

<b>1.</b>	<b>Einführung</b> .....	1
1.1	Synaptische Plastizität .....	1
1.1.1	Veränderungen der Signalstärke an den Synapsen.....	1
1.1.2	Veränderungen in der Anzahl axodendritischer Verbindungen.....	2
1.1.3	Plastizität des neuronalen Netzwerks in Abhängigkeit von Aktivität und Neuritenwachstum .....	2
1.1.4	Synaptische Plastizität im adulten Organismus .....	3
1.1.5	Neurotrophine als biochemische Grundlagen der synaptischen Plastizität.....	4
1.1.6	Synaptische Plastizität im Alter und bei der Alzheimer Demenz.....	7
1.1.6.1	Alter und synaptische Plastizität .....	7
1.1.6.2	Alzheimer Demenz und synaptische Plastizität.....	9
1.1.6.2.1	Alzheimer Demenz .....	9
1.1.6.2.1	Alzheimer Demenz und synaptische Dysfunktion .....	10
1.2	Mitochondrien .....	12
1.2.1	Mitochondrien Aufbau und Funktion .....	12
1.2.2	Atmungskette .....	13
1.2.1	Bedeutung der Mitochondrien in synaptischer Plastizität.....	14
1.2.2	Mitochondrien und oxidativer Stress .....	16
1.2.3	Alter und Mitochondrienfunktion.....	16
1.2.3.1	Alzheimer Demenz und Mitochondrien .....	19
1.2.3.1.1	Aß und Mitochondrien:.....	19
1.2.4	Therapie der Alzheimer Demenz .....	23
1.2.4.1	Acetylcholinesteraseinhibitoren.....	23
1.2.4.2	Piracetam und Nootropika .....	24
1.2.4.3	Neuroprotektiva, Memantin .....	25
1.2.4.4	Ginkgo-Biloba-Extrakt .....	25
1.2.4.7	Verbesserung der Mitochondrienfunktion .....	27
1.2.4.8	Andere Ansätze .....	28
1.3	Ziele der Arbeit.....	29
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	31
2.1	Geräte.....	31
2.2	Material .....	32
2.2.1	Chemikalien und Reagenzien .....	32

2.2.3	Medien und Puffer.....	35
2.2.5	Protease- und Phosphataseinhibitoren .....	38
2.2.6	Antikörper .....	38
2.2.7	Kits.....	39
2.2.8	Zelllinien.....	39
2.2.9	Mäuse .....	39
2.2.10	C57Bl/6NCrl Mäuse .....	39
2.2.11	Transgene Thy-1 APP Mäuse.....	40
2.4	Methoden.....	41
2.4.1	Genotypisierung APP transgener Mäuse.....	41
2.4.1.1	Zucht und Schwanzbiopsie .....	41
2.4.1.2	PCR .....	41
2.4.2	Proteinbestimmung nach BCA Methode .....	42
2.4.3	Zellkultur .....	43
2.4.3.1	Transfizierte Zelllinien .....	43
2.4.3.2	mtGFP Transfektion der APP PC12 Zellen .....	43
2.4.3.3	Stabile Transfektion .....	44
2.4.3.4	Subkultivierung der untersuchten Zelllinien .....	44
2.4.3.5	Differenzierung von PC12 Zellen .....	45
2.4.3.6	Fixierung der Zellen für die Durchlichtmikroskopie .....	45
2.4.4	Aggregation von $\beta$ Amyloid .....	47
2.4.5	Markierung von oligomerem A $\beta$ mit Cy3.....	47
2.4.7	Messung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) .....	48
2.4.8	MTT-Assay.....	48
2.4.9	Bestimmung der A $\beta$ Spiegel von HEK-Zellen .....	49
2.4.10	Mitochondriale Dynamik und Verteilung.....	50
2.4.10.1	Mitochondriale Dynamik .....	50
2.4.10.2	Mitochondriale Verteilung .....	50
2.4.10.3	Mitochondriale Sättigung der Neuriten.....	51
2.4.10.4	Lineare Wanderung der Mitochondrien in Neuriten .....	51
2.4.11	Mitochondriale Morphologie.....	51
2.4.12	Bestimmung der phosphoCREB Spiegel .....	52
2.4.13	Tierstudien .....	53
2.4.13.1	Piracetambehandlung.....	53

2.4.13.2	Piracetambehandlung II.....	53
2.4.13.3	Piracetambehandlung III.....	54
2.4.14	Gewebeentnahme.....	55
2.4.15	Westernblotanalyse synaptischer Marker .....	55
2.4.16	Isolierung von Hirnmitochondrien nach Sims.....	56
2.4.17	Isolierung von Hirnmitochondrien für den Oxygraphen .....	58
2.4.18	Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe .....	59
2.4.19	Citratsynthaseaktivität in isolierten Mitochondrien .....	61
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>63</b>
3.1	Der Einfluss pathogener Mechanismen der AD auf das Neuritenwachstum von PC12 Zellen .....	63
3.1.1.1	Neuritogenese bei unterschiedlichen Neurotrophinkonzentrationen .....	64
3.1.1.2	NGF erhöht das Mitochondriale Membranpotential (MMP).....	65
3.1.1.3	Gesteigerte CREB Phosphorylierung nach NGF Inkubation.....	66
3.1.2	A $\beta$ beeinträchtigt das Neuritenwachstum und die mitochondriale Funktion..	67
3.1.2.1	Beeinträchtigte Neuritogenese in APP PC12 Zellen .....	67
3.1.2.2	Beeinträchtigte NGF abhängige Neuritogenese in APP PC12 Zellen .....	68
3.1.2.4	Beeinträchtigte Neuritogenese und MMP durch oligomeres A $\beta$ .....	70
3.1.3	Nitrosativer Stress beeinträchtigt Mitochondrienfunktion und Neuritenwachstum .....	72
3.1.3.1	Nitrosativer Stress verringert MMP und Neuritogenese .....	72
3.1.3.2	Der Einfluss von nitrosativem Stress auf das MMP differenzierender PC12 Zellen .....	74
3.1.3.3	Mitochondriale Schädigung durch Komplex I Inhibition.....	75
3.1.3.4	Rotenon verringert das MMP und die Neuritogenese in PC12 Zellen.....	75
3.1.3.5	Komplex I Inhibition und nitrosativer Stress zeigen den stärksten Effekt auf das Neuritenwachstum .....	76
3.2	Verringerung der synaptischen Plastizität in AD Tiermodellen .....	78
3.2.1	Einfluss von Risikofaktoren der AD auf die Expression synaptischer Marker <i>in</i> <i>vivo</i> .....	78
3.2.1.1	Einfluss des Alters auf die Expression synaptischer Marker in C57Bl6 Mäusen .....	78
3.2.1.2	Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex 18 und 3 Monate alter C57Bl6 Mäuse .....	79

3.2.1.3	Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex 9 und 3 Monate alter C57Bl6 Mäuse .....	81
3.2.2	Einfluss der A $\beta$ Pathologie auf die Expression synaptischer Marker in C57Bl6 Mäusen .....	82
3.2.2.1	Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex 9 Monate alter C57Bl6 APP Mäuse .....	83
3.2.2.2	Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex 18 Monate alter C57Bl6 APP Mäuse .....	84
	Expression der synaptischen Marker in Abhängigkeit vom Alter der Mäuse: .....	85
3.3	Beeinträchtigte mitochondriale Dynamik im APP PC12 Zellmodell.....	87
3.3.1	mtGFP ist in den Mitochondrien lokalisiert.....	88
3.3.2	Verringerte Neuritenlänge in mtGFP APPsw PC12 Zellen.....	89
3.3.3	Verringerte mitochondriale Dynamik und Verteilung in APPsw PC12 Zellen .....	90
3.3.4	Auswirkungen von A $\beta$ auf die mitochondriale Dynamik .....	91
3.3.5	Applikation von Cy3 getagtem A $\beta$ zu lebenden Zellen.....	91
3.3.6	Charakterisierung von Cy3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	92
3.3.6.1	Zellviabilität nach Schädigung durch Cy3 getaggttes oligomeres A $\beta$ und ungetaggttem A $\beta$ .....	93
3.3.6.2	Aggregation von oligomerem A $\beta$ <sub>1-42</sub> und Cy3 getaggttem oligomerem A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	94
3.3.6.3	Mitochondriales Membranpotential nach Schädigung mit Cy3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	95
3.3.7	A $\beta$ induzierte Verringerung der mitochondrialen Dynamik beeinflusst das Neuritenwachstum .....	97
3.3.7.1	Mitochondriale Dynamik in PC12 Zellen nach 24h Inkubation mit Cy3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	97
3.3.7.2	Neuritenlänge von differenzierten mtGFP PC12 Zellen nach Inkubation Cy3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> für 24h .....	98
3.3.7.3	Cy3 getaggttes A $\beta$ kommt intrazellulär und in den Neuriten vor .....	99
3.3.7.4	Der Einfluss von Cy3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> auf die Neuritogenese und mitochondriale Verteilung in mtGFP PC12 Zellen .....	101
3.3.7.4.1	CY3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> verringert das Neuritenwachstum und die lineare Wanderung der Mitochondrien .....	101
3.3.7.4.2	A $\beta$ führt zu einer Verringerung der Mitochondrien in den Neuriten.....	103

3.4	Mitochondriale Protektion hebt pathologische Veränderungen des Neuritenwachstums auf .....	105
3.4.1	Piracetam verringert die A $\beta$ -Toxizität auf die Neuritogenese von PC12 Zellen .....	105
3.4.2	Piracetam verbessert die durch SNP verringerte Neuritogenese in PC12 Zellen .....	106
3.4.3	Piracetam verbessert die Neuritogenese im APP PC12 Zellmodell .....	108
3.4.4	Der Effekt von Piracetam auf Komplex I Schädigung in differenzierten PC12 Zellen .....	109
3.4.5	CREB Phosphorylierung in PC12 APPsw, die mit Piracetam behandelt wurden .....	110
3.4.6	Der Einfluss von Piracetam auf das mitochondriale Membranpotential und A $\beta$ -load in APPwt HEK Zellen nach nitrosativem Stress.....	112
3.4.7	Einfluss von Piracetam auf die mitochondriale Morphologie Rotenon behandelter HEK Zellen .....	114
3.5	Einfluss mitochondrialer Protektion durch Piracetam im AD Tiermodell und an alten Mäusen .....	116
3.5.1	Der Einfluss von Piracetam auf die Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex in Abhängigkeit vom Alter .....	116
3.5.1.1	Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex 9 Monate alter Mäuse nach Piracetambehandlung.....	117
3.5.2	Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex 18 Monate alter Mäuse nach Piracetambehandlung.....	118
3.5.3	Expression synaptischer Marker in APP transgenen Mäusen nach Piracetambehandlung .....	119
3.5.3.1	Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex 9 Monate alter APP Mäusen nach Piracetambehandlung .....	120
3.5.4	Expression synaptischer Marker in Hippokampus und Cortex 18 Monate alter APP Mäusen nach Piracetambehandlung .....	121
3.5.5	Zusammenfassung: Expression synaptischer Marker nach Piracetambehandlung in 9 und 18 Monate alten Mäusen .....	122
3.5.6	Zusammenfassung: Expression synaptischer Marker in 9 und 18 Monate alten APP transgenen Mäusen nach Piracetambehandlung .....	123

3.6	Der Einfluss von Piracetam auf die Funktion isolierter Mitochondrien aus Thy-1 APP Mäusen.....	124
3.6.1	Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe Piracetam behandelter APP transgener Mäuse.....	124
3.6.2	RCR und ETS isolierter Mitochondrien 9 Monate alter APP transgener Tiere nach Piracetambehandlung .....	126
3.6.3	Citratsynthaseaktivität Piracetam behandelter APP transgener Mäuse .....	127
3.6.4	Analyse der mitochondrialen Proteomics nach Piracetambehandlung .....	128
4.	<b>Diskussion</b> .....	132
4.1	NGF Behandlung verbessert die Mitochondrienfunktion.....	132
4.1.1	Endogene Expression von humanem mutierten APP führt zu einem verringerten Neuritenwachstum .....	132
4.1.2	Nitrosativer Stress und Komplex I Beeinträchtigung führen zu einem verringerten Neuritenwachstum .....	134
4.1.3	Effekte von A $\beta$ auf die mitochondriale Wanderungsgeschwindigkeit in mtGFP PC12 Zellen. ....	135
4.1.4	Etablierung einer Untersuchungsmethode zum Einfluss von A $\beta$ auf die mitochondriale Dynamik.....	137
4.1.5	Charakterisierung des Cy3 getaggtten oligomeren A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	137
4.1.6	Mitochondriale Dynamik in Cy3 A $\beta$ <sub>1-42</sub> behandelten PC12 Zellen .....	138
4.1.7	Auswirkungen von A $\beta$ und Alter auf die strukturelle synaptische Plastizität <i>in vivo</i> .....	141
4.1.8	Untersuchung der strukturellen synaptischen Plastizität im AD Tiermodell und in alten Mäusen.....	141
4.1.9	Expression synaptischer Marker in alten Mäusen.....	142
4.2	Verbesserung der verringerten synaptischen Plastizität durch mitochondriale Protektion.....	143
4.3	Effekte von Piracetam auf die pathologisch erniedrigte strukturelle synaptische Plastizität.....	143
4.3.1	Neuritogenese in A $\beta$ und SNP behandelten differenzierten PC12 Zellen nach Piracetambehandlung .....	144
4.3.2	Erhöhte CREB Phosphorylierung in Piracetam behandelten APPsw PC12 Zellen nach NGF Stimulation .....	145

4.3.3	Mitochondriale Funktion und A $\beta$ -load in Piracetam behandelten HEK Zellen nach nitrosativem Stress.....	146
4.3.4	Protektion der mitochondrialen Morphologie durch Piracetam nach Rotenonbehandlung.....	147
4.4	Piracetam verbessert die synaptische Plastizität und die mitochondriale Funktion <i>in vivo</i> .....	148
4.4.1	Expression synaptischer Marker in alten und APP transgenen Mäusen nach Piracetambehandlung.....	148
4.4.2	Piracetam verbessert die Komplex I Atmung im AD Mausmodell.....	149
4.4.3	Piracetam erhöht die Expression mitochondrialer Proteine im AD-Mausmodell.....	151
4.4.3.1	Proteomicsanalyse der Piracetam gefütterten APP transgenen Mäuse.....	151
4.5	Überlegungen zum Wirkmechanismus von Piracetam.....	152
5.	<b>Fazit</b> .....	155
6.	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	157
7.	<b>Literatur</b> .....	161
8.	<b>Publikationen und Poster</b> .....	175
8.1	<b>Originalarbeiten und Übersichtsartikel:</b> .....	175
8.2	<b>Posterpräsentationen:</b> .....	175
9.	<b>Danksagung</b> .....	177
10.	<b>Lebenslauf</b> .....	178