragestellung</b> .....	<b>9</b>
1. 1. Neurodegenerative Erkrankungen und das Aktin-Zytoskelett.....	9
1. 2. Drebrin und der Alterungsprozess .....	11
1. 3. A $\beta$ -Monomere und ADDLs (=A $\beta$ -Oligomere).....	16
<b>2. Methodik</b> .....	<b>19</b>
2. 1. Erzeugung der DBN-KO-Mäuse.....	19
2. 2. Erzeugung der DBN-KO/GPX4Het-Mäuse.....	21
2. 3. Drebrin in Neuronen .....	23
i) Immunhistochemie.....	23
ii) Mikroskopische Analyse .....	25
2. 4. Drebrin in Astrozyten .....	26
i) Isolation und Kultivierung kortikaler Astrozyten.....	26
ii) Transfektion mit Rab 5/7/8 sowie ApoE2/4 .....	27
iii) Behandlung mit Dextran als Marker für Flüssigphasen-Endozytose.....	28
iv) Behandlung mit A $\beta$ -Monomeren .....	28
v) Behandlung mit A $\beta$ -Oligomeren (ADDLs) .....	29
vi) Quantifizierung und Statistische Auswertung .....	30
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
3. 1. Drebrin in Neuronen .....	31
3. 2. Drebrin in Astrozyten .....	37
i) Behandlung mit Dextran .....	38
ii) Behandlung mit A $\beta$ -Monomeren .....	40
iii) Behandlung mit A $\beta$ -Oligomeren (ADDLs) .....	45
iv) Kolo-kalisation von A $\beta$ -Monomeren/-Oligomeren mit Rab5/7/8 und ApoE2/4.....	54
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>57</b>
4. 1. Drebrin in Neuronen .....	57
4. 2. Drebrin in Astrozyten .....	60

4. 3. Schlussfolgerungen und Ausblick .....	67
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>69</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>78</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>79</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>80</b>
<b>Bescheinigung Statistik.....</b>	<b>81</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Arbeitshypothese	12
<b>Abbildung 2</b>	A: Generierung des Null-Allels mittels FRT/FRP- sowie Cre/loxP-Rekombinationssystem, B: Kreuzung der Tiere zur Generierung einer DBN-KO-Maus, C: Western Blot von Gehirnllysaten der DBN-WT und DBN-KO Mäuse	20
<b>Abbildung 3</b>	Generierung des Knock-In-Allels mittels homologer Rekombination mittels Zielvektor und Neomycin-Kassette	21
<b>Abbildung 4</b>	NeuN-Färbung der hippocampalen Region von jung-adulten und stark gealterten DBN-WT und DBN-KO Mäusen	32
<b>Abbildung 5</b>	NeuN-Färbung und HE-Färbung der hippocampalen Region von stark gealterten DBN-WT und DBN-KO Mäusen	34
<b>Abbildung 6</b>	NeuN- und Hämatoxylin-Färbung von 72 Wochen alten DBN-KO/GPX4WT und DBN-KO/GPX4Het-Mäusen	35
<b>Abbildung 7</b>	NeuN- und Hoechst-Färbung von 95 Wochen alten DBN-KO/GPX4WT und DBN-KO/GPX4Het-Mäusen	36
<b>Abbildung 8</b>	Darstellung des Behandlungsschemas der Astrozyten-Zellkulturen	37
<b>Abbildung 9</b>	Dextran Zeitachse	39
<b>Abbildung 10</b>	Übersicht der für 24h mit 0,2 $\mu$ M A $\beta$ 647-Monomeren behandelten Astrozyten	41
<b>Abbildung 11</b>	Ausmaß der Aufnahme für 24h mit 0,2 $\mu$ M A $\beta$ 647-Monomeren behandelten Astrozyten	43
<b>Abbildung 12</b>	Untersuchung der Korrelation zwischen Anzahl der A $\beta$ 647-Monomer-positiven Vesikel und der Fläche des Nukleus in DBN-WT Ctrl	44

- Abbildung 13** Untersuchung der Kolo­kalisierung zwischen A $\beta$ 647-Monomer-Signal und Nukleus-Signal in DBN-WT 45
- Abbildung 14** Übersicht der für 24h mit 0,4  $\mu$ M ADDL488-Oligomeren bzw. 1 $\mu$ g/ml Vehikel488 behandelten Astrozyten 47
- Abbildung 15** Ausmaß der Aufnahme für über 24h mit 0,4  $\mu$ M ADDL488-Oligomeren behandelten Astrozyten 50
- Abbildung 16** Bohnenförmig deformierte Nuklei in mit 24h mit 0,4 $\mu$ M ADDL488-Oligomeren behandelten Astrozyten 50
- Abbildung 17** Untersuchung der Korrelation zwischen Anzahl der ADDL488-Oligomer-positiven Vesikel und der Fläche des Nukleus in DBN-WT Ctrl 51
- Abbildung 18** Erneute Untersuchung der Korrelation zwischen Anzahl der ADDL488-Oligomer-positiven Vesikel und der Fläche des Nukleus in DBN-WT Ctrl mit bereinigten Daten 52
- Abbildung 19** Untersuchung der Kolo­kalisierung zwischen ADDL488-Oligomer-Signal und Nukleus-Signal in DBN-WT 53
- Abbildung 20** Übersicht der für 24h mit 0,4  $\mu$ M ADDL488/ADDL647-Oligomeren behandelten, eGFP-Rab5 (A)/ eGFP-Rab8 (B)/ mScarlett-Rab7 (C)-transfizierten Astrozyten 54
- Abbildung 21** A und B: Übersicht der für 24h mit 0,4  $\mu$ M ADDL488-Oligomeren behandelten, mScarlett-ApoE4 (A)/ ApoE2 (B) transfizierten Astrozyten; C: Übersicht der für 24h mit 0,2  $\mu$ M A $\beta$ 647-Monomeren/ 0,4  $\mu$ M ADDL647-Oligomeren behandelten mScarlett-ApoE4 transfizierten Astrozyten; D: Übersicht der für 24h mit 0,2  $\mu$ M A $\beta$ 647-Monomeren (links)/ 0,4  $\mu$ M ADDL647-Oligomeren (rechts) behandelten mScarlett-ApoE4 transfizierten P4-embryonalen Astrozyten 56

## Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid- $\beta$
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ADDLs	A $\beta$ -derived diffusible ligands = von A $\beta$ -abstammende diffusionsfähige Liganden
APP	Amyloid- $\beta$ Precursor Protein = Amyloid Vorläuferprotein
ApoE2	$\epsilon$ 2-Allel von Apolipoprotein E
ApoE4	$\epsilon$ 4-Allel von Apolipoprotein E
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARP2/3	Actin related protein 2/3
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
BA1	Bafilomycin A1
CA	Cornu Ammonis
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-dependent protein kinase = Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CMV	Cytomegalievirus
Cre	cyclization recombination
Ctrl	Kontrolle = ohne mechanische Verletzung
Ctx	Kortex
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DBN-KO	Drebrin-Knockout
DBN-KO/GPX4-Het	Drebrin-Knockout/ GPX4-Heterozygot

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Einleitung/ Fragestellung

DBN-KO/GPX4-WT	Drebrin-Knockout/GPX4-Wildtyp
DBN-WT	Drebrin-Wildtyp
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl-Sulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drebrin	developmentally regulated brain protein = entwicklungsgemäß reguliertes Gehirnprotein
F1	first filial generation = erste kindliche Generation
F-Aktin	fibrilläres Aktin
FCS	fetales Kälberserum
FLP	Rekombinase Flippase
FRT	Flippase-Recognition-Target
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
G-Aktin	globuläres Aktin
GD	Gyrus dentatus
GFAP	glial fibrillary acidic protein = saures Gliafaserprotein
GPX4	Glutathionperoxidase 4
GS	Goat Serum = Ziegenserum
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Einleitung/ Fragestellung

Hip	Hippocampus
ICC	Intra-Klassen-Korrelations-Koeffizient
IVC	individuell belüftete Käfige
LME	L-Leucin-Methylester
LoxP	locus of X-over P1
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
MCI	Mild Cognitive Impairment = milde kognitive Beeinträchtigung
NeuN	Neuronal Nuclei
NeuNquickH	Kombinationsfärbung aus NeuN und Hämatoxylin
PAP	perisynaptische astrozytäre Fortsätze
PBS	phosphatgepufferter Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P/S	Penicillin-Streptomycin
PTM	Post-Translationaler-Modifikations
Rab-GTPasen	Ras-related in brain-monomere G-Proteine
ROS	Reactive Oxygen Species = reaktive Sauerstoffspezies
SA- $\beta$ -Geo-pA	Splice-Acceptor- $\beta$ -Geo-Poly-A
Scr	gescratched = mit mechanischer Verletzung
Str	Striatum
Sub	Subiculum
ZNS	zentrales Nervensystem

## **Zusammenfassung**

Das Aktinfilament-bindende Protein Drebrin, welches bei Alzheimer Patienten vermindert vorliegt, ist ein wichtiger Stabilisator des Aktinnetzwerks in dendritischen Spines exzitatorischer Neurone (Harigaya et al. 1996; Hayashi et al. 1996). Obwohl ein Drebrin-Verlust allein keine Neurodegeneration auslöst (Willmes et al. 2017), wirkt die Drebrin-vermittelte Stabilisierung von Aktinfilamenten einer stressbedingten Neurodegeneration entgegen (Kreis et al. 2019). Eine nachlassende Reduktion von ROS könnte bei Alterungsprozessen in Neuronen eine wesentliche Rolle spielen (Mack et al. 2016). Es wurde daher untersucht, ob Drebrin-defiziente Neurone vulnerabler gegenüber altersinduzierten Stressfaktoren sind und ob Funktionseinschränkungen der ROS-Abwehr diese Vulnerabilität steigern. Dafür wurden Gehirnschnitte von adulten sowie dem Greisenalter entsprechenden DBN-KO Mäusen immunhistochemisch untersucht. Verglichen wurde dabei der Einfluss des Drebringens kombiniert mit einem partiellen KO der Glutathion Peroxidase 4 (GPX4). In stark gealterten DBN-KO sowie in den DBN-KO/GPX4-Het Tieren zeigten sich gegenüber den Kontrolltieren keine Anzeichen für eine lokale Neurodegeneration in Hippocampus und Kortex, jedoch ein selektiver Verlust von NeuN in hippocampalen Pyramidalzellen. Weitere Untersuchungen zu möglichen subtilen Veränderungen aufgrund extremer Alterung konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Drebrin-defiziente Mäuse leiden zudem in Folge von Gehirnverletzungen unter einer fehlerhaften astrozytären Narbenbildung bedingt durch gestörten endosomalen Transport (Schiweck et al. 2021). Endosomaler Transport entscheidet vermutlich auch über die potentielle Neutralisation von A $\beta$ -Peptiden, weshalb eine Rolle von Astrozyten in der Pathogenese von Morbus Alzheimer (AD) diskutiert wird (Prasad und Rao 2018). Um die Aufnahme von A $\beta$ -Isoformen in Astrozyten zu analysieren, wurden astrozytäre Zellkulturen mit markierten A $\beta$ -Monomeren/-Oligomeren behandelt und deren Aufnahme quantifiziert. Überdies wurden Untersuchungen zur A $\beta$ -Aufnahme auf ein in-vitro-Wundheilungsmodell für Astrozytenkulturen ausgedehnt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Astrozyten in Primärkultur ein heterogenes Aufnahmeverhalten beider A $\beta$ -Isoformen zeigen. Allerdings konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Subpopulation von Astrozyten (sog. „Vielfresser“) die A $\beta$ -Monomere/-Oligomere in endosomale Vesikel aufnehmen und sich Nukleus-nahe Akkumulationen des Amyloids bildeten. Die Aufnahme der oligomeren Isoform wurde zudem durch den AD-Risikofaktor ApoE gesteigert. Diese Ergebnisse können dazu beitragen, die beobachteten Subpopulationen von Astrozyten anhand ihrer Aufnahme von A $\beta$ -Isoformen gezielt zu charakterisieren. Zeitrafferstudien sowie eine genaue Analyse der Akkumulation innerhalb der Vielfresser könnten erste Hinweise auf mechanistische Zusammenhänge zwischen dem intrazellulären Schicksal des A $\beta$  und seinem Schädigungspotential in Astrozyten aufdecken.

### **Abstract**

The actin-side-binding protein Drebrin, of which lower levels were seen in AD patients, has been identified as an important stabilizer of the actin network in dendritic spines of excitatory neurons (Harigaya et al. 1996; Hayashi et al. 1996). Although a Drebrin loss on its own does not cause neurodegeneration in a mouse model (Willmes et al. 2017), Drebrin-mediated stabilization of actin filaments protects against insult-driven neurodegeneration (Kreis et al. 2019). Decreased reduction of ROS potentially causing a variety of cellular malfunctions could be one underlying mechanism of age-induced stress in neurons (Mack et al. 2016). It was therefore analysed, whether Drebrin-deficient neurons are more vulnerable to age-dependent stressors and if impaired ROS-protection may increase this vulnerability. Therefore, brain sections ranging from adult to very old age were immunohistochemically evaluated with emphasis on the impact of Drebrin genotype in combination with a partial knock-down of the glutathione peroxidase 4 (GPX4). Whilst neither senile DBN-KO nor DBN-KO/GPX4-Het animals showed evidence of manifest neurodegeneration in the hippocampus or cortex, some pyramidal neurons of the hippocampus lost their common marker NeuN. Additional studies into more subtle transformations due to very old age in both mouse models were precluded by time constraints.

Furthermore, Drebrin-deficient suffer from deficient astrocytic scar formation after brain injury due to failed endosomal transport (Schiweck et al. 2021). Endosomal transport may also plays a crucial role during neutralization of amyloidgenic A $\beta$ -peptides, placing astrocytes in the centre stage of Alzheimer's Disease (AD) pathogenesis (Prasad and Rao 2018). To directly analyse the intracellular uptake of A $\beta$ -isoforms astrocytic cultures were treated with fluorescently labelled A $\beta$ -monomers/oligomers and vesicular uptake per cell was quantified. In addition, an in vitro-scar formation assay was employed to activate endosomal turnover. In conclusion, astrocytes in culture show a remarkable range of A $\beta$ -isoform uptake behaviour preventing significant differences between analysed parameters. However, a small subpopulation of astrocytes (termed "binge eaters") took up A $\beta$ -monomers as well as presumably toxic A $\beta$ -oligomers in an extraordinary high amount of endosomal vesicles and at the same time displayed peri-nuclear accumulations of amyloid. Moreover, uptake in particular of oligomeric A $\beta$  was increased by ApoE, a well known risk factor for AD. Expanding these preliminary results, different subpopulations of astrocytes may be characterized on the basis of their labelled amyloid uptake. Hence, time lapse studies as well as more detailed analysis of endosomal A $\beta$  accumulation in binge eaters may lead to first insights into mechanistic aspects of the intracellular fate of A $\beta$  and its toxic potential in astrocytes.

## **1. Einleitung/ Fragestellung**

### **1. 1. Neurodegenerative Erkrankungen und das Aktin-Zytoskelett**

Durch die stetig steigende Lebenserwartung in westlichen Populationen stellen die damit ebenfalls steigenden Inzidenzen altersbedingter kognitiver Beeinträchtigungen eine große gesellschaftliche und wirtschaftliche Herausforderung dar (Hebert et al. 2003). Bereits in der physiologischen Gehirnalterung treten eine Vielzahl neurobiologischer Veränderungen in Kombination mit einem Abfall der kognitiven Funktionen auf. Die pathologische Abgrenzung von physiologischer Hirnalterung und dem Beginn einer neurodegenerativen Erkrankung ist dabei schwer zu treffen, da sich beide Zustände durch die Aggregation fehlgefalteter Proteine auszeichnen (Elobeid et al. 2016). Unser begrenztes Wissen wird insbesondere durch die Diskrepanz zwischen morphologischen Veränderungen des Gehirns und klinischen Symptomen deutlich (Wyss-Coray 2016). Neurodegenerative Demenzerkrankungen wie Morbus Alzheimer betreffen mehr als 46 Millionen Patienten weltweit (Prince et al. 2015). Durch teilweise rapiden kognitiven Abbau verbunden mit Störungen von Gedächtnis, Orientierung und Sprache sowie fortschreitender Pflegebedürftigkeit ist Morbus Alzheimer eine der am meisten gefürchteten Erkrankungen des hohen Alters neben lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Krebs oder kardiovaskulären Krankheiten (Wyss-Coray 2016). Die Pathogenese von Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerativen Demenzformen ist - trotz jahrzehntelanger Forschungsarbeit im Bereich der Alzheimer Ursachen und der Identifikation wichtiger pathologischer Prozesse - bisher nicht vollständig aufgeklärt und verstanden. Daher existieren bis dato keine wirksamen Therapiemöglichkeiten, um diese Erkrankungen aufzuhalten oder zu heilen. Trotz vermutlich unterschiedlicher Auslöser der chronischen Neurodegeneration und je nach Demenz spezifisch betroffenen Hirnregionen korrelieren die neurologischen Symptome der jeweiligen Demenzen mit einer zunehmenden Dysfunktion der synaptischen Signalübertragung, die dem neuronalen Tod meist um Jahre bis Jahrzehnte vorausgeht (Selkoe 2002). Ein möglicher Grund für diese Störungen in der synaptischen Signalübertragung, Konnektivität und Dichte sind Veränderungen in der Morphologie dendritischer Spines, die kleine variabel geformte Vorwölbungen der Neuronenoberfläche darstellen und den postsynaptischen Teil der Mehrzahl der glutamatergen exzitatorischen Synapsen im Vorderhirn bilden (Penzes et al. 2011).

Aktinfilamente sind die wesentlichen zytoskelettalen Bauteile der dendritischen Spines (Hayashi et al. 1996). Das Fundament für die Struktur des Spine-Kopfes bildet ein komplexes Netzwerk verzweigter Aktin-Filamente, wohingegen der Spine-Hals viele lange, längs-ausgerichtete Aktin-Filament-Bündel aufweist (Hotulainen und Hoogenraad 2010, Rochefort und Konnerth 2012). Darüber hinaus hat der Grad der Aktin-Depolymerisation und somit das Verhältnis von globulären Aktin (G-Aktin) zu fibrillären Aktin (F-Aktin) einen entscheidenden Einfluss auf die Spine-Morphologie (Murakoshi und Yasuda 2012). Der kontinuierliche Umbau des Aktin-Zytoskeletts ist durch damit verknüpfte Veränderungen der Spine-Morphologie nicht nur essentiell für den Aufbau neuer Gedächtnisinhalte, sondern auch für die Aufrechterhaltung und Stabilisierung synaptischer Regelkreise mittels neuronaler Plastizität (Hotulainen und Hoogenraad 2010, Newey et al. 2005). Somit spielen Aktin-Zytoskelett-Modulatoren eine Schlüsselrolle in Lernprozessen.

Für eine intakte Hirnfunktion wird ein funktionierendes Zusammenspiel aller neuronalen Zellen benötigt. Hier spielen neben Neuronen vor allem gliale Zellen – mit Astrozyten als vorherrschende gliale Zellform - eine wichtige Rolle zum Erhalt des neuronalen Systems. Dabei haben Astrozyten nicht nur Neuronen-unterstützende Funktionen wie den Erhalt der synaptischen Homöostase durch Modulation der extrazellulären Ionen-Konzentrationen oder die Bereitstellung von Metaboliten und Nährstoffen (Wang und Bordey 2008), sondern regulieren auch aktiv den zerebralen Blutfluss und die synaptische Transmission durch Freisetzung synaptisch aktiver Moleküle wie Glutamat, Purin oder  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA; Sofroniew und Vinters 2010). Diese Forschungsergebnisse werden in der Hypothese der „dreigliedrigen Synapse“ (tripartite synapse) zusammengefasst, nach der Astrozyten durch ihre direkte und interaktive Rolle mit Neuronen während synaptischer Aktivität in einer für die Informationsverarbeitung wesentlichen Art ein ebenso essentieller Bestandteil der Synapse sind wie das prä- und postsynaptische Nervenende (Araque et al. 1999). Wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts in Astrozyten sind Aktinfilamente, die zeitgleich eine Schlüsselrolle für den „Gestaltwandel“ von polygonalen zu sternförmigen Astrozyten oder vice versa einnehmen (Schiweck et al. 2018). Während polygonale Astrozyten prominente Aktinfasern mit hohem Aktivitätslevel von Myosin-II vorweisen (John et al. 2004), sind in der Ausbildung sternförmiger Astrozyten nur wenig filamentöses Aktin und stattdessen ein Actin related Protein 2/3 (ARP2/3)-abhängiges Aktin-Netzwerk sichtbar (Murk et al. 2013).

Die Regulation von Aktinfilamenten ist auch in den perisynaptischen astrozytären Fortsätzen (PAPs) von großer Bedeutung. Über die PAPs bilden die Astrozyten die „dreigliedrigen Synapsen“ zu Neuronen aus und modulieren und unterstützen so bis zu 2 Millionen Synapsen pro Astrozyt (Oberheim et al. 2006). Der hochmotile/dynamische Kontakt zu den Neuronen erfolgt dabei über astrozytäre Ausläufer ähnlich zu Lamellipodien- oder Filopodien, die F-Aktin-reiche subzelluläre Kompartimente von migrierenden nicht-neuronalen Zellen darstellen (Hirrlinger et al. 2004). Da PAPs frei von Mikrotubuli und Intermediärfilamenten sind, ist eine Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts zur strukturellen Veränderung der PAPs wahrscheinlich (Schiweck et al. 2018). So könnten Aktin-Zytoskelett-Modulatoren auch über die Regulation der astrozytären Funktion einen Einfluss auf die neuronale und das gesamte Gehirn betreffende Integrität und Funktionalität (/Viabilität) nehmen.

## 1. 2. **Drebrin und der Alterungsprozess**

Das developmentally regulated brain protein (Drebrin) ist ein Aktinfilament-bindendes Protein, das vor allem in dendritischen Spines von exzitatorischen Neuronen exprimiert wird (Shirao 1995, Hayashi et al. 1996, Sekino et al. 2007) und sich daher als histologisches Marker-Protein für dendritische Spines etabliert hat. Es gibt zwei Drebrin-Isoformen: embryonales Drebrin E, das in den Somata migrierender Neurone und in den neuronalen Fortsätzen post-migratorischer Neurone während der neuronalen Entwicklung angereichert ist, und das adulte Drebrin A, das in Neuronen zu Beginn der Synapsenbildung exprimiert wird (Hayashi et al. 1996). Bereits 1996 fand man in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten molekulare Auffälligkeiten in Form eines Verlusts an Drebrin (Harigaya et al. 1996, Shim und Lubec 2002). Dies könnte für einen erheblichen Verlust dendritischer Spines selbst oder - darüber hinaus - für eine ursächliche, protektive Rolle Drebrins für den Spine-Erhalt sprechen. Letzteres wird vor allem durch die Beobachtung wahrscheinlicher, dass in Patienten mit Mild Cognitive Impairment (MCI), einem mutmaßlichem Prodromalstadium von Morbus Alzheimer mit im Vergleich zu späteren Alzheimer-Stadien nur milden Neurodegeneration, ebenfalls bereits verminderte hippocampale Drebrin-Spiegel gemessen wurden (Counts et al. 2012). So könnte unter Abwesenheit von Drebrin die Integrität und Funktion von Synapsen insbesondere im hippocampalen Bereich gestört sein.

Junge adulte Drebrin-Knockout-Mäuse zeigten jedoch in vergangenen Studien unter Standardbedingungen keinerlei Defizite bei der Entwicklung, Morphologie, Funktion und Plastizität von Synapsen im Hippocampus (Willmes et al. 2017). Dies lässt vermuten, dass zwar ein Drebrin-Verlust allein nicht zu einer Synapsenpathologie führe, jedoch ein Drebrin-Verlust in Kombination mit anderen Stressfaktoren potentiell schädigend für die Synapsen sein könnte. In diesem Zuge postulierte die Arbeitsgruppe Eickholt (Institut für Biochemie, Charité) einen neuartigen Mechanismus (Abbildung 1), der Neurone gegen Synapsenverlust in Folge von zellulärem oxidativen Stress schützt und in dem Drebrin eine zentrale Rolle zukommt. Drebrin wird dabei durch Phosphorylierung durch eine stressinduzierte Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)-Kinase stabilisiert und stabilisiert daraufhin F-Aktin, wodurch das Aktin-Zytoskelett der Zelle geschützt wird (Mikati et al. 2013). Somit könnte Drebrin das Neuron erheblich stressresistenter machen (Kreis et al. 2019).

Ein Bündel möglicher kumulativer Stressfaktoren könnte in diesem Kontext bereits der „normale“ – das heißt der physiologische – Alterungsprozess hervorbringen, da dieser mit Veränderungen im Metabolismus, replikativer Seneszenz, erhöhter Resistenz gegenüber Apoptose sowie einer kontinuierlichen mitochondrialen Dysfunktion und damit verbundener Mehrproduktion an Reactive Oxygen Species (ROS) einhergeht (Mack et al. 2016). ROS können die ATM-Kinase aktivieren und damit zum oben beschriebenen protektiven Drebrin-Mechanismus beitragen.

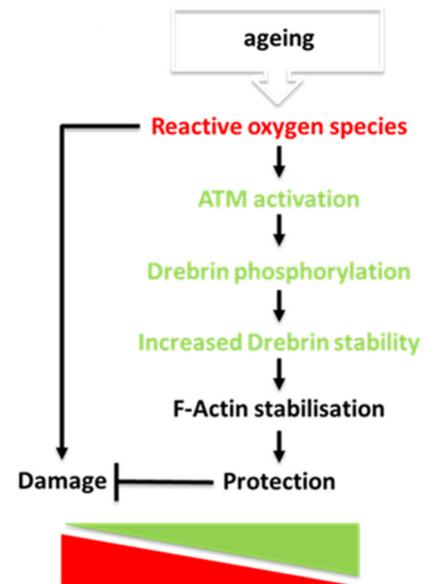


Abbildung 1: Arbeitshypothese: Altersbedingt erhöhte Konzentrationen an ROS führen zur Aktivierung einer ATM-Kinase, die durch Phosphorylierung Drebrin und damit ebenso fibrilläres Aktin stabilisiert (Kreis et al. 2019).

Das Ausmaß des Einflusses des Altersprozesses auf die Aktin-Dynamik und die synaptische Funktion sind weitestgehend unbekannt, wobei eine Vielzahl an Studien in Alters-Tiermodellen und an Patienten mit altersbedingten Erkrankungen dessen wichtige Rolle unterstreichen (Mack et al. 2016). So zeigten Proteom-Analysen von jungen und alten Gewebeproben veränderte Konzentrationen spezifischer Aktin-Isoformen: eine Verringerung an  $\alpha$ -Aktin im Muskel (Piec et al. 2005, Gelfi et al. 2006) sowie eine Hochregulation des  $\beta$ -Aktins in verschiedenen Geweben (Alfadda et al. 2013, Kasper et al. 2009) wurden beobachtet. Die genauen Auswirkungen dieser Verschiebung des Verhältnisses von  $\alpha$ -Aktin zu  $\beta$ -Aktin sind derzeit jedoch noch unklar. Darüber hinaus könnten altersbedingte Aktin-Dysfunktionen auch das Ergebnis veränderter Post-Translationaler-Modifikations(PTM)-Muster sein (Mack et al. 2016). So könnten oxidativer Stress und die Ansammlung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) während des Alterns zur Aktin-Carboxylierung und -Oxidation führen, die wiederum die Suszeptibilität gegenüber pathologischen Modifikationen Aktin-reicher Strukturen erhöhen (Poon et al. 2006, Castro et al. 2013). Dabei kann es nicht nur zu Funktionsverlust des Aktins durch Protein-Fehlfaltung, sondern durch weitere Oxidation des Aktins auch zu einer vermutlich toxischen Aggregatbildung und somit kritischen Störung der Proteostase kommen, was letztendlich zu Zell- und Gewebdysfunktion führen kann (Castro et al. 2013). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass altersbedingte Defekte der Proteostase auch Signalmoleküle und damit die interzelluläre Kommunikation beeinflussen könnten (Wyss-Coray 2016). Auch weitere Kennzeichen des Alterns wie genomische Instabilität, epigenetische Veränderungen oder eine Erschöpfung der Stammzell-Reserven könnten zu vermehrten zellulären Stress beitragen (López-Otín et al. 2013).

Obwohl Drebrin im Gehirn nicht nur in Neuronen exprimiert wird, ist es bisher vor allem dort untersucht worden (Aoki et al. 2005). Gehirnverletzungen im Mausmodell führen zur direkten Hochregulation der Drebrin-Spiegel in Astrozyten und Mäuse mit Drebrin-Verlust zeigen eine defizitäre astrozytäre Narbenbildung und exzessive Neurodegeneration in Folge von Gehirnverletzungen (Schiweck et al. 2021). Für diese Narbenbildung durch die Astrozyten ist der Prozess der reaktiven Astroglieose unabdingbar, in dem die Astrozyten starke molekulare und morphologische Veränderungen als Reaktion auf pathologische Bedingungen wie z.B. Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) jeglicher Art durchlaufen (Sofroniew 2009).

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Einleitung/ Fragestellung

Typische Charakteristika reaktiver Astrozyten sind Zellkörperhypertrophie, eine verstärkte Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP) und durch die strukturellen Änderungen auch die kontextabhängige Regulation der inflammatorischen Antwort insbesondere durch die Abgrenzung des inflammatorischen Bereiches durch aus Astrozyten- und Fibroblasten-bestehenden Narbengewebe (Eddleston und Mucke 1993, Sofroniew 2005).

So könnten auch entzündliche Prozesse erfolgreiches, gesundes Altern sowie altersbedingte neurodegenerative Erkrankungen/ unerfolgreiches Altern bedingen und vorantreiben: Hier wurde sogenanntes „Inflammaging“ beobachtet, das eine niedriggradige chronisch systemische Inflammation während des Alterns in Abwesenheit einer offenkundigen Infektion („sterile“ Inflammation) beschreibt (Franceschi und Campisi 2014). Vermutlich ist das Ausmaß der Aktivierung der Astrozyten, das graduell vom Ausmaß der ZNS-Verletzung oder der Konzentration der triggernden Moleküle abhängt, entscheidend für die Balance zwischen Neuronen-schützenden und Neuronen-schädigenden Interaktionen zwischen Astrozyten und den von ihnen kontaktierten Neuronen (Sofroniew 2009). Als Spektrum extremer Aktivierung und Veränderungen, die durch verschiedenste pathologische ZNS-Schädigungen ausgelöst werden und die neuronale Schädigung verursachen können, wurde reaktive Astroglieose beschrieben (Sofroniew 2014). So stellte man beispielsweise fest, dass stark gealterte und somit aktivierte Astrozyten vermehrt Inflammationsfaktoren wie Intermediärfilament-Proteine, Cytokine sowie intrazelluläre Protein-Aggregate exprimieren beziehungsweise aufweisen (Salminen et al. 2011). Darüber hinaus könnten die durch Astroglieose beeinträchtigte oxidative Stressabwehr und der veränderte Cholesteroll- und Glukose-Metabolismus zur Störung der wichtigen Unterstützung der benachbarten Neurone durch Astrozyten führen, deren wesentliche Aufgabe es unter anderem ist, optimale Umgebungsbedingungen für Neurone durch homöostatische Regulation aufrechtzuerhalten (Osborn et al. 2016). Aber auch neuroprotektive Auswirkungen der Aktivierung der Astrozyten wie zum Beispiel die Reparatur der Blut-Hirn-Schranke, der Gewebsumbau oder die Bereitstellung von Energie-Substraten bei niedriger Versorgung wurden beobachtet (Buffo et al. 2010).

Zusammenfassend kann demnach davon ausgegangen werden, dass altersbedingte Veränderungen der Zellen mit vermehrtem zellulären Stress einhergehen. Daraus ergibt sich die Arbeitshypothese, dass insbesondere das Aktin-Zytoskelett von Neuronen und Astrozyten im Alter zusätzlichen Schutz benötigt. Drebrin könnte hierbei als Vermittler protektive Mechanismen als Antwort auf zunehmenden zellulären Stress auslösen.

In der vorliegenden Arbeit soll daher untersucht werden, ob die Neurone von Drebrin-Knockout Mäusen anfälliger gegenüber altersinduzierten Stressfaktoren und damit stärker von Neurodegeneration betroffen sind als Neurone von Drebrin-Wildtyp Mäusen. Um diese Arbeitshypothese zu untersuchen, wurden exemplarisch frontale Gehirnschnitte von jungen adulten und stark gealterten Drebrin-Knockout Tieren (DBN-KO) immunhistochemisch untersucht und mit gleichaltrigen Drebrin-Wildtyp Kontrolltieren (DBN-WT) verglichen. Die jungen adulten Mäuse waren 10 Wochen und die stark gealterten Mäuse 124 Wochen alt, was bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von  $\geq 3$  Jahren einem fortgeschrittenen Greisenalter beim Menschen entspräche und als stark gealtert definiert wird (Fox et al. 2007). Um potentielle Neurodegeneration zu detektieren, wurde die Schichtung im Kortex, das neuronale Band im Hippocampus sowie das Striatum im Hinblick auf Intensität und Verteilungsmuster des Markerproteins Neuronal Nuclei (NeuN) und der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung untersucht. Darüber hinaus wurde ein Mausmodell zur Untersuchung von potentiell vermehrtem oxidativen Stress entwickelt: die Drebrin-Knockout/ GPX4-Heterozygoten (DBN-KO/GPX4-Het)-Mäuse. Dies sind DBN-KO Mäuse mit einer Punktmutation im aktiven Zentrum der Glutathionperoxidase 4 (GPX4; Brütsch et al. 2015). Die GPX4 ist Teil eines wichtigen antioxidativen Schutzsystems, das die dauerhaft in der Zelle produzierten ROS reduziert und damit unschädlich macht (Brigelius-Flohé und Maiorino 2013). Daher wurde vermutet, dass bei einem heterozygoten/partiellen GPX4-Knockout die Mäuse somit mehr oxidativem Stress ausgesetzt wären. Mäuse mit einem homozygoten Knockout der GPX4 sind nicht lebensfähig (Imai et al. 2003). Die Auswirkungen dieses potentiell vermehrten zellulären Stresses auf die Drebrin-defizienten Neurone könnten weitere Informationen über mögliche Drebrin-vermittelte Widerstandsmechanismen der Neurone liefern.

### 1. 3. **A $\beta$ -Monomere und ADDLs (=A $\beta$ -Oligomere)**

Eine erhöhte Größe und Zahl an Endosomen ist einer der frühesten Marker von Neurodegeneration z.B. bei Alzheimer-Demenz, Niemann-Pick Typ C sowie dem Down-Syndrom und tritt meist bereits Dekaden vor Amyloid- $\beta$ (A $\beta$ ) -Plaques und kognitiven Defiziten auf (Prasad und Rao 2018). Ein „endosomaler Stau“ ist der vereinende Mediator nachgelagerter Pathologien in der neurodegenerativen Erkrankung Alzheimer-Demenz und ein „Entstauen“ der Endosomen hätte somit ein hohes therapeutisches Potential (Small et al. 2017).

Durch Endozytose-aufgenommene Moleküle gelangen zunächst in Endosomen, die die Hauptsortierstation zur Kontrolle der Balance zwischen endozytotischer Wiederverwendung (Recycling) und lysosomaler Degradation sind (Weeratunga et al. 2020). Während der Ausreifung der hochdynamischen Endosomen vom frühen zum späten Endosom liegen verschiedenste Ras-related in brain-monomere G-Proteine (Rab-GTPasen) vor, die sich typischerweise in bestimmten Mikrodomänen mit unterschiedlichsten Funktionen befinden (Norris und Grant 2020). Ein Drebrin-Verlust beeinflusst auch den endosomalen Transport: So zeigten Drebrin-suffiziente Wildtyp-Astrozyten eine Mikrotubuli-assistierte Bildung tubulärer Endosomen von verletzungsspezifischen Rab8-Vesikeln, die einen einwärtsgerichteten Transport in das Zellzentrum fördern könnten (Schiweck et al. 2021). DBN-KO Astrozyten waren zwar generell fähig zur Endozytose, wiesen jedoch eine Akkumulation von Endosomen in Membranzisternen-ähnlichen Strukturen in der Zellperipherie und direkt unterhalb der Membran auf (Schiweck et al. 2021).

Einer der größten Risikofaktoren für Alzheimer-Demenz und kognitiven Abbau, das  $\epsilon$ 4 Allel von Apolipoprotein E (ApoE4), verstärkt eine präsymptomatische endosomale Dysfunktion und führt zum defekten endozytotischen Abbau (Clearance) von A $\beta$  (Prasad und Rao 2018). Es kann davon ausgegangen werden, dass der A $\beta$ -Metabolismus durch die Astrozyten moduliert wird. So findet die A $\beta$ -Aufnahme in die Astrozyten durch den Low density lipoprotein receptor-related protein 1(LRP1)-Rezeptor statt und durch die Blockade dieses LRP1-Signalwegs durch ApoE4 kann die Aufnahme von A $\beta$  in die Astrozyten vermindert werden (Liu et al. 2017).

Die Ansammlung und Ablagerung von A $\beta$ -Peptiden in Form seniler Plaques im Gehirn, die aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP) herausgespalten werden, ist neben der Bildung von Neurofibrillenbündeln aus Tau-Protein einer der zentralen beobachteten pathologischen Veränderungen in der Entwicklung der Alzheimer-Demenz (Hardy und Selkoe 2002, Armstrong 2009). So wird die Pathogenese der Alzheimer-Demenz gemäß der „Amyloid-Hypothese“ durch eine Zunahme der Amyloid-Produktion ausgelöst (Hardy und Higgins 1992).

Dabei bleibt jedoch unklar, in welcher Form das Amyloid- $\beta$ -Peptid das Hirngewebe am meisten schädigt, wenngleich erste Hinweise auf eine vermutlich primär toxische Wirkung löslicher Oligomere des Amyloid- $\beta$ -Peptides (ADDLs = A $\beta$ -derived diffusible ligands) hindeuten, deren Applikation zu einer abweichenden Morphologie dendritischer Spines, einer Abnahme der Spine-Dichte sowie zu einer Drebrin-Verminderung in Neuronen führte (Kayed et al. 2003, Ishizuka und Hanamura 2017). Obwohl eine abschließende Klärung noch aussteht, deutet vieles darauf hin, dass lösliches, monomeres A $\beta$  vermutlich keine pathologischen Konsequenzen (Walsh und Selkoe 2007) und auch unlösliche Amyloid-Plaques nur lokal begrenzte Auswirkungen haben (Mucke und Selkoe 2012). Darüber hinaus fehlt eine eindeutige Korrelation zwischen dem Auftreten und der Anzahl amyloider Plaques und der Progression der Alzheimer-Demenz (Gong et al. 2003). Im Gegensatz dazu besteht die Attraktivität des Konzeptes löslicher Zwischenstadien zwischen Monomeren und Plaques in folgenden Punkten: In mehreren Studien zeigte sich eine solide Korrelation zwischen löslichen A $\beta$ -Spiegeln und dem Ausmaß von Synapsenverlust und kognitiver Dysfunktion (Lue et al. 1999, McLean et al. 1999). Darüber hinaus könnte so ein Kontinuum zwischen dem physiologischen Alterungsprozess mit ebenfalls auftretenden unlöslichen A $\beta$ -Peptiden, einem pathologischen Alterungsprozess als Zwischenstadium und Alzheimer Demenz mit deutlich erhöhten löslichen A $\beta$ -Spiegeln aufgezeigt werden (Wang et al. 1999). Außerdem wurde spezifisch durch A $\beta$ -Oligomere veränderte Langzeitpotenzierung beobachtet (Walsh et al. 2005), wohingegen die verstärkte Degradation von A $\beta$ -Monomeren keinen Einfluss auf die Langzeitpotenzierung zu haben scheint (Walsh et al. 2002). Die Auswirkungen einer direkten ADDL-Applikation auf Astrozyten sind bisher unbekannt.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Einleitung/ Fragestellung

Um die Rolle des endosomalen Transportes in Astrozyten bei der A $\beta$ -Aufnahme und die Konsequenzen eines Drebrin-Verlusts zu untersuchen, wurden optische Analysen von kultivierten Astrozyten mit den potentiell endosomalen Substraten Dextran, monomeren A $\beta$  und löslichen A $\beta$ -Oligomeren (ADDLs) durchgeführt. Dextran – ein Molekül mit einer molekularen Masse von 10-40 kiloDalton - dient dabei als Marker-Protein für die clathrin-abhängige Flüssigphasen-Endozytose der Astrozyten ähnlich zu einem Versuchsaufbau der Arbeitsgruppe um Cao (Cao et al. 2007). Das Schicksal der A $\beta$ -Monomere nach der rezeptorvermittelten Endozytose sowie der Modus der Aufnahme der A $\beta$ -Oligomere (ADDLs) und deren Verstoffwechslung in der Zelle wurden bislang noch nicht charakterisiert.

Das Aktinfilament-bindende Protein Drebrin ist ein wichtiger Modulator des Aktinnetzwerkes in neuronalen Zellen insbesondere in Neuronen und Astrozyten. Diese Arbeit soll dazu beitragen, eine erweiterte Charakterisierung degenerativer und potentiell protektiver Mechanismen des Zytoskeletts Drebrin-defizienter Zellen unter oxidativen Stress sowie  $\beta$ -Amyloid-Behandlung durchzuführen. Darüber hinaus soll das möglicherweise Drebrin-vermittelte intrazelluläre Schicksal von A $\beta$ -Monomeren und A $\beta$ -Oligomeren (ADDLs) innerhalb der Astrozyten näher untersucht und eine mögliche erhöhte Suszeptibilität Drebrin-defizienter Neurone und Astrozyten detektiert werden.

## **2. Methodik**

Alle Mäuse wurden unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen gehalten. Der Arbeitsgruppe liegt eine Genehmigung zur Tötung von Tieren (T0347/11, 30.01.2019) zwecks Organentnahme vor. Bei allen Experimenten und bei der Erstellung der Doktorarbeit wurde die „Satzung der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ befolgt.

### **2. 1. Erzeugung der DBN-KO-Mäuse**

Um die Auswirkungen eines Drebrin-Verlustes auf Neurone und Astrozyten zu untersuchen, wurde die Mauslinie des Stamms C57BL/6N Dbn1tm1a\_ Konditional Maus Projekt (KOMP) CSD40214 verwendet.

Die Erzeugung der DBN-KO Mäuse erfolgte mittels konditionaler Gendeletion (konditionaler Knockout) mittels cyclization recombination (Cre)/ locus of X-over P1 (loxP)-Rekombinationssystem (siehe dafür auch Willmes et al. 2017). Dafür wurde eine Mauslinie genetisch so verändert, dass sie den loxP-flankierten Genabschnitt exprimiert (gefloxte Maus) während die andere Mauslinie Cre exprimiert (Cre-Maus).

Zur Generierung der geflochten Maus wurde oberhalb des kritischen Exons in ein Intron des Drebrin-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine trapping-Kassette mit Splice-Acceptor- $\beta$ -Geo-Poly-A (SA- $\beta$ -Geo-pA) flankiert durch zwei Flippase-Recognition-Targets(FRT)-Erkennungsstellen und zwei lox-P-Sequenzen inseriert und in die Keimbahn eingebracht (siehe Abbildung 2A). Das Einbringen der loxP-Sequenzen in die Exon-flankierenden-Introns erfolgte unter Funktionserhalt des Gens, sodass phänotypisch kein Unterschied zwischen der geflochten Maus sowie der Wildtyp-Maus besteht.

Durch Kreuzung mit einer Rekombinase Flippase (FLP) exprimierenden Maus wurden die zwei FRT-Erkennungsstellen in den Nachkommen erkannt und entsprechend die SA- $\beta$ -Geo-pA-Kassette herausgeschnitten. Es entsteht ein präkonditionales Allel.



Als Resultat der Homozygotie für das Drebrin-Null-Allel wurden wie erwartet keine Drebrin-Proteine in den Gehirnlysaten der DBN-KO Maus detektiert (siehe Abbildung 2C). Darüber hinaus konnten Drebrin-Fragmente mit niedrigerem Molekulargewicht durch eine etwaige Drebrin-Expression der verbliebenen Exone ausgeschlossen werden. Das validierte die Eignung der genetisch modifizierten Mäuse für die Untersuchung der Auswirkungen eines Drebrin-Verlusts.

Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen (IVCs) unter Standardbedingungen (Raumtemperatur 22 ± 2 C, relative Feuchtigkeit 55 ± 10%) unter einem Tag-Nacht-Zyklus von 12h zu 12h mit künstlichem Licht gehalten. Die Tiere wurden mit pelletierter Mausnahrung ad libitum (Ssniff V1534-000) gefüttert und hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser.

## 2. 2. Erzeugung der DBN-KO/GPX4Het-Mäuse

Zudem hielt die Arbeitsgruppe DBN-KO/GPX4-Het-Mäuse. Dies sind DBN-KO Mäuse mit einer Punktmutation im aktiven Zentrum der Glutathionperoxidase 4 (GPX4; Brütsch et al. 2015). GPX4 ist Teil eines wichtigen antioxidativen Schutzsystems, das die dauerhaft in der Zelle produzierten ROS reduziert und damit unschädlich macht (Brigelius-Flohé und Maiorino 2013). Mäuse mit einem homozygoten Knockout der GPX4 sind nicht lebensfähig (Imai et al. 2003). Daher wurde vermutet, dass bei einem heterozygoten/partiellen GPX4-KO die Mäuse mehr oxidativem Stress ausgesetzt wären.

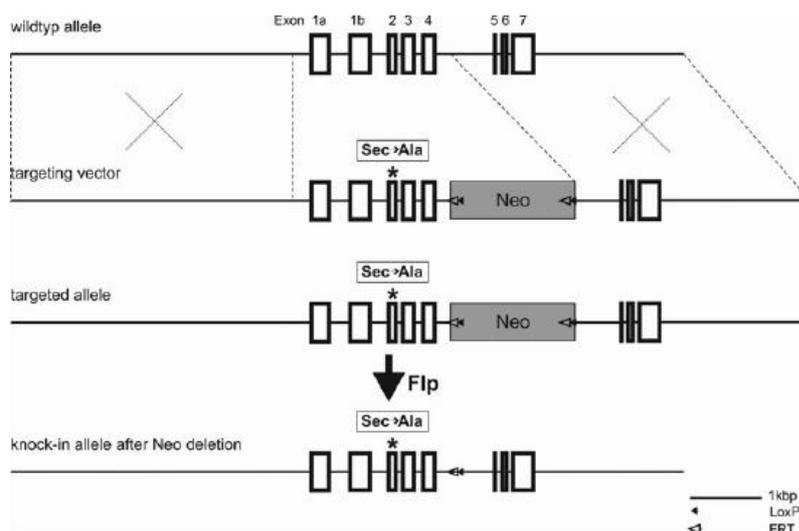


Abbildung 3: Generierung des Knock-In-Allels mittels homologer Rekombination mittels Zielvektor und Neomycin-Kassette, Oben: Struktur des Wildtyp-GPX4-Gens, der Asterisk kennzeichnet das Selenocystein Codon UGA in Exon 3. Für gezielte Knock-In Genmodifikation wurde das Selenocystein-UGA-Codon in das Alanin-GCA-Codon mutiert (Brütsch et al. 2015)

Die Erzeugung der GPX4-Het Mäuse erfolgte mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Mäuse mit dem Mutanten Sec46Ala-Konstrukt, einer katalytisch inaktiven GPX4-Variante durch Austausch eines katalytischen Selenocysteins (Codon UGA) mit einem redox-inaktiven Alanin (Codon GCA; Brütsch et al. 2015). Dabei wurde mittels gezielter Knock-In-Genmodifikation der Targeting-Vektor mit dem Alanin-GCA-Codon mit einer Neomycin-Kassette, die durch ein LoxP und zwei FRT-flankiert ist, in den Selenocystein-kodierenden Genabschnitt inseriert (siehe Abbildung 3). Dafür wurden 10µg des Targeting-Vektors zunächst durch Swal linearisiert und anschließend mittels Elektroporation in Bafilomycin A1 (BA1; C57BL/6 x 129/svEv) hybride embryonale Stammzellen transfiziert. Nur Neomycin-resistente Klone wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) analysiert und die rekombinanten embryonalen Stammzellen in C57BL/6-Blastozysten mikroinjiziert. Die resultierenden Chimären wurden mit FLP-Rekombinase exprimierenden Mäusen verpaart, um die zwei FRT-Erkennungsstellen in den Nachkommen zu erkennen und damit die Neomycin-Kassette wieder zu entfernen. Es entsteht ein präkonditionales Allel. Nachdem die Deletion der Neomycin-Kassette sowie die induzierte Punktmutation bestätigt wurden, wurden die Mäuse der ersten kindlichen Generation(F1)-Mäuse mit C57BL/6N WT-Mäusen verpaart, um das FLP Transgen zu entfernen. Schließlich wurden die heterozygoten F2-Mäuse verpaart und die resultierenden F3 Mäuse mittels PCR genotypisiert.

Anschließend wurden die GPX4-Het Mäuse mit den DBN-KO Mäusen gekreuzt, sodass DBN-KO/GPX4-Het-Mäuse hervorgebracht wurden.

Die Mäuse wurden in individuell belüfteten Käfigen (IVCs) unter Standardbedingungen (Raumtemperatur 22 ± 2 C, relative Feuchtigkeit 55-10%) unter einem Tag-Nacht-Zyklus von 12h zu 12h mit künstlichem Licht gehalten. Die Tiere wurden mit pelletierter Mausnahrung ad libitum (Ssniff V1534-000) gefüttert und hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser.

### 2. 3. **Drebrin in Neuronen**

Um zu untersuchen, ob ein Drebrin-Verlust langfristig zu Neurodegeneration führt, wurden die Gehirne von jungen adulten (10 Wochen alten) sowie stark gealterten (124 Wochen alten) DBN-WT und DBN-KO Mäusen sowie von gealterten (72 Wochen) und stark gealterten (95 Wochen) DBN-KO/GPX4-WT und DBN-KO/GPX4-Het Mäusen begutachtet. Dafür wurden Schnitte der Mäusegehirne mit Neuronal Nuclei (NeuN), Hämatoxylin-Eosin (HE) und der Kombinationsfärbung aus NeuN und Hämatoxylin (NeuNquickH) angefärbt und histologisch untersucht. Dabei diente NeuN als neuronaler Marker für die Darstellung der Neuronenverteilung und damit zum Aufspüren potentieller Neurodegeneration, wohingegen HE als allgemeiner Gewebemarker gegebenenfalls Entzündungsreaktionen detektieren sollte. Darüber hinaus erfolgte eine Färbung mit Hoechst 33342 als Marker für den Zellkern mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA; Atale et al. 2014).

#### **i) Immunhistochemie**

In der NeuN(Neuronal Nuclei)-Färbung wird ein Antikörper eingesetzt, der neuronenspezifisch an ein neuronales Kernprotein bindet, das in nahezu allen post-mitotischen Nervenzellen von Wirbeltieren exprimiert wird. Zerebelläre Purkinje-Zellen, Mitralzellen des Bulbus olfactorius sowie retinale Photorezeptorzellen werden aufgrund fehlender NeuN-Expression nicht angefärbt (Mullen et al. 1992). Jedoch kann man mit der NeuN-Färbung die meisten reifen/ adulten Neurone in Gewebeproben und Gehirnschnitten detektieren. Daher eignet sich die NeuN-Färbung besonders für die Beurteilung der Neuronenverteilung in den Gehirnschnitten und damit zur Detektion potentieller Neuronenverluste in spezifischen Hirnarealen. Von besonderem Interesse war hierbei eine potentielle Darstellung von Neurodegeneration in der Hippocampusformation, da bei Läsionen oder Neuronenverlusten in dieser Region bekanntermaßen kognitive Verhaltensauffälligkeiten bei Mäusen detektiert werden können.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Methodik

Bei der indirekten Immunhistochemie werden die fixierten Gehirnschnitte mit einem ersten Antikörper behandelt, der in diesem Fall spezifisch an neuronale Kernproteine (NeuN) bindet und damit reife/ adulte Nervenzellen im Schnitt detektiert. An diesen ersten Antikörper bindet ein biotinylierter zweiter Antikörper, der spezifisch gegen Antikörper einer bestimmten Spezies (in diesem Fall Anti-Maus) wirkt. Aufgrund der Affinität von Avidin zu Biotin bindet nun ein chromogenes Avidin-Enzym und bildet somit einen Avidin-Biotin-Komplex (ABC) mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper. Dieses Enzym sorgt unter Zugabe eines Substrates für Substratumsatz und dadurch für die Herstellung eines Farbstoffes an der durch den ersten Antikörper markierten Stelle des Gehirns. Somit können die neuronalen Kernproteine nachgewiesen werden.

Die Gehirnschnitte wurden über Nacht mit Blockingsolution bestehend aus 1% Triton X-100/10% Ziegenserum (Goat Serum = GS) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) blockiert und permeabilisiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Waschvorgang mit 0,5% Polysorbat-20 (Tween)/2% GS in PBS für jeweils circa 5-10 min. Danach wurde der erste Antikörper gegen NeuN (Mouse Anti-NeuN Antibody Clone A60 MAB377, monoklonaler Antikörper von Mäusen, Millipore, Verdünnung 1:100) über Nacht hinzugegeben. Am dritten Tag erfolgte erneut ein Waschvorgang mit PBS (0,5% Tween/ 2% GS), ein erneutes Blockieren mit Blockingsolution sowie eine 30-minütige Inkubation mit einem biotinyliertem zweiten Antikörper – in diesem Fall nach dem ersten Antikörper Anti-Maus (Vectastain).

Daraufhin wurde mit PBS gewaschen, mit dem Vectastain ABC Reagent A und B 30 min inkubiert und zuletzt erneut mit PBS gewaschen.

Für die Färbung der Schnitte wurden diese mit Peroxidase Substrat Solution 3,3-Diaminobenzidin (DAB; ImmPACT DAB Chromogen und Diluent aus dem Peroxidase Substrat Kit SK-4105, VectorLabs) inkubiert. Nachdem die erwünschte Farbintensität erreicht wurde (circa fünf Minuten), wurden die Schnitte mehrfach mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) gewaschen, um die Farbreaktion zu stoppen. Schließlich wurden die angefärbten Schnitte auf Objektträger aufgezogen, leicht angetrocknet und mit der Eindecklösung Mowiol (40 ml PBS, 20 ml Glycerol, 2g 1,4-Diazabicyclo-(2,2,2)octan (DABCO)) eingedeckt.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Methodik

Außerdem erfolgten weitere Färbungen mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie die Kombinationsfärbung mit NeuN und Hämatoxylin-Eosin (NeuNquickHE). Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen, z.B. den Zellkern mit DNA oder das raue endoplasmatische Retikulum, blau, Eosin färbt die extrazelluläre Matrix und das Zytoplasma pink (Fischer et al. 2008). Die restlichen Zellstrukturen nehmen andere Farbtöne als Kombinationen dieser Farben an. Somit zeigt die Färbung die generelle Architektur und Verteilung der Zellen, ermöglicht einen allgemeinen Überblick über die Gehirnschnitt-Struktur und erlaubt zwischen den nukleären und zytoplasmatischen Anteilen der Zelle zu unterscheiden. Darüber hinaus erfolgte eine Färbung mit Hoechst 33342 als Marker für den Zellkern mit der DNA (Atale et al. 2014).

## **ii) Mikroskopische Analyse**

Die mikroskopische Analyse erfolgte am Olympus BX61 Mikroskop, an dem Bilder mittels „cell sens“ Software erstellt wurden, sowie am NikonTiWidefield Mikroskop, an dem Bilder mittels „NIS Elements“ Software erstellt wurden.

Die Bildbearbeitung, das manuelle Zusammensetzen der Übersichtsaufnahmen sowie das Erstellen der Abbildungen erfolgte mit „ImageJ“ und Microsoft „PowerPoint“.

Durch die Intensität sowie das Verteilungsmuster der neuronalen Marker im histologischen Bild konnten Rückschlüsse auf die Neuronendichte im Kortex, der Hippocampusschleife sowie im Striatum gezogen werden.

## 2. 4. **Drebrin in Astrozyten**

### **i) Isolation und Kultivierung kortikaler Astrozyten von Mäusen**

Die Isolation und Kultivierung kortikaler Mausastrozyten erfolgte nach dem Standard-Protokoll der Arbeitsgruppe (Schiweck et al. 2021). Dabei wurden die kortikalen Astrozyten von DBN-WT und DBN-KO-Mäusen nach dem Standard-Entnahmeverfahren bei Ratten (Murk et al. 2013) entnommen. Die Kortexhälften wurden in „Hank’s Balanced Salt Solution“ (HBSS, gibco) gesammelt und anschließend mit möglichst wenig Flüssigkeit einzeln in 2 ml Eppendorfgefäße transferiert. Zu Beginn erfolgte die Präparation und Aussaat der Kortices gebündelt, wodurch die Zahl der Experimente N der Anzahl der unabhängigen biologischen Replikate n (= Kortices der unterschiedlichen Versuchstiere) entsprach. Durch später folgende einzeln erfolgende Präparation der Kortices der unterschiedlichen Versuchstiere und die getrennte Aussaat der Astrozyten, konnten mehrere unabhängige biologische Replikate n in einem Experiment und damit eine höhere Gesamtzahl an unabhängigen Parametern erfasst werden. Nach Zugabe von 0,25 ml Trypsin (LifeTechnologies) pro Cortexhälfte wurde das Gewebe mechanisch mittels Pipette zerkleinert und für 15 min im 37°C-Wasserbad inkubiert. Alle 3 min erfolgte dabei eine Trituration, damit das Gewebe möglichst gleichmäßig trypsinisiert wurde und keine Gewebsüberreste zurückblieben. Danach wurde das Trypsin durch Zugabe von Astrozyten-Standardmedium (nachfolgend Medium) bestehend aus „Dulbecco’s modified Eagle’s medium“ mit hohem Glukosegehalt (DMEM GlutaMAX, Lonza) mit 10% Fetalen Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin (P/S) inhibiert. Anschließend wurde das Gemisch auf mit 15 ml Medium gefüllte T75 Flaschen ausgesät. Die Flaschen wurden vorher für 30 min mit Kollagen I (0,025%, BD Biosciences) und 100 µg/ml Poly-Ornithin (Sigma). beschichtet. Es erfolgte ein Mediumwechsel am folgenden Tag sowie eine dreiwöchige Anzucht mit wöchentlichen Mediumwechseln.

Nach 21 Tagen wurde eine Behandlung der Kulturen mit 60 mM L-Leucin-Methylester (LME, Sigma) in Medium für 15-45 min zur Eliminierung von Mikroglia durchgeführt. Sobald die Astrozyten zu 90% konfluierend waren, wurden die Zellen auf für 60 min mit Kollagen I/Poly-Ornithin (s.o.) beschichteten 18mm-Deckglässchen oder ibidi-Dishes aufgeteilt. Dafür wurden die Kulturen mit 15 ml warmen HBSS gewaschen und anschließend mit 4 ml warmen Trypsin pro Flasche für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Methodik

Dabei werden die Astrozyten durch energetische, seitlich-tangentiale Schläge gegen die Zellkulturflasche abgelöst, was optisch unter dem Mikroskop geprüft wurde. Nach mehrmaligem Abspülen des Flaschenbodens mit 8 ml Medium wurde das Astrozyten-Gemisch in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt, bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellsediment mit 10 ml Medium resuspendiert. Daraufhin wurden die Astrozyten in der gewünschten Dichte (zumeist 100.000 Zellen pro 18mm-Deckglässchen) auf die Deckglässchen ausgesät.

Die Durchführung der Experimente erfolgte circa 2-3 Tage später, nachdem die Astrozyten auf den Deckglässchen eine circa 90%ige Konfluenz erreicht hatten.

Alle verwendeten Materialien waren steril und die Arbeit an den Kulturen wurde an Klasse II Zellkulturbänken (ThermoFisherScientific) durchgeführt.

#### **ii) Transfektion mit Rab 5/7/8 sowie ApoE2/4**

Ein Teil der Astrozyten-Zellkulturen wurde circa 48 Stunden nach Aussaat auf die Deckglässchen mit fluoreszierenden Rab5, 7 und 8 sowie ApoE2 und 4 mittels Trans IT LT1 Transfektions-Reagenz (Mirus) nach Protokoll des Herstellers transfiziert. Dafür wurde der Transfektions-Mix mittels Zugabe von eGFP-Rab5, mScarlett-Rab7, eGFP-Rab8, mScarlett-ε2 Allel von Apolipoprotein E (ApoE2) oder mScarlettApoE4 in einem Eppendorf Gefäß vorbereitet, sodass diese in 1 µl Endkonzentration vorlagen. Die vorherige Präparation der Plasmide erfolgt mittels „NukleoBond Xtra Maxi“-Kit (Macherey-Nagel) nach Protokoll des Herstellers. Daraufhin wurden 50 µl serum-freies Medium (Opti-Men I reduced-serum Medium, Gibco) sowie 3µl Mirus zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Komplexe des Transfektions-Reagenzes mit der Rab-DNA bildeten. Es folgte die 90-minütige Inkubation der auf den Deckglässchen ausgesäten Astrozyten mit dem vorbereiteten Opti-Men-Transfektions-Mix bei 36 °C und ein anschließender Mediumwechsel. Die Durchführung der Experimente erfolgte circa 24 Stunden nach Transfektion.

### **iii) Behandlung mit Dextran als Marker für Flüssigphasen-Endozytose**

Nach oben beschriebener Standardanzucht wurden einem Teil der Kulturen mechanische Verletzungen („gescratched“ = nachfolgend „Scr“) zugefügt, um eine in vitro Aktivierung der Wundheilung der Astrozyten vergleichbar mit anderen ZNS-Verletzungen zu erreichen (Schiweck et al. 2021). Dafür wurde 24 Stunden vor Fixation eine kleine Pipettenspitze (200 µl) schräg gehalten gerade von oben nach unten über das Deckglässchen gezogen. Danach wurde mit 10 µg Dextran (Dextran Texas Red, invitrogen, nachfolgend „Dextran 595“) pro ml Medium für eine 24h Verlaufsstudie (24/12/8/2/1 h) bei 37°C inkubiert, um die Flüssigphasen-Endozytose-Aktivität jeweils im aktivierten und nicht-aktivierten Zustand zu verfolgen.

Nach der gewünschten Inkubationsdauer und Waschen mit HBSS wurden die Astrozyten für 20 min mit PHEM PFA Sucrose (3,7% Paraformaldehyd, 4% Sucrose, 25mM HEPES, 60mM PIPES, 10mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min in 0,02% Triton X-100/ 1% Album V Fraktion in PHEM Puffer (pH 7.4, 25mM HEPES, 60mM PIPES, 10mM EGTA, 2mM MgCl<sub>2</sub>) gleichzeitig permeabilisiert und unspezifische Antikörper-Bindungsstellen blockiert. Nach Waschen mit PHEM Puffer erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Acti-Stain-488 Phalloidin (1:200 Verdünnung, Cytoskeletton) und ein anschließender Waschvorgang mit PHEM Puffer. Beim letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe des Farbstoffes Hoechst 33342 (1:10.000, invitrogen) und die Inkubation für 5 min. Schließlich wurden die Deckglässchen mittels ProLongGold Antifade Einbettungsmedium (Invitrogen) auf Objektträgern eingedeckelt.

### **iv) Behandlung mit A $\beta$ -Monomeren**

Wie unter 3.4. ii) beschrieben wurde einem Teil der Kulturen 24h vor Fixation eine mechanische Verletzung zugefügt, um eine in vitro Aktivierung der Wundheilung der Astrozyten herbeizuführen. Gleichzeitig mit der Aktivierung der Astrozyten erfolgte die Inkubation mit 1 µl pro 1 ml Medium (Endkonzentration 1µg/ml, 0,2 µM) humanem  $\beta$ -Amyloid (1-42) HiLyte Fluor 647 (AnaSpec) für 24h bei 37°C. Nach der gewünschten Inkubationsdauer wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, fixiert, blockiert und permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit PHEM Puffer erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem 1. Antikörper anti-Rab8 (Sicgen) und anschließend ein dreimaliger Waschvorgang mit PHEM Puffer.

Daraufhin wurden die Astrozyten für eine Stunde mit den 2. Antikörper Anti-Goat Alexa-488 (Invitrogen) und dem Fluoreszenz-Farbstoff Acti-Stain-555 Phalloidin (Cytoskeleton) inkubiert. Es folgten wie oben beschrieben ein Waschvorgang mit PHEM Puffer, die Färbung mit Hoechst sowie das Eindeckeln.

#### **v) Behandlung mit A $\beta$ -Oligomeren (ADDLs)**

Wie unter 3.4. ii) beschrieben wurde einem Teil der Kulturen 24h vor Fixation eine mechanische Verletzung zugefügt. Gleichzeitig mit der Aktivierung der Astrozyten wurde mit 1:250 (Endkonzentration 0,4  $\mu$ M) Alexa-488-markierten ADDLs für 24h bei 37°C inkubiert. Die Produktion des oligomeren, löslichen A $\beta$ 1-42 (ADDLs) erfolgte nach dem Standard-Protokoll der Arbeitsgruppe (Kreis et al. 2013). Die A $\beta$ -Peptide (Peptid Synthese Haupteinrichtung/Core Facility) wurden in eiskalten 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol (HFIP, Sigma) in 2,5mg/ml Konzentration (0,554 mM) aufgelöst und in 50 $\mu$ l Aliquats bei -80°C gelagert. Danach erfolgte für die oligomere Präparation die Verdunstung des HFIP in einem SpeedVac Vakuum Konzentrator für 30 min. Nachfolgend wurde das monomerisierte Peptid in 5,5 $\mu$ l Dimethyl-Sulphoxid (DMSO) resolubilisiert, in PBS in 100 $\mu$ M Konzentration verdünnt und bei 4°C für 48h inkubiert, um Oligomere zu bilden. Um potentiell filamentöses Material zu entfernen, wurden die Zentrifugenröhrchen bei 17.000xg für 15 min zentrifugiert und der Überstand, der die oligomere Präparation enthielt, wurde in ein neues Röhrchen transferiert. Im Anschluss erfolgte die Markierung mittels „Alexa Fluor 488 Microscale Protein Labelling Kit“ (A30006, Invitrogen). Dafür wurden 8,85  $\mu$ l des Alexa Fluor 488 TFP Esters (11,3 nmol/ $\mu$ l) zur Oligomerpräparation hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundenen Farbstoff kovalent markierten ADDL488 zu trennen, wurde eine Affinitätsmatrix-basierte Abtrennung des ungebundenen Farbstoffes durchgeführt. Die finale Verdünnung betrug 1,2  $\mu$ M. Ein anderer Teil der Astrozyten-Kulturen wurde 24h vor Fixation mit 1 $\mu$ g/ml DMSO als Vehikel-Kontrolle zur Quantifizierung eines möglichen Backgrounds im 488-Kanal behandelt. Nach der gewünschten Inkubationsdauer wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen, fixiert, blockiert und permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit PHEM Puffer erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem 1.Antikörper anti-Rab8 (Sicgen) und anschließend ein dreimaliger Waschvorgang mit PHEM Puffer.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Methodik

Daraufhin wurden die Astrozyten für eine Stunde mit den 2. Antikörper Anti-Goat Alexa-568 (Invitrogen) und dem Fluoreszenz-Farbstoff Phalloidin Atto 647 (SigmaAldrich) inkubiert. Es folgten wie oben beschrieben ein Waschvorgang mit PHEM Puffer, die Färbung mit Hoechst sowie das Eindeckeln.

Für spätere Experimente mit Rab5-, Rab7- und Rab8-transfizierten Astrozyten erfolgte die Behandlung mit 1:250 (Endkonzentration 0,4  $\mu$ Molar) Alexa-647-markierten ADDLs für 24h bei 37°C. Die Herstellung sowie das Labelling der Alexa-647-markierten ADDLs erfolgten nach demselben Protokoll wie für die Alexa-488-markierten ADDLs (s.o.).

### **vi) Quantifizierung und Statistische Auswertung**

Die mikroskopische Analyse erfolgte am konfokalen Leica DMI 6000 SP8 Fluoreszenz-Mikroskop des neurowissenschaftlichen Forschungszentrums der Charité, an dem Bilder mittels „Leica Application Suite (LAS) X“ Software erstellt wurden.

Die Aufnahme des Dextrans, der A $\beta$ -Monomere sowie der ADDLs in die Astrozyten wurde mittels Bildverarbeitung („surface tool“, IMARIS software, Bitplane) quantifiziert. Dabei können Objekte oberhalb eines definierten Intensität-Schwellenwertes identifiziert und deren Parameter erfasst werden. Mittels „surface tool“ wurde auch die Fläche der Nuklei erfasst, um eine Korrelationsanalyse zwischen Nukleus-Fläche und Anzahl der aufgenommenen A $\beta$ -Monomere/ -Oligomere (ADDLs) durchzuführen. Darüber hinaus wurde eine Analyse der Kolokalisation zwischen A $\beta$ 647-Monomer/ADDL488-Oligomer-Signal und Nukleus-Signal (Hoechst) in DBN-WT Astrozyten auf Grundlage des Intensitäts/Voxel-basierten Ansatzes durchgeführt („colocalisation tool“, IMARIS software, Bitplane). Dabei werden Objekte oberhalb eines definierten Intensitäts-Schwellenwertes identifiziert und deren Grad an Kolokalisation berechnet. Die Bildbearbeitung sowie das Erstellen der Abbildungen erfolgten mit „ImageJ“, Microsoft „PowerPoint“ und „Draw.io“.

Die statistische Auswertung der Daten wurde in GraphPadPrism 8.0 unter anderem in Form von Superplots nach dem Vorbild von (Lord et al. 2020) durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3. 1. Drebrin in Neuronen**

Um zu untersuchen, ob ein Drebrin-Verlust langfristig zu Neurodegeneration führt, wurden die Gehirne von jung-adulten (10 Wochen alten) sowie stark gealterten (124 Wochen alten) DBN-WT und DBN-KO Mäusen begutachtet. Dafür wurden Schnitte der Mäusegehirne mit NeuN angefärbt und histologisch untersucht. Durch Beurteilung der Intensität und des Verteilungsmusters von NeuN konnten Rückschlüsse auf die Neuronenverteilung gezogen und potentielle Neurodegeneration detektiert werden.

Die typische Morphologie der Drebrin-suffizienten und Drebrin-defizienten Mäuse ist anhand von Beispielbildern in Abbildung 4 gezeigt.

In den jung-adulten DBN-WT Mäusen zeigt sich eine typische Schichtung von Neuronen im Kortex (insbesondere eine dichte Packung der Zellen in den zellkörperreichen Schichten), ein durchgängiges neuronales Band der Hippocampusformation vor allem in der Cornu Ammonis 3 (CA3)-Region mit den pyramidalen Zellkörpern sowie eine normale Neuronenverteilung im Striatum. Die Signalintensität sowie Neuronenverteilung ist homogen, es gibt keine Hinweise auf eine Ausdünnung oder insbesondere lokale „Unterbrechungen“ in der CA3-Region, die ein starkes Indiz für einen Neuronenverlust darstellen würden.

Die Intensität und Neuronenverteilung ist bei den jung-adulten DBN-KO Mäusen in Kortex, Hippocampus sowie Striatum im Vergleich zu den jung-adulten DBN-WT Mäusen identisch. Daher gibt es auch hier keinerlei Anzeichen für eine stattgehabte Neurodegeneration, die bereits im jung-adulten Gehirn beginnt.

Bei den stark gealterten DBN-WT Mäusen sind die Neurone des neuronalen Bandes in der CA3-Region des Hippocampus deutlich weniger intensiv gefärbt und die dichte Packung der Zellkörper in der CA3-Region zeigt sich leicht ausgedünnt. Demzufolge liegt hier vermutlich eine geringere Anzahl an NeuN positiven Neuronen vor, was möglicherweise ein Hinweis auf eine beginnende Neurodegeneration sein könnte. Dagegen zeigen sich Kortex und Striatum hinsichtlich Intensität und Neuronenverteilung identisch zu den jungen adulten DBN-WT Mäusen und weisen demnach keinerlei Anzeichen für Neurodegeneration auf.

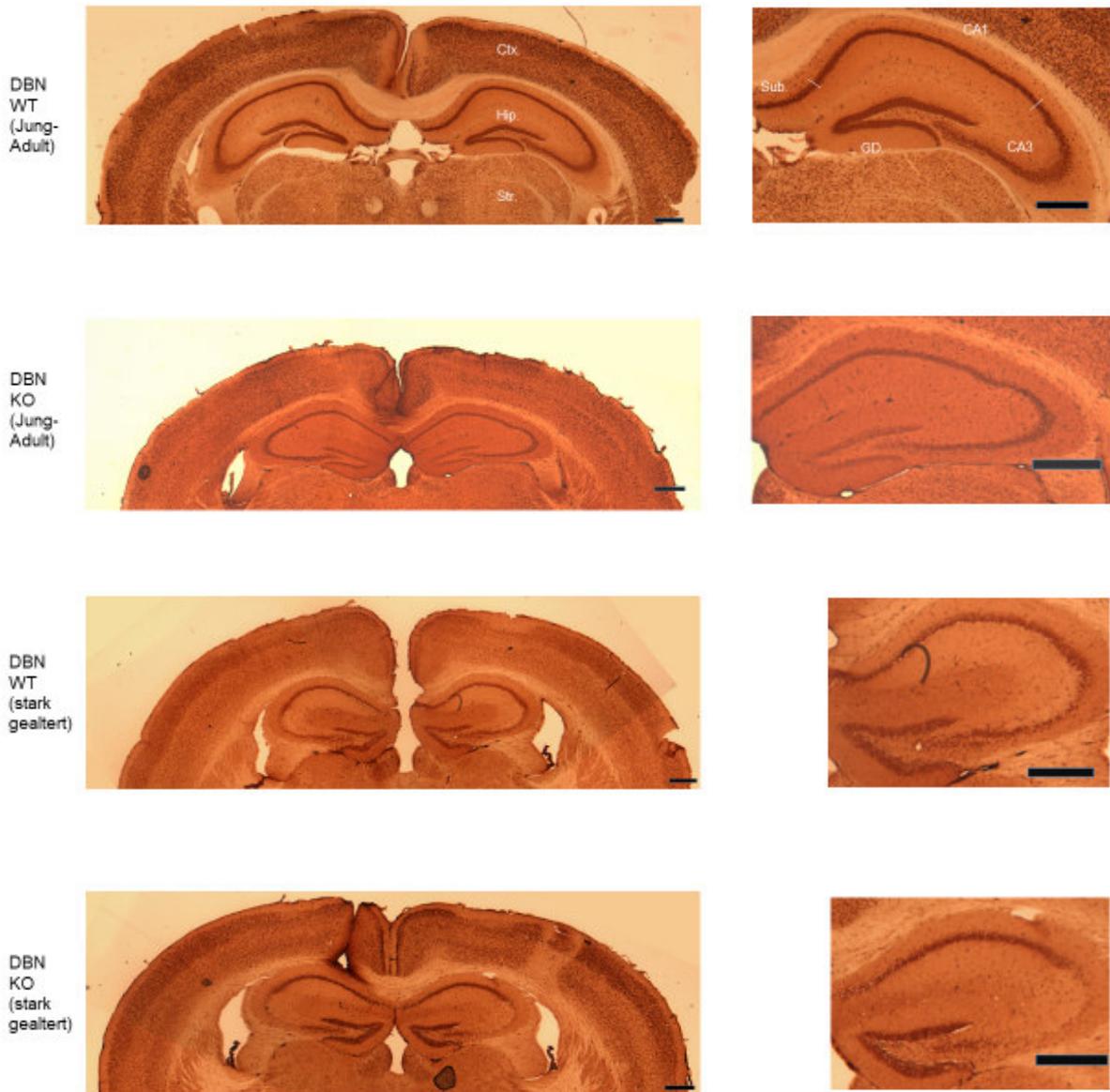


Abbildung 4: NeuN-Färbung der hippocampalen Region von jung-adulten und stark gealterten DBN-WT und DBN-KO Mäusen. Deutlich erkennbare Signalabschwächung in CA3-Region der stark gealterten DBN-KO Maus. Ctx. – Kortex, Hip. – Hippocampus, Str. – Striatum, Sub. Subiculum, GD. – Gyrus dentatus, Maßstab entspricht 500µm

Im Gegensatz dazu ist die Neuronenverteilung des neuronalen Bandes zwischen CA1-Region und Gyrus dentatus des Hippocampus – also der CA3-Region - bei den stark gealterten DBN-KO Mäusen lückenhaft unterbrochen. In der CA3-Region ist die Signalintensität von NeuN wesentlich geringer, was für eine selektive Neurodegeneration dieser pyramidalen Neurone spricht. Der Kortex und das Striatum sind hinsichtlich Intensität und Neuronenverteilung identisch zu den jung-adulten DBN-WT Mäusen.

Nachfolgend wurden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) durchgeführt, deren typische Morphologie im Vergleich zu der reinen NeuN-Färbung in Abbildung 5 ersichtlich wird. Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen, z.B. den Zellkern mit DNA oder das raue endoplasmatische Retikulum, blau, Eosin färbt die extrazelluläre Matrix und das Zytoplasma pink (Fischer et al. 2008). Die restlichen Zellstrukturen nehmen andere Farbtöne als Kombinationen dieser Farben an. Somit zeigt die Färbung die generelle Architektur und Verteilung der Zellen, ermöglicht einen allgemeinen Überblick über die Gehirnschnitt-Struktur und erlaubt zwischen den nukleären und zytoplasmatischen Anteilen der Zelle zu unterscheiden. In den stark gealterten DBN-WT und -KO Mäusen zeigt sich eine typische Schichtung von Neuronen im Kortex, ein durchgängiges neuronales Band in der Hippocampusformation sowie eine normale Neuronenverteilung im Striatum. Die Signalintensität sowie Neuronenverteilung ist homogen, es gibt keine Hinweise auf lokale „Unterbrechungen“ insbesondere in der CA3-Region und somit – im Gegensatz zu den Auffälligkeiten in der NeuN-Färbung - keinerlei Anzeichen für einen kompletten Neuronenverlust. Demnach deutet der Verlust von NeuN in den Neuronen der CA3-Region des Hippocampus von stark gealterten Mäusen auf mögliche Veränderungen – jedoch nicht auf Neurodegeneration - hin.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Ergebnisse

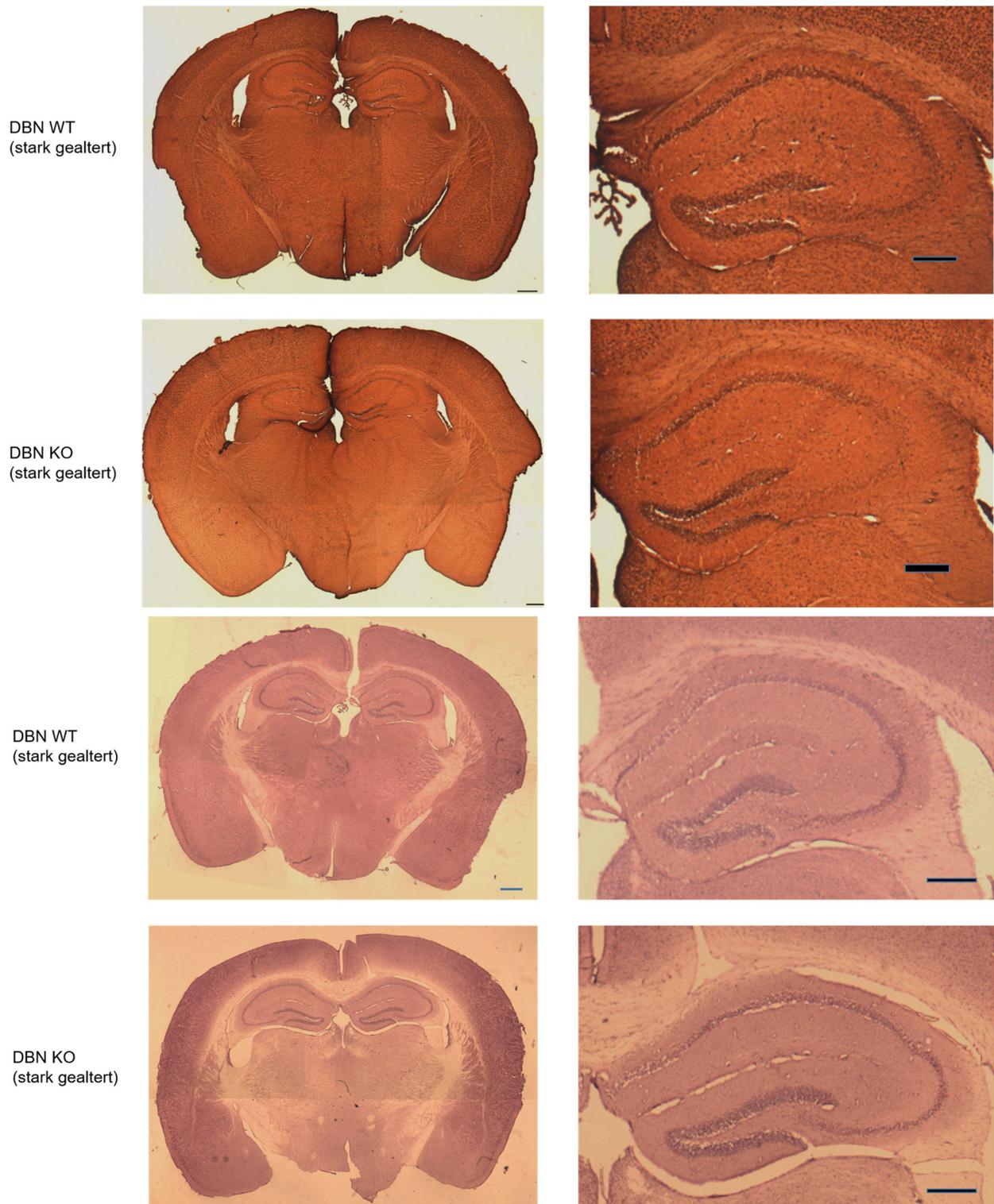


Abbildung 5: NeuN-Färbung (oben) und HE-Färbung (unten) der hippocampalen Region von stark gealterten DBN-WT und DBN-KO Mäusen. Deutlich erkennbare Signalabschwächung in CA3-Region der stark gealterten DBN-KO Maus in der NeuN-Färbung. Keine erkennbare Signalabschwächung in der HE-Färbung. Maßstab entspricht 500µm

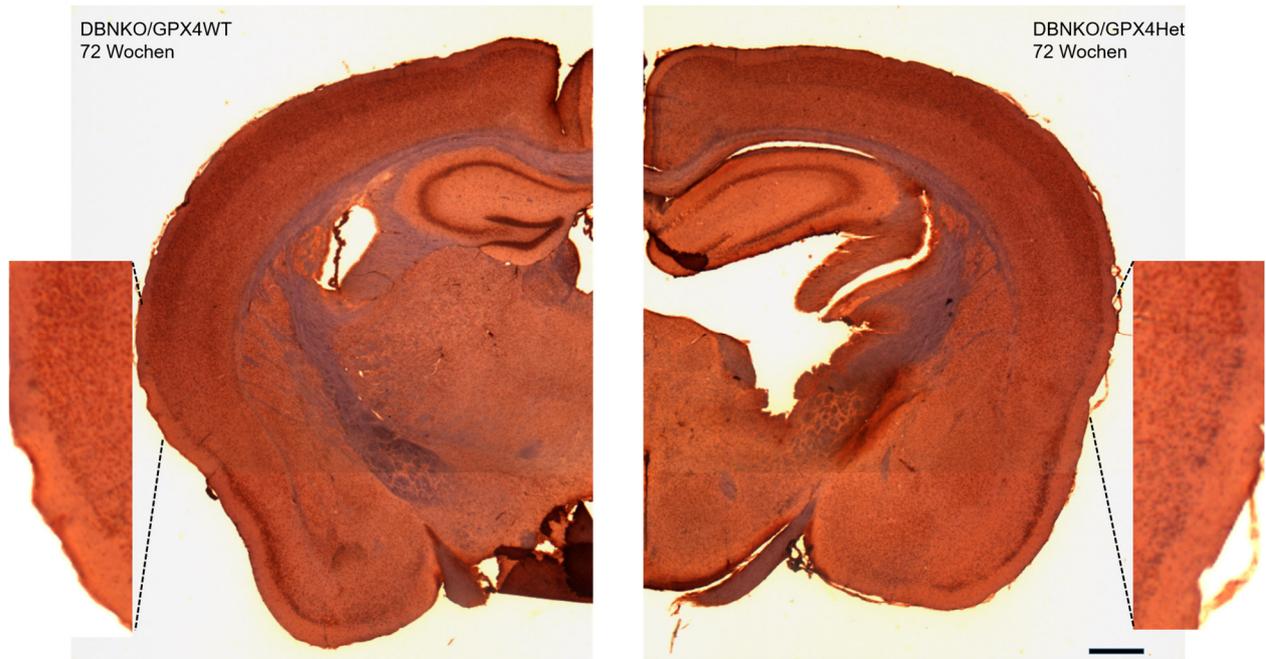


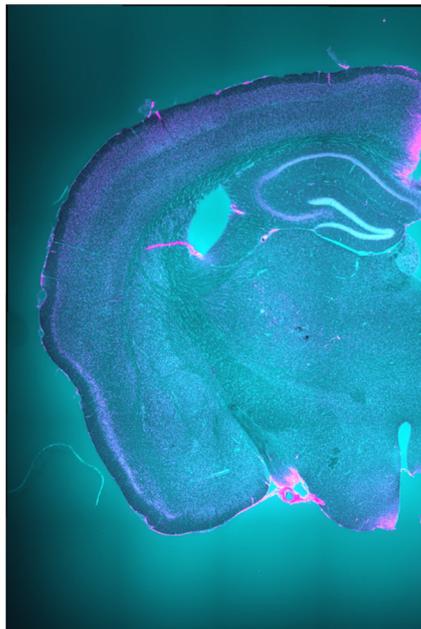
Abbildung 6: NeuN- (NovaRed, rot) und Hämatoxylin- (quickstain, blau) Färbung von 72 Wochen alten DBN-KO/GPX4WT und DBN-KO/GPX4Het-Mäusen, keine erkennbare Signalabschwächung in CA3-Region des Hippocampus, Maßstab entspricht 500µm

Um eventuell altersabhängige Prozesse durch vermehrten oxidativen Stress zu beschleunigen, wurden DBN-KO-Mäuse mit heterozygoten GPX4-Mäusen gekreuzt. Durch eine heterozygote Knock-In-Genmodifikation im Gen der GPX4, die in eine katalytisch inaktive GPX4-Variante durch Austausch eines katalytischen Selenocysteins transkribiert und translatiert wird, soll die Aktivität der GPX4 als wichtiges antioxidatives Schutzsystem um die Hälfte reduziert und somit die Zellen vermehrten oxidativen Stress ausgesetzt werden. Die typische Morphologie der Drebrin-defizienten sowie GPX4-suffizienten und GPX4-heterozygoten Mäuse im Alter von 72 Wochen (ca. 18 Monate) ist anhand von Beispielbildern in Abbildung 6 gezeigt. Es zeigt sich eine typische Schichtung von Neuronen im Kortex, ein durchgängiges neuronales Band in der Hippocampusformation sowie eine normale Neuronenverteilung im Striatum. Die Signalintensität sowie Neuronenverteilung ist homogen, es gibt keine Hinweise auf lokale „Unterbrechungen“ insbesondere in der CA3-Region und somit keinerlei Anzeichen für einen Neuronenverlust. Da bereits in den Drebrin-defizienten Mäusegehirnen keinerlei Anzeichen für Neuronenverlust in der Hippocampusformation sichtbar sind, ist dies ebenso in Drebrin-suffizienten Mäusen erwartbar. In den Abbildungen zeigen sich erneut Kortextbereiche in denen kein NeuN angefärbt ist, während die Hämatoxylin-Färbung

weiterhin die Zellkerne kennzeichnet. So weist der selektive NeuN-Verlust auch hier auf mögliche Veränderungen der Neurone im Alterungsprozess hin.

Abbildung 7 zeigt die typische Morphologie der jeweils Drebrin-defizienten sowie GPX4-suffizienten und GPX4-heterozygoten Mäuse im Alter von 95 Wochen (ca. 24 Monate) an Beispielbildern. Hier wurde mit Hoechst als Marker für den Nukleus sowie NeuN als Marker neuronaler Kernproteine gefärbt. Es zeigt sich eine typische Schichtung von Neuronen im Kortex, ein durchgängiges neuronales Band in der Hippocampusformation sowie eine normale Neuronenverteilung im Striatum. Die Signalintensität sowie Neuronenverteilung ist homogen, es gibt eine leichte Signalabschwächung in der CA3-Region des Hippocampus, die jedoch grenzwertig ist und somit kein direktes Anzeichen für einen Neuronenverlust liefert. Diese grenzwertige Signalabschwächung ist sowohl bei den DBN-KO/GPX4-WT als auch den DBN-KO/GPX4-Het Schnitten sichtbar. Demnach führt ein partieller Funktionsverlust der GPX4 nicht zu vermehrter Neurodegeneration.

DBNKO/GPX4WT  
95 Wochen



DBNKO/GPX4Het  
95 Wochen

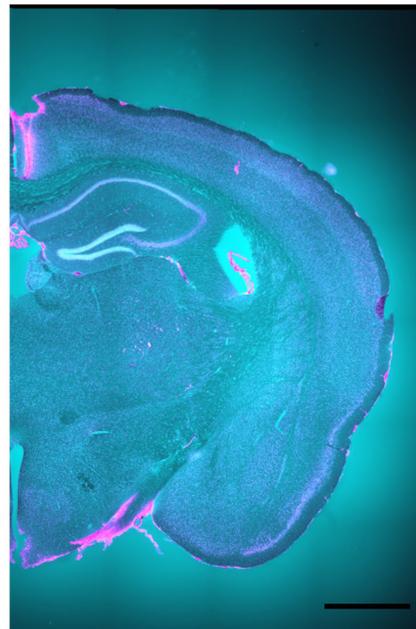


Abbildung 7: NeuN- (magenta) und Hoechst- (blau) Färbung von 95 Wochen alten DBN-KO/GPX4WT und DBN-KO/GPX4Het-Mäusen, keine erhebliche Signalabschwächung in der CA3-Region des Hippocampus, Maßstab entspricht 500µm

### 3. 2. Drebrin in Astrozyten

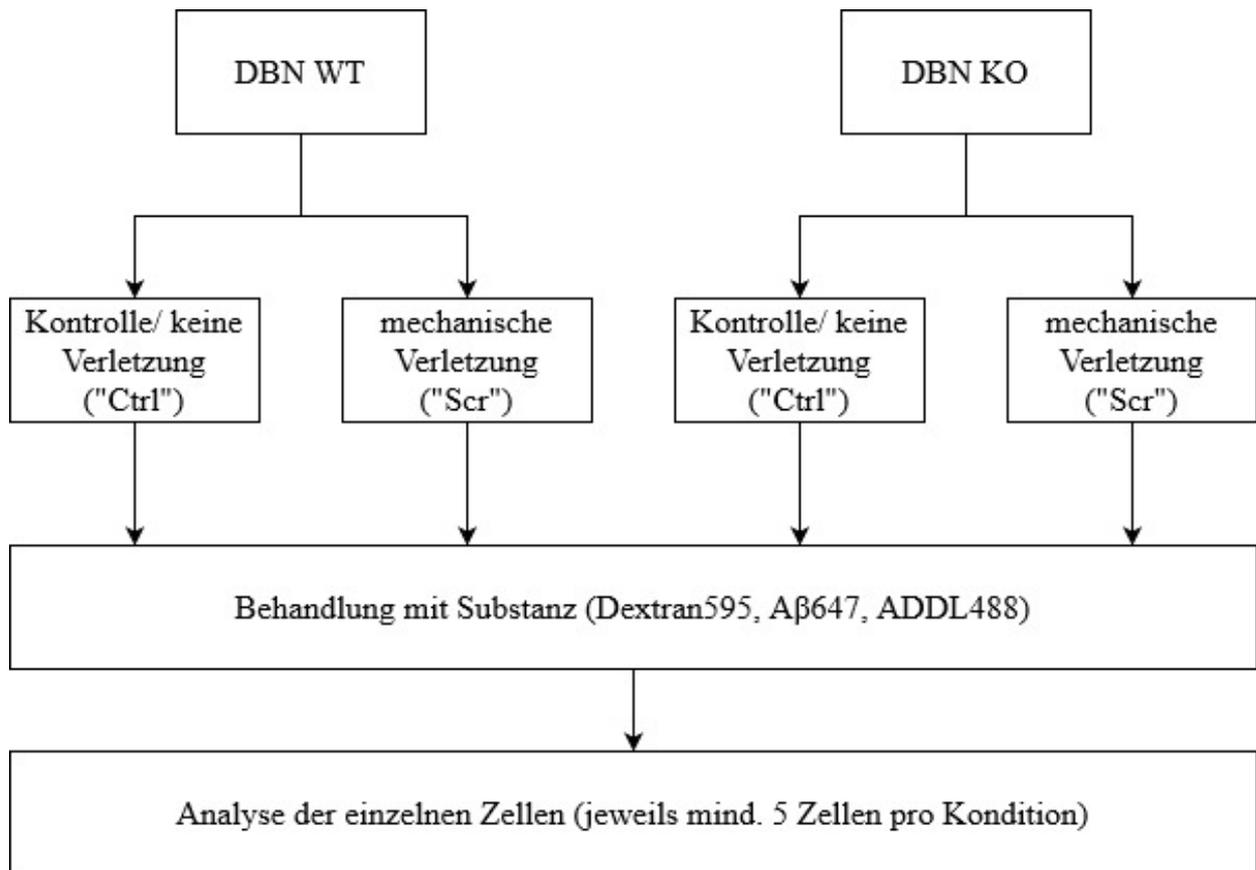


Abbildung 8: Darstellung des Behandlungsschemas der Astrozyten-Zellkulturen

Um die Auswirkungen eines Drebrin-Verlustes auf die generelle Endozytosefähigkeit sowie die spezielle Aufnahme von A $\beta$ -Spezies (Monomeren/ Oligomeren) von Astrozyten näher zu untersuchen, wurden Astrozyten-Zellkulturen angezchtet, teilweise mechanisch verletzt, um Wundheilungsprozesse zu aktivieren, und mit den Substanzen Dextran595, A $\beta$ 647-Monomeren und ADDL488-Oligomeren behandelt (Abbildung 8). N entspricht hier der Zahl der unabhängigen Experimente und n repräsentiert die Anzahl der biologischen Replikate, dementsprechend der Zahl der unterschiedlichen Versuchstiere/ Embryonen.

### i) Behandlung mit Dextran

Um die Flüssigphasen-Endozytose-Aktivität jeweils im aktivierten und nicht-aktivierten Zustand sowie in Drebrin-suffizienten und Drebrin-defizienten Astrozyten zu verfolgen, wurde direkt nach Aktivierung der Wundheilung mittels mechanischer Verletzung eines Teils der Astrozyten mit 10 µg Dextran595 (Dextran Texas Red, invitrogen) pro ml Medium für eine 24h Verlaufsstudie (24/12/8/2/1 h) bei 37°C inkubiert. In Abbildung 9 sind sowohl die typische Morphologie der fixierten Dextran595-behandelten Drebrin-suffizienten und Drebrin-defizienten sowie der unverletzten/ nicht aktivierten und aktivierten Astrozyten an Beispielbildern als auch die Ergebnisse der Quantifizierung dargestellt.

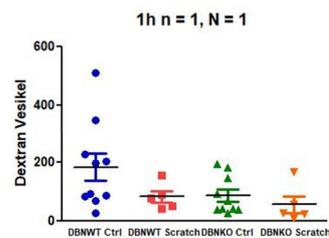
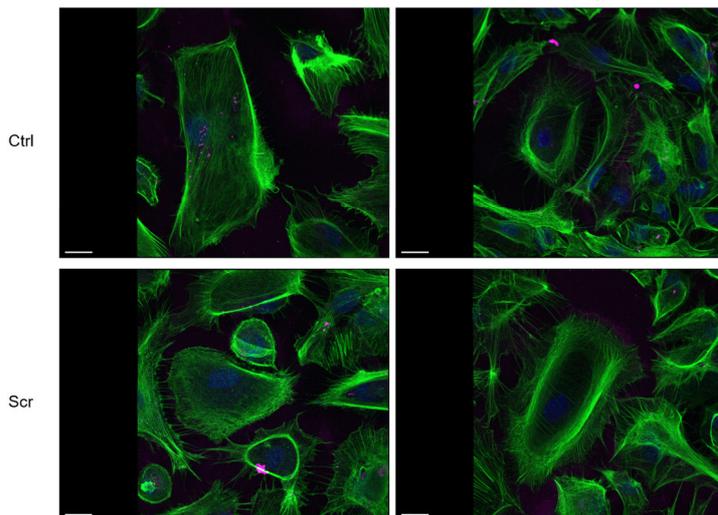
#### Rolle von Drebrin-Defizienz in Astrocyten – Dextran Zeitachse

1 h nach Dextran Behandlung (10 µg/ml)

magenta = Dextran , blau = Hoechst, grün = ActiStain488 Phalloidin

DBN WT

DBN KO



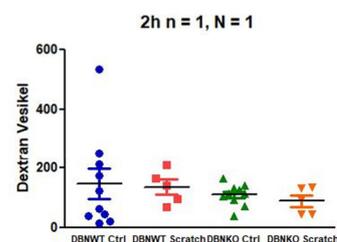
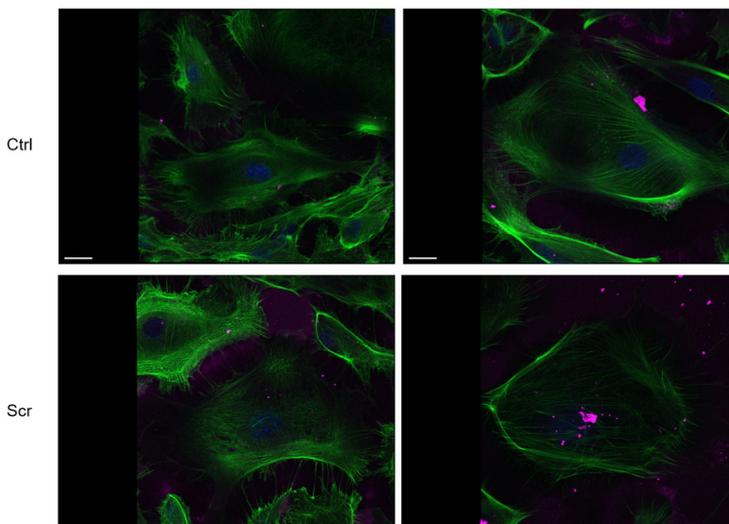
Quantifizierung mittels IMARIS surface tool Routine

2 h nach Dextran Behandlung (10 µg/ml)

magenta = Dextran , blau = Hoechst, grün = ActiStain488 Phalloidin

DBN WT

DBN KO

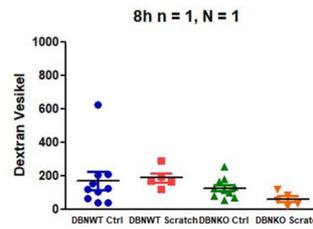
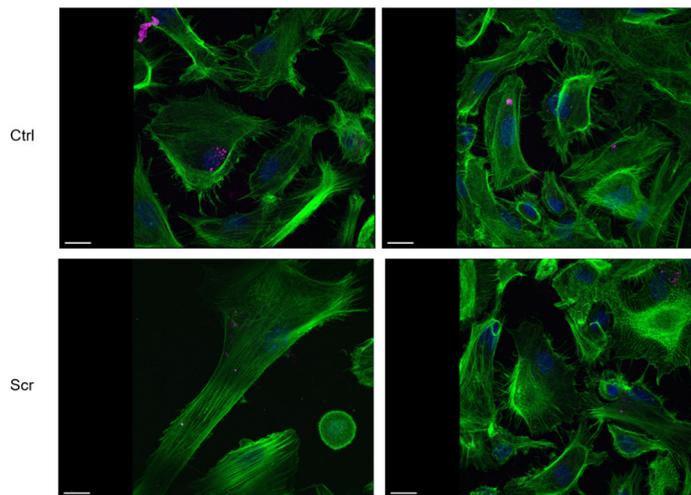


Quantifizierung mittels IMARIS surface tool Routine

# Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Ergebnisse

8 h nach Dextran Behandlung (10 µg/ml)  
DBN WT

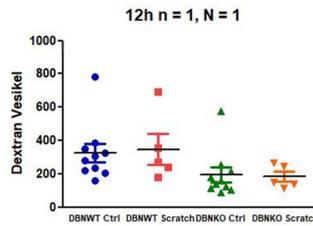
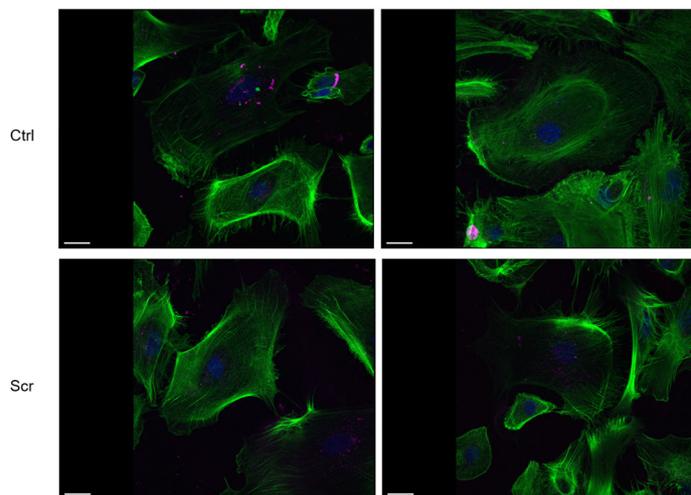
magenta = Dextran , blau = Hoechst, grün = ActiStain488 Phalloidin  
DBN KO



Quantifizierung mittels  
IMARIS surface tool Routine

12 h nach Dextran Behandlung (10 µg/ml)  
DBN WT

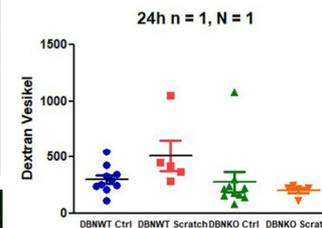
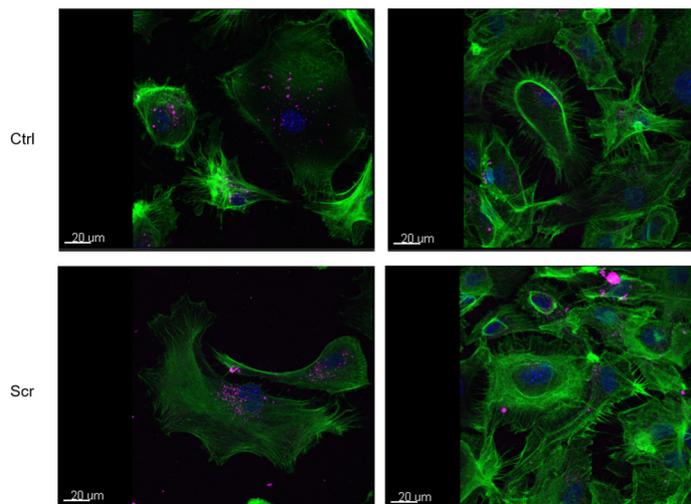
magenta = Dextran , blau = Hoechst, grün = ActiStain488 Phalloidin  
DBN KO



Quantifizierung mittels  
IMARIS surface tool Routine

24 h nach Dextran Behandlung (10 µg/ml)  
DBN WT

magenta = Dextran , blau = Hoechst, grün = ActiStain488 Phalloidin  
DBN KO



Quantifizierung mittels  
IMARIS surface tool Routine

Abbildung 9: Dextran Zeitachse, Dextran595 = magenta, ActiStain588 Phalloidin = grün, Hoechst = blau, Maßstab entspricht 20µm sowie Quantifizierung der Dextran-Vesikel, einzelne Punkte repräsentieren einzelne Zellen (5-10 pro Kondition)

Die Astrozyten zeigen über alle Zeitspannen hinweg eine unentwegte Aufnahme von Dextran595. Diese Aufnahme nimmt über die Zeit kontinuierlich zu: Von durchschnittlich circa 100 gezählten Dextran595-Vesikeln nach 1h bis zu circa 325 erfassten Dextran595-Vesikeln nach 24h Inkubation. Damit kann eine verstärkte Flüssigphasen-Endozytose-Aktivität abhängig von der Dauer der Inkubation gezeigt werden. Insbesondere in der 2- und 8-stündigen Inkubation zeigt sich kein Unterschied in den Mittelwerten zwischen den verschiedenen Konditionen (DBN-WT Ctrl, DBN-WT Scr, DBN-KO Ctrl, DBN-KO Scr). Jedoch zeigen die Drebrin-defizienten Astrozyten nach 12- und 24-stündiger Inkubation im Mittel eine dezent niedrigere Dextran595-Aufnahme als Drebrin-suffiziente Astrozyten. Insbesondere die mittels mechanischer Verletzung aktivierten Astrozyten zeigen im DBN-WT eine verstärkte Dextran595-Aufnahme. Es wurden 5-10 Zellen pro Kondition ( $n' = \text{Zell zu Zell Variabilität}$ ) aus jeweils einem biologischen Replikat  $n$  in einem erfolgten unabhängigen Versuchsdurchlauf  $N$  als Pilotexperiment untersucht. Für valide Aussagen zur Bestätigung dieses beobachteten Trends sind weitere Versuchsdurchläufe notwendig.

## ii) Behandlung mit A $\beta$ -Monomeren

Um das möglicherweise Drebrin-vermittelte intrazelluläre Schicksal verschiedenster A $\beta$ -Spezies innerhalb der Astrozyten näher zu charakterisieren und eine mögliche erhöhte Suszeptibilität Drebrin-defizienter Astrozyten gegenüber A $\beta$  zu detektieren, wurden die Astrozyten direkt nach Aktivierung der Wundheilung eines Teils der Astrozyten mit monomeren und oligomeren A $\beta$  behandelt. Es wurden ausschließlich Astrozyten mit einem Zellkern in die Analysen einbezogen, da sich noch in Teilung befindliche Zellen (gekennzeichnet durch mehrere Zellkerne) vermutlich noch nicht in polygonale Astrozyten ausdifferenziert haben und eine verstärkte Aufnahme zeigten. Damit könnten diese sich teilenden Zellen potentielle Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen verschleiern. Um zu überprüfen, ob monomeres A $\beta$ , das in Neuronen vermutlich keine direkte toxische Wirkung zeigt (Walsh und Selkoe 2007), auch in Astrozyten nicht primär toxisch wirkt, wurden die Astrozyten mit A $\beta$ 647-Monomeren behandelt. In Abbildung 10 sind sowohl die typische, polygonale Morphologie der fixierten 24h mit A $\beta$ 647(Monomer)-behandelten Drebrin-suffizienten und Drebrin-defizienten sowie der nicht-aktivierten und aktivierten Astrozyten an Beispielbildern als auch die Ergebnisse der Quantifizierung dargestellt.

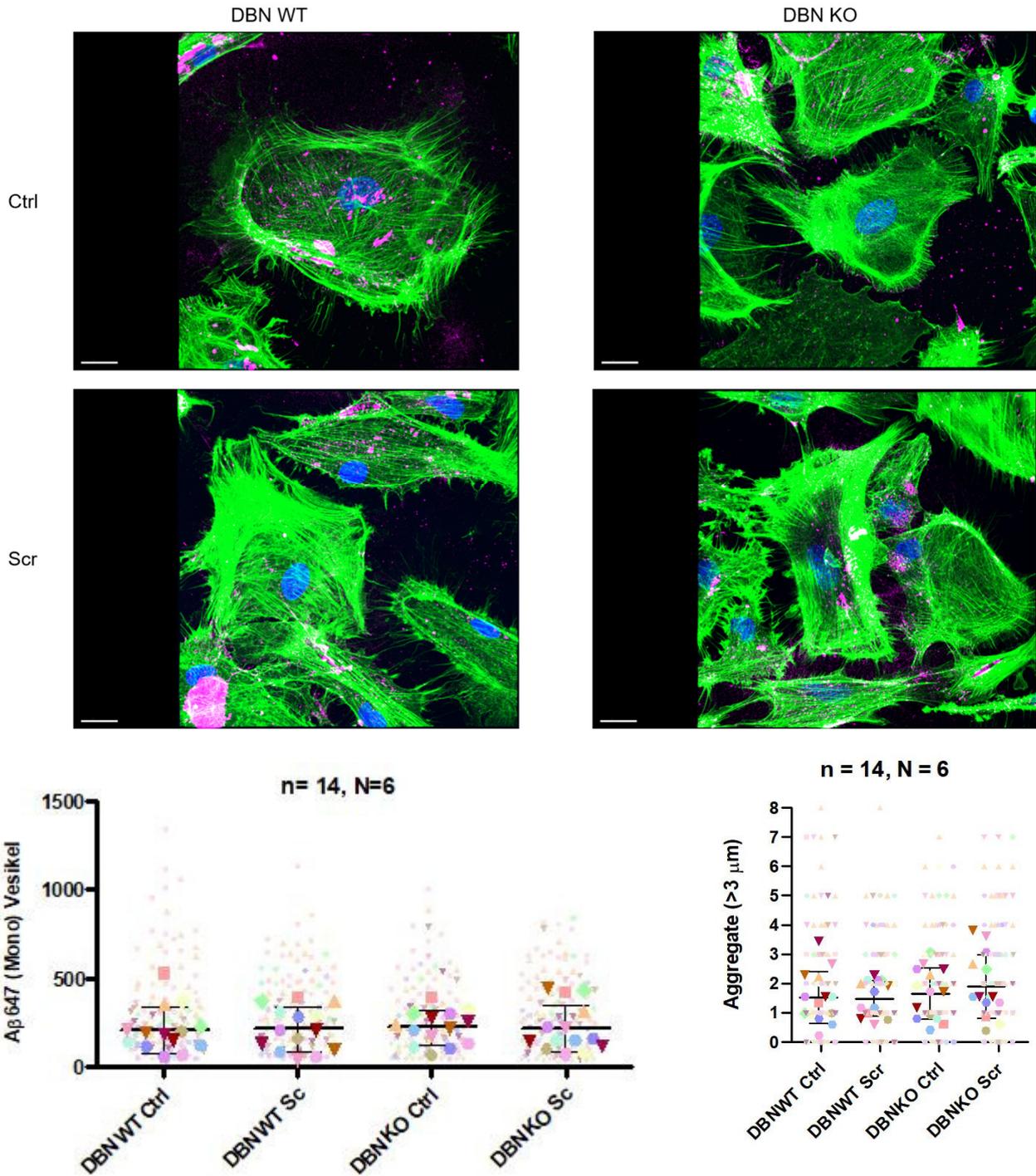


Abbildung 10: Übersicht der für 24h mit 0,2 μM Aβ47-Monomeren behandelten Astrozyten, Aβ47 Monomere = magenta, ActiStain488 Phalloidin = grün, Hoechst = blau, Maßstab entspricht 20μm sowie Superplots der Vesikelanzahl und Aggregatanzahl (> 3μm), transparente Punkte sind einzelne Datenpunkte (insgesamt 130 einzelne Zellen n'), kräftig gefärbte Punkte sind Mittelwerte der einzelnen biologischen Replikate n, verschiedene Farben repräsentieren zusammengehörige biologische Replikate, verschiedene Formen repräsentieren unabhängige Experimente N

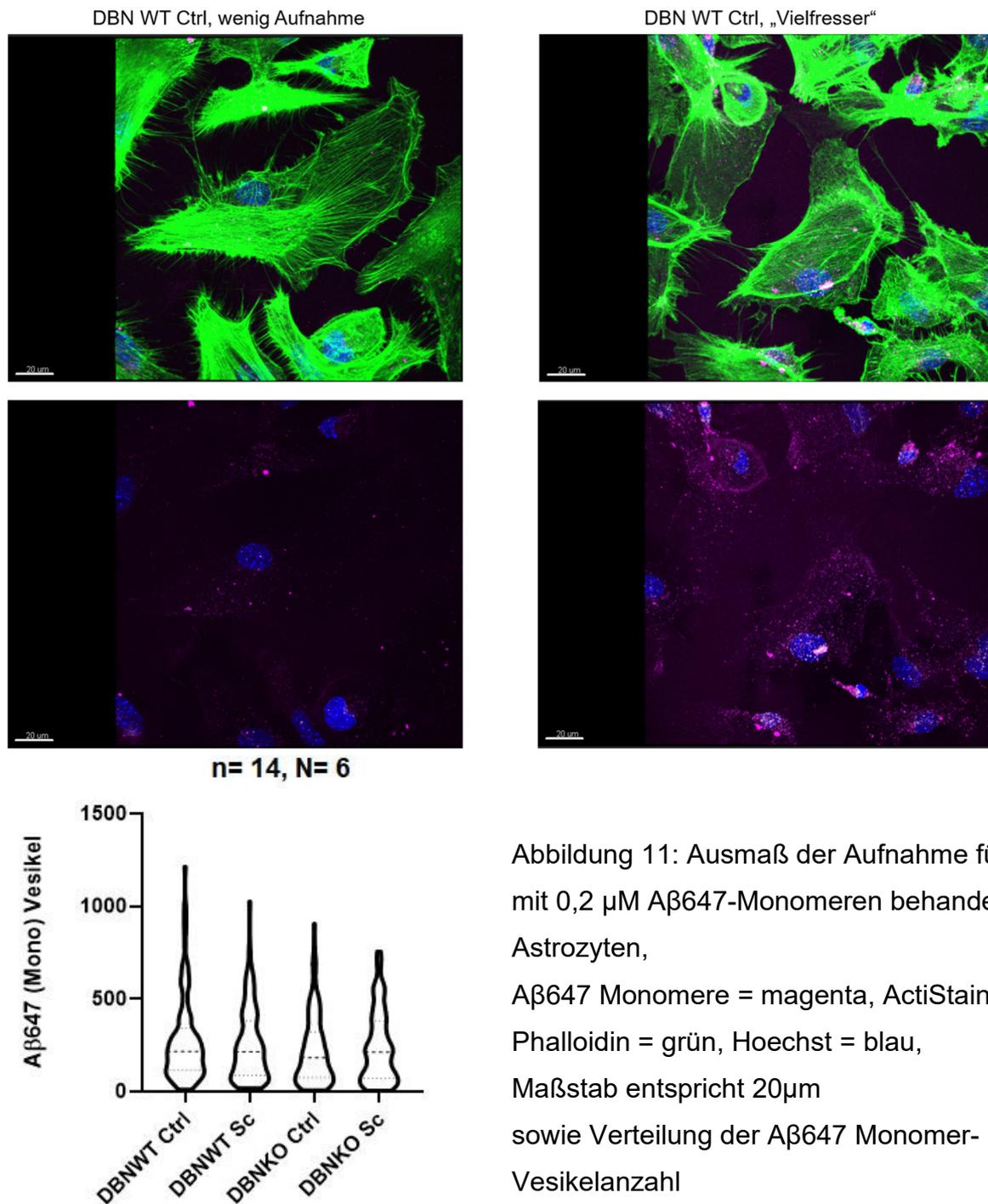
Es wurden insgesamt 130 einzelne Zellen ( $n' = \text{Zell zu Zell Variabilität}$ ) von 14 unabhängigen biologischen Replikaten  $n$  in 6 unabhängigen Experimenten  $N$  untersucht. Die Astrozyten nahmen durchschnittlich circa 210 A $\beta$ 647-Monomere innerhalb von 24 Stunden auf, wobei es keinen signifikanten Unterschied in der mittleren A $\beta$ 647-Monomer-Aufnahme zwischen den definierten Konditionen (DBN-WT Ctrl, DBN-WT Scr, DBN-KO Ctrl, DBN-KO Scr) gab. Dies gilt auch für die Anzahl an Aggregaten, die vermutlich aus fehlgefalteten akkumulierten A $\beta$ 647-Monomeren bestehen und deren Größe ( $>3 \mu\text{m}$ ) die Größe einzelner Vesikel deutlich übersteigt. Demnach haben die Aktivierung der Wundheilung sowie ein Knockout von Drebrin keinen Einfluss auf die mittlere Aufnahme von A $\beta$ -Monomeren.

Zudem wurde der Intra-Klassen-Korrelations-Koeffizient (ICC) berechnet, um die Reliabilität der Messwertreihen zu überprüfen. Die Berechnung des ICC erfolgte mittels Werten aus der „One-Way-ANOVA“-Analyse in GraphPadPrism (Pleil et al. 2018). Es ergaben sich folgende Werte:

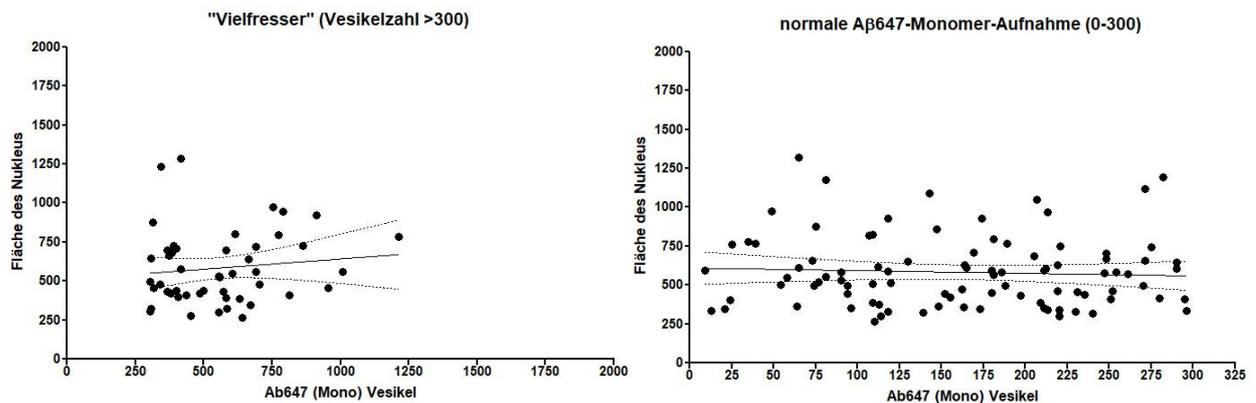
biologisches Replikat n	MSb	MSw	k (Messungen pro Probe)	$\sigma_b^2$	$\sigma_w^2$	ICC
n1 (20-11-06)	133000	17550		155 744,8387	17550	0,040713
n2 (20-11-20)	71740	44130		170 162,4118	44130	0,003667
n3 (20-12-04)	91630	34340		115 498,1739	34340	0,0143
n4 (21-04-09a)	85030	22090		20 3147	22090	0,124698
n5 (21-04-09b)	40610	26230		20 719	26230	0,02668
n6(21-05-07a)	38980	12200		20 1339	12200	0,098899
n7(21-05-07b)	14860	4143		20 535,85	4143	0,114526
n8(21-05-07c)	33680	8394		20 1264,3	8394	0,130903
n9(21-05-07d)	53300	20440		20 1643	20440	0,074401
n10(21-05-07e)	6413	2754		20 182,95	2754	0,062293
n11(21-05-21a)	36240	20540		20 785	20540	0,036811
n12(21-05-21b)	108100	13540		20 4728	13540	0,258813
n13(21-05-21c)	19320	12190		20 356,5	12190	0,028414
n14(21-05-21d)	20080	22110		20 -101,5	22110	-0,00461

Die ICC-Werte befinden sich im Bereich zwischen 0-0,259. Bedingt durch die geringe Variabilität des Datensatzes deutet ein niedriger ICC darauf hin, dass die gezeigten Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit auf wirklichen Unterschieden und nicht auf Zufall beruhen (Pleil et al. 2018). Die Korrelation innerhalb der Cluster – also in den einzelnen biologischen Replikaten – ist demnach gering.

Das Ausmaß der Aufnahme der A $\beta$ 647-Monomere war in den individuellen Astrozyten über die definierten Konditionen (DBN-WT Ctrl, DBN-WT Scr, DBN-KO Ctrl, DBN-KO Scr) optisch sehr heterogen. So imponierten einige der Astrozyten mit sehr geringer und einige der Astrozyten mit sehr hoher A $\beta$ 647-Monomer-Vesikelanzahl. Eine exemplarische Übersicht der DBN-WT Astrozyten mit wenig A $\beta$ 647-Monomer-Aufnahme und der A $\beta$ 647-Monomer-„Vielfresser“ sowie eine Darstellung der Verteilung des Ausmaßes der A $\beta$ 647-Monomer-Aufnahme mittels Violin-Plots findet sich in Abbildung 11.



Da einzelne Astrozyten beobachtet werden konnten, deren vermehrte Aufnahme von A $\beta$ 647-Monomeren mit einem vergrößerten Nukleus korrelierte, wurde eine Korrelations-Analyse für die Fläche des Zellkerns und die Anzahl der A $\beta$ 647-Monomer positiven Vesikel in DBN-WT Ctrl-Astrozyten durchgeführt. In der Analyse wurden Astrozyten mit gemäßigter A $\beta$ 647-Monomer-Aufnahme (Vesikelzahl <300) mit „Vielfresser“-Astrozyten mit einer Vesikelzahl > 300 (siehe Abbildung 12) verglichen.



Ist die Neigung signifikant nicht-Null?

F 0,6843  
DFn, DFd 1.000, 47.00  
P Wert 0,4123  
Abweichung von Null? Nicht Signifikant

Ist die Neigung signifikant nicht-Null?

F 0,3212  
DFn, DFd 1.000, 92.00  
P Wert 0,5723  
Abweichung von Null? Nicht Signifikant

Abbildung 12: Untersuchung der Korrelation zwischen Anzahl der A $\beta$ 647-Monomer-positiven Vesikel und der Fläche des Nukleus in DBN-WT Ctrl, keine signifikante Korrelation detektierbar

Sowohl „Vielfresser“ als auch Astrozyten mit gemäßigter A $\beta$ 647-Monomer-Aufnahme wiesen keine Korrelation zwischen der Fläche des Zellkerns und der Anzahl der A $\beta$ 647-positiven Vesikel auf.

Da sich einige der A $\beta$ 647-Monomer-Aggregate mit der Hoechst-Markierung der Zellkerne überlagerten, wurde zudem eine Analyse der Kolo-kalisation zwischen A $\beta$ 647-Signal und Nukleus-Signal (Hoechst) in DBN-WT Astrozyten mittels „ColocalisationTool“ im Bildverarbeitungsprogramm IMARIS durchgeführt. Die Ergebnisse der Kolo-kalisations-Analyse sind in Abbildung 13 dargestellt.

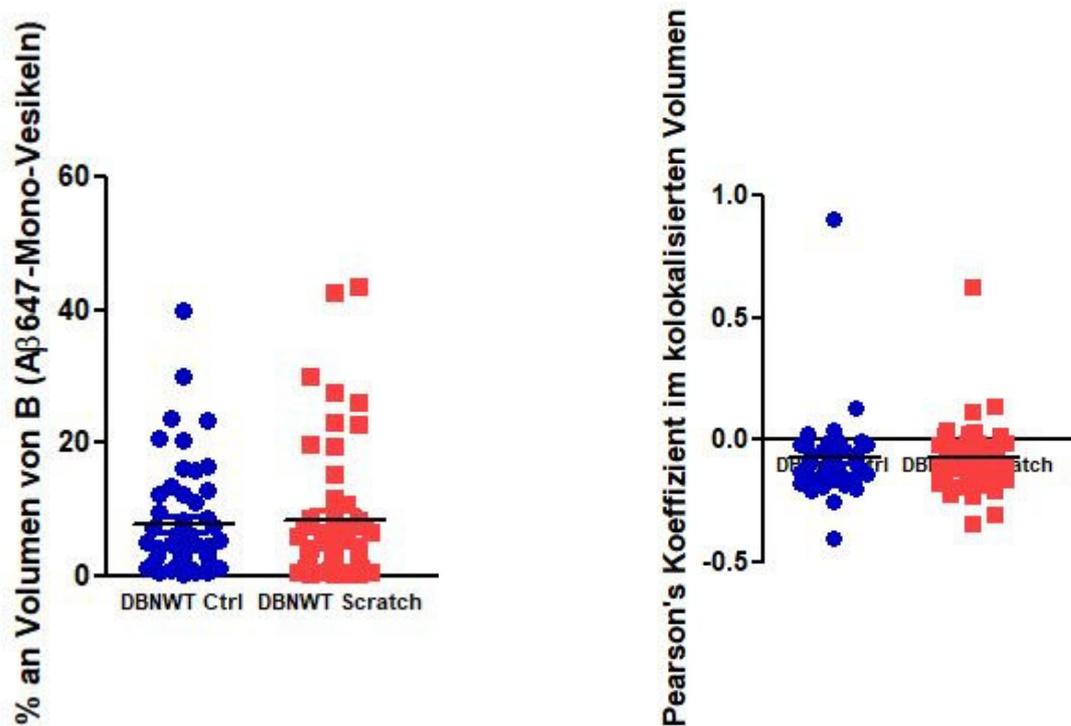


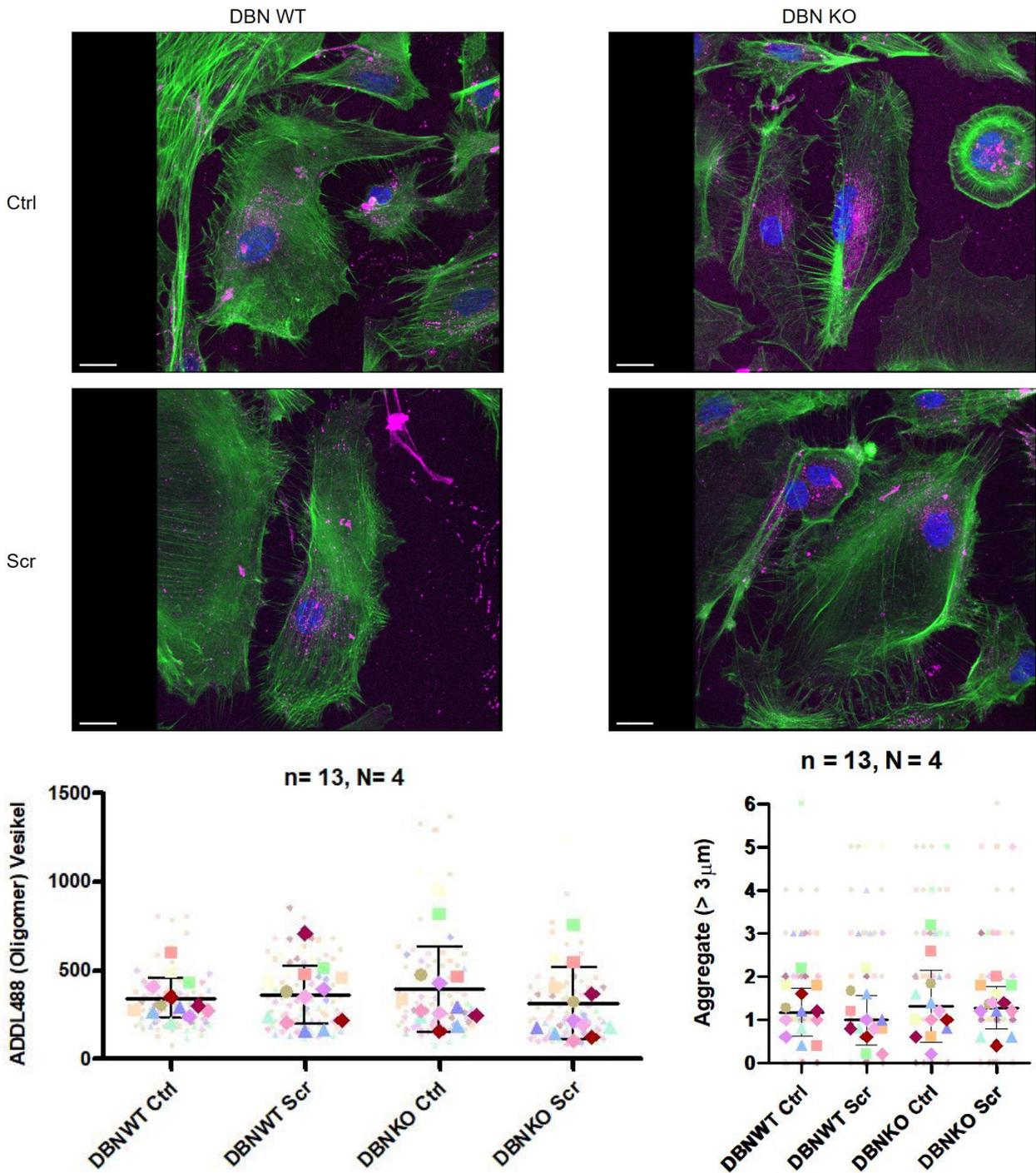
Abbildung 13: Untersuchung der Kolokalisation zwischen Aβ647-Monomer-Signal und Nukleus-Signal in DBN-WT, keine signifikante Kolokalisation detektierbar

Das Aβ647-Monomer-Signal kolokalisiert zu circa 8-10% seines Volumens mit der Hoechst-Markierung, was auf einen zumindest sehr engen Kontakt zum Zellkern hinweist. Allerdings konnte keine Steigerung dieses Kontaktes durch in vitro-Aktivierung der Wundheilung mittels mechanischer Verletzung beobachtet werden. Der Pearson-Koeffizient liegt sehr nahe bei Null. Werte nahe Null zeigen Verteilungen von Daten, die unkorreliert zueinander stehen (Dunn et al. 2011). Dies spricht demnach gegen eine Kolokalisation von Aβ-Monomer- und Zellkern-Signal.

### iii) Behandlung mit Aβ-Oligomeren (ADDLs)

Um zu überprüfen, ob oligomeres, lösliches Aβ, von dem vermutet wird, dass es in Neuronen direkt toxisch wirkt (Lue et al. 1999, McLean et al. 1999, Walsh und Selkoe 2007), auch eine direkt toxische Wirkung in Astrozyten aufweist und ob der Mechanismus der ADDL488-Oligomer-Aufnahme Drebrin-vermittelt oder abhängig von der Wundheilungsaktivität ist, wurden die Astrozyten zudem für 24h mit Alexa-488-markierten ADDLs sowie einer Vehikel-Kontrolle (ungebundenes Alexa-488-Fluorophor in DMSO) behandelt, fixiert und anschließend untersucht. Es wurden ausschließlich Zellen mit einem Zellkern in die Analyse einbezogen (siehe 3.2ii).

In Abbildung 14 sind sowohl die typische, polygonale Morphologie der fixierten 24h mit ADDL488-Oligomer und Vehikel-behandelten Drebrin-suffizienten und Drebrin-defizienten sowie der unverletzten/nicht aktivierten und aktivierten Astrozyten an Beispielbildern als auch die Ergebnisse der Quantifizierung dargestellt.



Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns: Ergebnisse

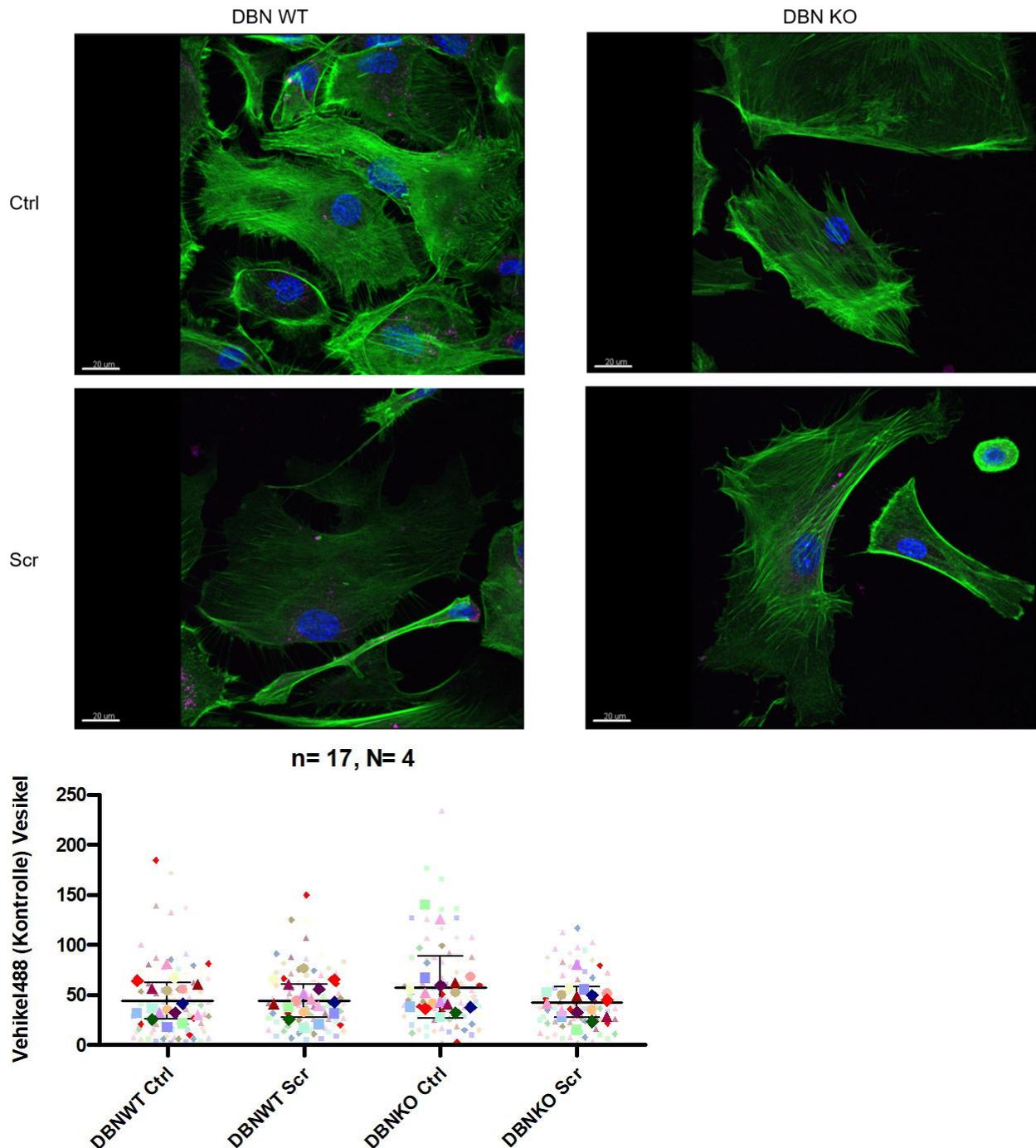


Abbildung 14: Übersicht der für 24h mit 0,4 μM ADDL488-Oligomeren (oben) bzw. 1 μg/ml Vehikel488 (DMSO, unten) behandelten Astrozyten, ADDL488-Oligomere/ Vehikel488 = magenta, Phalloidin Atto565 = grün, Hoechst = blau, Maßstab entspricht 20 μm sowie Superplots der Vesikelanzahl und Aggregatanzahl (> 3 μm), transparente Punkte sind einzelne Datenpunkte (insgesamt jeweils 85 einzelne Zellen n'), kräftig gefärbte Punkte sind Mittelwerte der einzelnen biologischen Replikate n, verschiedene Farben repräsentieren zusammengehörige biologische Replikate, verschiedene Formen repräsentieren unabhängige Experimente N

Es wurden insgesamt 85 einzelne Zellen ( $n' = \text{Zell zu Zell Variabilität}$ ) von 13 unabhängigen biologischen Replikaten  $n$  in 4 unabhängigen Experimenten  $N$  untersucht. Die Astrozyten nahmen durchschnittlich circa 350 ADDL488-Oligomere innerhalb von 24 Stunden auf, wobei es keinen signifikanten Unterschied in der ADDL488-Oligomer-Aufnahme zwischen den definierten Konditionen (DBN-WT Ctrl, DBN-WT Scr, DBN-KO Ctrl, DBN-KO Scr) gab. Dies gilt auch für die Anzahl an Aggregaten, die sich vermutlich nach Aufnahme in die Vesikel bilden und deren Größe ( $>3 \mu\text{m}$ ) die Größe einzelner Vesikel deutlich übersteigt. Demnach haben die Aktivierung der Wundheilung sowie ein Knockout von Drebrin keinen Einfluss auf die Aufnahme von A $\beta$ -Oligomeren

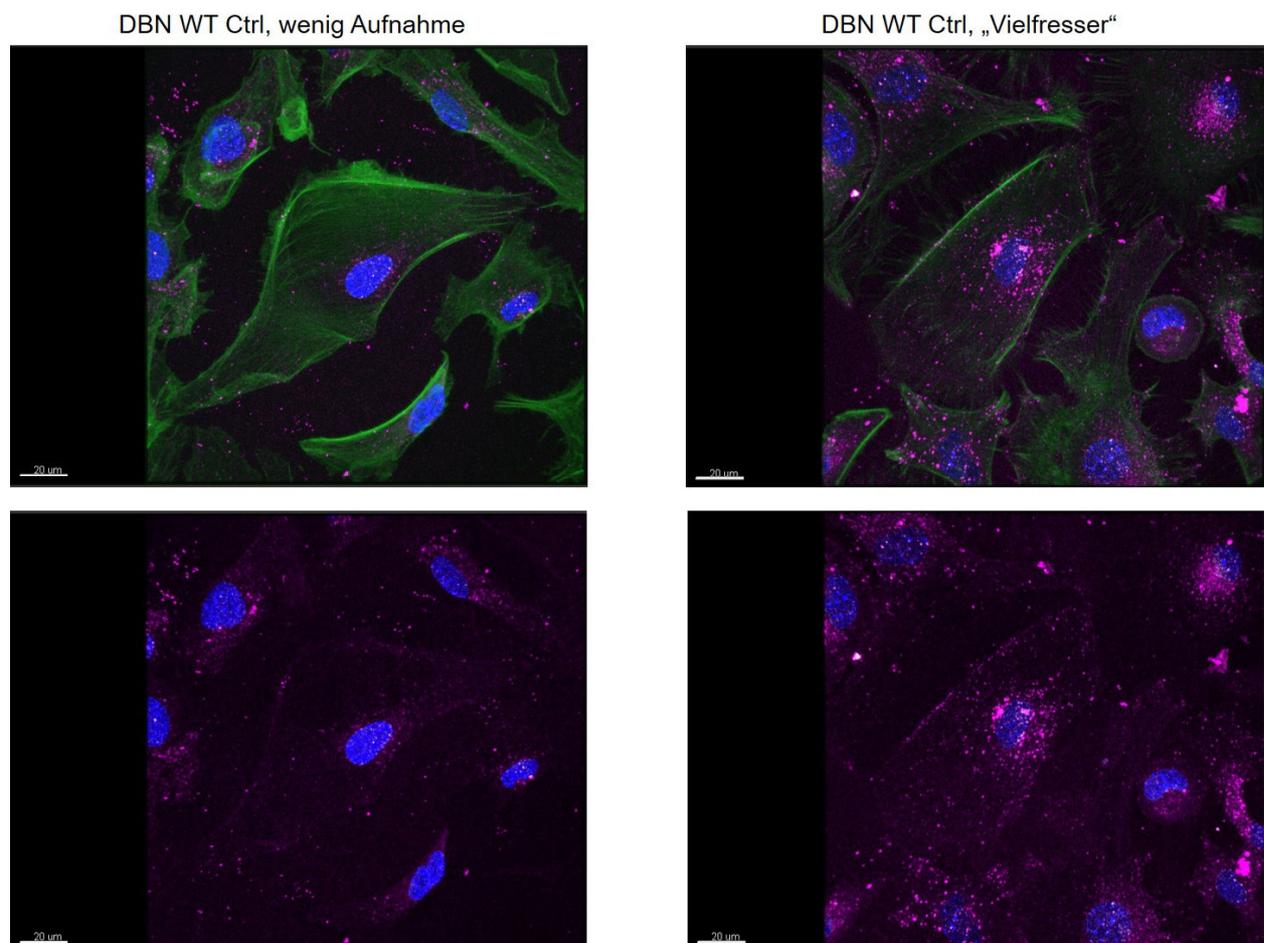
Es wurden insgesamt 85 einzelne Zellen ( $n' = \text{Zell zu Zell Variabilität}$ ) von 17 unabhängigen biologischen Replikaten  $n$  in 4 unabhängigen Experimenten  $N$  untersucht. Die Astrozyten zeigten einen durchschnittlichen Hintergrund von circa 45 detektierten 488 Signalen über dem Schwellenwert, wobei es optisch und quantifiziert keinen signifikanten Unterschied zwischen den definierten Konditionen (DBN-WT Ctrl, DBN-WT Scr, DBN-KO Ctrl, DBN-KO Scr) gab. Innerhalb der Vehikel-behandelten Zellen bildeten sich keine Aggregate größer als  $3 \mu\text{m}$ . Somit zeigt die Vehikel-Kontrolle ein erfolgreiches Labelling der ADDL488-Oligomere an, da bei diesen eine deutlich größere Vesikelanzahl als das Hintergrund-Signalnachgewiesen werden konnte.

Zudem wurde der Intra-Klassen-Korrelations-Koeffizient (ICC) berechnet, um die Reliabilität der Messwertreihen zu überprüfen (s.o.). Es ergaben sich folgende Werte:

biologisches Replikat $n$	MSb	MSw	k (Messungen pro Probe)	$\sigma_b^2$	$\sigma_w^2$	ICC
n1 (21-03-12)	149800	43220		100	1065,8	43220 0,024066
n2 (21-04-09a)	19870	63800		20	-2196,5	63800 -0,03566
n3 (21-04-09b)	30550	26010		20	227	26010 0,008652
n4(21-04-09c)	266400	82460		20	9197	82460 0,100341
n5(21-04-09d)	174000	78360		20	4782	78360 0,057516
n6(21-04-23a)	4640	8295		20	-182,75	8295 -0,02253
n7(21-04-23b)	13210	11690		20	76	11690 0,006459
n8(21-04-23c)	26820	8019		20	940,05	8019 0,104927
n9(21-05-07a)	57370	21790		20	1779	21790 0,075481
n10(21-05-07b)	45500	19130		20	1318,5	19130 0,064479
n11(21-05-07c)	32400	5987		20	1320,65	5987 0,180722
n12(21-05-07d)	50300	5117		20	2259,15	5117 0,306278
n13(21-05-07e)	215400	8967		20	10321,65	8967 0,535115

Die ICC-Werte befinden sich im Bereich zwischen 0-0,306 mit einem Ausreißerwert von 0,535 bei n13. Bedingt durch die geringe Variabilität des Datensatzes deutet ein niedriger ICC darauf hin, dass die gezeigten Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit auf wirklichen Unterschieden und nicht auf Zufall beruhen (Pleil et al. 2018). Die Korrelation innerhalb der Cluster – also in den einzelnen biologischen Replikaten (Versuchstieren) – ist demnach gering.

Das Ausmaß der Aufnahme der ADDL488-Oligomere war in den individuellen Astrozyten über die definierten Konditionen (DBN-WT Ctrl, DBN-WT Scr, DBN-KO Ctrl, DBN-KO Scr) optisch sehr heterogen. So imponierten einige der Astrozyten mit sehr geringer und einige der Astrozyten mit sehr hoher ADDL488-Oligomer-Vesikelanzahl. Eine exemplarische Übersicht der DBN-WT Astrozyten mit wenig ADDL488-Aufnahme und der ADDL488-„Vielfresser“ sowie eine Darstellung der Verteilung des Ausmaßes der ADDL488- und der Vesikel-Aufnahme mittels Violin-Plots findet sich in Abbildung 15.



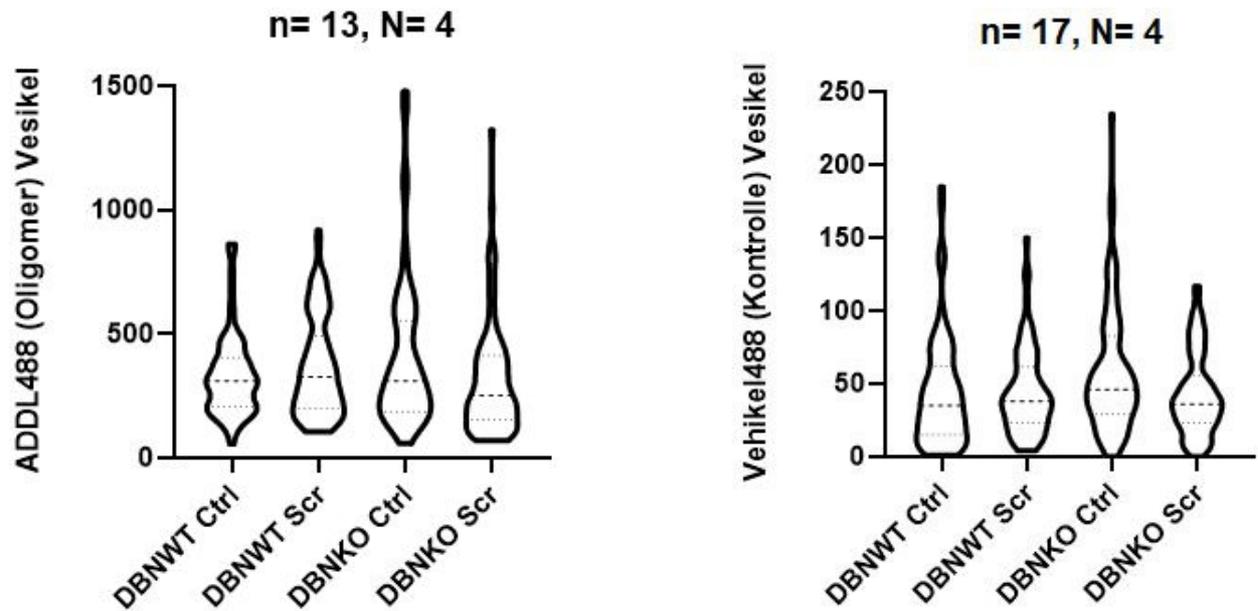


Abbildung 15: Ausmaß der Aufnahme für über 24h mit 0,4  $\mu$ M ADDL488-Oligomeren behandelten Astrozyten, ADDL488-Oligomere = magenta, Phalloidin Atto565 = grün, Hoechst = blau, Maßstab entspricht 20 $\mu$ m sowie Verteilung der ADDL488-Oligomer-/Vehikel488-Vesikelanzahl

In einigen stark-ADDL488-Oligomer aufnehmenden Astrozyten zeigen sich zudem bohnenförmig deformierte Zellkerne, neben denen sich die ADDL488-Oligomer-Aggregate sehr stark im direktem Kontakt - teilweise sogar innerhalb des Zellkerns - akkumulieren (siehe exemplarisch Abbildung 18). Dies wurde in allen Konditionen (DBN-WT Ctrl, DBN-WT Scr, DBN-KO Ctrl, DBN-KO Scr) in einzelnen Astrozyten beobachtet.

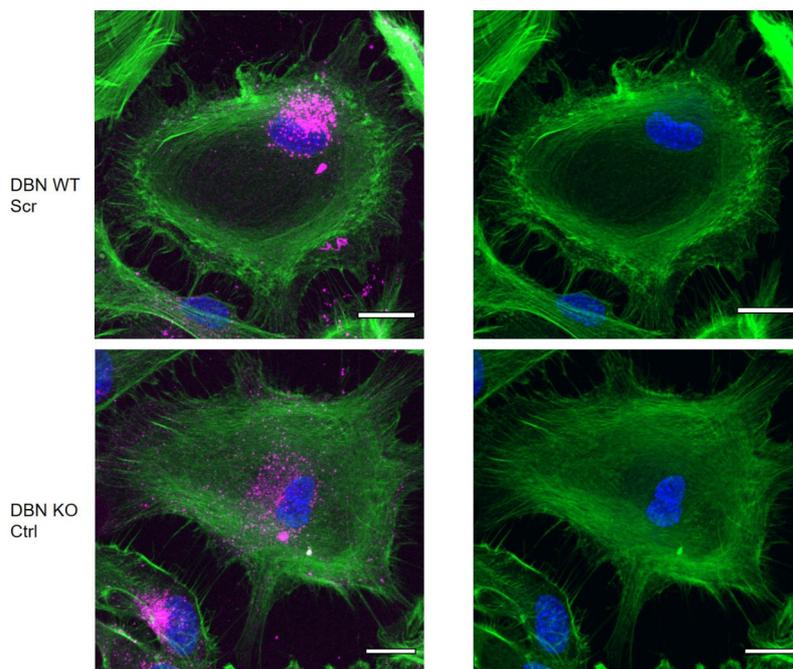
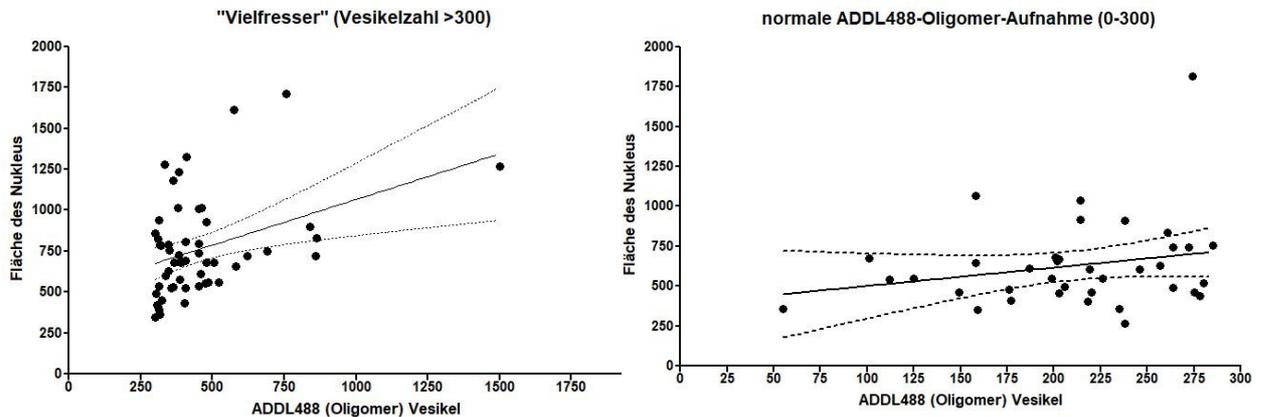


Abbildung 16:  
Bohnenförmig deformierte Nuklei in mit 24h mit 0,4 $\mu$ M ADDL488-Oligomeren behandelten Astrozyten, ADDL488-Oligomere = magenta, Phalloidin Atto565 = grün, Hoechst = blau, Maßstab entspricht 20 $\mu$ m

Um das mögliche Ausmaß der Nukleus-Deformation zu quantifizieren, wurde eine Korrelations-Analyse für die Fläche des Zellkerns und die Anzahl der ADDL488-Oligomer positiven Vesikel in DBN-WT Ctrl Astrozyten durchgeführt. In der Analyse wurden Astrozyten mit gemäßigter ADDL488-Oligomer-Aufnahme (Vesikelzahl <300) mit „Vielfresser“-Astrozyten mit einer Vesikelzahl > 300 verglichen (siehe Abbildung 16).



Ist die Neigung signifikant nicht-Null?

F

8,662

DFn, DFd

1, 51

P Wert

0,0049

Abweichung von Null?

Signifikant

Ist die Neigung signifikant nicht-Null?

F

1,970

DFn, DFd

1.000, 35.00

P Wert

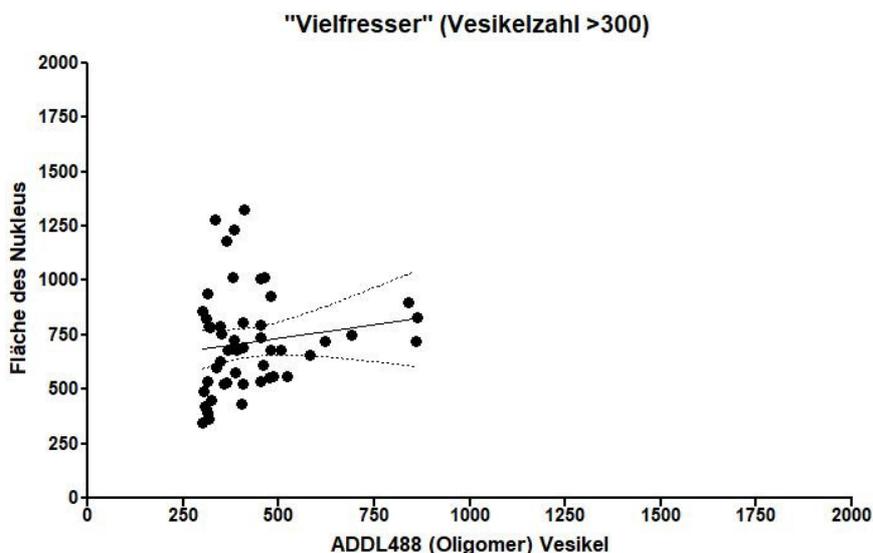
0,1692

Abweichung von Null?

Nicht Signifikant

Abbildung 17: Untersuchung der Korrelation zwischen Anzahl der ADDL488-Oligomer-positiven Vesikel und der Fläche des Nukleus in DBN-WT Ctrl, keine signifikante Korrelation in Astrozyten mit normaler ADDL488-Oligomer-Aufnahme detektierbar, signifikant erscheinende Korrelation in ADDL488-„Vielfressern“

Ähnlich zu den A $\beta$ 647-Monomer-behandelten Astrozyten wiesen auch die Zellen mit gemäßigter ADDL488-Oligomer-Aufnahme keine Korrelation zwischen der Fläche des Zellkerns und der Anzahl der ADDL488-positiven Vesikel auf. Jedoch gibt es eine signifikante Korrelation zwischen der Fläche des Zellkerns und der Anzahl von ADDL488-positiven Vesikeln bei den ADDL488-„vielfressenden“ Astrozyten. Da diese signifikant erscheinende Korrelation der ADDL488-„vielfressenden“ Astrozyten jedoch vor allem auf Ausreißerwerten mit großer Nukleusfläche zu beruhen schien, ist fraglich, ob die Datenwolke gut durch die dargestellte Gerade beschrieben wird. Daher wurde die Korrelationsanalyse erneut mit bereinigten Daten (ohne 3 Ausreißerpunkte) wiederholt. Die erneute Korrelationsanalyse der ADDL488-„vielfressenden“ Astrozyten mit bereinigten Daten, bei der sich nun keine Korrelation zwischen der Fläche des Nukleus und der Zahl an ADDL488-positiven Vesikeln mehr zeigte, ist in Abbildung 15 sichtbar. So könnten die 3 Ausreißerwerte hinweisend auf eine zusätzliche Population an stark A $\beta$ -Oligomer-aufnehmenden Astrozyten mit großem Zellkern sein oder lediglich statistische Ausreißer darstellen.



Ist die Neigung signifikant nicht-Null?

F	1,080
DFn, DFd	1.000, 48.00
P Wert	0,3039
Abweichung von Null?	Nicht Signifikant

Abbildung 18: Erneute Untersuchung der Korrelation zwischen Anzahl der ADDL488-Oligomer-positiven Vesikel und der Fläche des Nukleus in DBN-WT Ctrl mit bereinigten Daten (- 3 Ausreißer), keine signifikante Korrelation bei den „Vielfressern“ detektierbar

Ausgehend von der obigen Beobachtung der Nukleusdeformation wurde zudem eine Analyse der Kollokalisierung zwischen ADDL488-Signal und Nukleus-Signal (Hoechst) in DBN-WT Astrozyten mittels „ColocalisationTool“ im Bildverarbeitungsprogramm IMARIS auf Grundlage des Intensitäts/Voxel-basierten Ansatzes durchgeführt (Abbildung 19).

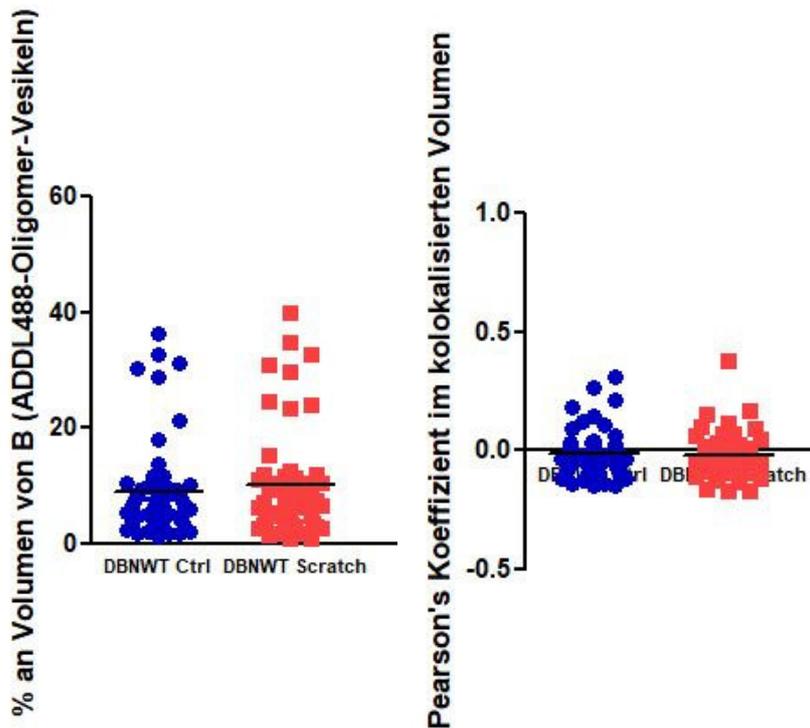


Abbildung 19: Untersuchung der Kollokalisierung zwischen ADDL488-Oligomer-Signal und Nukleus-Signal in DBN-WT, keine signifikante Kollokalisierung detektierbar

Das ADDL488-Oligomer-Signal kolokalisiert zu circa 8-10% seines Volumens mit der Hoechst-Markierung, was auf einen zumindest sehr engen Kontakt zum Zellkern hinweist. Allerdings konnte keine Steigerung dieses Kontaktes durch in vitro-Aktivierung der Wundheilung mittels mechanischer Verletzung beobachtet werden. Der Pearson-Koeffizient liegt sehr nahe bei Null. Werte nahe Null zeigen Verteilungen von Daten, die unkorreliert zueinander stehen (Dunn et al. 2011). Dies spricht demnach gegen eine Kollokalisierung von ADDL488-Oligomer- und Zellkern-Signal.

#### iv) Kolokalisation von A $\beta$ -Monomeren/-Oligomeren mit Rab5/7/8 und ApoE2/4

Um das intrazelluläre Schicksal der löslichen A $\beta$ -Oligomere (ADDLs) innerhalb der Astrozyten und den grundlegenden Mechanismus der A $\beta$ -Aufnahme näher zu charakterisieren, wurden die DBN-WT Astrozyten je mit Rab5/7/8 transfiziert und 24h nach Transfektion für 24h mit Alexa-488- sowie Alexa647-markierten ADDLs inkubiert. Es erfolgte keine Aktivierung der Wundheilung mittels mechanischer Verletzung, somit handelt es sich bei den untersuchten Astrozyten ausschließlich um unverletzte/nicht aktivierte DBN-WT Ctrl Astrozyten. Die typische Morphologie der Rab5/7/8-transfizierten Astrozyten ist anhand von Beispielbildern in Abbildung 20 dargestellt.

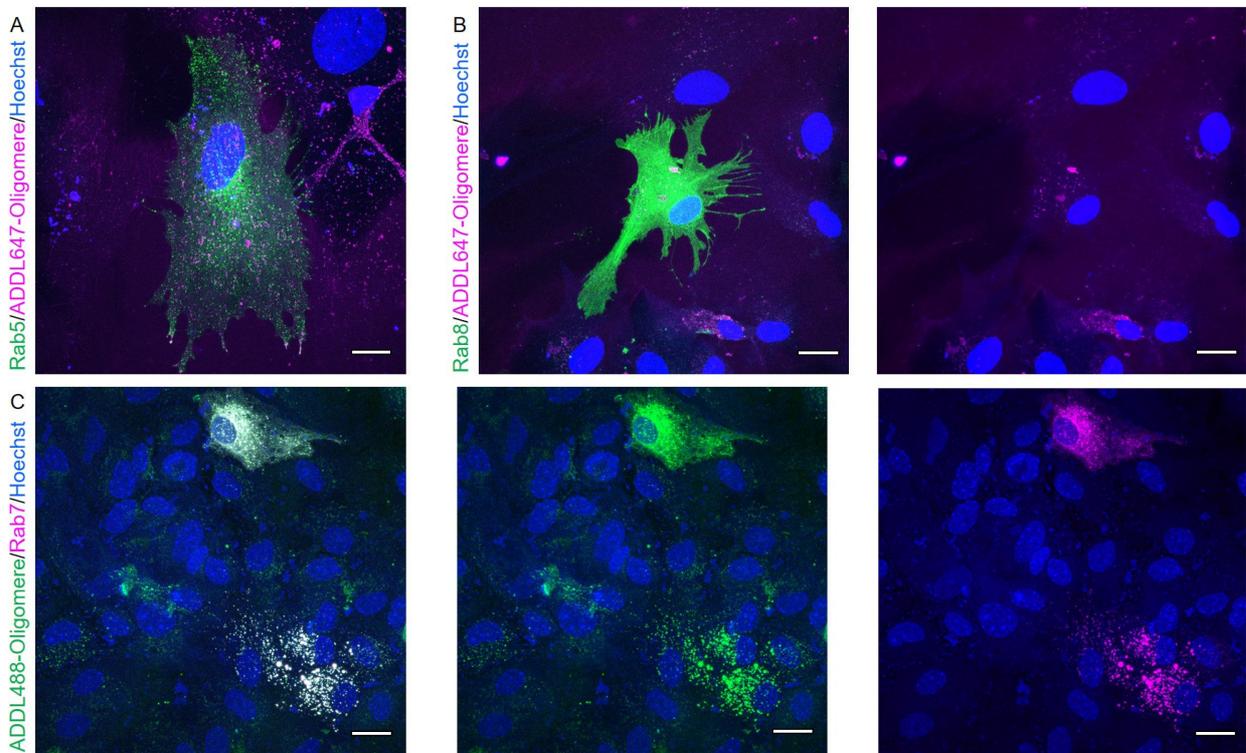
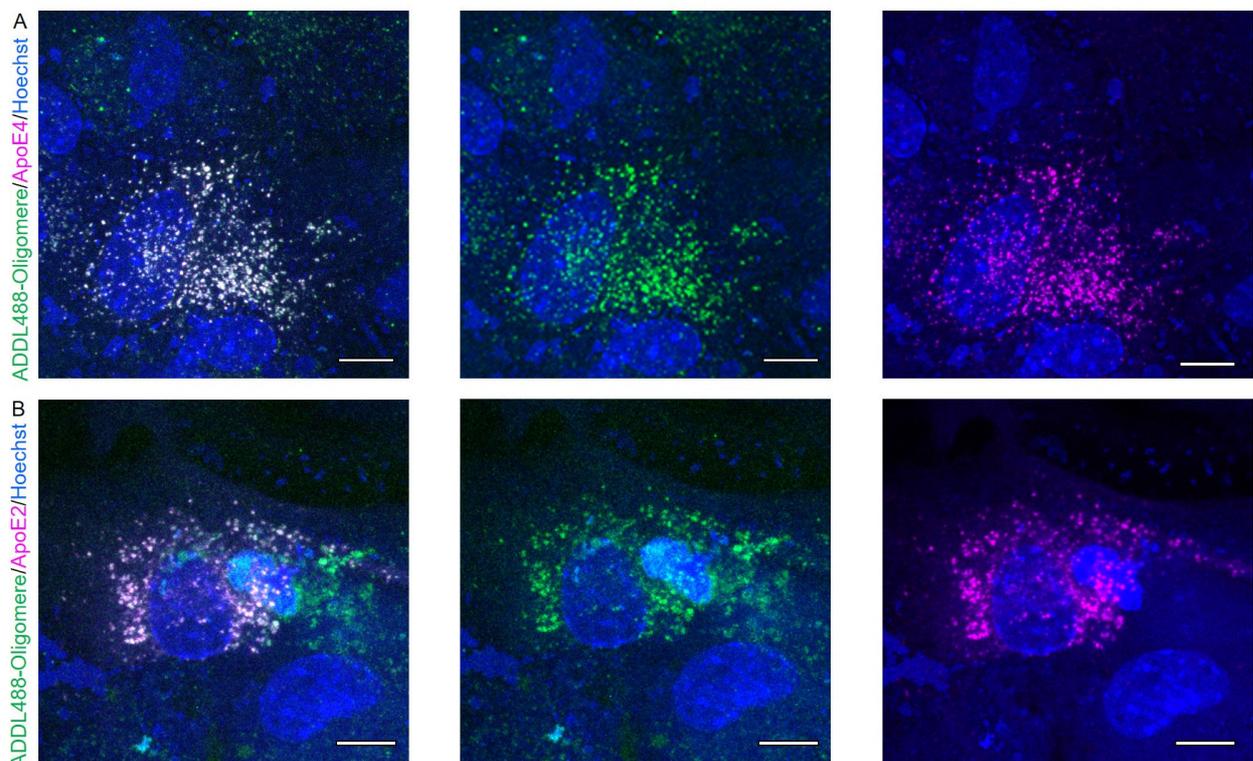


Abbildung 20: Übersicht der für 24h mit 0,4  $\mu$ M ADDL488/ADDL647-Oligomeren behandelten, eGFP-Rab5 (A)/ eGFP-Rab8 (B)/ mScarlett-Rab7 (C)-transfizierten Astrozyten, ausschließlich DBN-WT Ctrl, Maßstab entspricht 20  $\mu$ m, keine Kolokalisation von Rab5/8 mit ADDL647 sichtbar, optische Kolokalisation von Rab7 und ADDL488

Es gibt keine Kolokalisation des Rab5-/Rab8-Signals mit den ADDL647-Oligomer-positiven Vesikeln, jedoch sind das Signal der ADDL488-Oligomer-positiven Vesikel sowie das Rab7-Signal deckungsgleich. Dies spricht für eine Kolokalisation von Rab7 mit ADDL488-Oligomeren.

Die verstärkte Expression von Rab7 durch die Transfektion wirkt jedoch vermutlich nicht verstärkend auf die Aufnahme der löslichen A $\beta$ -Oligomere, da von wenig bis sehr starker Aufnahme alle Typen von Aufnahme unter den Rab7 exprimierenden Astrozyten zu beobachten waren (nicht gezeigt).

Einer der größten Risikofaktoren für Alzheimer Demenz ist die ApoE4-Isoform des Apolipoproteins, wohingegen die ApoE2-Isoform einen protektiven Effekt vermittelt (Verghese et al. 2011). Um die mögliche Rolle von ApoE4 und ApoE2 in der A $\beta$ -Aufnahmeaktivität von Astrozyten näher zu untersuchen, erfolgte die Transfektion mit ApoE4 und ApoE2 inklusive 24-stündiger Inkubation mit 0,4  $\mu$ M ADDL488/ADDL647-Oligomeren bzw. 0,2  $\mu$ M A $\beta$ 647-Monomeren. Dabei zeigt sich das Signal der ADDL488/ADDL647-Oligomere deckungsgleich mit dem Signal von ApoE2 und ApoE4 (siehe Abbildung 21A und B). Demgegenüber steht die fehlende Kolo-kalisation des ApoE4-Signals mit A $\beta$ 647-Monomer-positiven Vesikeln (Abbildung 21C). Die Transfektion mit ApoE4 steigert die Akkumulation von A $\beta$ -Oligomeren in P4-embryonalen Astrozyten, wohingegen die A $\beta$ -Monomere dort nicht verstärkt akkumulieren (Abbildung 21D). Dies könnte auf einen stärkeren Einfluss von ApoE4 bei der Aufnahme und Verstoffwechslung von löslichen A $\beta$ -Oligomeren und explizit nicht bei der Aufnahme von A $\beta$ -Monomeren hinweisen.



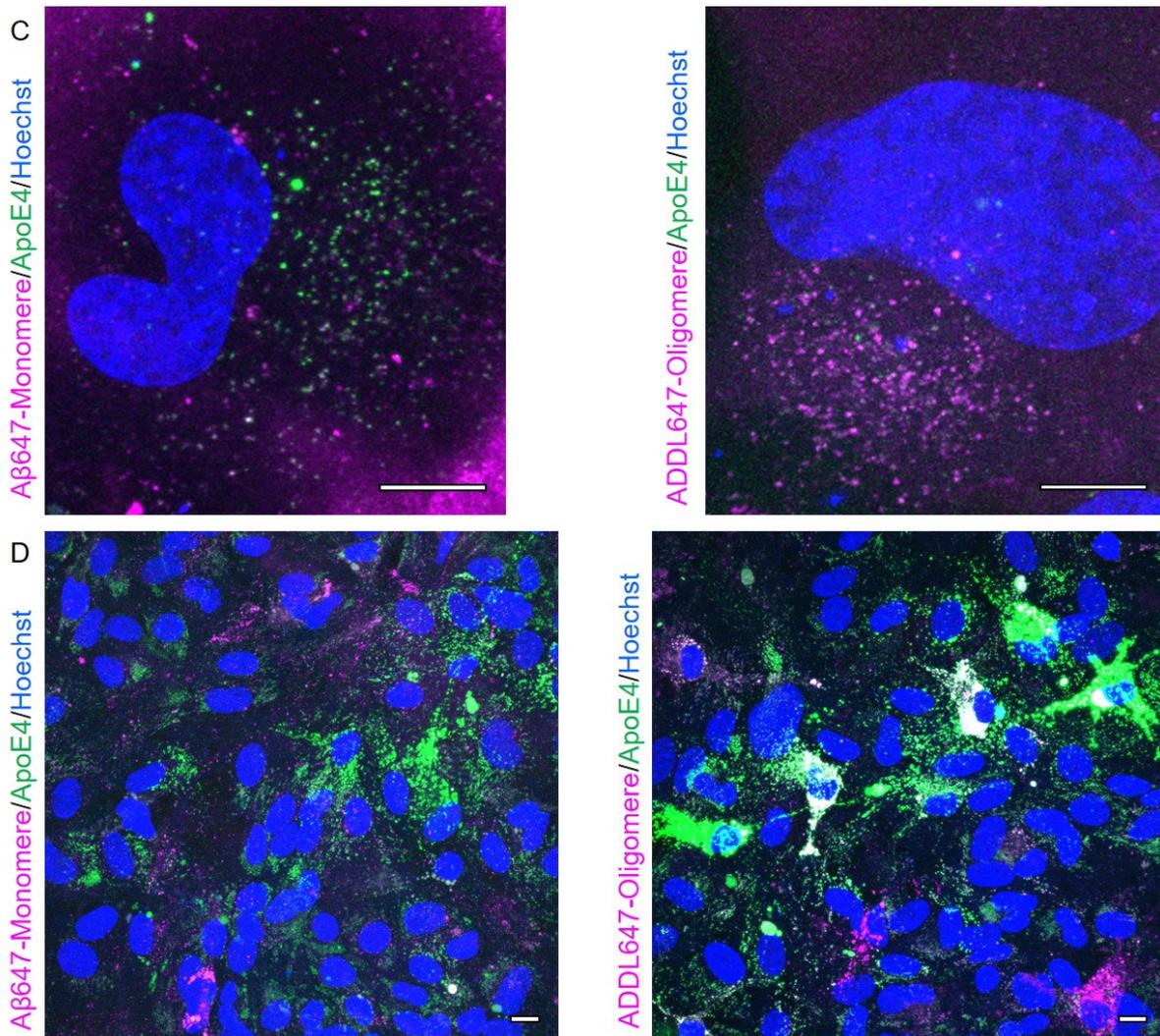


Abbildung 21: A und B: Übersicht der für 24h mit 0,4  $\mu$ M ADDL488-Oligomeren behandelten, mScarlett-ApoE4 (A)/ ApoE2 (B) transfizierten Astrozyten, ausschließlich DBN-WT Ctrl, Maßstab entspricht 10  $\mu$ m, optische Kollokalisation von ApoE2/4 und ADDL488

C: Übersicht der für 24h mit 0,2  $\mu$ M A $\beta$ 647-Monomeren (links)/ 0,4  $\mu$ M ADDL647-Oligomeren (rechts) behandelten mScarlett-ApoE4 transfizierten Astrozyten, Maßstab entspricht 10  $\mu$ m, keine Kollokalisation von A $\beta$ 647-Monomeren und ApoE4 sichtbar, Kollokalisation von ADDL647-Oligomeren und ApoE4

D: Übersicht der für 24h mit 0,2  $\mu$ M A $\beta$ 647-Monomeren (links)/ 0,4  $\mu$ M ADDL647-Oligomeren (rechts) behandelten mScarlett-ApoE4 transfizierten P4-embryonalen Astrozyten, Maßstab entspricht 10  $\mu$ m, deutlich stärkere Akkumulation von ADDL647-Oligomeren durch ApoE4-Transfektion, keine verstärkte Akkumulation der A $\beta$ 647-Monomere sichtbar

## 4. Diskussion

### 4. 1. Drebrin in Neuronen

Bei den jung-adulten DBN-WT und DBN-KO Mäusen zeigten sich wie erwartet keine Unterschiede in der Morphologie des Hippocampus. Dies wurde bereits in vorherigen Studien (Willmes et al. 2017) festgestellt und widerlegte die damalige Hypothese und vorherige Forschungsergebnisse, nach denen bereits ein alleiniger Drebrin-Verlust zu veränderter Spine-Formation und -Morphologie und demnach zu veränderter Spine-Plastizität führen würde (Jung et al. 2015). Demnach zeigt sich hier erneut, dass ein Drebrin-Verlust allein nicht ausreichend ist, um die Änderung der Spine-Morphologie sowie Neurodegeneration hervorzurufen.

Bei den stark gealterten DBN-WT Mäusen findet man in der NeuN-Färbung ein schwächer ausgeprägtes neuronales Band zwischen CA1-Region und Gyrus dentatus – also in der CA3-Region - des Hippocampus. Zudem ist in der NeuN-Färbung die Neuronendichte des neuronalen Bandes in der CA3-Region bei den stark gealterten DBN-KO Mäusen deutlich geringer. In dieser Region sind kaum noch NeuN-positive Zellkerne nachweisbar, was für einen Verlust neuronaler Kernproteine in den Neuronen spricht und demnach mit NeuN als weit akzeptierten und häufig genutzten Marker für neuronale Kernproteine eigentlich auf einen Neuronenverlust hindeuten würde (Mullen et al. 1992).

Im Gegensatz dazu zeigen sich in der HE-Färbung in der Morphologie des Hippocampus keine Auffälligkeiten im Sinne von Abschwächung der Signalintensität oder inhomogener Neuronenverteilung mit lokalen Unterbrechungen des neuronalen Bandes. Demnach sind die Neurone in der CA3-Region des Hippocampus weiterhin vorhanden, könnten jedoch durch mögliche Veränderungen neuronale Kernproteine, die normalerweise mittels NeuN angefärbt werden, verloren haben. Solch ein selektiver Verlust an neuronalen Kernprotein mit noch vorhandenen neuronalen Zellkernen und Zellkörpern ist bereits in Neuronen des Rückenmarks von seneszenten Ratten (Portiansky et al. 2006) sowie in zerebralen Neuronen von Mäusen nach Schlaganfall/ zerebraler Ischämie (Unal-Cevik et al. 2004) beschrieben. Es wurde zudem gezeigt, dass die Immunreaktivität von NeuN stark von dessen Phosphorylierungszustand abhängt (Lind et al. 2005).

Dies könnte möglicherweise ein Hinweis auf einen pathologischen Gesundheitszustand der Neurone und den baldigen Beginn einer Neurodegeneration sein, die in einem gewissen Maß auch im normalen Alterungsprozess abläuft. Gesundes, erfolgreiches Altern und ein fehlerhafter, krankhafter Alterungsprozess mit Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen sind nicht klar abgrenzbar (Wyss-Coray 2016). Neuronenverlust und –schädigung in einem gewissen Ausmaß müssen demnach nicht mit funktionellen Einschränkungen der Kognition einhergehen. So ist zu vermuten, dass auch der moderate Verlust an neuronalen Kernproteinen in den stark gealterten DBN-WT Mäusen im vorliegenden Fall nicht zu kognitiven Defiziten geführt hätte, dies müsste jedoch durch Verhaltensexperimente an den Mäusen überprüft werden. Darüber hinaus stellt sich NeuN in den vorliegenden Experimenten für sich allein genommen als unsicherer Marker für die Detektion von Neurodegeneration dar.

Da aber zusammengefasst keine eindeutige Neurodegeneration in stark gealterten Tieren beobachtet werden konnte, spricht dies gegen die Arbeitshypothese, dass DBN-WT Tiere widerstandsfähiger gegenüber altersinduziertem Stress wären als DBN-KO Tiere, bei denen der protektive Drebrin-Mechanismus zur Abschwächung der Toxizität von ROS und anderen zellulären Stressoren durch Stabilisierung des fibrillären Aktins fehlen würde.

Daher wurde vermutet, dass der rein altersinduzierte Stress potentiell nicht die Schwelle des (neuro-)toxischen Stresses überschritt. Durch eine heterozygote Knock-In-Genmodifikation im Gen der GPX4, die in eine katalytisch inaktive GPX4-Variante durch Austausch eines katalytischen Selenocysteins transkribiert und translatiert wird, sollte die Aktivität der GPX4 als wichtiges antioxidatives Schutzsystem um die Hälfte reduziert werden und somit der oxidative Stress, dem die Neurone vermutlich altersabhängig ausgesetzt sind, über diese mögliche (bisher nicht bekannte) Schwelle gebracht werden. In den DBN-KO/GPX4-WT sowie DBN-KO/GPX4-Het Mäusen konnte der oben beschriebene Verlust neuronaler Kernproteine nicht nur in der CA3-Region, sondern auch im Kortex beobachtet werden. Da dies jedoch auch in den DBN-KO/GPX-WT Tieren ersichtlich war und sich darüber hinaus keine Hinweise auf eine verstärkte Neurodegeneration in den DBN-KO/GPX4-Het Mäusen zeigten, wurde auch diese Arbeitshypothese von vermehrter Suszeptibilität Drebrin-defizienter Neurone gegenüber potentiell erhöhten oxidativen Stress durch partiellen GPX4-KO nicht bestätigt.

Dies könnte zum einen daran liegen, dass das Level des oxidativen Stresses durch partiellen Funktionsverlust der GPX4 weiterhin nicht die mögliche Schwelle zur Neurodegeneration überschreitet. Falls dies der Fall wäre, müssten weitere antioxidative Schutzsysteme wie z.B. die Superoxid-Dismutasen oder Katalasen (Wang et al. 2018) blockiert werden oder eine verstärkte Produktion von ROS in den Zellen beispielsweise mittels NADPH-Oxidasen (Bedard und Krause 2007) angeregt werden, um eine eventuell erhöhte Suszeptibilität Drebrin-defizienter Neurone zu detektieren. Zum anderen könnte der heterozygote Knock-In im Gen der GPX4 jedoch durch verstärkte Transkription und Translation des WT-Allels ausgeglichen werden und damit nicht zu dem vermuteten erhöhten oxidativen Stress führen. Überraschenderweise wurde in vorherigen Studien gezeigt, dass GPX4-Het Mäuse eine längere Lebenserwartung aufweisen als GPX4-WT Mäuse – vermutlich begründet durch verspätetes Auftreten maligner Tumore sowie eine signifikant erhöhte Sensibilität gegenüber durch oxidativen Stress ausgelöster Apoptose in Leberzellen (Ran et al. 2007). Diese beobachtete verstärkte Apoptose in den Zellen GPX4-heterozygoter Mäuse findet jedoch anscheinend nicht in Neuronen statt, da in den durchgeführten Experimenten eben keine ausgeprägte Neurodegeneration beobachtet wurde. Neurone sind also entweder weniger stark von oxidativer Stressreduktion durch die GPX4 abhängig als andere Zelltypen oder können die Toxizität des potentiell vermehrten oxidativen Stresses durch andere Schutzsysteme besser entschärfen. Nach dieser Hypothese wäre die heterozygote GPX4-Maus kein geeignetes Versuchstier für die Detektion der Wirkung vermehrten oxidativen Stresses auf Drebrin-defiziente Neurone.

Die Repräsentativität der unter 4.1 „Drebrin in Neuronen“ genannten Ergebnisse ist durch folgende Punkte limitiert: Aufgrund der langwierigen Alterung der zu untersuchenden Mäuse konnte nur eine Stichprobe (ca. 40 Schnitte) an jung-adulten und stark gealterten DBN-WT und DBN-KO Mäusen untersucht werden. Ebendies gilt auch für die Untersuchung der jung-adulten und stark gealterten DBN-KO/GPX-WT und DBN-KO/GPX-Het Mäuse, bei denen durch die eingeschränkte Verfügbarkeit stark gealterter Tiere lediglich eine limitierte Anzahl von Schnitten (ca. 10 Schnitte) ausgewertet werden konnten. Diese vorläufigen Ergebnisse in unabhängigen Versuchsreihen zu validieren, würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

Darüber hinaus wären weitere Untersuchungen an Tieren aller Altersklassen sowie molekulare Analysen interessant, um die Zeitspanne des Beginns und die molekularen Mechanismen der veränderten Immunreaktivität des NeuNs genauer einzugrenzen und zu charakterisieren. Ebenso wären Verhaltensexperimente insbesondere an den stark gealterten DBN-KO Mäusen aufschlussreich, um mögliche funktionelle kognitive Defizite zu erkennen. Demnach könnte man funktionell zwischen „normaler“ altersassoziierter milder Neurodegeneration sowie krankhaften Neuronenveränderungen mit kognitivem Abbau differenzieren und eventuell Korrelationen zu histopathologischen Erscheinungen herstellen, um die Grenze zwischen eben diesen klarer definieren zu können.

#### 4. 2. **Drebrin in Astrozyten**

Sowohl in der Behandlung mit Dextran als Marker für Flüssigphasen-Endozytose als auch in der Behandlung mit A $\beta$ -Monomeren und -Oligomeren (ADDLs) zeigten sich keine starken Unterschiede in der jeweiligen mittleren Aufnahmeaktivität zwischen DBN-WT und DBN-KO Astrozyten. Darüber hinaus zeigte sich durch eine mittels mechanischer Verletzung („Scr“) ausgelösten Aktivierung der Astrozyten (Schiweck et al. 2021) ebenfalls keine veränderte Endozytose- oder A $\beta$ -Aufnahmeaktivität der Astrozyten. Dieses Ergebnis war deshalb überraschend, da in durch mechanische Verletzung aktivierten Astrozyten die Bildung Rab8-positiver, tubulärer Endosomen, durch die ein einwärtsgerichteter Transport von der Plasmamembran in das Zellzentrum stattfindet, beschrieben wurde (Schiweck et al. 2021). Diese tubulären Endosomen konnten in DBN-KO Astrozyten nicht beobachtet werden, was auf eine gestörte Wundheilung Drebrin-defizienter Neurone hindeutet (Schiweck et al. 2021). Ob diese gestörte Internalisierung an der Plasmamembran auch Funktionseinschränkungen der Endozytose von Astrozyten nach sich zieht, muss durch weitere Versuchsreihen zur Dextranaufnahme noch geklärt werden. Die dezenten Unterschiede in der Dextran-24h-Verlaufsstudie könnten auf ebensolche funktionellen Unterschiede hindeuten. Die fehlende Beobachtung einer vermehrten Beseitigung von A $\beta$ -Monomeren und -Oligomeren mittels vermehrter Bildung tubulärer Endosomen in aktivierten Astrozyten und eines verminderten Abtransports von A $\beta$  durch gestörte Endozytosefähigkeit in DBN-KO Astrozyten in den vorliegenden Untersuchungen stehen jedoch im Gegensatz zu oben genannten Studien. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der Astrozyten sowie die Stabilisierung von F-Aktin mittels Drebrin vermutlich keinen Beitrag zur Aufnahme und Verstoffwechslung von A $\beta$  leisten.

Es wurden ausschließlich Astrozyten mit einem Zellkern in die Analysen einbezogen, da sich noch in Teilung befindliche Zellen (gekennzeichnet durch mehrere Zellkerne) eine verstärkte Aufnahmeaktivität – eventuell bedingt durch fehlende Ausdifferenzierung in polygonale Astrozyten - zeigten. Damit könnten diese sich teilenden Zellen potentielle Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen verschleiern. Für die Planung weiterführender Experimente wäre auch der Einsatz eines Mitose-Inhibitors denkbar, damit alle Astrozyten in der G<sub>0</sub>-Zellzyklusphase arretiert sind und somit eine zusätzliche Variabilität der Endozytose durch den Zellzyklus ausgeschlossen werden kann.

Es wurden sowohl in den A $\beta$ 647-Monomer- als auch in den ADDL488-Oligomer-behandelten Astrozyten in allen untersuchten Konditionen (DBN-WT Ctrl, DBN-WT Scr, DBN-KO Ctrl, DBN-KO Scr) Zellen mit sehr geringer und Zellen mit sehr hoher Vesikelanzahl beobachtet. Die Darstellung in den SuperPlots als auch in den Violin-Plots zeigt, dass sich die Aufnahme im Mittel nicht signifikant unterscheidet. Die Verteilung der A $\beta$ 647-Monomere als auch der Vehikel-Kontrolle stellt sich relativ gleichmäßig mit einigen einzelnen Zellen mit extrem hoher Anzahl an Vesikeln dar. Demgegenüber gibt es bei den ADDL488-Oligomer-behandelten Astrozyten in der Kondition DBN-WT Ctrl (keine in-vitro Aktivierung der Wundheilung) vermutlich 3 Populationen von Astrozyten: Einige mit sehr wenig, einige mit gemäßigter und einige mit sehr hoher ADDL488-Oligomer-Aufnahme („Vielfresser“). Dafür spricht die taillierte Violinen-Form mit vermutlich 3 unterschiedlichen Medianen gegenüber einer ansonsten nicht-spindelförmig erscheinenden Normalverteilung mit nur einem Median. Darüber hinaus weisen die Violin-Plots der ADDL488-Oligomer-Aufnahme darauf hin, dass eine Aktivierung der Astrozyten sowie der DBN-Genotyp zwar nicht den Mittelwert, jedoch das Verhältnis der 3 Populationen zueinander verändern. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Population der „Vielfresser“ betrachtet, deren Anzahl internalisierter Vesikel sich durch Aktivierung weiter erhöht. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur A $\beta$ 647-Monomer-Aufnahme und deutet auf unterschiedliche Mechanismen der Aufnahme von A $\beta$ -Monomeren und -Oligomeren hin. Bei den DBN-WT Scr sowie bei den DBN-KO Ctrl Astrozyten sind nur Zellen mit gemäßigter Aufnahme sowie eine Population von „Vielfressern“ mit noch stärker erhöhter Aufnahme sichtbar. Im DBN-KO Scr sind nur Astrozyten mit gemäßigter Aufnahme sowie im Vergleich zum DBN-KO Ctrl „Vielfresser“ mit weniger ADDL488-Oligomer-Aufnahme vorhanden.

All dies könnte auf eine Heterogenität der Astrozyten hindeuten, deren mechanistische Ursache noch unklar ist. Weitere Experimente, die im Rahmen dieser Dissertation aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden konnten, sollen daher gezielt die Population der „Vielfresser“ sowohl in Zeitrafferstudien in lebenden Zellen als auch in weiterführenden Analysen zur Integrität der Zellen analysieren. So wäre die Färbung mit Markerproteinen für Zelltod wie z.B. verschiedenste Caspasen und Calcium-Marker als wichtige Mediatoren der Apoptose (Van Opdenbosch und Lamkanfi 2019, Orrenius et al. 2003) interessant, um die potentiell toxischen Auswirkungen einer verstärkten Aufnahme löslicher A $\beta$ -Oligomere (ADDLs) zu analysieren. Außerdem wäre die molekulare Charakterisierung der unterschiedlich erscheinenden Astrozyten-Populationen sinnvoll, um z.B. einen möglichen Unterschied in der Expression von Rabs, ApoE2/4 oder anderer Marker zu detektieren, die hinweisend für eine ursächliche Beteiligung der entsprechenden Moleküle sein könnten.

In einigen stark-ADDL488-Oligomer aufnehmenden Astrozyten zeigen sich zudem bohnenförmig deformierte Zellkerne, neben denen sich die ADDL488-Oligomer-Aggregate sehr stark im direktem Kontakt - teilweise sogar innerhalb des Zellkerns – akkumulierten. Da dies in allen untersuchten Konditionen in einzelnen Astrozyten beobachtet wurde, ist diese Nukleusdeformation vermutlich weder Drebrin-vermittelt noch abhängig von in-vitro Wundheilung. Es wurde vermutet, dass eine hohe Vesikelanzahl zu einer verstärkten Deformation des Nukleus durch direkte Toxizität der ADDL488-Oligomere führen könnte. Um das mögliche Ausmaß der Nukleusdeformation zu quantifizieren, wurde eine Korrelations-Analyse für die Fläche des Zellkerns und die Anzahl der ADDL488-Oligomer-positiven Vesikel in DBN-WT Ctrl Astrozyten durchgeführt. In der Korrelationsanalyse von der Fläche des Nukleus und Anzahl der ADDL488-Oligomer-positiven Vesikel gab es für die Astrozyten mit gemäßigter Aufnahme (0-300 Vesikel) keine Korrelation zwischen der Fläche des Zellkerns und der Vesikelanzahl. Jedoch gab es eine signifikant erscheinende Korrelation zwischen der Fläche des Zellkerns und der Anzahl von ADDL488-positiven Vesikeln bei den ADDL488-„vielfressenden“ Astrozyten. Da diese signifikant erscheinende Korrelation der ADDL488-„vielfressenden“ Astrozyten vor allem auf den Ausreißern mit großer Nukleusfläche zu beruhen schien, ist fraglich, ob die Datenwolke gut durch die dargestellte Gerade beschrieben wurde.

Daher wurde die Korrelationsanalyse erneut mit bereinigten Daten (ohne 3 Ausreißerpunkte) wiederholt. Die erneute Korrelationsanalyse der ADDL488-„vielfressenden“ Astrozyten mit bereinigten Daten zeigte keine Korrelation zwischen der Fläche des Nukleus und der Zahl an ADDL488-positiven Vesikeln mehr. So könnten die 3 Ausreißerwerte hinweisend auf eine zusätzliche Population an sehr stark A $\beta$ -Oligomer-aufnehmenden Astrozyten mit korrelierendem großem Zellkern sein oder lediglich statistische Ausreißer darstellen. Dies könnte auf eine stark verstärkte ADDL-Oligomer-Aufnahme-Kapazität von Astrozyten mit deutlich größerem Zellkern oder ein durch ADDL-Oligomere induziertes „Anschwellen“ des Nukleus hinweisen. Eine einfache Erklärung für diese Beobachtung könnte ein Zusammenhang zwischen Zellkern- und Gesamtzellgröße sein. So weisen Zellen ein relativ konstantes Verhältnis zwischen Zellkerngröße und Gesamtzellgröße auf – gezeigt am Beispiel von Hefe (Jorgensen et al. 2007). Eine größere Zelle könnte mehr Angriffsfläche sowie mehr verfügbare endozytosevermittelnde Moleküle mit sich bringen und damit eine vermehrte Aufnahmekapazität bedingen. Demnach könnte man in weiteren Experimenten eine mögliche Korrelation zwischen Zellgröße und Anzahl an aufgenommenen A $\beta$ -Monomer und –Oligomer-Vesikeln untersuchen. Es könnte jedoch auch sein, dass auch Astrozyten mit ähnlicher Gesamtgröße unterschiedlich große Zellkerne und damit eine unterschiedlich starke Aufnahme vorweisen oder dass die Aufnahme wie bei den „gemäßigt aufnehmenden“ Astrozyten auch bei den „Vielfressern“ in keiner Weise mit der Größe von Zellkern und Astrozyt korreliert. Eine sichere Aussage darüber lässt sich nur mit weiteren Experimenten mit Fokussierung auf „vielfressende“ Astrozyten treffen. Die dargestellten Beobachtungen zeigen jedoch sicher, dass die Fläche des Zellkerns als Marker für eine mögliche Nukleusdeformation ungeeignet ist, da bei einer bohnenförmigen Deformation die Nukleusfläche sowohl größer als auch kleiner werden kann. Weitere Analysen mit anderen Parametern als Marker für Nukleusdeformation sowie Zeitrafferuntersuchungen an lebenden Zellen zur Beobachtung einer möglichen direkten Toxizität von A $\beta$ -Oligomeren sind nötig. Mögliche Marker wären zum Beispiel Lamine als integrale Bestandteile der Kernhülle und Verbindungspunkt des Nukleus zur Zellperipherie (Burke und Stewart 2013) und Nukleoporine, die die innere und äußere Kernhülle mit Kanälen verbinden und damit den nukleozytoplasmatischen Transport ermöglichen (Beck und Hurt 2017).

Das A $\beta$ 647-Monomer-Signal kolokalisiert zu circa 8-10% seines Volumens mit der Hoechst-Markierung, was auf einen zumindest sehr engen Kontakt zum Zellkern hinweist. Allerdings konnte keine Steigerung dieses Kontaktes durch in vitro-Aktivierung der Wundheilung mittels mechanischer Verletzung beobachtet werden. Der Pearson-Koeffizient mit Werten nahe Null zeigt Verteilungen von Daten, die unkorreliert zueinander stehen (Dunn et al. 2011). Demnach sind die A $\beta$ -Monomere und –Oligomere (ADDLs) nicht primär im Zellkern, sondern vor allem diffus in der gesamten Zelle verteilt. In den Astrozyten fällt jedoch eine verstärkte Ansammlung von Aggregaten perinukleär auf. Dies ist ein möglicher Hinweis auf eine Anreicherung der A $\beta$ -Peptide im Aggresom, einer Vimentin-umhüllten, ubiquitin-reichen Struktur im Mikrotubuli-organisierenden Zentrum, die als zelluläre Antwort auf das Vorliegen aggregierter, nicht-abbaubarer Proteine gebildet wird und als Zeichen des Überschreitens der zellulären Kapazität für Proteindegradation gedeutet werden kann (Johnston et al. 1998). Dies könnte die Astrozyten mittels Abschottung der A $\beta$ -Peptide vor deren möglichen zytotoxischen Effekten schützen und durch selektive Aktivierung der Aggrephagie – einer selektiven Form der Autophagie – den eventuell bereits beeinträchtigten Proteinabbau ausgleichen (Hytinen et al. 2014). Durch weitere Experimente, in denen gezielt Bestandteile des Aggresoms wie z.B. Vimentin,  $\gamma$ -Tubulin oder Ubiquitin angefärbt werden (Taylor et al. 2003, García-Mata et al. 1999), könnte diese mögliche Anreicherung von A $\beta$ -Peptiden im Aggresom bestätigt oder ausgeschlossen werden. Desweiteren soll der mögliche Zusammenhang zwischen perinukleärer Aggregation und der Deformation des Zellkerns (s.o.) genauer untersucht werden.

Eine in den Astrozyten beobachtete bohnenförmige Nukleusdeformation, die teils wie eine Verdrängung des Nukleus durch hineindrückende A $\beta$ -Oligomere (ADDLs) anmutet, soll insbesondere durch Zeitrafferexperimente näher untersucht werden. Eine mögliche Erklärung für die bohnenförmige Nukleusdeformation wäre, dass durch veränderte zytoplasmatische Gegebenheiten durch die Behandlung mit ADDL488-Oligomeren eine zytoskelettmodulierte Deformation des Nukleus stattfindet. Diese aktive Nukleusdeformation wird durch das Aktinomyosin- und mikrotubuläre Zytoskelett vermittelt, die via Nesprin an den Nukleus gekoppelt sind (Mukherjee et al. 2020, Roux et al. 2009). Insbesondere nukleäres F-Aktin beugt einer Nukleusdeformation vor, indem es als Antwort auf zellulären Stress das nukleäre Volumen und die Sphärizität erhöht (Lamm N. 2020).

Zusammenfassend ergeben sich aus den Korrelations- und Kollokalisationsanalysen von ADDL488-Oligomer-positiven Vesikeln und Zellkern mögliche Hinweise auf einen neuartigen Toxizitätsmechanismus von A $\beta$ -Oligomeren auf Kernproteine in Astrozyten.

Während der Ausreifung der hochdynamischen Endosomen vom frühen zum späten Endosom liegen verschiedenste Ras-related in brain-monomere G-Proteine (Rab-GTPasen) vor, die sich typischerweise in bestimmten Mikrodomänen mit unterschiedlichsten Funktionen befinden (Norris und Grant 2020). Von den hier untersuchten Rabs ergab sich eine starke Kollokalisation des Rab7-Signals mit den ADDL488-Oligomer-positiven Vesikeln im Gegensatz zu Rab5/8. Rab7 ist beim Übergang vom frühen zum späten Endosom sowie in der Ermöglichung der Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen und somit für den Abbau von aufgenommenen Substanzen von Bedeutung (Guerra und Bucci 2016, Feng et al. 1995). Aus der beobachteten Kollokalisation lässt sich schließen, dass lösliche A $\beta$ -Oligomere (ADDLs) am ehesten in späten Endosomen und Lysosomen abgebaut werden. Die verstärkte Expression von Rab7 durch die Transfektion wirkt jedoch nicht verstärkend auf die Aufnahme der löslichen A $\beta$ -Oligomere. Daraus lässt sich schließen, dass Rab7 eher als Marker für ADDL488-Oligomer-positive Vesikel dienen kann und weniger als grundlegender Verursacher „vielfressender“ Astrozyten. Durch die fehlende Kollokalisation von Rab5/8 mit den ADDL647-Oligomer-positiven Vesikeln, spielen Rab5 als wichtiger Regulator der Bildung früher Endosomen und deren Anheftung an Mikrotubuli (Zerial und McBride 2001) und Rab8 als Mediator von endosomalen Transport Golgi-verlassender Substanzen Richtung Plasma-Membran sowie das Plasma-Membran-Recycling (Peränen 2011) vermutlich keine oder zumindest eine untergeordnete Rolle in der endosomalen Sortierung löslicher A $\beta$ -Oligomere.

Darüber hinaus kolokalisieren ausschließlich die löslichen A $\beta$ -Oligomere (ADDLs) mit ApoE (hier am Beispiel der ApoE2 und ApoE4-Isoform gezeigt), wohingegen A $\beta$ -Monomere keinen Hinweis auf Kolokalisation zeigen. Die verschiedenen Isoformen von ApoE wirken in unterschiedlicher Weise auf die Entstehung der Alzheimer Demenz ein, wobei ApoE4 mit einem erhöhten Risiko und ApoE2 mit einem verminderten Risiko für das Auftreten von Alzheimer Demenz verbunden sind (Verghese et al. 2011). ApoE4 verstärkt eine präsymptomatische endosomale Dysfunktion und führt zum defekten endozytotischen Abbau (Clearance) von A $\beta$ -Monomeren in Astrozyten (Prasad und Rao 2018). Die A $\beta$ -Aufnahme in die Astrozyten findet durch den Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) -Rezeptor statt und durch die Blockade dieses LRP1-Signalwegs durch ApoE4 kann die Aufnahme von A $\beta$ -Monomeren in die Astrozyten vermindert werden (Liu et al. 2017). Die Aufnahme von A $\beta$ -Oligomeren in Abhängigkeit von der ApoE-Isoform wurde bisher noch nicht untersucht. ApoE erleichtert den Umbau von löslichen monomeren A $\beta$  in toxische lösliche oligomere A $\beta$ -Formen mit  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (ADDLs; Fagan et al. 2002). Außerdem führt die Expression von ApoE zu isoform-spezifischen Unterschieden in der Ansammlung von A $\beta$  (Verghese et al. 2011). Die hier erhobenen Daten deuten auf eine wichtige Rolle des ApoE bei der Aufnahme sowie vermutlich beim intrazellulären Schicksal der aufgenommenen A $\beta$ -Oligomere (ADDLs) hin. Ferner wurde eine Akkumulation von A $\beta$ -Oligomeren in ApoE4-transfizierten Astrozyten deutlich über das vorherige Maß der nicht-transfizierten „Vielfresser“ hinaus beobachtet. Dieser Effekt war spezifisch für A $\beta$ -Oligomere und zeigte sich nicht bei den untersuchten A $\beta$ -Monomer-behandelten Astrozyten. Dies könnte einerseits ein Hinweis auf eine Verstärkung der astrozytären A $\beta$ -Oligomer-Aufnahmeaktivität durch ApoE4 sein. Zum anderen könnte ApoE4 auch den Abbau von A $\beta$ -Oligomeren inhibieren oder erschweren. Beide Hypothesen würden die verstärkte Akkumulation von A $\beta$ -Oligomeren in ApoE4-transfizierten Astrozyten erklären. Die Auswirkungen dieser verstärkten Akkumulation auf die Astrozyten müssen noch untersucht werden – insbesondere ob hierbei auch eine Nukleusdeformation beobachtbar wäre und ob eine mögliche direkte Toxizität der A $\beta$ -Oligomere ohne ApoE4 beziehungsweise mit ApoE2 als protektiver Isoform geringer ausfällt. Demnach sind auch hier weitere Analysen mit anderen Parametern als Marker für Nukleusdeformation sowie Zeitrafferuntersuchungen an lebenden Zellen für die Charakterisierung der A $\beta$ -Oligomer-Aufnahme und deren Mechanismen nötig.

#### 4. 3. **Schlussfolgerungen und Ausblick**

Neurodegenerative Demenzerkrankungen sind weiterhin eine gefürchtete Fehlentwicklung des Alterungsprozesses. Frühere Studien zeigen, dass das F-Aktin-stabilisierende Protein Drebrin die Sensitivität von Neuronen gegenüber intra- und extrazellulären Stressoren maßgeblich beeinflusst. Die hier erhobenen Daten im Mausmodell zeigen jedoch zum einen, dass ein Verlust von Drebrin allein in stark gealterten Mäusen keine detektierbare Neurodegeneration auslöst. Ein Drebrin-Verlust führt damit nicht zu einer verstärkten Vulnerabilität des Neurons gegenüber Altersstress im Sinne von manifester Neurodegeneration. Zum anderen konnte diese auch nicht durch vermehrten endogenen oxidativen Stress provoziert werden. Die Ergebnisse sind aufgrund der genannten Limitationen kritisch zu hinterfragen. Darüber hinaus wäre auch die Betrachtung der Auswirkungen anderer intra- und extrazellulärer Stressfaktoren bei DBN-KO Mäusen interessant, um zu überprüfen, ob die Drebrin-defizienten Neurone vulnerabler gegenüber anderen molekularen Veränderungen sind und es demnach dort zu vermehrter Neurodegeneration kommen könnte. Ob und in welcher Form dieser vermehrte zelluläre Stress Auswirkungen in Form von vermehrter oder andersgelagerter Neurodegeneration auf die Drebrin-defizienten Neurone hat, könnte weitere Informationen über mögliche Drebrin-vermittelte Widerstandsmechanismen der neuronalen Zellen liefern. Es bleibt abzuwarten, ob in einem Mausmodell für Morbus Alzheimer die Sensitivität der Neurone gegen Neurodegeneration durch Drebrin beeinflusst wird.

In einem für diese Dissertation entwickelten in vitro-Assay konnte die Aufnahme von Dextran als Marker für die Flüssigphasen-Endozytose sowie von A $\beta$ -Monomeren und A $\beta$ -Oligomeren als pathologischer Marker der Alzheimer Demenz in Astrozyten beobachtet und mittels Bildverarbeitungssoftware quantifiziert werden. Dabei wurde in Drebrin-defizienten sowie mittels mechanischer Verletzung aktivierten Astrozyten keine veränderte mittlere Aufnahme-Aktivität von Dextran, A $\beta$ -Monomeren oder A $\beta$ -Oligomeren (ADDLs) nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der Astrozyten sowie die Stabilisierung von F-Aktin mittels Drebrin keinen Beitrag zur Aufnahme und Verstoffwechslung von monomeren A $\beta$  leisten. Bei den A $\beta$ -Oligomer-behandelten Astrozyten zeigten sich allerdings Unterschiede in der Verteilung der Vesikelanzahl pro Zelle mit dem Hinweis auf eine „Vielfresser“-Population, deren Aufnahme sich unter aktivierten Bedingungen noch weiter verstärken könnte.

Diese Beobachtung steht im Gegensatz zur A $\beta$ 647-Monomer-Aufnahme und deutet auf unterschiedliche Mechanismen der Aufnahme von A $\beta$ -Monomeren und -Oligomeren hin. Darüber hinaus könnten diese Daten die Grundlage für weiterführende gezielte Untersuchungen der Population der A $\beta$ -Oligomer-„Vielfresser“ sowohl in Zeitrafferstudien in lebenden Zellen als auch in weiterführenden Analysen zur Integrität der Zellen z.B. mittels Zelltod-Markern wie Caspasen und Calcium zur Untersuchung einer potentiell toxischen Wirkung der A $\beta$ -Aufnahme darstellen. Außerdem wäre die molekulare Charakterisierung der unterschiedlich erscheinenden Astrozyten-Populationen z.B. in der Expression von Rabs und ApoE-Isoformen sinnvoll, um mechanistische Ursachen für deren Heterogenität zu detektieren. Hinweise auf eine Anreicherung von A $\beta$ -Peptiden im Aggresom könnten mittels Anfärbung von Vimentin,  $\gamma$ -Tubulin und Ubiquitin zukünftig bestätigt werden. Eine bohnenförmige Nukleusdeformation – möglicherweise durch Verdrängung des Nukleus durch hineindrückende A $\beta$ -Oligomere – wurde in den Astrozyten beobachtet und könnte in weiteren folgenden Experimenten durch Färbung von Laminen und Nukleoporinen sowie durch Detektion weiterer Parameter mittels Bildverarbeitungssoftware näher charakterisiert werden. Lösliche A $\beta$ -Oligomere (ADDLs) könnten aufgrund einer Kolo-kalisation mit Rab7 in späten Endosomen und Lysosomen vorliegen und ihr Ausmaß an Aggregation und Toxizität wird vermutlich durch ApoE4 beeinflusst.

Die Durchführung von Zeitrafferstudien in lebenden Zellen wäre für den zeitlichen Verlauf der A $\beta$ -Aufnahme, den Versuch einer mechanistischen Charakterisierung sowie der Detektion potentiell toxischer Wirkungen von A $\beta$  insbesondere in „vielfressenden“ Astrozyten sinnvoll. Inwiefern eine potentiell schädliche übermäßige Aktivierung und veränderte Aufnahmeaktivität Drebrin-defizienter Astrozyten zur Schädigung der Astrozyten und anderer neuraler Zellen führen, könnte die Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer weiter entschlüsseln und damit mögliche neue Therapieansätze hervorbringen.

## Literaturverzeichnis

- Alfadda, A. A., Benabdelkamel, H., Masood, A., Moustafa, A., Sallam, R., Bassas, A. and Duncan, M. (2013) 'Proteomic analysis of mature adipocytes from obese patients in relation to aging', *Exp Gerontol*, 48(11), 1196-203.
- Aoki, C., Sekino, Y., Hanamura, K., Fujisawa, S., Mahadomrongkul, V., Ren, Y. and Shirao, T. (2005) 'Drebrin A is a postsynaptic protein that localizes in vivo to the submembranous surface of dendritic sites forming excitatory synapses', *J Comp Neurol*, 483(4), 383-402.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P. and Haydon, P. G. (1999) 'Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner', *Trends Neurosci*, 22(5), 208-15.
- Armstrong, R. A. (2009) 'The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease', *Folia Neuropathol*, 47(4), 289-99.
- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. and Rani, V. (2014) 'Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques', *J Microsc*, 255(1), 7-19.
- Beck, M. and Hurt, E. (2017) 'The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(2), 73-89.
- Bedard, K. and Krause, K. H. (2007) 'The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology', *Physiol Rev*, 87(1), 245-313.
- Brigelius-Flohé, R. and Maiorino, M. (2013) 'Glutathione peroxidases', *Biochim Biophys Acta*, 1830(5), 3289-303.
- Brütsch, S. H., Wang, C. C., Li, L., Stender, H., Neziroglu, N., Richter, C., Kuhn, H. and Borchert, A. (2015) 'Expression of inactive glutathione peroxidase 4 leads to embryonic lethality, and inactivation of the Alox15 gene does not rescue such knock-in mice', *Antioxid Redox Signal*, 22(4), 281-93.
- Buffo, A., Rolando, C. and Ceruti, S. (2010) 'Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential', *Biochem Pharmacol*, 79(2), 77-89.
- Burke, B. and Stewart, C. L. (2013) 'The nuclear lamins: flexibility in function', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(1), 13-24.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns

- Cao, H., Chen, J., Awoniyi, M., Henley, J. R. and McNiven, M. A. (2007) 'Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells', *J Cell Sci*, 120(Pt 23), 4167-77.
- Castro, J. P., Jung, T., Grune, T. and Almeida, H. (2013) 'Actin carbonylation: from cell dysfunction to organism disorder', *J Proteomics*, 92, 171-80.
- Counts, S. E., He, B., Nadeem, M., Wu, J., Scheff, S. W. and Mufson, E. J. (2012) 'Hippocampal drebrin loss in mild cognitive impairment', *Neurodegener Dis*, 10(1-4), 216-9.
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M. and McDonald, J. H. (2011) 'A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy', *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(4), C723-42.
- Eddleston, M. and Mucke, L. (1993) 'Molecular profile of reactive astrocytes-- implications for their role in neurologic disease', *Neuroscience*, 54(1), 15-36.
- Elobeid, A., Libard, S., Leino, M., Popova, S. N. and Alafuzoff, I. (2016) 'Altered Proteins in the Aging Brain', *J Neuropathol Exp Neurol*, 75(4), 316-25.
- Fagan, A. M., Watson, M., Parsadanian, M., Bales, K. R., Paul, S. M. and Holtzman, D. M. (2002) 'Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease', *Neurobiol Dis*, 9(3), 305-18.
- Feng, Y., Press, B. and Wandinger-Ness, A. (1995) 'Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic', *J Cell Biol*, 131(6 Pt 1), 1435-52.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J. and Zeller, R. (2008) 'Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections', *CSH Protoc*, 2008, pdb.prot4986.
- Fox, J. G., Davisson, M. T., Quimbly, F. W., Barthold, S. W., Newcomer, C. E. and Smith, A. L. (2007) *The Mouse in Biomedical Research (Second Edition), Volume III: Normative Biology, Husbandry, and Models*, American College of Laboratory Animal Medicine: Academic Press.
- Franceschi, C. and Campisi, J. (2014) 'Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69 Suppl 1, S4-9.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns

- García-Mata, R., Bebök, Z., Sorscher, E. J. and Sztul, E. S. (1999) 'Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera', *J Cell Biol*, 146(6), 1239-54.
- Gelfi, C., Vigano, A., Ripamonti, M., Pontoglio, A., Begum, S., Pellegrino, M. A., Grassi, B., Bottinelli, R., Wait, R. and Cerretelli, P. (2006) 'The human muscle proteome in aging', *J Proteome Res*, 5(6), 1344-53.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., Krafft, G. A. and Klein, W. L. (2003) 'Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(18), 10417-22.
- Guerra, F. and Bucci, C. (2016) 'Multiple Roles of the Small GTPase Rab7', *Cells*, 5(3).
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002) 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics', *Science*, 297(5580), 353-6.
- Hardy, J. A. and Higgins, G. A. (1992) 'Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis', *Science*, 256(5054), 184-5.
- Harigaya, Y., Shoji, M., Shirao, T. and Hirai, S. (1996) 'Disappearance of actin-binding protein, drebrin, from hippocampal synapses in Alzheimer's disease', *J Neurosci Res*, 43(1), 87-92.
- Hayashi, K., Ishikawa, R., Ye, L. H., He, X. L., Takata, K., Kohama, K. and Shirao, T. (1996) 'Modulatory role of drebrin on the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex', *J Neurosci*, 16(22), 7161-70.
- Hebert, L. E., Scherr, P. A., Bienias, J. L., Bennett, D. A. and Evans, D. A. (2003) 'Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census', *Arch Neurol*, 60(8), 1119-22.
- Hirrlinger, J., Hülsmann, S. and Kirchhoff, F. (2004) 'Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ', *Eur J Neurosci*, 20(8), 2235-9.
- Hotulainen, P. and Hoogenraad, C. C. (2010) 'Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function', *J Cell Biol*, 189(4), 619-29.

Isabell Battke: Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns

- Hyttinen, J. M., Amadio, M., Viiri, J., Pascale, A., Salminen, A. and Kaarniranta, K. (2014) 'Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases', *Ageing Res Rev*, 18, 16-28.
- Imai, H., Hirao, F., Sakamoto, T., Sekine, K., Mizukura, Y., Saito, M., Kitamoto, T., Hayasaka, M., Hanaoka, K. and Nakagawa, Y. (2003) 'Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene', *Biochem Biophys Res Commun*, 305(2), 278-86.
- Ishizuka, Y. and Hanamura, K. (2017) 'Drebrin in Alzheimer's Disease', *Adv Exp Med Biol*, 1006, 203-223.
- John, G. R., Chen, L., Riviuccio, M. A., Melendez-Vasquez, C. V., Hartley, A. and Brosnan, C. F. (2004) 'Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis', *J Neurosci*, 24(11), 2837-45.
- Johnston, J. A., Ward, C. L. and Kopito, R. R. (1998) 'Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins', *J Cell Biol*, 143(7), 1883-98.
- Jorgensen, P., Edgington, N. P., Schneider, B. L., Rupes, I., Tyers, M. and Futcher, B. (2007) 'The size of the nucleus increases as yeast cells grow', *Mol Biol Cell*, 18(9), 3523-32.
- Jung, G., Kim, E. J., Cicvaric, A., Sase, S., Gröger, M., Höger, H., Sialana, F. J., Berger, J., Monje, F. J. and Lubec, G. (2015) 'Drebrin depletion alters neurotransmitter receptor levels in protein complexes, dendritic spine morphogenesis and memory-related synaptic plasticity in the mouse hippocampus', *J Neurochem*, 134(2), 327-39.
- Kasper, G., Mao, L., Geissler, S., Draycheva, A., Trippens, J., Kühnisch, J., Tschirschmann, M., Kaspar, K., Perka, C., Duda, G. N. and Klose, J. (2009) 'Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton', *Stem Cells*, 27(6), 1288-97.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W. and Glabe, C. G. (2003) 'Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis', *Science*, 300(5618), 486-9.
- Kreis, P., Gallrein, C., Rojas-Puente, E., Mack, T. G. A., Kroon, C., Dinkel, V., Willmes, C., Murk, K., Tom-Dieck, S., Schuman, E. M., Kirstein, J. and Eickholt, B. J. (2019) 'ATM phosphorylation of the actin-binding protein drebrin controls oxidation stress-resistance in mammalian neurons and *C. elegans*', *Nat Commun*, 10(1), 486.

- Kreis, P., Hendricusdottir, R., Kay, L., Papageorgiou, I. E., van Diepen, M., Mack, T., Ryves, J., Harwood, A., Leslie, N. R., Kann, O., Parsons, M. and Eickholt, B. J. (2013) 'Phosphorylation of the actin binding protein Drebrin at S647 is regulated by neuronal activity and PTEN', *PLoS One*, 8(8), e71957.
- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J. and Schilling, K. (2005) 'Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization', *J Neurosci Res*, 79(3), 295-302.
- Liu, C. C., Hu, J., Zhao, N., Wang, J., Wang, N., Cirrito, J. R., Kanekiyo, T., Holtzman, D. M. and Bu, G. (2017) 'Astrocytic LRP1 Mediates Brain A $\beta$  Clearance and Impacts Amyloid Deposition', *J Neurosci*, 37(15), 4023-4031.
- Lord, S. J., Velle, K. B., Mullins, R. D. and Fritz-Laylin, L. K. (2020) 'SuperPlots: Communicating reproducibility and variability in cell biology', *J Cell Biol*, 219(6).
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E. and Rogers, J. (1999) 'Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease', *Am J Pathol*, 155(3), 853-62.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G. (2013) 'The hallmarks of aging', *Cell*, 153(6), 1194-217.
- Mack, T. G., Kreis, P. and Eickholt, B. J. (2016) 'Defective actin dynamics in dendritic spines: cause or consequence of age-induced cognitive decline?', *Biol Chem*, 397(3), 223-9.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I. and Masters, C. L. (1999) 'Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease', *Ann Neurol*, 46(6), 860-6.
- Mikati, M. A., Grintsevich, E. E. and Reisler, E. (2013) 'Drebrin-induced stabilization of actin filaments', *J Biol Chem*, 288(27), 19926-38.
- Mucke, L. and Selkoe, D. J. (2012) 'Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(7), a006338.
- Mukherjee, A., Barai, A., Singh, R. K., Yan, W. and Sen, S. (2020) 'Nuclear plasticity increases susceptibility to damage during confined migration', *PLoS Comput Biol*, 16(10), e1008300.

Mullen, R. J., Buck, C. R. and Smith, A. M. (1992) 'NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates', *Development*, 116(1), 201-11.

Murakoshi, H. and Yasuda, R. (2012) 'Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines', *Trends Neurosci*, 35(2), 135-43.

Murk, K., Blanco Suarez, E. M., Cockbill, L. M., Banks, P. and Hanley, J. G. (2013) 'The antagonistic modulation of Arp2/3 activity by N-WASP, WAVE2 and PICK1 defines dynamic changes in astrocyte morphology', *J Cell Sci*, 126(Pt 17), 3873-83.

Newey, S. E., Velamoor, V., Govek, E. E. and Van Aelst, L. (2005) 'Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation', *J Neurobiol*, 64(1), 58-74.

Norris, A. and Grant, B. D. (2020) 'Endosomal microdomains: Formation and function', *Curr Opin Cell Biol*, 65, 86-95.

Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S. and Nedergaard, M. (2006) 'Astrocytic complexity distinguishes the human brain', *Trends Neurosci*, 29(10), 547-53.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B. and Nicotera, P. (2003) 'Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 552-65.

Osborn, L. M., Kamphuis, W., Wadman, W. J. and Hol, E. M. (2016) 'Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease', *Prog Neurobiol*, 144, 121-41.

Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J. E. and Woolfrey, K. M. (2011) 'Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders', *Nat Neurosci*, 14(3), 285-93.

Peränen, J. (2011) 'Rab8 GTPase as a regulator of cell shape', *Cytoskeleton (Hoboken)*, 68(10), 527-39.

Piec, I., Listrat, A., Alliot, J., Chambon, C., Taylor, R. G. and Bechet, D. (2005) 'Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle', *FASEB J*, 19(9), 1143-5.

Pleil, J. D., Wallace, M. A. G., Stiegel, M. A. and Funk, W. E. (2018) 'Human biomarker interpretation: the importance of intra-class correlation coefficients (ICC) and

- their calculations based on mixed models, ANOVA, and variance estimates', *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 21(3), 161-180.
- Poon, H. F., Vaishnav, R. A., Getchell, T. V., Getchell, M. L. and Butterfield, D. A. (2006) 'Quantitative proteomics analysis of differential protein expression and oxidative modification of specific proteins in the brains of old mice', *Neurobiol Aging*, 27(7), 1010-9.
- Portiansky, E. L., Barbeito, C. G., Gimeno, E. J., Zuccolilli, G. O. and Goya, R. G. (2006) 'Loss of NeuN immunoreactivity in rat spinal cord neurons during aging', *Exp Neurol*, 202(2), 519-21.
- Prasad, H. and Rao, R. (2018) 'Amyloid clearance defect in ApoE4 astrocytes is reversed by epigenetic correction of endosomal pH', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(28), E6640-E6649.
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G.-C., Wu, Y.-T. and Prina, M. (2015) *World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*, London: Alzheimer's Disease International.
- Ran, Q., Liang, H., Ikeno, Y., Qi, W., Prolla, T. A., Roberts, L. J., Wolf, N., Van Remmen, H., VanRemmen, H. and Richardson, A. (2007) 'Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 62(9), 932-42.
- Rochefort, N. L. and Konnerth, A. (2012) 'Dendritic spines: from structure to in vivo function', *EMBO Rep*, 13(8), 699-708.
- Roux, K. J., Crisp, M. L., Liu, Q., Kim, D., Kozlov, S., Stewart, C. L. and Burke, B. (2009) 'Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(7), 2194-9.
- Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M. and Soininen, H. (2011) 'Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype', *Eur J Neurosci*, 34(1), 3-11.
- Schiweck, J., Eickholt, B. J. and Murk, K. (2018) 'Important Shapeshifter: Mechanisms Allowing Astrocytes to Respond to the Changing Nervous System During Development, Injury and Disease', *Front Cell Neurosci*, 12, 261.
- Schiweck, J., Murk, K., Ledderose, J., Münster-Wandowski, A., Ornaghi, M., Vida, I. and Eickholt, B. J. (2021) 'Drebrin controls scar formation and astrocyte reactivity

- upon traumatic brain injury by regulating membrane trafficking', *Nat Commun*, 12(1), 1490.
- Sekino, Y., Kojima, N. and Shirao, T. (2007) 'Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis', *Neurochem Int*, 51(2-4), 92-104.
- Selkoe, D. J. (2002) 'Alzheimer's disease is a synaptic failure', *Science*, 298(5594), 789-91.
- Shim, K. S. and Lubec, G. (2002) 'Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome', *Neurosci Lett*, 324(3), 209-12.
- Shirao, T. (1995) 'The roles of microfilament-associated proteins, drebrins, in brain morphogenesis: a review', *J Biochem*, 117(2), 231-6.
- Small, S. A., Simoes-Spassov, S., Mayeux, R. and Petsko, G. A. (2017) 'Endosomal Traffic Jams Represent a Pathogenic Hub and Therapeutic Target in Alzheimer's Disease', *Trends Neurosci*, 40(10), 592-602.
- Sofroniew, M. V. (2005) 'Reactive astrocytes in neural repair and protection', *Neuroscientist*, 11(5), 400-7.
- Sofroniew, M. V. (2009) 'Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation', *Trends Neurosci*, 32(12), 638-47.
- Sofroniew, M. V. (2014) 'Astrogliosis', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(2), a020420.
- Sofroniew, M. V. and Vinters, H. V. (2010) 'Astrocytes: biology and pathology', *Acta Neuropathol*, 119(1), 7-35.
- Taylor, J. P., Tanaka, F., Robitschek, J., Sandoval, C. M., Taye, A., Markovic-Plese, S. and Fischbeck, K. H. (2003) 'Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein', *Hum Mol Genet*, 12(7), 749-57.
- Unal-Cevik, I., Kiliç, M., Gürsoy-Ozdemir, Y., Gurer, G. and Dalkara, T. (2004) 'Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note', *Brain Res*, 1015(1-2), 169-74.
- Van Opendenbosch, N. and Lamkanfi, M. (2019) 'Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease', *Immunity*, 50(6), 1352-1364.

- Vergheze, P. B., Castellano, J. M. and Holtzman, D. M. (2011) 'Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders', *Lancet Neurol*, 10(3), 241-52.
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. and Selkoe, D. J. (2002) 'Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo', *Nature*, 416(6880), 535-9.
- Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. (2007) 'A beta oligomers - a decade of discovery', *J Neurochem*, 101(5), 1172-84.
- Walsh, D. M., Townsend, M., Podlisny, M. B., Shankar, G. M., Fadeeva, J. V., El Agnaf, O., Hartley, D. M. and Selkoe, D. J. (2005) 'Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (A $\beta$ ) fibrillogenesis block oligomerization of natural A $\beta$  and thereby rescue long-term potentiation', *J Neurosci*, 25(10), 2455-62.
- Wang, D. D. and Bordey, A. (2008) 'The astrocyte odyssey', *Prog Neurobiol*, 86(4), 342-67.
- Wang, J., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1999) 'The levels of soluble versus insoluble brain A $\beta$  distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging', *Exp Neurol*, 158(2), 328-37.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A. and Hekimi, S. (2018) 'Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling', *J Cell Biol*, 217(6), 1915-1928.
- Weeratunga, S., Paul, B. and Collins, B. M. (2020) 'Recognising the signals for endosomal trafficking', *Curr Opin Cell Biol*, 65, 17-27.
- Willmes, C. G., Mack, T. G., Ledderose, J., Schmitz, D., Wozny, C. and Eickholt, B. J. (2017) 'Investigation of hippocampal synaptic transmission and plasticity in mice deficient in the actin-binding protein Drebrin', *Sci Rep*, 7, 42652.
- Wyss-Coray, T. (2016) 'Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation', *Nature*, 539(7628), 180-186.
- Zerial, M. and McBride, H. (2001) 'Rab proteins as membrane organizers', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 107-17.

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Isabell Battke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse der protektiven Reaktionen des Zytoskeletts während degenerativer Prozesse des Gehirns - Erweiterte Charakterisierung Drebrin-defizienter Zellen/ Analysis of protective cytoskeletal reactions during degenerative processes in the brain - extended characterization of Drebrin-deficient cells“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des StGB) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum            Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe möchte ich mich bei Prof. Dr. Britta Eickholt bedanken. Mein großer Dank gilt außerdem Dr. Till Mack für die umfangreiche Betreuung, sehr gute Anleitung, die ständige Verfügbarkeit bei Fragen und Problemen sowie die ausführlichen Korrekturen.

Außerdem möchte ich allen Kollegen meiner Arbeitsgruppe danken, mit denen ich über die Jahre zusammenarbeiten durfte und die mich herzlich aufgenommen haben. Namentlich hervorheben möchte ich hier Juliane Schiweck, Kristin Lehmann und Kerstin Schlawe, die mich bei meinen ersten Schritten im Labor stets geduldig unterstützt haben. Ihr Engagement und ihre Beharrlichkeit haben mich motiviert und inspiriert.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, Arabella Modes und ganz besonders Hendrik Lottermoser danken, die mir stets ein Anker auch in schwierigen und fordernden Zeiten waren, die immer an mich geglaubt und mich kontinuierlich in meinen Vorhaben unterstützt haben.

## Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

**Battke, Isabell**  
Emailadresse: [Isabell.Battke@charite.de](mailto:Isabell.Battke@charite.de)  
Matrikelnummer: .  
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Britta Eickholt, Dr. Till Mack  
Promotionsinstitution / Klinik: Institut für Biochemie

**Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)**  
Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch  
Posterschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucherschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin  
Tel. +49 (0)30 450 562171  
[geraldine.rauch@charite.de](mailto:geraldine.rauch@charite.de)  
<https://biometrie.charite.de/>



### Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau *Isabell Battke* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 07.05.2021
- Termin 2: 06.07.2021

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Deskriptive Darstellung der Daten mit geeigneten Grafiken
- Berechnung der Intraclass-Correlation innerhalb der Cluster
- Berücksichtigung möglicher Korrelationen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 06.07.2021  
Konietschke

Name des Beraters/der Beraterin: Frank

  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN  
Institut für Biometrie und  
Klinische Epidemiologie  
Prof. Dr. Frank Konietschke  
Campus Charité Mitte  
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin  
Besucherschrift: Reinhardtstraße 58

  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN  
Institut für Biometrie und  
Klinische Epidemiologie  
Campus Charité Mitte  
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin  
StB: Reinhardtstr. 58