Protektion perineuronaler Netze der extrazellulären Matrix gegenüber Verbreitung und Einlagerung des Tau-Proteins

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:
Susann Bachstein, geborene Becker

Geburtsdatum / Geburtsort:
15.10.1988 / Leipzig

angefertigt an / in:
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig / Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung molekulare und zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration

Betreuer:
Prof. Dr. med. habil. Thomas Arendt
PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. Markus Morawski

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 20.08.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis....IV
Formelverzeichnis....VI
1 Einleitung....1
1.1 Die Alzheimer Demenz....1
1.1.1 Die Alzheimer Demenz als neurodegenerative Erkrankung....1
1.1.2 Pathogenese der Alzheimer Demenz....2
1.2 Das Tau-Protein....9
1.2.1 Funktionen und Eigenschaften des Tau-Proteins....9
1.2.2 Genetischer Code und Struktur des Tau-Proteins....10
1.2.3 Posttranslationale Modifikationen des Tau-Proteins....11
1.3 Das perineuronale Netz....13
1.3.1 Definition des perineuronalen Netz....13
1.3.2 Aufbau von perineuronalen Netzen....13
1.3.3 Entwicklung von perineuronalen Netzen....18
1.3.4 Ausprägung von perineuronalen Netzen in bestimmten Hirnregionen....18
1.3.5 Ausprägung von perineuronalen Netzen an bestimmten Neuronentypen....20
1.3.6 Funktionen von perineuronalen Netzen....21
2 Aufgabenstellung....23
3 Materialien und Methoden....25
3.1 Materialien....25
3.1.1 Materialien zur Herstellung von Gefrierschnitten....25
3.1.2 Materialien zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen....27
3.1.3 Materialien zur Markierung und Auswertung durch Immunhistochemie....29
3.2 Methoden....32
3.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten....32
3.2.2 Herstellung organotypischer Schnittkulturen....33
3.2.3 Beschreibung der quantitative Auswertung der Verteilung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen....37
4 Ergebnisse....41
4.1 Darstellungen der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten....41
4.1.1 Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Wildtypen....41
4.1.2 Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen....45
4.1.3 Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC....46
4.2 Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen als *Liveimaging*....48
4.2.1 Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Wildtyp-Mäusen als *Liveimaging*....48
4.2.2 Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen als

Liveimaging.....52
4.2.3 Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC als *Liveimaging*.....57
4.3 Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen.....59
4.3.1 Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von fixierten organotypischen Schnittkulturen.....59
4.3.2 Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen während des *Liveimaging*.....68
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse.....72
5 Diskussion.....75
5.1 Diskussion der Methode.....75
5.1.1 Diskussion der Verwendung organotypischer Schnittkulturen.....75
5.1.2 Diskussion der Effekte der Zugabe von exogenem Tau-Protein zu organotypischen Schnittkulturen.....76
5.1.3 Diskussion der Markierung mit Immunhistochemie.....76
5.1.4 Diskussion der quantitativen Auswertung der Verteilung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen durch Umwandlung der Übersichtsbilder in Tabellen.....77
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....78
5.2.1 Diskussion der Ergebnisse der Wildtypen.....78
5.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Tenascin-R-*Knockout*-Mäuse.....80
5.2.3 Diskussion der Ergebnisse von Wildtypen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC.....83
5.3 Ausblick.....85
6 Zusammenfassung.....87
7 Literatur-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....90
Literaturverzeichnis.....90
Abbildungsverzeichnis.....120
Tabellenverzeichnis.....125
8 Anlagen.....128
8.1 Statistik zur quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen während des *Liveimaging*.....128
8.2 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....133
8.3 Lebenslauf.....134
8.4 Danksagung.....135

Bibliographische Beschreibung

Bachstein, Susann

Protektion perineuronaler Netze der extrazellulären Matrix gegenüber Verbreitung und Einlagerung des Tau-Proteins

Universität Leipzig, Dissertation

89 S., 287 Lit., 23 Abb., 21. Tab.

Referat:

Tauopathien wie u.a. die Alzheimer-Demenz sind eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen mit intrazellulärer Ablagerung des hyperphosphorylierten Tau-Proteins. Perineuronale Netze sind eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix im Zentralen Nervensystem. Sie bestehen u.a. aus Chondroitinsulfat-Proteoglykanen und Tenascin-R.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer Protektion perineuronaler Netze vor Tau-Protein-Einlagerung. Zu Beginn wurde die Verteilung des Tau-Proteins und die verschiedenen Arten perineuonaler Netze in der Mauslinie *C57Bl6* (Wildtyp) und deren Tenascin-R-*Knockout* beschrieben. Die Darstellung der Komponenten erfolgte mithilfe von Gefrierschnitten und Immunhistochemie. Um die Ausbreitung von Tau-Protein zu untersuchen, wurden organotypische Hirnschnittkulturen angelegt und markiertes Tau-Protein zugesetzt. Es wurden verschiedene Antikörper genutzt, welche bestimmte Seitenketten von Chondroitinsulfat-Proteoglykanen darstellen. Die Chondroitinsulfat-Seitenketten wurden mit dem Enzym Chondroitinase ABC entfernt, um deren Funktion zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten deutliche Unterschiede in der Verteilung von Tau-Protein. Es reicherte sich bei den Wildtypen und den Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen diffus extrazellulär um Neuronen mit perineuronalen Netzen an. Im Unterschied dazu verteilte sich Tau-Protein nach der Abspaltung der Chondroitinsulfat-Seitenketten vom perineuronalen Netz gleichmäßig über die Schnittkultur ohne sich an perineuronalen Netzen anzureichern.

Die vorliegende Arbeit stellt die neuroprotektive Funktion der perineuronalen Netze und insbesondere ihrer Chondroitinsulfat-Seitenketten gegenüber zugegebenem Tau-Protein heraus. Weiterhin weist sie den Verlust der neuroprotektiven Funktion gegenüber zugegebenem Tau-Protein nach Behandlung mit Chondroitinase ABC nach.

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	β-Amyloid
Aβ39	β-Amyloid, welches aus 39 Aminosäuren besteht
Aβ40	β-Amyloid, welches aus 40 Aminosäuren besteht
Aβ42	β-Amyloid, welches aus 42 Aminosäuren besteht
AD	Alzheimer'sche Erkrankung
APP	Amyloid-Precursor-Protein
Aqua dest.	*Aqua destillata*
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	*Bovine* Serum Albumin (Rinderserum-Albumin)
CRTL1	*Cartilage* Link Protein 1
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
CT	Computertomografie
Cy2	Indocarbocyanin 2
Cy3	Indocarbocyanin 3
Cy5	Indocarbocyanin 5
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAG	Glykosaminoglykane
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
h	Stunden
HAS	Hyaluronsäuresynthetasen
inf.	*inferior*
lat.	*lateral*
med.	*medial*
MNTB	mittlerer Trapezkörperkern

N.	*Nervus, (-i)*
Ncl.	*Nucleus, (-i)*
NeuN	Neuronales Kernprotein
NFT	Neurofibrillenbündel (*neurofibrillary tangles*)
NP	Senile Plaques
NT	fadenförmige Neurofibrillen (*neuropil threads*)
PBS	*Phosphate buffered saline*
PBS-T	*Phosphate buffered saline*-Tween
PN	perineuronales Netz, (-e)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sup.	*superior*
TnR$^{-/-}$	Tenascin-R-*Knockout*
Tr.	*Tractus*
WFA	Wisteria floribunda-Agglutinin
WT	Wildtyp
WT^{ChABC}	mit dem Enzym Chondroitinase behandelte Wildtypen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Formelverzeichnis

Symbol	Bedeutung
P1	Wert für perineuronale Netze (PN)
P2	um Schnittkultur-freie Flächen korrigierter Wert für PN
R1	Rauschart 1
R2	Rauschart 2
T1	Wert für zugegebenes Tau-Protein
T2	um Schnittkultur-freie Flächen korrigierter Wert für zugegebenes Tau-Protein
W1	Mittelwert der Kolokalisation von PN und Tau-Protein
W2	um Schnittkultur-freie Flächen korrigierter Mittelwert der Kolokalisation von PN und Tau-Protein

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer Demenz

1.1.1 Die Alzheimer Demenz als neurodegenerative Erkrankung

Die Alzheimer Demenz (AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung mit Zunahme involutiver Veränderungen und Funktionsstörungen (**Beyreuther** 2002). Die Erstbeschreibung erfolgte 1907 durch den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer (1864-1915) (**Alzheimer** 1907). Die AD zeichnet sich durch Symptome wie Gedächtnisstörungen, Verwirrtheit, Wortfindungs- und apraktische Störungen, völligen Verlust von Einsichts- und Urteilsvermögen, impulsive und aggressive Handlungsweisen, Inkontinenz und fehlendes Erkennen bisher vertrauter Personen aus (**Beyreuther** 2002). Insgesamt schreitet die Erkrankung in verschiedenen Phasen über acht bis zehn Jahre kontinuierlich fort, zeigt aber eine ausgeprägte interindividuelle Streuung (**Albert** 1964; **Bracco** 1994).

Obwohl die AD mit zirka 60 % aller Demenzerkrankungen als die häufigste Demenz gilt, ist die Diagnose immer noch schwierig zu stellen. Eine definitive Diagnosestellung ist nur *post mortem* durch Obduktion möglich (**Beyreuther** 2002). Das Erkennen eines Demenzsyndroms mit entsprechendem Verlauf und klinischem Erscheinungsbild und eine Hirnatrophie in der Computertomografie sprechen für die Erkrankung, andere Ursachen einer Demenz werden dabei ausgeschlossen (**Beyreuther** 2002). Jedoch fehlt zurzeit die Notwendigkeit einer definitiven Diagnosestellung, da eine entsprechende Therapie nicht vorhanden ist. Lediglich symptomatische und sozial-psychiatrische Maßnahmen sind angezeigt. Zur Besserung kognitiver Defizite können Cholinesteraseinhibitoren führen (**Beyreuther** 2002).

1.1.2 Pathogenese der Alzheimer Demenz

Senile Plaques als bedeutende Pathologie der Alzheimer Demenz

Eine bedeutende Pathologie bei der AD bilden die senilen Plaques (NP). Sie enthalten einen zentralen Kern aus unlöslichem β-Amyloid und zahlreichen degenerierten Neuriten, der von Astrozyten und aktivierter Mikroglia umgeben ist (**Bartels et al.** 2005). In der Umgebung der Plaques, die extrazellulär liegen, kommt es zur Neurodegeneration. NP treten auch bei anderen Demenzen auf, sind jedoch nicht so zahlreich (**Zubenko** 1997). Umstritten ist allerdings, ob die Immunreaktion primär chronisch vorhanden ist und dadurch neurodegenerative Prozesse in Gang gesetzt werden, oder ob die Immunreaktion erst sekundär als Antwort auf die Bildung von Plaques und Tangles entsteht. Für die primär vorhandene Immunreaktion spricht unter anderem, dass mit nichtsteroidalen Antiphlogistika behandelte Patienten weniger häufig an AD erkranken (**Beyreuther** 2002).

Die Anzahl extrazellulärer Plaques korreliert mit dem Grad der Demenz bei der AD, die Anzahl an *β*-Amyloid allerdings nicht (**Beyreuther** 2002). *β*-Amyloid besteht aus 39 bis 42 Aminosäuren (A*β*39-42). Es aggregiert leicht, bildet nahezu unlösliche Fibrillen und scheint zytotoxisch auf die umgebenden Zellen zu wirken (**Bartels et al.** 2005). Zirka 90 % des von einer Zelle produzierten A*β*-Peptids sind A*β*40-Produkte, zirka 10 % sind A*β*42-Produkte. Aufgrund der beiden zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Alanin, neigt A*β*42 stärker zur Aggregation als A*β*40 (**Clark et al.** 2003). *β*-Amyloid-Peptid entsteht bei der pathologischen Spaltung eines Vorläuferproteins, des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) (**Bartels et al.** 2005). APP ist ein Transmembranprotein, dessen Gen auf Chromosom 21 liegt. Isoformen entstehen durch alternatives *Splicing* und posttranslationale Veränderungen (**Bartels et al.** 2005). Physiologisch findet die Spaltung des APP durch die sogenannte *α*-Sekretase im Bereich des A*β*-Peptids statt. Nach der Spaltung folgt die Sezernierung der N-terminalen Domäne. Das C-terminale Fragment wird weiter durch Proteinasen abgebaut (**Bartels et al.** 2005). Pathophysiologisch relevant ist die Spaltung des APP durch die *β*-Sekretase, die ein verkürztes N-terminales Bruchstück und ein C-terminales Restprotein hinterlässt. Das C-terminale Restprotein kann anschließend durch die *γ*-Sekretase in ein C-terminales Peptid und das pathogene *β*-Amyloid (A*β*40 oder A*β*42) gespalten werden (**Clark et al.** 2003). Durch die verstärkte Bildung von *β*-Amyloid kommt es zu einem Verlust der neuroprotektiven Komponente von APP

und zur Anreicherung der Spaltprodukte β-Amyloid zuerst intrazellulär, später auch extrazellulär (**Beyreuther** 2002).

In Tiermodellen führt die Überexpression amyloidogener Proteine teilweise zur Ausbildung des Krankheitsbildes der AD. Das Mausmodell Tg2576 zeigt, dass Aggregationsprozesse zum Ausfall neurologischer Funktionen führen, das Fehlen des jeweiligen Proteins aber nicht (**Flach** 2006; **Morawski et al.** 2010c). Die Tiere zeigen eine Überexpression der schwedischen Mutation des humanen APP, sind aber phänotypisch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden.

Tau-Protein-Veränderungen als bedeutende Pathologie der Alzheimer Demenz

Eine weitere bedeutende Pathologie bei der AD bilden Einschlüsse aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Fibrilläre Tau-Pathologien gibt es nicht nur bei der AD. Der Begriff der Tauopathien wurde erstmals 1997 von Spillantini verwendet (**Spillantini et al.** 1997; **Arendt et al.** 2016). Tauopathien werden als eine Gruppe von sporadischen oder familiären neurodegenerativen Erkrankungen bezeichnet, die durch filamentäre Anordnungen von hyperphosphoryliertem Tau-Protein in Neuronen oder in Neuronen und Gliazellen charakterisiert sind (**Ballatore et al.** 2007; **Chin und Goldman** 1996; **Ferrer et al.** 2014; **Spillantini und Goedert** 1998, 2013). Es existieren aktuell etwa 20 verschiedene Tauopathien. Diese werden in primäre und sekundäre Tauopathien klassifiziert. Die Einteilung beruht auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft und ist abhängig davon, ob die Tau-Pathologie der Hauptfaktor für die Beeinträchtigungen ist oder ob Assoziationen mit anderen Pathologien bestehen (**Dickson et al.** 2011; **Kovacs** 2016; **Williams** 2006). Primäre Tauopathien sind Erkrankungen, die durch eine frontotemporale Degeneration mit Zerstörung des Frontal- und Temporallappens gekennzeichnet sind (**Cairns et al.** 2007; **Dickson et al.** 2011; **Mackenzie et al.** 2010; **Seltman und Matthews** 2012). Beispiele sind die Pick´sche Erkrankung, Progressive Supranukleäre Blickparese, Kortikobasale Degeneration, Agyrophile Körnerkrankheit (**Duyckaerts et al.** 2009) und der Parkinsonismus (**Goedert und Jakes** 2005). Die AD gehört zu den sekundären Tauopathien. Dazu zählen unter anderen auch das Down-Syndrom, Prionen-Erkrankungen, die Lewy-Körper-Störung, die chronisch-traumatische Enzephalopathie, Morbus Huntington und die Niemann Pick Erkrankung Typ C (**Williams** 2006).

Als Tauopathie weist die AD intrazelluläre Ablagerungen des hyperphosphorylierten Tau-Proteins in Form von Neurofibrillenbündeln (*neurofibrillary tangles*, NFT) oder fadenförmigen Neurofibrillen (*neuropil threads*, NT) in Neuronen auf (**Duyckaerts et al.** 2009). Die aggregierten Filamente der NFT lagern sich im Soma ab, NT hingegen lagern sich im Bereich der Dendriten, seltener der Axone ab (**Crowther und Goedert** 2000; **Goedert** 1999; **Lee et al.** 2001). NFT reichern sich typischerweise in den Pyramidenneuronen des Hippocampus, dem entorhinalen Kortex und in Schicht III und V des Isokortex an. Es reichert sich nicht in Interneuronen an (**Braak et al.** 1986; **Duyckaerts et al.** 1989). Die Hauptkomponente der NT sind paarige helikale Filamente (PHF-Tau). PHF-Tau hat einen Durchmesser von 8 bis 20 nm und eine Periodizität von 80 nm (**Goedert et al.** 1992a). Das sonst lösliche Tau-Protein ist hyperphosphoryliert und neigt vermehrt zur Aggregation (**Bartels et al.** 2005). Durch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen kommt es zu einer übermäßigen Phosphorylierung von Tau-Protein an bis zu 21 Epitopen (**Grundke-Iqbal et al.** 1986; **Matsuo et al.** 1994; **Yan et al.** 1994). Dieses Ungleichgewicht kann durch die Aktivierung von Proteinkinasen durch Heparin oder Heparansulfat beziehungsweise durch Ganglioside entstehen (**Goedert et al.** 1996; **Nuydens et al.** 1995; **Pelech** 1995; **Pelech et al.** 1993; **Yan et al.** 1994). Weitere funktionell wichtige Faktoren, die zu einer Erhöhung der Aktivität von Proteinkinasen führen, sind ATP-Mangel (**Bush et al.** 1995; **Roder und Ingram** 1991), Insulinmangel (**Hong und Lee** 1997) oder Erhöhung der APP-Konzentration (**Greenberg et al.** 1994). Durch seine übermäßige Phosphorylierung kann Tau-Protein nicht mehr an Mikrotubuli binden. Diese werden instabil und der axoplasmatische Flux wird gestört (**Goedert et al.** 1991; **Goedert et al.** 1995; **Beyreuther** 2002). Dadurch kann es zur Distorsion und Fragmentierung des GOLGI-Apparates und zur fehlerhaften Prozessierung von Proteinen kommen (**Stieber et al.** 1996; **Beyreuther** 2002).

Die AD wird als sekundäre Tauopathie bezeichnet, da sie durch die senilen Plaques eine weitere Pathologie besitzt. Der Zusammenhang zwischen intrazellulären Ablagerungen des hyperphosphorylierten Tau-Proteins und den senilen Plaques ist immer noch weitgehend ungeklärt. Bewiesen ist, dass es Wechselwirkungen in beide Richtungen gibt. Das heißt, β-Amyloid kann die Menge an hyperphosphoryliertem Tau-Protein erhöhen und umgekehrt (**Ittner und Götz** 2011; **Bright et al.** 2015). Dieser Zusammenhang konnte in zahlreichen Tierversuchen gezeigt werden. Wenn transgene Mäuse für humanes mutiertes APP mit transgenen Mäusen für humanes Tau-Protein gekreuzt werden, zeigen die Tiere eine erhöhte Menge an pathologischem

Tau-Protein. Die Menge an β-Amyloid ist nicht erhöht (**Lewis et al.** 2001). Auch β-Amyloid-Injektionen in Mäuse, welche transgen für humanes Tau-Protein sind, führen zur Vermehrung der Tau-Protein-Einschlüsse (**Götz** 2001; **Bolmont et al.** 2007).

Ausbreitung der Alzheimer-spezifischen degenerativen Veränderungen im menschlichen Gehirn

Die AD führt zu einer degenerativen Veränderung einiger Hirnareale, während andere Areale bis zum Endzustand erhalten bleiben. Nervenzellen in den Teilbereichen des limbischen Systems wie entorhinale Region, Amygdala und die Hippocampusformation, die Faserverbindungen zum Isokortex unterhalten, zeigen die ersten alzheimertypischen Veränderungen (**Braak und Braak** 1997).

Die alzheimertypischen neurofibrillären Veränderungen werden bei älteren Patienten häufig gefunden, können jedoch nicht zu den normalen Altersveränderungen gezählt werden. In vielen Fällen finden sich neben den extraneuronalen NFT auch neu gebildete intraneuronale NFT. Die Krankheit erlischt also nicht, der pathologische Prozess der AD schreitet unaufhaltsam fort, zeigt keine Remission und keine Chance zur spontanen Ausheilung (**Braak und Braak** 1995).

Die ersten neuritischen Plaques entstehen im Extrazellularraum der basalen Teile des Isokortex, häufig des Temporallappens. Von dort breiten sich diese aufsteigend in weitere Bereiche der isokortikalen Assoziationsfelder aus. Erst spät entstehen Ablagerungen in der entorhinalen Region, der Amygdala und der Hippocampusformation. Im Endstadium der Erkrankung treten in nahezu allen Bereichen der Hirnrinde und in vielen subkortikalen Gebieten Ablagerungen auf (**Braak und Braak** 1997). Die ersten intrazellulären Ablagerungen aus hyperphosphorylierten Tau-Protein in Form von NFT entstehen meist in unmittelbarer Nähe der Lipofuszinkörnchen der Nervenzellen. Sie können durch das endogene Enzymsystem nicht abgebaut werden und sammeln sich im Soma bis in die Zellfortsätze allmählich an. Die betroffenen Nervenzellen sterben vermutlich ab und werden von Makrophagen abgebaut. Extraneuronal bleiben die NFT frei im Gewebe liegen und werden vermutlich im Verlauf einiger Jahre abgebaut (**Braak und Braak** 1997). Im Bereich des Isokortex sind nur bestimmte Arten von Projektionsneuronen zur NFT-Bildung fähig, viele Interneurone bleiben frei von diesen Pathologien (**Hyman und Gómez-Isla** 1994).

Die ersten kortikalen neurofibrillären Veränderungen entstehen in einem kleinen Feld und breiten sich von dort nach einem kennzeichnenden Muster aus. Dieses

Muster dient als Basis für eine Gliederung der pathologischen Veränderungen in den Stadien nach Braak (**Braak und Braak** 1991, 1994; **Hyman und Trojanowski** 1997; **Nagy et al.** 1997), wie in Abbildung 1.1 zu sehen ist.

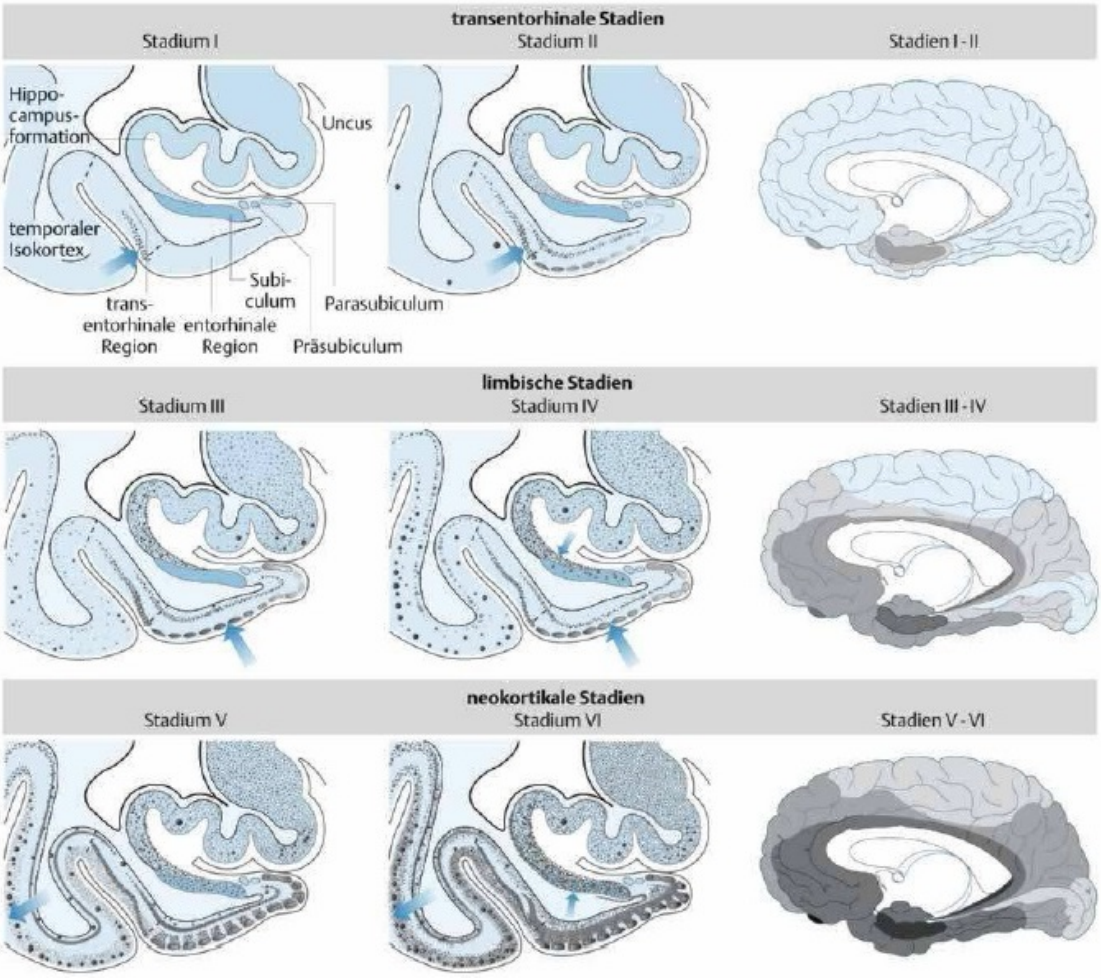

Abbildung 1.1: Charakteristisches Ausbreitungsmuster der neurofibrillären Veränderungen bei der Alzheimer-Demenz nach Braak: Im linken und mittleren Bildteil sind die Veränderungen von Stadium I bis zu Stadium VI in Frontalschnitten durch den Uncusbereich der Hippocampusformation und vordere Abschnitte des Gyrus parahippocampalis dargestellt. Die Pfeile weisen auf Schlüsselmerkmale hin, die für die jeweiligen Stadien besonders typisch sind und das Bestimmen der Stadien erleichtern. Im rechten Bildteil ist die Ausbreitung der Veränderungen über eine rechte Hemisphäre in der Betrachtung von medial wiedergegeben, nach (**Braak und Braak** 1997).

Mit dem Auftreten erster mit Silbersalzen schwärzbarer NFT ist das Stadium I erreicht. Insgesamt können sechs Stadien durchlaufen werden. Die NFT nehmen dabei an Schweregrad zu und breiten sich zugleich flächenmäßig weiter aus. Die Stadien I und II sind dabei als präklinische Stadien zu bezeichnen. Die ersten kortikalen neurofibrillären Tangles entstehen immer in einem Randbereich der entorhinalen Rinde, der transentorhinalen Region, die als Eintrittspforte für den isokortikalen

Datenstrom angesehen wird. Klinisch zeigen sich in den transentorhinalen Stadien I und II noch keine Symptome. In den Altersklassen zwischen 25 und 35 Jahren sind bereits etwa 20 % der Fälle im Stadium I oder II. Altern ist daher zwar ein Risikofaktor für eine klinisch erkennbare Phase der AD, ein alterndes Gehirn ist aber keine Voraussetzung für den Beginn eines degenerativen Prozesses. Die AD braucht eine ungewöhnlich lange Zeit für ihre Entwicklung und tritt daher erst in höherem Alter in Erscheinung (**Braak und Braak** 1997).

Ab den limbischen Stadien III und IV treten deutliche Veränderungen innerhalb der entorhinalen Region, der Amygdala und der Hippocampusformation auf. Es kommt zu schleichend einsetzenden Symptomen. Abhängig von den unterschiedlichen Reservekapazitäten der Individuen zeigen sich geringgradige Einbußen intellektueller Fähigkeiten und erste Veränderungen der Persönlichkeit (**Jellinger et al.** 1991; **Braak et al.** 1993; **Bancher et al.** 1996), weil die Veränderungen bilateral symmetrisch in beiden Hemisphären auftreten und sich auf die übergeordneten Zentren der limbischen Schleife konzentrieren. Das Stadium III ist bereits durch eine schwere Zerstörungen der entorhinalen Region gekennzeichnet. Zunächst ist die oberflächliche Zellschicht, die Informationen vom Isokortex aufnimmt und zur Hippocampusformation führt, betroffen (**Van Hoesen et al.** 1991; **Gómez-Isla et al.** 1996). Im Stadium IV treten Veränderungen in tiefen Schichten hinzu, die für die Rückprojektion aus der Hippocampusformation zum Isokortex verantwortlich sind. Somit wird der Hippocampus weitestgehend vom Isokortex isoliert (**Hyman et al.** 1984; **Van Hoesen und Hyman** 1990). Insgesamt beschränken sich die Veränderungen noch weitestgehend auf den vorderen und medialen Bereich des Temporallappens, also auf die limbischen Zentren, wie die Hippocampusformation, die Amygdala und die entorhinale Region. Eine deutliche isokortikale Beteiligung ist ebenfalls zu verzeichnen.

Die Stadien V und VI werden als isokortikale Stadien bezeichnet (**Braak und Braak** 1997) und bilden die Endphase der Krankheit. Es kommt zur schweren Zerstörung großer Bereiche des Gehirns mit deutlichen klinischen Symptomen. Wesentliches Merkmal ist das Vorkommen großer Mengen neurofibrillärer Veränderungen in nahezu allen Teilbereichen der Hirnrinde, vor allem aber in den ausgedehnten Assoziationsarealen des Isokortex. Der einsetzende starke Verlust an kortikalen Projektionsneuronen ist mit Schrumpfungen der Hirnrinde und einem entsprechendem Verlust an Gehirngewicht verbunden. Insbesondere in den frontalen und temporalen Bereichen der Hirnrinde sind die Furchen entsprechend erweitert. Erst mit Übergreifen des pathologischen Prozesses auf die isokortikalen

Assoziationsregionen kommt es vermutlich zur Zerstörung langer kortiko-kortikaler Verbindungen. Dadurch kommt es zu einer weitgehenden Isolierung der postzentralen parietookzipitotemporalen Areale der Isokortex von seinen präzentralen Anteilen, also dem frontalen Assoziationskortex und den zum motorischen System gehörigen Feldern (**Lewis et al.** 1987).

Die AD ist durch einen hochgradig selektiven Untergang von Nervenzellen gekennzeichnet. Einige Systeme, wie die Zentren der limbischen Schleife und die sensorischen und frontalen Assoziationsfelder, werden nahezu vollständig zerstört. Andere Systeme wie die primären und sekundären Felder des Neokortex bleiben erhalten. Das auditorische System bleibt ebenso frei von alzheimertypischen Veränderungen. Beim motorischen System kommt es erst spät durch die neurofibrillären Veränderungen in den dopaminergen Projektionsneuronen des Mittelhirns zu einem hyperton-hypokinetischem Syndrom (**Braak et al.** 1998). Dabei ist auffällig, das in den am schwächsten myelinisierten Feldern des Allokortex die ersten alzheimertypischen Veränderungen entstehen und sich gegenläufig zum Prozess der Myelinisierung allmählich in Richtung der Primärfelder des Isokortex ausbreiten. Da Oligodendrogliazellen nicht nur die Axon-umhüllenden Markscheiden aufbauen, sondern auch Einfluss auf das axonale Zytoskelett ausüben, ist es möglich, dass Funktionseinbußen von Oligodendrogliazellen eine Rolle bei der Entstehung der AD spielen (**Braak und Braak** 1996).

Einige Studien zeigen, dass bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen, einschließlich der AD, die Ausbreitung von fehlgefalteten Protein-Aggregaten im Gehirn aus einer Prionen-ähnlichen Übertragung von Zelle zu Zelle resultiert (**Brundin et al.** 2010; **Frost und Diamond** 2010; **Walker et al.** 2013). Humanes Tau-Protein kann demnach im extrazellulären Raum durch einen aktiven Prozess der Sekretion freigesetzt und endozytiert werden, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (**Clavaguera et al.** 2009; **Frost et al.** 2009; **Kim et al.** 2010a; **Kim et al.** 2010b; **Guo und Lee** 2011; **Yamada et al.** 2011; **Chai et al.** 2012; **Karch et al.** 2012; **Kfoury et al.** 2012; **Plouffe et al.** 2012; **Saman et al.** 2012; **Simón et al.** 2012; **Wu et al.** 2013). In einem transgenen Mausmodell, indem die menschliche Tau-Überexpression im entorhinalen Kortex eingeschränkt war, wurde die Verbreitung der Tau-Pathologie entlang synaptisch verknüpfter Schaltkreise beobachtet (**Calignon et al.** 2012; **Liu et al.** 2012). Dies weist darauf hin, dass die Sekretion von Tau-Protein durch präsynaptische Neuronen und seine Aufnahme durch postsynaptische Neuronen die sequenziellen Ereignisse sein könnten, die zur Ausbreitung der Tau-Pathologie im Gehirn führen (**Mohamed et al.** 2013).

1.2 Das Tau-Protein

1.2.1 Funktionen und Eigenschaften des Tau-Proteins

Das Tau-Protein ist ein Mikrotubuli-assoziertes Protein. Hauptfunktion ist die Mikrotubuli-Bindung und -Regulation. 80 % des Tau-Proteins ist an Mikrotubuli gebunden (**Igaev et al.** 2014). Tau-Protein reguliert die mechanische Stabilität von Mikrotubuli und definiert den Mikrotubuli-Abstand (**Weingarten et al.** 1975; **Witman et al.** 1976; **Cleveland et al.** 1977; **Binder et al.** 1986; **Papasozomenos und Binder** 1986; **Drechsel et al.** 1992; **Chen et al.** 1992). Mit der Bindung von Tubulin reguliert Tau-Protein die Morphogenese und Differenzierung der Neuriten-Polarität, axonales Auswachsen, axonale Verlängerung und neuronale Plastizität. Der axonale Transport wird über Kinesin reguliert. (**Drubin et al.** 1985; **Hirokawa et al.** 1988; **Caceres und Kosik** 1990; **Esmaeli-Azad et al.** 1994; **Brandt et al.** 1995; **Kempf et al.** 1996; **Liu et al.** 1999; **Takei et al.** 2000; **Samsonov et al.** 2004; **Dixit et al.** 2008; **Dawson et al.** 2010).

Tau-Protein ist auch dendritisch, pre- und postsynaptisch lokalisiert (**Morris et al.** 2011; **Regan et al.** 2016). Es interagiert mit dem Aktin-Zytoskelett und erfüllt Funktionen an synaptischen Neurotransmitter-Rezeptoren wie muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren, die noch weitgehend ungeklärt sind (**Gómez-Ramos et al.** 2009; **Ittner et al.** 2010). Eventuell dient es als Lücke für Bindungspartner oder als synaptische Bremse (**Arendt et al.** 2016). Im Zellkern ist Tau-Protein an der Bildung der mitotischen Spindel beteiligt (**Loomis et al.** 1990; **Wang et al.** 1993; **Thurston et al.** 1997; **Luna-Muñoz et al.** 2005; **Lu et al.** 2014). Es interagiert durch seine Prolin-reiche Region mit DNA (**Wei et al.** 2008; **Qi et al.** 2015), kann RNA binden (**Kampers et al.** 1996) und ist für die chromosomale Stabilität verantwortlich. Pathologische Tau-Proteine verlieren ihre Funktion an Synapsen und im Zellkern. Neben den Neuronen wird es auch in Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert (**Spillantini et al.** 2006).

Humanes Tau-Protein ist je nach Isoform 55 bis 62 Kilodalton groß. Es besteht dabei zu zirka 15 % aus den hydrophilen Aminosäuren (AS) Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan und Valin und ist sehr gut wasserlöslich. Abhängig von ihrer Isoform haben diese AS bei physiologischem pH-Wert eine positive Nettoladung und führen zu einem hohen isoelektrischen Punkt zwischen 8,3 – 10 Coulomb. Tau-Protein weist insgesamt eine positive Nettoladung bei physiologischem pH-Wert auf (**Wright und Dyson** 1999; **Uversky et al.** 2000; **Romero et al.** 2001).

Tau-Protein besteht aus 4 Regionen – N-terminal eine negativ geladene Projektionsdomäne, eine saure, Prolin-reiche Region, eine Mikrotubuli-Bindungsregion und der C-terminalen Region (**Brandt et al.** 1995; **Buée et al.** 2000; **Arendt et al.** 2016). Die Mikrotubuli-Bindungsregion kann sich durch Bindung verändern (**Woody et al.** 1983; **Kadavath et al.** 2015). Durch ihre negative Ladung wird die N-terminale Region bei Bindung abgestoßen (**Hirokawa et al.** 1988; **Mukhopadhyay und Hoh** 2001; **Kar et al.** 2003; **Amos** 2004). Dies reguliert den Abstand der Mikrotubuli (**Chen et al.** 1992). Die C-terminale Region mit den Repeat-Regionen reguliert die Rate der Mikrotubuli-Polymerisation, die Interaktion mit der Plasmamembran und kann zahlreiche Bindungspartner binden. Somit bildet Tau-Protein das Gerüst für die Signal-Protein-Modulation (**Brandt und Lee** 1993; **Maas et al.** 2000; **Eidenmüller et al.** 2001; **Reynolds et al.** 2008).

1.2.2 Genetischer Code und Struktur des Tau-Proteins

Das Tau-Protein-Gen befindet sich auf dem menschlichen Chromosom 17. Es enthält insgesamt 16 Exons. Daraus entstehen sechs Isoformen durch alternatives *Splicing* von Exon 2, 3 und 10 (**Neve et al.** 1986; **Goedert und Crowther** 1989; **Goedert et al.** 1989; **Himmler** 1989; **Andreadis et al.** 1992). Tau-Protein wird in Neuronen gebildet. Alle sechs Isoformen sind im Gehirn vertreten, präferentiell in Axonen aber auch somatodendritisch, in Synapsen sowie im Zellkern. Zusätzliche Isoformen gibt es im peripheren Nervensystem durch alternatives *Splicing* von Exon 4A und 6 (**Couchie et al.** 1992; **Goedert et al.** 1992b; **Nunez und Fischer** 1997; **Boyne et al.** 1995; **Andreadis et al.** 1995; **Arikan et al.** 2002; **Li et al.** 2003b; **Wang et al.** 2004). Auf Exon 10 befindet sich eine der vier Mikrotubuli-Bindungsregionen (**Spillantini et al.** 2006). Beim *Splicing* von Exon 10 entsteht Tau-Protein mit vier statt drei Mikrotubuli-Bindungsregionen. Die Mikrotubuli-Bindungsregion besteht je nach Isoform aus drei oder vier hoch kondensierten Domänen (*Repeats)* (**Spillantini und Goedert** 1998; **Goedert und Jakes** 1990; **Hong et al.** 1998). Die sechs Isoformen kommen gewebe- und funktionsabhängig vor. Sie verändern sich mit dem Alter des Individuums. Während des Wachstums beziehungsweise fetal bestehen sie meistens aus drei *Repeats*. Dies ermöglicht eine höhere zytoskeletale Plastizität während des Neuritenwachstums und der Synaptogenese (**Goedert und Crowther** 1989; **Goedert et al.** 1989; **Goedert et al.** 1992b; **Couchie et al.** 1992; **Nunez und Fischer** 1997). Isoformen mit drei *Repeats* haben eine schwächere Mikrotubuli-Bindung verglichen mit vier *Repeats*. Die aus vier *Repeats* bestehende Domäne hat eine bis zu 40fach höhere Affinität zu Mikrotubuli (**Lee et al.** 1989; **Maccioni et al.**

1989). Ein Wechsel zu vier *Repeats* erfolgt mit der Formierung von Synapsen (**Altman und Sudarshan** 1975; **Simons und Land** 1987). Dies könnte zu einer höheren Mikrotubuli-Stabilität führen. Allerdings sind auch adult bis zu 20 % Isoformen mit drei *Repeats* vorhanden (**Janke et al.** 1996), wahrscheinlich um weiterhin neuronale Plastizität zu ermöglichen (**Bullmann et al.** 2009). Im Neokortex lassen sich drei Tau-Protein-Isoformen detektieren, deren Domänen aus drei *Repeats* bestehen (**Spillantini et al.** 2006). Diese führen zu abnormalem, pathologischem Tau-Protein. Verantwortlich dafür sind Punktmutationen in drei benachbarten Nukleotiden des Tau-Gens. Damit ist Exon 10 wichtig für das normale *Splicing* des Tau-Proteins. Ein Defekt des Tau-Gens findet sich bei der *G-to-A*-Mutation der familiären AD (**Spillantini et al.** 2006).

1.2.3 Posttranslationale Modifikationen des Tau-Proteins

Neben alternativem *Splicing* führen auch posttranslationale Modifikationen wie O-Glykosylierung (**Arnold et al.** 1996; **Liu et al.** 2004; **Li et al.** 2006) und vor allem Phosphorylierung zu molekularer Heterogenität (**Flach** 2006) von individuellen Tau-Molekülen (**Lindwall und Cole** 1984; **Drechsel et al.** 1992; **Bramblett et al.** 1993; **Yoshida und Ihara** 1993; **Biernat et al.** 1993). Durch eine Veränderung der Phophorylierung erfolgte eine schnelle Veränderung der Bindung zu den Mikrotubuli (**Cleveland et al.** 1977; **Morris et al.** 2011). Dadurch kann sowohl der axonale (**LaPointe et al.** 2009; **Xia et al.** 2015), als auch der dendritische Transport reguliert werden (**Ebneth et al.** 1998). Die Veränderung der Phophorylierung erfolgt durch eine hohe Zahl an Proteinkinasen und Proteinphosphatasen (**Biernat et al.** 1993; **Reynolds et al.** 2008; **Usardi et al.** 2011; **Morris et al.** 2015). Mit höherem Phosphorylierungsgrad sinkt die Affinität zu den Mikrotubuli (**Trinczek et al.** 1995; **Eidenmüller et al.** 2000; **Flach** 2006).

Tau-Protein ist naturgemäß ungefaltet (**Uversky** 2002, 2015; **Jeganathan et al.** 2008). Höhere Grade der Phopsphorylierung können zur Aggregation zu PHF-Tau führen. Die Phosphorylierung erfolgt meist an physiologischen Epitopen. Zusätzlich existieren noch krankheitsspezifische Phospho-Epitope (**Matsuo et al.** 1994; **Song et al.** 1997; **Gärtner et al.** 1998; **Li et al.** 2003a; **Scharf et al.** 2008; **Oka et al.** 2011; **Wang et al.** 2015). Hyperphosphorylierung entsteht durch eine Imbalance von Tau-Proteinkinasen und -phosphatasen (**Ross und Poirier** 2004; **Kuret et al.** 2005a; **Kuret et al.** 2005b; **Mandelkow und Mandelkow** 2012). Tau-Protein besitzt

regulative Elemente, die die Aggregation zu NFT verhindern. Bei Phosphorylierung dieser Sequenzen kommt es zu deren Funktionsverlust und Bildung von NFT, die in den Extrazellularraum diffundieren und dort akkumulieren (**Beyreuther** 2002).

Auch *in vitro* ist die Aggregationsinduktion möglich. Die Aggregation zu NFT erfolgt über die Bildung von *β*-Faltblattstrukturen aus zwei Hexapeptidmotiven in den repetitiven Mikrotubulibindungsregionen. Diese dimerisieren mit Molekülen im *random-coil*-Zustand. Die Anteile im *random-coil*-Zustand ragen aus dem Filament heraus und bilden eine hydrophobe, krause Hülle *(fuzzy coat)* um das Filament (**Berriman et al.** 2003; **Bergen et al.** 2005). Um diesen Kern bilden sich dann kugelförmige Protofibrillen und Oligomere, die schließlich zu Filamenten assemblieren (**Friedhoff et al.** 1998a; **Friedhoff et al.** 1998b; **Caughey und Lansbury** 2003).

Aktivatoren von Proteinkinasen sind unter anderem Metallionen, wie dreiwertige Eisenionen und Aluminiumionen und Polyanionen, wie Heparin, Arachidonsäure und RNA (**Goedert et al.** 1996; **Wong et al.** 2002). In Experimenten konnte dabei gezeigt werden, dass die Aggregation von Tau-Protein der Maus am besten durch Heparin und Eisen(III)chlorid möglich war, Aggregation von humanem Tau-Protein am besten durch Heparin (**Flach** 2006). Mit zunehmender Aggregationsdauer kommt es dabei zunächst zur Dimerisierung. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur Aggregation. Dann treten Protofibrillen und Oligomere, später Filamente auf. Die mit Heparin induzierte Aggregation dauert zwar im Vergleich mit der durch Eisen(III)chlorid induzierten Aggregation (6 – 24 h) länger (24 – 48 h), wirkt aber weniger toxisch (**Flach** 2006).

1.3 Das perineuronale Netz

1.3.1 Definition des perineuronalen Netz

Perineuronale Netze (PN) sind eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix (EZM) im ZNS. Sie kommen im ZNS von Fischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln und vielen Säugetierspezies vor, unter anderem in dem der Maus (**Brückner et al.** 1999; **Brückner et al.** 2000; **Brückner et al.** 2003; **Dityatev et al.** 2007) und des Menschen (**Brückner et al.** 1999; **Brückner et al.** 2008). Erstmals wurden sie 1882 durch Camillo Golgi und Ramón y Cajal (**Celio et al.** 1998) als netzartige Strukturen beschrieben, die den Zellkörper einiger Neuronen umgeben. Sie bilden retikuläre Strukturen mit Zwischenräumen für Synapseneingänge, umhüllen die proximalen Dendriten, das Axoninitialsegment und einzelne präsynaptische Boutons von speziellen Neuronen (**Celio und Blümcke** 1994; **Brückner et al.** 2008). PN sind hauptsächlich negativ geladene Strukturen (**Brückner et al.** 1993; **Bandtlow und Zimmermann** 2000; **Morawski et al.** 2015).

1.3.2 Aufbau von perineuronalen Netzen

Überblick über den Aufbau von perineuronalen Netzen

PN formen große, stabile Aggregate auf der Oberfläche von Neuronen und Dendriten. Ihre Struktur ist der EZM im Knorpel ähnlich (**Lundell et al.** 2004).

Hauptsächlich bestehen die PN aus Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat-Proteoglykanen (CSPG), Link-Protein und Tenascin-R (**Carulli et al.** 2006; **Carulli et al.** 2007; **Deepa et al.** 2006; **Köppe et al.** 1997; **Kwok et al.** 2010). Abbildung 1.2 zeigt die Zusammensetzung eines PN als Schema. Die Hyaluronsäuresynthetasen synthetisieren einen Strang aus Hyaluronsäuren, der auf der Zellmembran verankert bleibt. Die CSPG binden an die Hyaluronsäure (**Toole** 2004). Link-Protein stabilisiert diese Bindung (**Matsumoto et al.** 2003; **Mörgelin et al.** 1994; **Rauch et al.** 2004; **Spicer et al.** 2003). Tenascin-R vernetzt die CSPG untereinander und sorgt so für die makromolekulare Struktur der PN (**Lundell et al.** 2004).

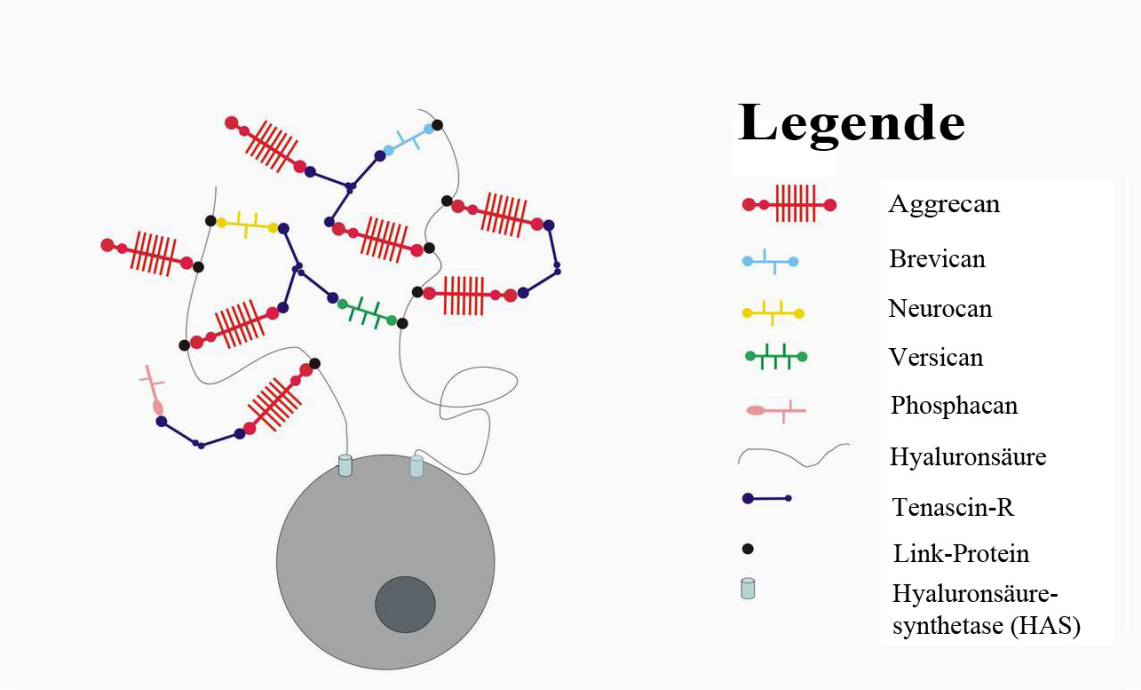

Abbildung 1.2: Schema der Zusammensetzung eines perineuronalen Netzes: Der Hyaluronsäurestrang wird von Hyaluronsäuresynthetasen gebildet und auf der Oberfläche von Neuronen verankert. Die Chondroitinsulfat-Proteoglykane binden an die Hyaluronsäure, das Link-Protein stabilisiert diese Bindung und die Chondroitinsulfat-Proteoglykane werden durch Tenascin-R untereinander vernetzt, nach (**Suttkus** 2013).

Hyaluronsäure als Bestandteil perineuronaler Netze

Hyaluronsäure ist ein Glucosaminoglykan (GAG), das einen wichtigen Bestandteil des Bindegewebes, u.a. der EZM, darstellt. Es besteht aus 250 bis 50.000 glykosidisch verknüpften Disaccharideinheiten und ist zwischen 20.000 Dalton und 1,5 Megadalton groß (**Itano und Kimata** 2002). Hyaluronsäure bindet an CSPG und verankert diese auf der Zellmembran (**Wang und Fawcett** 2012). Sie ist negativ geladen und trägt zum polyanionischen Charakter der PN bei (**Brückner et al.** 1993).

Hyaluronsäuresynthetasen (HAS) bilden Hyaluronsäure schon pränatal, sie liegen auf der Innenseite der Plasmamembran von Neuronen (**Toole** 2004). Es gibt drei Isoformen (HAS1, HAS2 und HAS3) (**Itano und Kimata** 2002). HAS1 wird vom menschlichen Chromosom 19 und vom Chromosom 17 der Maus kodiert, HAS2 wird vom menschlichen Chromosom 8 und vom Chromosom 15 der Maus kodiert, HAS3 wird vom menschlichen Chromosom 16 und vom Chromosom 8 der Maus kodiert (**Spicer et al.** 1997). Diese Enzyme übertragen in der Zelle die wachsende Kette auf immer neue Monosaccharidbausteine. Die so immer länger werdende Kette wird durch ABC-Transporter durch die Membran aus der Zelle heraustransportiert (**Itano und Kimata** 2002). So bilden die Hyaluronsäureketten das Rückgrat der PN (**Galtrey**

und Fawcett 2007; **Kwok et al.** 2011). Diese Rolle zeigt sich z.B. nach Gabe von Hyaluronidase zu Zellkulturen. Dort fallen die PN komplett in sich zusammen (**Galtrey und Fawcett** 2007). In HAS3-*Knockout*-Mäusen sieht man reduzierte Extrazellularräume sowie eine erhöhte epileptiforme Aktivität in CA1-Pyramidenneuronen des Hippocampus (**Arranz et al.** 2014).

Chondroitinsulfat-Proteoglykane als Bestandteil perineuronaler Netze

Proteoglykane sind wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix. Bei den Seitenketten der Proteoglykane in den PN handelt es sich um negativ geladene Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykane (CS-GAG) (**Bandtlow und Zimmermann** 2000). Aufgrund ihrer negativen Ladung tragen auch die Seitenketten zum polyanionischen Charakter der PN bei (**Brückner et al.** 1993).

Am Aufbau der PN sind verschiedene Proteoglykane beteiligt. Dabei handelt es sich um die Gruppe der Lektikane sowie zusätzlich um Phosphacan (**Bandtlow und Zimmermann** 2000; **Lander** 1993; **Rhodes und Fawcett** 2004).

Zu den in PN vorkommenden Lektikanen gehören Aggrecan, Versican, Neurocan und Brevican (**Yamaguchi** 2000). Aggrecan kann bis zu 100 Chondroitinsulfat-Seitenketten tragen und ist je nach Glykosylierungsgrad 250 bis 750 Kilodalton groß (**Matthews et al.** 2002; **Watanabe et al.** 1995). Es findet sich in allen PN und agiert als Gerüst für andere Moleküle (**Brückner et al.** 1993; **Giamanco et al.** 2010; **Hockfield et al.** 1990; **Matthews et al.** 2002; **Morawski et al.** 2010c; **Morawski et al.** 2011). Aggrecan wird ab der zweiten postnatalen Woche von Neuronen und Gliazellen produziert (**Brückner et al.** 2000; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008) und vom menschlichen Chromosom 15 und vom Chromosom 7 der Maus kodiert (**Krueger et al.** 1999; **Watanabe et al.** 1995). Aggrecan ist essentiell für Aufbau und Funktion der PN. So sind z.B. Aggrecan-*Knockout*-Mäuse nicht lebensfähig (**Watanabe et al.** 1995) und ihre PN können mit *WFA* (Lektin *Wisteria floribunda*, welches spezifisch N-Acetylgalactosamin-*β*-1-Reste von Glykoproteinen in EZM bindet*)* nicht mehr markiert werden, obwohl andere PN-Bestandteile wie Hyaluronsäure, Tenascin-R, Link-Protein und Brevican unverändert exprimiert werden (**Giamanco et al.** 2010). Werden Neuronen mit Chondroitinase ABC behandelt, werden die GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine abgespalten. Dies führt zur Veränderung des polyanionischen Charakters der PN (**Giamanco et al.** 2010).

Versican spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen (**Matsumoto et al.** 2003). Es wird ab dem 3. postnatalen Tag von Gliazellen produziert (**Brückner et al.** 2000; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008) und ist häufig mit Link-Protein (HAPLN2) kolokalisiert (**Kwok et al.** 2011). Auch Versican-*Knockout*-Mäuse sind wie Aggrecan-*Knockout*-Mäuse nicht lebensfähig (**Spicer et al.** 2003).

Neurocan ist 130 bis 150 Kilodalton groß und wird ab dem 3. postnatalen Tag von Neuronen und Gliazellen produziert (**Brückner et al.** 2000; **Zhou et al.** 2001; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008). Neurocan wird vom menschlichen Chromosom 19 und vom Chromosom 8 der Maus kodiert (**Cichon et al.** 2011; **Rauch et al.** 1995). Neurocan-*Knockout*-Mäuse entwickeln sich im Gegensatz zu den Aggrecan-*Knockout*-Mäusen und Versican-*Knockout*-Mäusen scheinbar normal (**Zhou et al.** 2001).

Brevican ist 50 bis 90 Kilodalton groß und spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum von Axonen und der Zellwanderung (**Brakebusch et al.** 2002). Es wird ab der 2. postnatalen Woche von Neuronen und Gliazellen produziert (**Brückner et al.** 2000; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008). Brevican wird vom menschlichen Chromosom 1 und vom Chromosom 3 der Maus kodiert (**Nomoto et al.** 2002; **Rauch et al.** 1997). Brevican-Knockout-Mäuse sind fertil und haben eine normale Lebenserwartung, ihre Gehirnanatomie entspricht den Wildtypmäusen (**Brakebusch et al.** 2002). Allerdings zeigen sie signifikante Defizite in der Langzeitpotenzierung im Hippocampus, was sich aber nicht im Lernen und in Gedächtnisdefiziten widerspiegelt (**Brakebusch et al.** 2002). Es wird vermutet, dass insbesondere Brevican als Modulator der synaptischen Übertragung dienen könnte (**Sonntag et al.** 2015).

Phosphacan ist ein Enzym der Rezeptor-ähnlichen-Protein-Tyrosin-Phosphatase und ist 90 Kilodalton groß (**Garwood et al.** 2003). Es wird ab dem dritten postnatalen Entwicklungstag von Neuronen und Gliazellen produziert und kann nicht an Hyaluronsäure binden. Es interagiert mit Tenascin-R und Zelladhäsionsmolekülen (**Brückner et al.** 2000; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008). Die Rolle von Phosphacan in den PN zeigt sich v.a. in Phosphacan-*Knockout*-Mäusen. Diese zeigen ein reduziertes Arbeitsgedächtnis, ein verändertes Koordinationsverhalten und reduzierte Reaktionen auf thermische und taktile Stimuli (**Lafont et al.** 2009).

Link-Protein als Bestandteil perineuronaler Netze

Das Link-Protein ist ein kleines extrazelluläres Protein, welches 38 – 43 Kilodalton groß ist und die Bindung zwischen Hyaluronsäure und den CSPG stabilisiert, die essentiell für die kondensierte Struktur der PN ist (**Kwok et al.** 2011; **Matsumoto et al.** 2003; **Mörgelin et al.** 1994; **Rauch et al.** 2004; **Spicer et al.** 2003). Es gehört zur Hyaluron- und Proteoglykan-*binding*-Link-Protein-Gen-Familie (HAPLN) (**Spicer et al.** 2003) und wird ab dem 14. Entwicklungstag von Neuronen produziert (**Brückner et al.** 2000; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008).

Es sind drei verschiedene HAPLN (HAPLN1, HAPLN2 und HAPLN4) im Gehirn bekannt (**Spicer et al.** 2003). HAPLN3 befindet sich nur in glatter Muskulatur und der Plazenta und wird vom menschlichen Chromosom 15 kodiert (**Spicer et al.** 2003). HAPLN2 befindet sich nur im adulten Nervensystem an myelinisierten Axonen und an Ranvier'schen Schnürringen (**Kwok et al.** 2011) und wird vom menschlichen Chromosom 1 kodiert (**Spicer et al.** 2003). HAPLN1 wird vom menschlichen Chromosom 5 kodiert (**Spicer et al.** 2003). Die Rolle der Link-Proteine zeigt sich in den verschiedenen *Knockout*-Mäusen. HAPLN1-*Knockout*-Mäuse zeigen kompakte und reduzierte EZM um Zellen (**Carulli et al.** 2010; **Kwok et al.** 2010). HAPLN2-*Knockout*-Mäuse zeigen abnormale, diffuse EZM um Ranvier'sche Schnürringe (**Bekku et al.** 2012; **Nomoto et al.** 2002).

Tenascin-R als Bestandteil perineuronaler Netze

Tenascin-R ist ein 160 bis 180 Kilodalton großes Glykoprotein, welches an CSPG bindet (**Aspberg et al.** 1997; **Fuss et al.** 1993). Tenascine sind wichtig für die Morphogenese, neuronale Entwicklung, neuronale Regeneration, Zellwanderung und Wundheilung (**Chiquet-Ehrismann und Tucker** 2011; **Pesheva et al.** 1994). Das Tenascin-R-Gen befindet sich auf dem menschlichen Chromosom 1 und dem Chromosom 4 der Maus (**Arrigo et al.** 1997). Tenascin-R wird von Gliazellen ab der 1. postnatalen Woche produziert (**Brückner et al.** 2000; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008). Belege für die Rolle von Tenascin-R in PN lassen sich aus Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen ableiten. Diese exprimieren kein Tenascin-R und weisen hierdurch nachweislich eine morphologisch stark veränderte Netzstruktur auf (**Brückner et al.** 2000; **Morawski et al.** 2014; **Weber et al.** 1999). Sie sind jedoch fertil und haben eine normale Lebenserwartung, ihre Gehirnanatomie entspricht den Wildtypmäusen (**Weber et al.** 1999). Allerdings zeigen die Tiere eine größere Ängstlichkeit, sind unkoordinierter und haben Defizite beim assoziativen Lernen

(**Chiquet-Ehrismann und Tucker** 2011). Die PN der Tenascin-R-*Knockout*-Mäuse haben eine geringere Markierbarkeit mit *WFA* und diffusere Netze verglichen mit den Wildtypmäusen (**Weber et al.** 1999; **Morawski et al.** 2014).

1.3.3 Entwicklung von perineuronalen Netzen

Die PN-Komponenten werden bereits im Embryonalstadium exprimiert, jedoch erst postnatal als PN ausgebildet, wenn die Hauptsynapsenverbindungen etabliert und stabilisiert sind (**Brückner et al.** 2000; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008). Die Ausbildung der einzelnen PN-Komponenten erfolgt nicht zeitgleich in den verschiedenen Hirnregionen (**Brückner et al.** 2000). Tabelle 1.1 zeigt die Entwicklung im Mausgehirn. Sie wird oft durch Sinneseindrücke während der Entwicklung ausgelöst, weil die PN abhängig von der Aktivität ihres Neurons reguliert werden. Wenn keine Sinneseindrücke erfolgen, bilden sich inkorrekte neuronale Verbindungen (**Brückner et al.** 2000; **Zimmermann und Dours-Zimmermann** 2008). Der Nachweis dafür erfolgte vor allem für das visuelle System (**Gáti et al.** 2010; **Pizzorusso et al.** 2002).

Tabelle 1.1: Entwicklung der perineuronalen Netze (PN) im Mausgehirn.

Zeitraum	**erstmals ausgebildeter PN-Anteil**	**Hirnregion**
1. postnatale Woche	Neurocan, Versican, Hyaluron-säure, Tenascin-R, Link-Protein	Hirnstammkerne: med. Ncl. des Trapezkörpers, Ncl. tericularis gigantocellularis
2. postnatale Woche	Phosphacan, Aggrecan und Brevican	subkortikales Vorderhirn: Ncl. Darkschewitsch, Ncl. mamillaris lat., Bereiche des Kortex: primärer somatosensorischer Kortex
3. - 6. postnatale Woche	alle PN-Anteile vollständig	in allen subkortikalen Regionen und im Kortex vollständig

1.3.4 Ausprägung von perineuronalen Netzen in bestimmten Hirnregionen

PN kommen in fast jeder Hirnregion des Säugetiergehirns vor. Ihre molekularen Zusammensetzungen, Morphologien und Häufigkeiten variieren von Region zu Region. Tabelle 1.2 zeigt die Ausprägung von PN in verschiedenen Anteilen des Rattengehirns (**Seeger et al.** 1994).

Tabelle 1.2: Ausprägung von perineuronalen Netzen (PN) in verschiedenen Anteilen des Rattengehirns (**Seeger et al.** 1994).

Hirnregion	**Unterbereich**	**Dichte**
Neokortex	Schicht IV und V des parietalen Kortex Schicht III und VI Schicht II nur im cingulären Kortex Schicht I	hoch gering gemäßigt kaum PN
Archikortex	Subiculum und Ammonshorn CA1-, CA2- und CA3-Region Gyrus dentatus	hoch gering
Paläokortex	piriformer Kortex Ncl. olfactorius anterior	hoch gering
subkortikale Bereiche des Vorderhirns	basales Vorderhirn: med. Part des med. septalen Ncl., Diagonales Band, dorsaler Part des lat. septalen Ncl. Neostriatum	hoch kaum PN
Zwischenhirn	Hypothalamus lat. hypothalamisches Gebiet, dorsaler Thalamus	gering kaum PN
Mittelhirn	Ncl. ruber reticulärer Teil der Substantia nigra Ncl. Darkschewitsch Ncl. Mesencephalicus Ncl. des N. oculomotorius und N. Trochlearis Colliculus sup. und inf.	hoch hoch hoch hoch hoch gering
Rhombencephalon	med. Part des Trapezkörpers Ncl. der Oliva sup. Ncl. des Lemniscus lat. motorische Ncl. des N. trigeminus Ncl. des N. abducens, N. Facialis, Tr. solitarius	hoch hoch hoch hoch gering
Cerebellum	alle Ncl. cerebelli granuläre Schicht	hoch an Golgi-Neuronen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich PN in fast jeder Region des Gehirns befinden. Die Verbreitung, die Menge und das Aussehen der PN unterscheidet sich in den verschiedenen Regionen und in verschiedenen Spezies. Besonders hervorzuheben sind die im Folgenden genannten Beispiele, da in den genannten Hirnregionen besonders viele PN zu finden sind und diese daher besonders gründlich untersucht worden sind: Visueller Kortex (**Pizzorusso et al.** 2002), *barrel* Kortex des somatosensorischen Kortex (**Bahia et al.** 2008), Amygdala (**Gogolla et al.** 2009),

Hippocampus (**Bukalo et al.** 2001) und auditorischer Hirnstamm (**Blosa et al.** 2013; **Sonntag et al.** 2015).

1.3.5 Ausprägung von perineuronalen Netzen an bestimmten Neuronentypen

PN umgeben nur Neurone, obwohl einige Bestandteile auch von Astrozyten und Oligodendrozyten gebildet werden. Im Kortex sind PN-tragende Neuronentypen oft GABAerge Interneurone, die mit dem Calcium-bindenden Protein Parvalbumin und mit der Kalium-Kanal-Untereinheit 3.1b assoziiert sind (**Erisir et al.** 1999; **Härtig et al.** 1999; **Kawaguchi und Kubota** 1997). Im Kortex wurden drei Arten von PN-tragenden Neuronentypen beschrieben. Zum ersten Neuronentyp gehören die nicht-pyramidalen, GABAergen Interneurone (**Härtig et al.** 1999; **Kawaguchi und Kubota** 1997). Neurone dieses Neuronentyps befinden sich vor allem in Schicht II, IV und VI der motorischen und primär sensorischen Areale. Ihre PN sind scharf konturiert und stark ausgeprägt (**Wegner et al.** 2003). Zum zweiten Neuronentyp gehören die glutamatergen Pyramidenzellen in Schicht III und V der motorischen und primär sensorischen Areale. Sie besitzen dünne, die Zelle schwach umreißende PN (**Brückner et al.** 1999; **Morawski et al.** 2004; **Wegner et al.** 2003). Zum dritten Neuronentyp gehören modifizierte glutamaterge Neurone der Schicht IV, die bisher nur in Gehirnen der Ratte beschrieben worden. Sie besitzen ein starkes, aber eher diffus ausgeprägtes PN und GABA-Rezeptoren, wie es für inhibitorische Interneurone typisch ist (**Wegner et al.** 2003).

Im Hirnstamm sind PN weit verbreitet und besonders oft assoziiert mit schnell feuernden Neuronen (**Arai et al.** 1991; **Caicedo et al.** 1996; **Lohmann und Friauf** 1996). Auch andere meist hochaktive Neuronentypen tragen PN (**Gundelfinger et al.** 2010; **Yasuhara et al.** 1994), sowohl glutamaterge und GABAerge, als auch glycinerge, aspartaterge und cholinerge Neurone (**Brückner et al.** 2008; **Härtig et al.** 2001b; **Horn et al.** 2003). Der Hippocampus besitzt scharf konturierte PN um Interneurone in der CA1-4-Region (**Brückner et al.** 2003; **Celio und Chiquet-Ehrismann** 1993; **Schüppel et al.** 2002). Sie können sowohl Parvalbumin-positiv als auch Calretinin- und Calbindin-tragend sein (**Lendvai et al.** 2013). Besonders hervorzuheben sind die glutamatergen Neuonen des mittleren Trapezkörperkernes (MNTB) im auditorischen Hirnstamm. Alle Neurone des MNTB tragen PN und bilden ein dichtes PN-Netzwerk (**Blosa et al.** 2013; **Sonntag et al.** 2015). Sie zeigen eine enge Verbindung zur *Calyx* von Held und ermöglichen so, die Herkunft einzelner Töne zu lokalisieren.

Nicht PN-assoziierte Neurone sind unter anderen die cholinergen Neurone im basalen Vorderhirn und die aminergen Neurone der Substantia nigra Pars compacta. Weiterhin nicht PN-tragend sind die Neurone der Raphekerne und des Locus coerulus im Hirnstamm, die serotoninerg, dopaminerg und noradrenerg sind (**Brauer et al.** 1993; **Brückner et al.** 2008; **Hobohm et al.** 1998).

1.3.6 Funktionen von perineuronalen Netzen

Die Funktionen des PN sind bis heute nur ansatzweise geklärt. Man geht heute von fünf Funktionskomplexen aus:

1. Sie unterstützen die Neuron-Glia-Interaktion und -Kommunikation und vermitteln und modifizieren Signalprozesse (**Faissner et al.** 2010). Möglicherweise helfen sie bei der Bildung von Diffusionsbarrieren an Synapsen (**Frischknecht et al.** 2009).

2. PN regulieren und limitieren während der Entwicklung die Plastizität des ZNS durch Stabilisierung von Synapsen und Einschränkung plastischer Veränderungen (**Brückner et al.** 2003; **Celio und Blümcke** 1994; **Galtrey und Fawcett** 2007; **Hockfield et al.** 1990). Sie begrenzen durch den stabiliserenden Einfluss der CSPG die Rezeptormobilität und nehmen dadurch Einfluss auf neuronale Entwicklung und Plastizität (**Dityatev et al.** 2007). Der stabilisierende Einfluss der CSPG auf Zelladhäsion und Zellwanderung zeigt sich nicht nur sekundär nach Verletzungen, sondern auch primär in der neuronalen Entwicklung und Reifung. Hier regulieren sie Proliferation, Migration, Adhäsion, neuronales Auswachsen und die Synapsenbildung, indem sie über eine Multidomäne mit Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen interagieren (**Bandtlow und Zimmermann** 2000; **Oohira et al.** 2000). Um den Einfluss auf die Plastizität von PN zu untersuchen, wurde Chondroitinase ABC auf verschiedene experimentelle Modelle angewendet. So wurde beschrieben, dass nach Behandlung des visuellen Kortex der Ratte mit Chondroitinase ABC, die Plastizität bezüglich der okularen Dominanz reaktiviert wurde (**Pizzorusso et al.** 2002). In der Amygdala von Mäusen hebt die Behandlung mit Chondroitinase ABC die spontane Erholung auf und erneuert die konditionierte Angst (**Gogolla et al.** 2009). Durch welche Mechanismen PN die ZNS-Plastizität einschränken, ist heute noch weitgehend ungeklärt.

3. CSPG verhindern im adulten Individuum Zellwanderung und axonales Auswachsen, z.B. nach Verletzungen des ZNS, und helfen bei der Wegfindung von Neuronen (**Celio und Blümcke** 1994; **Galtrey und Fawcett** 2007). Außerdem

hemmen sie das Neuritenwachstum *in vitro* durch ihre Chondroitinsulfat-Seitenketten (**Egea et al.** 2010). So schützen PN vor proteolytischen Aktionen nach zerebraler Ischämie. Traumata des adulten ZNS resultieren in der Bildung von glialen Narben, Degeneration von denervierten und zerstörten Neuronen und axonalem Auswachsen (**Galtrey und Fawcett** 2007). Das gliale Narbengewebe ist angereichert mit CSPG, die die axonale Regeneration hemmen (**Oohira et al.** 2000) und die Plastizität begrenzen, wenn die Blut-Hirn-Schranke zusammenbricht (**Rhodes und Fawcett** 2004). PN sind also keine fixen Strukturen, sondern können auch im adulten Zustand noch modifiziert werden (**Wang und Fawcett** 2012).

4. Ausgehend vom polyanionischen Charakter des PN wird von einer Regulation des perineuronalen Mikromilieus aufgrund einer lokalen Pufferfunktion für Kationen wie Calcium, Natrium und Kalium ausgegangen (**Härtig et al.** 1999; **Härtig et al.** 2001a; **Morawski et al.** 2015).

5. Eine neuroprotektive Funktion der PN wird diskutiert. CSPG könnten aufgrund ihrer negativen Ladung radikalbildende Ionen binden und die Radikalbildung reduzieren. So wären von PN umgebene Neurone möglicherweise vor Schäden durch Radikale und oxidativen Stress geschützt (**Suttkus** 2013). Besonders zeigt sich die Radikalbindung für Metallionen wie Eisen, Aluminium, Kupfer und Zink (**Hobohm et al.** 2005; **Morawski et al.** 2004; **Morawski et al.** 2010c; **Okamoto et al.** 1994). Des Weiteren konnte auch in Bezug auf die AD eine Protektion durch die PN festgestellt werden. Beispielsweise in Zellkulturmodellen zur Amyloid-β-Toxizität sind PN-tragende Neurone signifikant weniger von Neurodegeneration betroffen (**Miyata et al.** 2007). Weiterhin sind PN-tragende Neurone in humanem *post mortem*-Gewebe von AD-Patienten weniger von Lipofuscin-Akkumulation betroffen als Neurone ohne PN (**Morawski et al.** 2004). Kortikale PN-tragende Neurone bleiben größtenteils von Ablagerungen durch NFT verschont (**Brückner et al.** 1999; **Morawski et al.** 2010a). Das deutet auf eine relative Resistenz der motorischen und primär sensorischen Areale mit einer großen Anzahl PN-tragender Neurone hin (**Brückner et al.** 1999; **Morawski et al.** 2004; **Morawski et al.** 2010c).

2 Aufgabenstellung

Hypothese

Humanes Tau-Protein kann im extrazellulären Raum durch einen aktiven Prozess der Sekretion freigesetzt und endozytiert werden. Die stark negativ geladenen Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykan-Seitenketten der perineuronalen Netze binden das positiv geladene Tau-Protein und limitieren so die Verbreitung des Tau-Proteins sowie das Einschleusen des Tau-Proteins in die Zelle. Nach Zugabe von Tau-Protein sollten Neurone mit perineuronalem Netz weniger oder kaum von Einlagerung von potentiell toxischem Tau-Protein betroffen sein.

Ziel

Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis einer Protektion perineuronaler Netze vor Tau-Protein-Einlagerung. Des Weiteren soll die Verteilung des Tau-Proteins sowie verschiedene Typen perineuronaler Netze in den genutzten Mauslinien gezeigt werden.

Methodik 1

Darstellung der Tau-Protein-Verteilung und verschiedener Typen von perineuronalen Netzen im adulten Mausgehirn der zu untersuchenden Mauslinien mithilfe von Gefrierschnitten und Immunhistochemie.

Methodik 2

- Herstellung organotypischer Schnittkulturen aus Gehirnen von adulten Mäusen
- Zugabe von aggregiertem Tau-Protein zu verschiedenen Zeitpunkten, um

einen möglichen Einfluss der perineuronalen Netze auf die Verteilung des Tau-Proteins sowie eine potentielle Schutzfunktion der perineuronalen Netze gegenüber Tau-Protein-Einlagerung zu untersuchen. Dabei werden Zeitreihen angelegt, die durch Zugabe von Cy3-markiertem Tau-Protein eine mögliche Ausbreitung des Tau-Proteins innerhalb des Gewebes zeigen.

- Markierung und Auswertung der Versuche mittels Immunhistochemie: Markierung der Schnitte mit verschiedenen Markern für perineuronale Netze und Neurone und verschiedenen Tau-Protein-Antikörpern.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Materialien zur Herstellung von Gefrierschnitten

Tiermaterial zur Herstellung von Gefrierschnitten

Die Anfertigung von Gefrierschnitten soll zur Darstellung der Tau-Protein-Verteilung sowie der Charakterisierung verschiedener Typen von PN im Gehirn von adulten Mäusen dienen. Dazu wurden adulte Mäuse im Alter von zwei bis vier Monaten der Mauslinie *C57Bl6* (Wildtyp (WT)) und deren Tenascin-R-*Knockout* ($TnR^{-/-}$) verwendet. Die $TnR^{-/-}$ exprimieren kein Tenascin-R und weisen hierdurch nachweislich eine morphologisch stark veränderte Netzstruktur auf (**Brückner et al.** 2000; **Morawski et al.** 2014; **Weber et al.** 1999).

Die Tiere stammten aus dem Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Universität Leipzig. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden bei einem künstlichen 12-stündigen Tag-/Nacht-Zyklus unter konstanter Temperatur (22 °C) und Luftfeuchte gehalten. Alle Experimente wurden gemäß der Europäischen Richtlinie vom 24.11.1986 (86/609/EEC) durchgeführt. Die Tiertötungen wurden unter den Anzeigennummern TT68/12 und TT49/11 angezeigt und durch Mitarbeiter des Paul-Flechsig-Instituts für Hirnforschung durchgeführt.

Geräte zur Herstellung von Gefrierschnitten

Die Geräte und Apparaturen folgender Hersteller wurden für die Herstellung von Gefrierschnitten verwendet:

Microm SM 2000R	Leica
Minitherm CT	Heraeus Instruments

Taumler Polymax 104	Heidolph
Waage PB602-S	Mettler Toledo

Chemikalien zur Herstellung von Gefrierschnitten

Die genutzten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Dinatriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth
Glutaraldehyd	Serva Electrophoresis GmbH
Heparin	Ratiopharm
Kaliumchlorid	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Paraformaldehyd	Merck
Saccharose	Roth
Tissue-Tek (Gefrierklebstoff)	Sakura
Tween®-20	Sigma-Aldrich

Lösungen zur Herstellung von Gefrierschnitten

- Kochsalzlösung
  - 0,9 % NaCl
  - 0,1 % Heparin
  - in *aqua dest.*
- phosphatgepufferte Salzlösung, kurz PBS, pH 7,4
  - 1,7 mM NaH_2PO_4
  - 5,2 mM Na_2HPO_4
  - 150 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - in *aqua dest.*
- Fixierlösung
  - 4 % Paraformaldehyd
  - 0,1 % Glutaraldehyd
  - in PBS
- Gefrierschutzlösung
  - 30 % Saccharose
  - 0,1 % Natriumazid
  - in *aqua dest.*
- PBS + Natriumazid, pH 7,4

Verbrauchsmaterialien zur Herstellung von Gefrierschnitten

48-Well-Culture-Plate	Greiner bio-one
Kanülen, Spritzen, Mikrotom-Klingen, Pinsel	

3.1.2 Materialien zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Tiermaterial zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Für die Präparation organotypischer Schnittkulturen wurden ebenfalls adulte, zwei bis vier Monate alte Mäuse der Mauslinie *C57Bl6* (WT) und deren $TnR^{-/-}$ verwendet. Alle Experimente wurden gemäß der Europäischen Richtlinie vom 24.11.1986 (86/609/EEC) durchgeführt. Die Tiertötungen wurden unter den Anzeigennummern TT68/12 und TT49/11 angezeigt und durch Mitarbeiter des Paul-Flechsig-Instituts für Hirnforschung durchgeführt.

Geräte zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Die Geräte und Apparaturen folgender Hersteller wurden für die Herstellung organotypischer Schnittkulturen genutzt:

Brutschrank Function Line	Heraeus
Instruments Heizvorrichtung dTron 08.1	Jumo
Minitherm CT	Heraeus
Instruments Sterilbank Hera Safe HS12	Heraeus
Instruments Stereomikroskop	Zeiss
Vibratome Series 3000	TPI-Technical Products International
Waage PB602-S	Mettler Toledo

Chemikalien zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Die genutzten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Advanced DMEM	Invitrogen
Agarose	Invitrogen
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Sigma
D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Roth
Dinatriumdhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth
DMEM/HAMS F-12	Biochrom AG
Donor Horse Serum (Pferdeserum)	PAA Laboratories GmbH

Gentamycin	PAA Laboratories GmbH
Hepes ($C_8H_{18}N_2O_4S$)	Sigma
Hypoglue 111 Rapidkleber	Marston Domsel
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kynurensäure ($C_{10}H_7NO_3$)	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2{}^*6H_2O$)	Sigma
Myo-Inositol ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Pyruvat ($C_3H_3O_3Na$)	Merck
Saccharose	Roth
Tween®-20	Sigma-Aldrich

Präparationslösung und Kulturmedien zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Im nachfolgenden wird die Zusammensetzung der einzelnen Puffer und Medien dargestellt:

- Präparationslösung, pH 7,4
  - 2,5 mM KCl
  - 1 mM ($MgCl_2{}^*6H_2O$)
  - 260 mM D-Glucose
  - 26 mM $NaHCO_3$
  - 1,25 mM NaH_2PO_4
  - 2 mM Pyruvat
  - 3 mM Myo-Inositol
  - 1 mM Kynurensäure
  - 2 mM $CaCl_2$
  - in *aqua dest.*
- Kulturmedium, pH 7,4
  - 73 % DMEM/HAMS F-12
  - 24 % Pferdeserum
  - 2 % Hepeslösung (750 mM)
  - 0,9 % einer 20%igen D-Glucoselösung
  - 0,1 % Gentamycin
- Kulturmedium + Kaliumchlorid, pH 7,4
  - 97,5 % Kulturmedium
  - 2,5 % 6,4 mM KCl-Lösung

Verbrauchsmaterialien zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

6-Well-Culture-Plate	Greiner bio-one
Injector Blades (Klingen für Vibratom)	Agar Scientific
Millicell®–Sterilized Culture Plate Inserts	Millipore
Steritop	Millipore
sterile Ösen, sterile Pasteurpipetten	

3.1.3 Materialien zur Markierung und Auswertung durch Immunhistochemie

Notwendige Lösungen zur immunhistochemischen Behandlung der Gefrierschnitte und Schnittkulturen

- PBS, pH 7,4
  - 1,7 mM NaH_2PO_4
  - 5,2 mM Na_2HPO_4
  - 150 mM NaCl
  - 2,7 mM KCl
  - in *aqua dest.*
- PBS-Tween (PBS-T)
  - PBS
  - 0,05 % Tween®-20
- Blockerlösung
  - 2 % BSA (Rinderserum-Albumin)
  - 0,3 % Milchpulver
  - 0,5 % Eselnormalserum
  - in PBS-T

Geräte zur immunhistochemischen Behandlung der Gefrierschnitte und Schnittkulturen

Zur immunhistochemischen Markierung und anschließender Auswertung wurden folgende Geräte verwendet:

AxioCam MRm	Zeiss
Deckgläser 24 x 50 mm	Menzel Gläser GmbH & Co KG, Braunschweig
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Heizvorrichtung dTron 08.1	Jumo
Minitherm CT	Heraeus Instruments

Objektträger 25 x 75 x 1 mm	Menzel Gläser GmbH & Co KG, Braunschweig
Taumler Polymax 1040	Heidolph

Verbrauchsmaterialien zur immunhistochemischen Behandlung der Gefrierschnitte und Schnittkulturen

Aqua Poly/Mount	Polysciences Inc.
unmarkiertes, aggregiertes Tau-Protein	Arbeitsgruppe Holzer, PFI Leipzig
Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris*	Sigma-Aldrich
24-Well-Culture-Plate	Greiner bio-one
48-Well-Culture-Plate	Greiner bio-one

Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle. 3.1: Antikörper und Färbungen für die Fluoreszenzmarkierung,

Markierter Zellbestandteil	**Verwendeter Antikörper**	**Firma**	**Abkürzung**
Aggrecan	Anti-Aggrecan AB1031	Chemicon International	*AB1031*
Ubiquitin -carboxyl-terminal Hydrolase Isoenzym L1 im **Zytoplasma von Neuonen**	Anti-Protein Gene Product 9.5	Chemicon International	*PGP9.5*
	Cy3 gekoppeltes, aggregiertes Tau-Protein	Arbeitsgruppe Holzer, PFI Leipzig	
Sekundärantikörper	Cy2 gekoppeltes Esel-anti-Kaninchen (DaR-Cy2) Cy2 gekoppeltes Streptavidin Cy3 gekoppeltes Esel-anti-Maus (DaM-Cy3) Cy3 gekoppeltes Streptavidin Cy5 gekoppeltes Esel-anti-Kaninchen (DaR-Cy5) Cy5 gekoppeltes Esel-anti- Maus (DaM-Cy5) Cy5 gekoppeltes Streptavidin	Jackson Immuno-Research	
dsDNA	*Hoechst 33342*	Invitrogen	

N-Acetylgalactosamin-β-1-Reste von Glyko-proteinen in EZM	Lektin *Wisteria floribunda*, Biotin markiert	Sigma	*WFA*
DNA-bindendes Neuronen-spezifisches Protein im ZNS	Maus-Neuronales Kernprotein (NeuN)	Chemicon International	*NeuN*
Tau-Protein	Tau-p1	Chemicon International	*Tau1*

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Perfusion der Mäuse zur Herstellung von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Mäuse durch eine CO_2-Begasung getötet und im direkten Anschluss perfundiert. Dafür wurden die Tiere sternotomiert und die Herzventrikel zweifach eingeschnitten. Mit einer Kanüle erfolgte die Punktion der Herzspitze. Durch die Kanüle wurde 50 ml physiologische Kochsalzlösung in den großen Kreislauf und somit das Blut herausgespült. Anschließend wurde mit zirka 50 ml Fixierlösung nachgespült. Daraufhin erfolgte die sofortige Dekapitation der Mäuse und die Präparation der fixierten Gehirne aus den Schädelhöhlen. Vor dem Gefrierschneiden der Gehirne wurden diese noch 24 h bei Raumtemperatur nachfixiert und in einer 30%igen Saccharoselösung 48 – 72 h bei Raumtemperatur gelagert, um die Zellen beim anschließenden Schneidevorgang vor Kälte zu schützen.

Gefrierschneiden der Gehirne zur Herstellung von Gefrierschnitten

Die Herstellung der Gefrierschnitte erfolgte mithilfe eines Gefriermikrotoms (Microm SM 2000 R, Leica, Wetzlar, Deutschland). Dafür wurden die Gehirne zunächst vollständig bei -40 °C durchfroren. Dann wurde die Schneidetemperatur von -20 °C eingestellt und 30 µm dünne Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in eine mit je 1 ml PBS + Natriumazid gefüllte Kavität einer 48-Well-Platte übertragen. Bis zur Auswertung mittels Immunhistochemie wurden die Schnitte bei 8 °C im Kühlschrank (Profi Line, Liebherr, Deutschland) gelagert.

Markierung und Auswertung von Gefrierschnitten durch Immunhistochemie

Zunächst wurden die Gefrierschnitte für 20 Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation in 1 ml Blockerlösung, wodurch unspezifische Bindungsstellen maskiert wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers für 48 h bei 4 °C. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal mit PBS für je 10 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgte dann für 3 h bei Raumtemperatur in einer

Lösung bestehend aus 50 % Blockerlösung und 50 % PBS auf dem Taumler (Taumler Polymax 1040, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland). Dem folgend wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen, auf Objektträger (25 x 75 x 1 mm, Menzel Gläser GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) gezogen und auf der Wärmeplatte (Heizvorrichtung dTron 08.1, Jumo, Fulda, Deutschland) getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger zur Entwässerung durch eine aufsteigende Alkohol- und Toluol-Reihe geführt und mithilfe von Entelan und Deckglas (24 x 50 mm, Menzel Gläser GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) eingedeckt. Zur Auswertung der Schnitte wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

Mittels der unter Kapitel 3.1.3, Tabelle 3.1 beschriebenen Antikörper wurden verschiedene Typen von PN und die Verteilung von hyperphosphoryliertem Tau-Protein dargestellt. Hyperphosphoryliertes Tau Protein entsteht im adulten Mausgehirn wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben durch ein Ungleichgewicht zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen. Dieses Ungleichgewicht entsteht durch die Aktivierung von Proteinkinasen durch Heparin oder Heparansulfat beziehungsweise durch Ganglioside (**Goedert et al.** 1996; **Nuydens et al.** 1995; **Pelech et al.** 1993; **Pelech** 1995; **Yan et al.** 1994), ATP-Mangel (**Bush et al.** 1995; **Roder und Ingram** 1991), Insulinmangel (**Hong und Lee** 1997) und Erhöhung der APP-Konzentration (**Greenberg et al.** 1994).

3.2.2 Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Herstellung von Präparationslösung und Kulturmedien zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Alle Präparationslösungen und Kulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und an der Sterilbank filtriert.

Kultivierung der Schnittkulturen zur Herstellung organotypischer Schnittkulturen

Die Herstellung der organotypischen Schnittkulturen erfolgte in Anlehnung an Stoppini und Brückner (**Brückner und Grosche** 2001; **Stoppini et al.** 1991; **Morawski et al.** 2014). Für die Präparation organotypischer Schnittkulturen wurden adulte, zwei bis vier Monate alte Mäuse der Mauslinie *C57Bl6* (WT) und deren $TnR^{-/-}$ verwendet. Nach Tötung durch CO_2-Einleitung erfolgte die Dekapitation. Die Gehirne wurden nach ihrer Präparation aus den Schädelhöhlen unverzüglich in eisgekühlte

Präparationslösung überführt und darauffolgend in 1,5%ige, auf 37 °C temperierte Agaroselösung (Invitrogen, USA) eingebettet. Nach Erstarren des Agarose-Gehirnblockes folgte dessen Zuschnitt und die Fixierung mittels Gewebekleber (Hypoglue 111 Rapidkleber, Marston Domsel, Zülpich, Deutschland). Der Agarose-Gehirnblock wurde danach in die vollständig mit Präparationslösung gefüllte Vibratomkammer (Vibratome Series 3000, TPI-Technical Products International, Großbritannien) eingesetzt. Es wurden 200 µm dünne Schnitte angefertigt und diese sofort in eine mit 3 ml Kulturmedium gefüllte Kavität einer 6-Well-Platte (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) übertragen. Während des gesamten Schneidevorganges wurden die Vibratomkammer und die 6-Well-Platte auf 4 °C gekühlt und mit Carbogen begast. Dann erfolgte die Entfernung der Agarose und der Meningen unter sterilen Bedingungen. Sterile Kulturmembranen (Millicell®-Sterilized Culture Plate Insert, Millipore, Darmstadt, Deutschland) wurden in einer 6-Well-Platte mit je 1 ml Kulturmedium eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank (Brutschrank Function Line, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) vorinkubiert. Pro Kavität einer 6-Well-Platte wurden zwei Schnitte aufgelegt. Die Schnittkulturen wurden zunächst 24 h im Brutschrank inkubiert und dann in eine neue Kavität einer 6-Well-Platte übertragen. Alle zwei Tage erfolgte ein Austausch des Kulturmediums.

Zugabe von Tau-Protein und Vitalfärbung organotypischer Schnittkulturen sowie Darstellung der Ausbreitung des zugegebenen Tau-Proteins durch die Aufnahme von Zeitreihen

In den WT und $TnR^{-/-}$ sollte die Ausbreitung eines zugegebenen Tau-Proteins untersucht und dafür Zeitreihen angelegt werden. Dazu wurde zu den vitalen Schnittkulturen der WT und $TnR^{-/-}$ für 24 Stunden 2 µl unmarkiertes Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml gegeben. In einem weiteren experimentellen Ansatz erfolgte die Zugabe von 2 µl mit *Arraylt* markiertem Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml. Sowohl markiertes als auch unmarkiertes Tau-Protein wurde genau zwischen die zwei Schnittkulturen auf einer Kavität einer 6-Well-Platte gegeben, sodass es auf die eine Schnittkultur von ventral zuströmte und auf die andere von dorsal.

Da das markierte Tau-Protein bereits mit Indocarbocyanin3 (Cy3) gekoppelt (*Arraylt*) war, konnte die Diffusion und Anlagerung in die Schnittkulturen sofort fluoreszenzmikroskopisch (Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) nachvollzogen werden. Während dieses sogenannten

Liveimaging wurden Bilder nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h aufgenommen und *live* dokumentiert, wo sich das Tau-Protein anreichert. Acht Stunden nach Zugabe des Tau-Proteins erfolgte eine Vitalfärbung der Schnittkulturen mit *WFA* (1:100, Lektin *Wisteria floribunda*, Biotin markiert, Sigma, USA) über 12 Stunden. Danach wurde für drei Stunden Cy2-gekoppeltes Streptavidin (1:150, Jackson Immuno-Research, USA) hinzugefügt und anschließend dreimal mit Kulturmedium gewaschen. *WFA* bindet an die endständige N-Acetylgalactosamin (GalNAc)-Komponente der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine. Biotin, mit dem das *WFA* bereits gekoppelt ist, wird durch Streptavidin spezifisch gebunden. Durch Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffes Indocarbocyanins (Cy2) an Streptavidin wurde das vital an PN gebundene *WFA* dargestellt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten die PN identifiziert werden. Insgesamt 24 h nach Zugabe des Tau-Proteins erfolgte eine abschließende Aufnahme. Die Reaktion wurde daraufhin mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA, Merck, Darmstadt, Deutschland) gestoppt und gleichermaßen fixiert.

Mit den Schnittkulturen, die mit unmarkiertem Tau-Protein behandelt wurden, erfolgte nach 24 h ebenfalls die Fixation mit PFA. Nach 30-minütiger Inkubation mit PFA erfolgte die Überführung der Schnittkulturen in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).

Behandlung organotypischer Schnittkulturen mit Chondroitinase ABC, um die Funktion der GAG-Seitenketten perineuronaler Netze bei Zugabe von Tau-Protein zu untersuchen

Um die Funktion der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine bei Zugabe von Tau-Protein zu untersuchen, erfolgte deren Abspaltung vom PN mit dem Enzym Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich, USA). Somit wurde zu den WT und $TnR^{-/-}$ noch eine weitere Kondition (mit dem Enzym Chondroitinase ABC behandelter Wildtyp (WT^{ChABC})) untersucht.

Chondroitinase ABC wurde über einen Zeitraum von 20 h zu den Schnittkulturen gegeben. Erst danach erfolgte die Zugabe von Cy3-markiertem Tau-Protein und die Aufnahme von Bildern nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h. Nach 8 h erfolgte die Vitalfärbung mit *AB1031* (Anti-Aggrecan *AB1031*, 1:200, Chemicon, Limburg, Deutschland). *WFA* konnte nicht verwendet werden, da es nur die abgespaltenen Netzbestandteile gebunden und markiert hätte. Die eigentliche Position der PN hätte nicht mehr nachvollzogen werden können. Auch *AB1031* wurde nach 12 h für 3 h mit

Cy-2 (DaR cy2, 1:150, Jackson Immuno-Research, USA) markiert. 24 h nach Tau-Zugabe wurde die letzte Aufnahme gemacht und die Reaktion mit PFA gestoppt.

Auswertung der Verteilung von zugegebenem Tau-Protein durch die Markierung organotypischer Schnittkulturen mit Immunhistochemie

Zur Auswertung der Versuche wurden die Schnittkulturen mittels Immunhistochemie markiert. Hierbei wurde mit Antikörpern gearbeitet, die der Markierung von Neuronen, des Tau-Proteins und verschiedenen Bestandteilen des PN dienten. Welcher Zellbestandteil mit welchem Antikörper markiert wurde, ist Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Tabelle. 3.2: Verwendete Antikörper bezogen auf die einzelnen Zellbestandteile.

	Immunhistochemie	
	Primärantikörper	**Sekundärantikörper**
Tau-Protein-Färbung	Tau1 1:250	DaM-Cy3 1:250
Netzfärbung	*WFA* 1:100	Strept-Cy2 1:150
		Strept-Cy3 1:250
		Strept-Cy5 1:150
	AB1031 1:200	DaR-Cy2 1:150
Neuronenfärbung	*NeuN* 1:100	DaM-Cy5 1:150
	PGP 9.5 1:500	DaR-Cy5 1:150
Kernfärbung	*Hoechst 33342*	1:10000

Für die Markierung mittels Immunhistochemie wurden die Schnittkulturen mit den Membranen ausgeschnitten, in eine 24-Well-Platte überführt und dort dreimal je zehn Minuten in PBS-Tween (PBS-T) gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation in 1 ml Blockerlösung. Anschließend wurde der Primärantikörper zugegeben und für 48 h bei 4 °C inkubiert. Es erfolgten drei erneute Waschgänge mit PBS-T. Der sekundäre Antikörper wurde in eine Lösung bestehend aus 50 % Blockerlösung und 50 % PBS-T gegeben, die Schnitte wurden in diese Lösung überführt. Es erfolgte die dreistündige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Taumler (Taumler Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Deutschland). Danach wurden die Schnitte erneut dreimal in PBS-T gewaschen und für 1 h mit *Hoechst 33342* (1 mg/L, Invitrogen, USA) markiert. Abschließend wurden die Schnitte noch einmal in PBS gewaschen, auf Objektträger (25 x 75 x 1 mm, Menzel Gläser GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) gezogen und dann mittels Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc., USA)

und Deckglas (24 x 50 mm, Menzel Gläser GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) eingedeckt. Die exakte Behandlung der einzelnen Schnitte in ihren Kavitäten ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Zur Auswertung der Schnittkulturen wurde das Fluoreszenzmikroskop (Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200, ZeissM, Oberkochen, Deutschland) verwendet.

Tabelle 3.3: Behandlung und verwendete Antikörper bei den organotypischen Schnittkulturen.

	Live-Imaging	**Vitalfärbung**	**Immunhistochemie**	
			Primär -antikörper	**Sekundär -antikörper**
Kavität 1	Tau-Cy3 1:1000 in Kulturmedium	*WFA* 1:100 mit Streptavidin-Cy2 1:150	P*GP9.5* 1:500	DaRb-Cy5 1:150
			Hoechst - Kernfärbung	
Kavität 2 und 3	kein Liveimaging unmarkiertes Tau-Protein	keine Vital-färbung mit *WFA*	*WFA* 1:100	Streptavidin-Cy2 1:150
			Tau1 1:250	DaM-Cy3 1:250
			PGP9.5 1:500	DaRb-Cy5 1:150
			Hoechst - Kernfärbung	

3.2.3 Beschreibung der quantitative Auswertung der Verteilung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen

Umwandlung der Übersichtsbilder von Hirnschnittkulturen nach Zugabe von Tau-Protein und Fixierung in Tabellen

Zur Auswertung der Versuche wurden am Fluoreszenzmikroskop mithilfe einer Kamera (Axio-Cam MRm, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und des zugehörigen Programms AxioVison (Version 4.8.2.0, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) Übersichtsbilder der Hirnschnittkulturen aufgenommen. Nach der Aufnahme wurden die Bilder in dem verlustlosen Format *.tiff* gespeichert und nach einem festgelegten Schema in Photoshop (Version CS 2, Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) in Graubilder umgewandelt. Dieses Schema war für jedes Bild gleich.

In einem weiteren Programm, ACDsee (ACDsee Systems, 2000, Ltd., Version 3.0, Build 103), wurden die Bilder dann in 1bpp-Bilder umgewandelt.

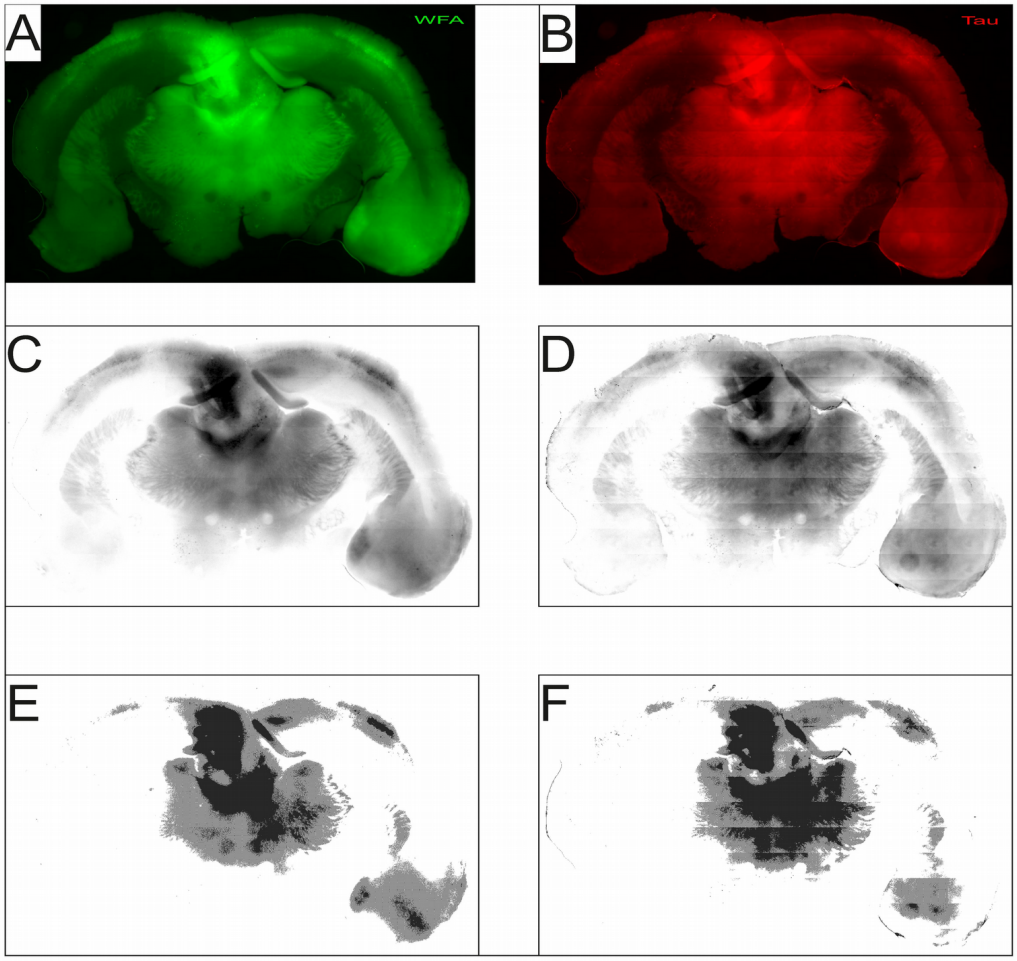

Abbildung 3.1: Bildbearbeitung: Bild (A) zeigt einen fixierten Schnitt in *WFA*-Cy2-Färbung, Bild (B) den selben Schnitt in Tau-Cy3-Färbung. Mittels Photoshop (Version CS 2, Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) wurden die Bilder (A) und (B) in die Graubilder (C) und (D) umgewandelt. Aus den Graubildern wurden mittels des Programmes ACDsee (ACDsee Systems, 2000, Ltd., Version 3.0, Build 103) die Bitmaps (1bpp) (E) und (F).

Die so konvertierten Bilder wurden dann mittels der AnalySIS Software (Version 15, Olympus SIS, Münster, Deutschland) analysiert. Mithilfe eines Makros zählte das Programm automatisch die schwarzen Bildpunkte in Kästchen von 50 x 50 Pixeln und gab diese anschließend als Tabelle aus. Die gesamte Bildbearbeitung ist am Beispiel eines fixierten WT-Schnittes mit den Färbungen *WFA*-Cy2 und Tau-Cy3 in Abbildung 3.1 gezeigt.

Beschreibung der Auswertung der Verteilung von zugegebenem Tau-Protein durch Analyse der in Tabellen umgewandelten Übersichtsbilder von Hirnschnittkulturen

Zur quantitativen Auswertung der Verteilung der PN und des applizierten Tau-Proteins (T) in den genutzten Mauslinien WT und $TnR^{-/-}$ und Konditionen (WT^{ChABC}) erfolgten Analysen mit den in der AnalySIS Software (Olympus SIS) erstellten Tabellen (siehe oben). Die zu einem Tier zugehörigen Tabellen wurden in die SPSS Software (IBM SPSS Statistics, Version 19) eingelesen und analysiert. Ein Fall repräsentierte hier einen Bildausschnitt aus 50 x 50 Pixeln. Die PN und das Tau-Protein repräsentierten jeweils eine Variable *P1* und *T1*.

Dabei war nicht die genaue Verteilung von PN und Tau-Protein in Bezug zum Hirnschnitt im Fokus, sondern die Kolokalisation der beiden Markierungen für PN (*P1)* und Tau-Protein (*T1)* in einem solchen Bildausschnitt. Der Mittelwert (*W1*), der die Kolokalisation von Tau-Protein und PN repräsentiert wurde über den jeweiligen Schnitt aus *P1*und *T1* ermittelt:

$$W1 = |P1 - T1| \tag{4.1}$$

Um eine Aussage treffen zu können, ob der berechnete Mittelwert einen hohen oder niedrigen Anteil von *P1* und *T1* aufweist, wurde auf zwei verschiedene Arten ein Rauschen (*R1* und *R2*, *Backgroundlevel*) für jedes einzelne Tier berechnet, mit dem dieser Wert verglichen wurde. *R1* stellt hierbei das gesamte im Schnitt angelagerte Tau-Protein so dar, als würde es sich gleichmäßig über den ganzen Schnitt verteilen.

$$R1 = |P1 - \overline{T1}| \tag{4.2}$$

R2 demgegenüber stellt die Differenz der von PN bedeckten Pixel zur halbmaximalen Anzahl, der in einem Bildausschnitt maximal möglichen Anzahl aller Pixel (2601 Pixel) dar. *R2* berechnet sich demnach als:

$$R2 = |P1 - 1300| \tag{4.3}$$

Die Mittelwerte *W1* der Mauslinien WT und $TnR^{-/-}$ und Konditionen (WT^{ChABC}) wurden mittels Wilcoxon-Test mit dem Rauschen (*Backgroundlevel*) *R1* und *R2* verglichen. Als maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit für diese statistischen Tests wurde p=0,05 festgelegt. Wenn also p<0,05, ist die Nullhypothese abzulehnen. Die Nullhypothese in diesem Falle für den Wilcoxon-Test lautet: Das Tau-Protein verteilt sich gleichmäßig über die Schnittkultur und lagert sich nicht an den PN an.

Um die Mauslinien WT und $TnR^{-/}$ und ihre Konditionen (WT^{ChABC}) untereinander vergleichen zu können, erfolgten weitere Anpassungen und Berechnungen, die im

Folgenden erläutert werden. Zum einen wurden Bildflächen, in denen sich keine Schnittkultur befindet, eliminiert. Zum anderen wurde für *P1* und *T1* je ein Schwellenwert ermittelt, um die Pixelwerte in einem Bildausschnitt (*x*) zu nominieren. Die so neu erhaltenen Variablen, die nun als Wert nur noch 1 oder 0 erhalten konnten, wurden als bereinigte Variablen PN (*P2*) und Tau-Protein (*T2*) definiert.

$$P2=1 \text{ für } x>210 \text{ Pixel und } P2=0 \text{ für } x\leq 210 \text{ Pixel} \quad (4.4)$$

$$T2=1 \text{ für } x>210 \text{ Pixel und } T2=0 \text{ für } x\leq 210 \text{ Pixel} \quad (4.5)$$

Analog wurde der Mittelwert (*W2*) über den jeweiligen Schnitt aus *P2* und *T2* berechnet: $W2=|P2-T2|$ (4.6)

Dabei wurden nur die Fälle eingeschlossen, in denen die bereinigten Variablen *P2* und *T2* den Wert 1 aufwiesen. Der ermittelte Mittelwert *W2* kann den Wert 0 annehmen, wenn PN und Tau-Protein kolokalisiert sind. Der Mittelwert W2 kann den Wert 1 annehmen, wenn PN und Tau-Protein nicht kolokalisiert sind. Alternativ nimmt der Mittelwert *W2* keinen Wert an, wenn im untersuchten Bildauschnitt kein organotypischer Schnitt vorhanden ist und somit weder PN noch Tau-Protein vorhanden sein kann. Daher ergibt sich ein Endwert zwischen 0 und 1. Geht der Mittelwert *W2* gegen 0, bedeutet das eine Kolokalisation von PN und Tau-Protein. Geht der Mittelwert *W2* gegen 1, bedeutet das keine Kolokalisation von PN und Tau-Protein.

Die Mittelwerte *W2* der Mauslinien WT und $TnR^{-/-}$ und Konditionen (WT^{ChABC}) wurden anschließend mittels U-Test nach Mann-Whitney verglichen. Als maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit für den U-Test nach Mann-Whitney wurde ebenfalls p=0,05 festgelegt. Wenn also p<0,05, ist die Nullhypothese abzulehnen. Die Nullhypothese für den U-Test nach Mann-Whitney lautet: WT und $TnR^{-/-}$ sowie WT^{ChABC} unterscheiden sich nicht in der Verteilung des Tau-Proteins über die Schnittkultur.

4 Ergebnisse

4.1 Darstellungen der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten

4.1.1 Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Wildtypen

Zur Illustration der PN-Typen und der Tau-Protein-Verteilung im Gehirn von WT wurden Gefrierschnitte erstellt und diese anschließend mittels Immunhistochemie markiert und ausgewertet. Die Methodik ist Kapitel 3.2.1 zu entnehmen. Es wurden verschiedene Marker verwendet. Die genaue Aufschlüsselung der verwendeten Antikörper ist Kapitel 3.1.3, Tabelle 3.1 zu entnehmen. *WFA* (Lektin *Wisteria floribunda*, Biotin markiert, Sigma, USA) ermöglicht die Identifizierung von PN, Tau-Protein wurde mit dem Antikörper *Tau1* (*Taup1*, Chemicon international, USA) markiert. Da beide Marker mittels unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Nachweissystemen (Indocarbocyanin2 und Indocarbocyanin 3) dargestellt wurden, lassen sich die Strukturen unter dem Fluoreszenzmikroskop unterscheiden. Zusätzlich wurden Neurone mit *NeuN* (Maus-Neuronales Kernprotein, Chemicon international, USA) oder *PGP9.5* (Anti-ProteinGene Product 9.5, Chemicon international, USA) und Zellkerne mit *Hoechst 33342* (Invitrogen, USA) markiert. Abbildung 4.1 zeigt eine solche Doppelmarkierung.

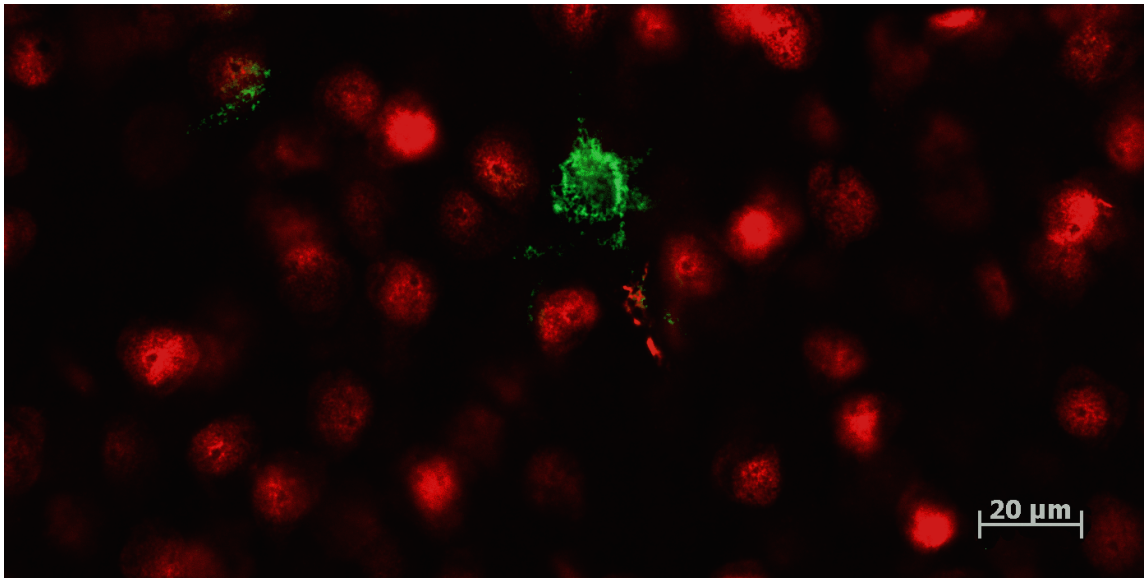

Abbildung 4.1: Das grün markierte perineuronale Netz (*WFA*) ist umgeben von zahlreichen rot markierten Neuronen (*PGP9.5*) des Kortex, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 20 µm.

Die Gefrierschnitte der WT zeigen überwiegend gitterartige, gut abgrenzbare PN im Neokortex und Hippocampus. Abbildung 4.2 zeigt die gitterartigen, gut abgrenzbaren PN in Gefrierschnitten von WT im *barrel* Kortex des Somatosensorischen Kortex. Im *barrel* Kortex werden die Informationen der Vibrissen von Nagetieren verarbeitet werden. Die PN sind besonders gut konturiert und zeigen einen dünnen perisomatischen Kranz.

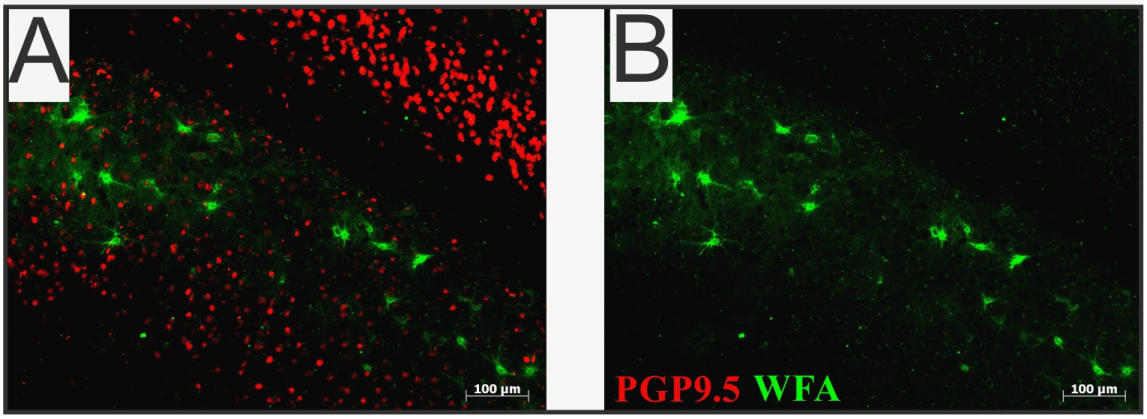

Abbildung 4.2: (A) und (B) zeigen gut abgrenzbare perineuronale Netze (*WFA)* in Gefrierschnitten von Wildtypmäusen im *barrel* Kortex des Somatosensorischen Kortex, in dem die Informationen der Vibrissen von Nagetieren verarbeitet werden, Neurone rot markiert (*PGP9.5*), aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Durch die gute Konturierung der Dendriten erscheinen die PN der WT weit verzweigt wie Abbildung 4.3:A-B im Vergleich mit den PN der $TnR^{-/-}$ zeigt. Das wurde bereits in sehr vielen Säugetierspezies nachgewiesen, zum Beispiel durch

Morawski (**Morawski et al.** 2010b) am kleinen Igeltenrek und durch Brückner (**Brückner und Grosche** 2001) an der Ratte.

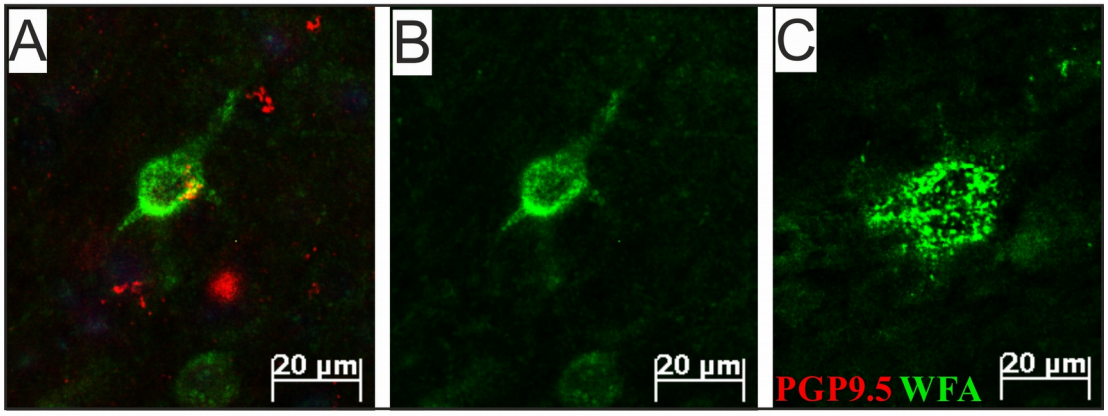

Abbildung 4.3: Typen perineuronaler Netze (PN, *WFA*) in Gefrierschnitten von Wildtypen (WT) und Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen ($TnR^{-/-}$): Die PN der WT (A) und (B) zeigen eine deutlich exprimierte, gitterartige Struktur und die Dendriten erscheinen gut konturiert. Die PN der WT erscheinen somit weiter verzweigt zu sein, als die PN der $TnR^{-/-}$ (C) . Diese sehen granulärer aus und zeigen einen dickeren perisomatischen Kranz als die PN der WT, Neurone rot markiert (*PGP9.5*), aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 20 µm.

In Abbildung 4.4 werden die PN-Typen der WT im *barrel* Kortex mit den PN der WT^{ChABC} und der $TnR^{-/-}$ verglichen. Die PN der WT zeigen eine deutlich exprimierte, gitterartige Struktur (Abbildung 4.4: (A) bis (H)).

Das Tau-Protein ist, wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein. Es bindet an Mikrotubuli, stabilisiert diese und reguliert in Axonen den axonalen Transport (**Weingarten et al.** 1975; **Witman et al.** 1976; **Cleveland et al.** 1977; **Binder et al.** 1986; **Papasozomenos und Binder** 1986; **Drechsel et al.** 1992; **Chen et al.** 1992). Daher ist es ubiquitär in allen Zellen lokalisiert. Beispielhaft ist dies in Abbildung 4.5: (A) bis (F) dargestellt.

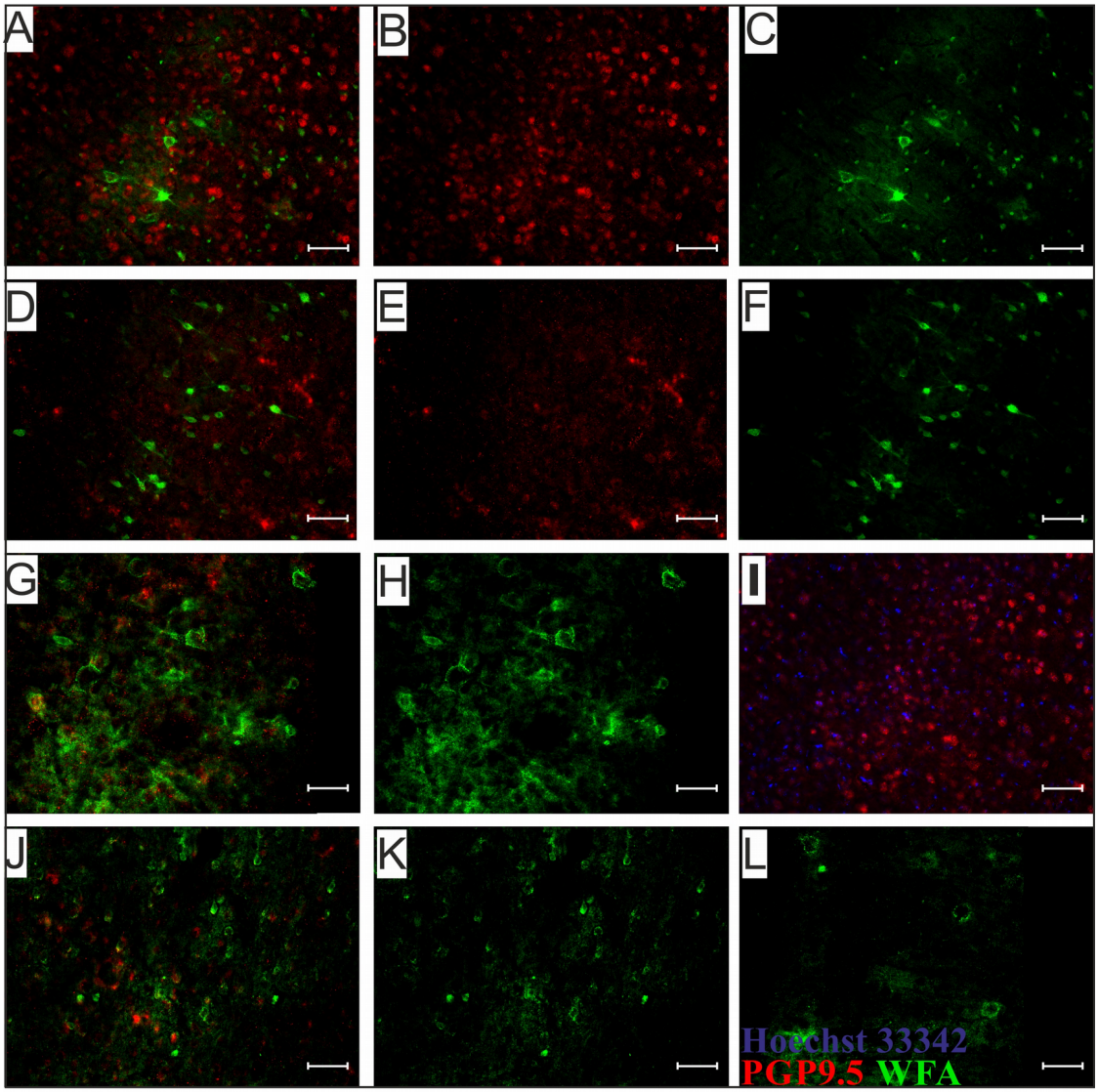

Abbildung 4.4: Typen perineuronaler Netze (PN, *WFA*) im barrel Kortex in Wildtypen (WT), nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}) und in Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen ($TnR^{-/-}$) in Gefrierschnitten: PN von WT (A) bis (H) zeigen eine deutlich exprimierte, gitterartige Struktur , wohingegen die $TnR^{-/-}$ (J) bis (L) diffusere, granuläre PN zeigen . Die PN der WT^{ChABC} (I) verlieren ihre Darstellbarkeit mit *WFA* , Neurone rot markiert (*PGP9.5*), Zellkerne blau markiert (*Hoechst 33342*), aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 50 µm.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gefrierschnitte von WT überwiegend gitterartige PN im Neokortex und Hippocampus zeigen. Diese sind besonders gut konturiert und zeigen einen dünnen perisomatischen Kranz. Tau-Protein ist ubiquitär in allen Zellen vorhanden.

4.1.2 Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen

Zur Illustration der PN-Typen und der Tau-Verteilung in Gehirnen von $TnR^{-/-}$ wurden Gefrierschnitte nach der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methodik erstellt und

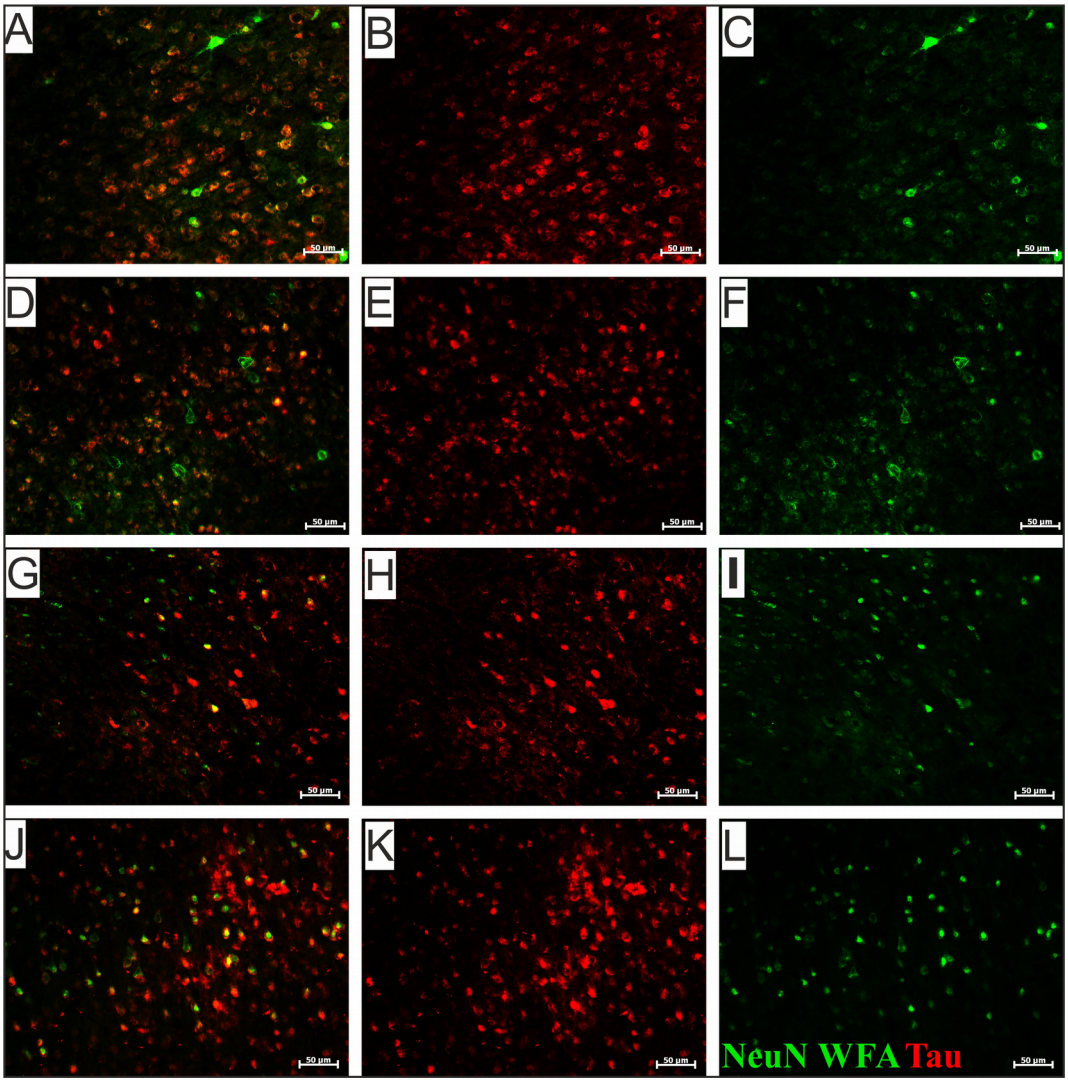

Abbildung 4.5: Tau-Protein-Verteilung in Gefrierschnitten: Tau-Protein ist als Mikrotubuli-assoziiertes Protein ubiquitär in allen Zellen und Axonen lokalisiert, sowohl in Wildtypen (A) bis (F), als auch in Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen, (G) bis (L), Neurone und perineuronale Netze grün markiert (*NeuN*, *WFA*), Tau-Protein rot markiert, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 50 µm.

diese mittels Immunhistochemie markiert und ausgewertet. Gefrierschnitte von $TnR^{-/-}$ zeigen überwiegend diffuse PN im Neokortex und Hippocampus. Ihre Struktur ist weniger deutlich exprimiert, sie erscheinen dadurch granulärer. Sie haben unterschiedliche Intensitäten und zeigen einen dickeren perisomatischen Kranz. In

Abbildung 4.4 sind die PN der $TnR^{-/-}$ im Vergleich mit den WT und den WT^{ChABC} im *barrel* Kortex dargestellt. Abbildung 4.4: (J) bis (L) zeigt die diffuseren, granulären PN der $TnR^{-/-}$. Die PN der $TnR^{-/-}$ sind besonders im Bereich der Dendriten weniger gut konturiert und erscheinen dadurch nicht so weit verzweigt wie die der WT. In Abbildung 4.3: (C) ist die geringere Konturierung der PN der $TnR^{-/-}$ dargestellt.

Die veränderte Struktur der PN von $TnR^{-/-}$ kann dadurch erklärt werden, dass in WT Tenascin-R über eine Domäne am C-Terminus der Proteoglykane bindet, so mit diesen einen Komplex bildet und sie miteinander vernetzt. Wird Tenascin-R nun in den $TnR^{-/-}$ nicht exprimiert, verändert sich die Struktur der PN. Sie ist in den $TnR^{-/-}$ diffuser. PN lassen sich noch mit *WFA* markieren, sind aber wesentlich schwächer zu sehen, verglichen mit den WT (**Weber et al.** 1999). Im Vergleich zu den WT ist die Grenze der PN von $TnR^{-/-}$ zur Umgebung nicht klar abgegrenzt und die Dendriten werden nicht mehr mit *WFA* markiert (**Brückner et al.** 2000; **Carulli et al.** 2010; **Weber et al.** 1999).

Auch in $TnR^{-/-}$ ist Tau-Protein ubiquitär in allen Zellen vorhanden. Eine Übersicht zeigt Abbildung 4.5: (G) bis (L).

Zusammenfassend zeigen sich die PN der $TnR^{-/-}$ eher diffus mit dickerem perisomatischem Kranz. Ihre Struktur ist weniger deutlich exprimiert und sie erscheinen dadurch granulärer, verglichen mit den WT. Die Markierung mit *WFA* ist schwächer ausgeprägt. Tau-Protein ist ubiquitär in allen Zellen vorhanden.

4.1.3 Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC

Zur Illustration der PN-Typen und der Tau-Verteilung in WT^{ChABC} wurden Gefrierschnitte nach der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methodik erstellt und diese mittels Immunhistochemie markiert und ausgewertet. Die Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich, USA) wurde in Kapitel 3.2.2 beschrieben und diente der Abspaltung der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine vom PN. Dadurch soll die Funktion der GAG-Seitenketten bei Zugabe von Tau-Protein untersucht werden. In Abbildung 4.4: (I) ist zu sehen, dass es dadurch zum Verlust der Darstellbarkeit mit *WFA* kommt, da *WFA* pezifische Motive auf den GAG-Seitenketten markiert, wie bereits von Härtig (**Härtig et al.** 1999) beschrieben. Werden die Neuronen mit Chondroitinase ABC behandelt, werden die

Seitenketten abgespalten, auf denen *WFA* spezifische Motive bindet (**Giamanco et al.** 2010).

Da die Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase ABC an sonst unveränderten WT geschieht, ist auch hier Tau-Protein ubiquitär in allen Zellen vorhanden.

Zusammenfassend kommt es durch die Abspaltung der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine vom PN durch das Enzym Chondroitinase ABC zum Verlust der Darstellbarkeit mit *WFA*. Tau-Protein ist ubiquitär in allen Zellen und Axonen vorhanden.

4.2 Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen als *Liveimaging*

4.2.1 Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Wildtyp-Mäusen als *Liveimaging*

In den WT sollte die Ausbreitung eines zugegebenen Tau-Proteins untersucht werden und dafür Zeitreihen angelegt werden. Dafür wurden den Schnittkulturen markiertes Tau-Protein zugesetzt. Die Methodik dazu ist Kapitel 3.2.2 zu entnehmen. Tau-Protein wurde genau zwischen die zwei Schnittkulturen auf einer Kavität einer 6-Well-Platte gegeben. So strömte es auf die eine Schnittkultur von ventral zu und auf die andere von dorsal.

Nach Zugabe des Tau-Proteins verteilt sich dieses in den WT fortschreitend über den Schnitt. Dabei ist zu sehen, dass von dorsal her zugegebenes Tau-Protein von den PN weitestgehend davon abgehalten wird, in die ventral gelegenen Hirnregionen vorzudringen und sich auch langsamer im Schnitt verteilt. Wird Tau-Protein hingegen von ventral zugegeben, dringt es schneller nach dorsal durch, wo es sich an den PN anreichert. Abbildung 4.6 zeigt eine Übersicht der Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur eines WT nach dorsaler Zugabe von 2 µl mit *Arraylt* markiertem Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h sowie den fixierten Schnitt nach 24 h. Die PN-reichen Kortexschichten bilden eine Barriere und verzögern die Ausbreitung von Tau-Protein bis zu 2 h. Danach dringt das Tau-Protein weiter nach ventral oder dorsal in die Schnittkultur vor.

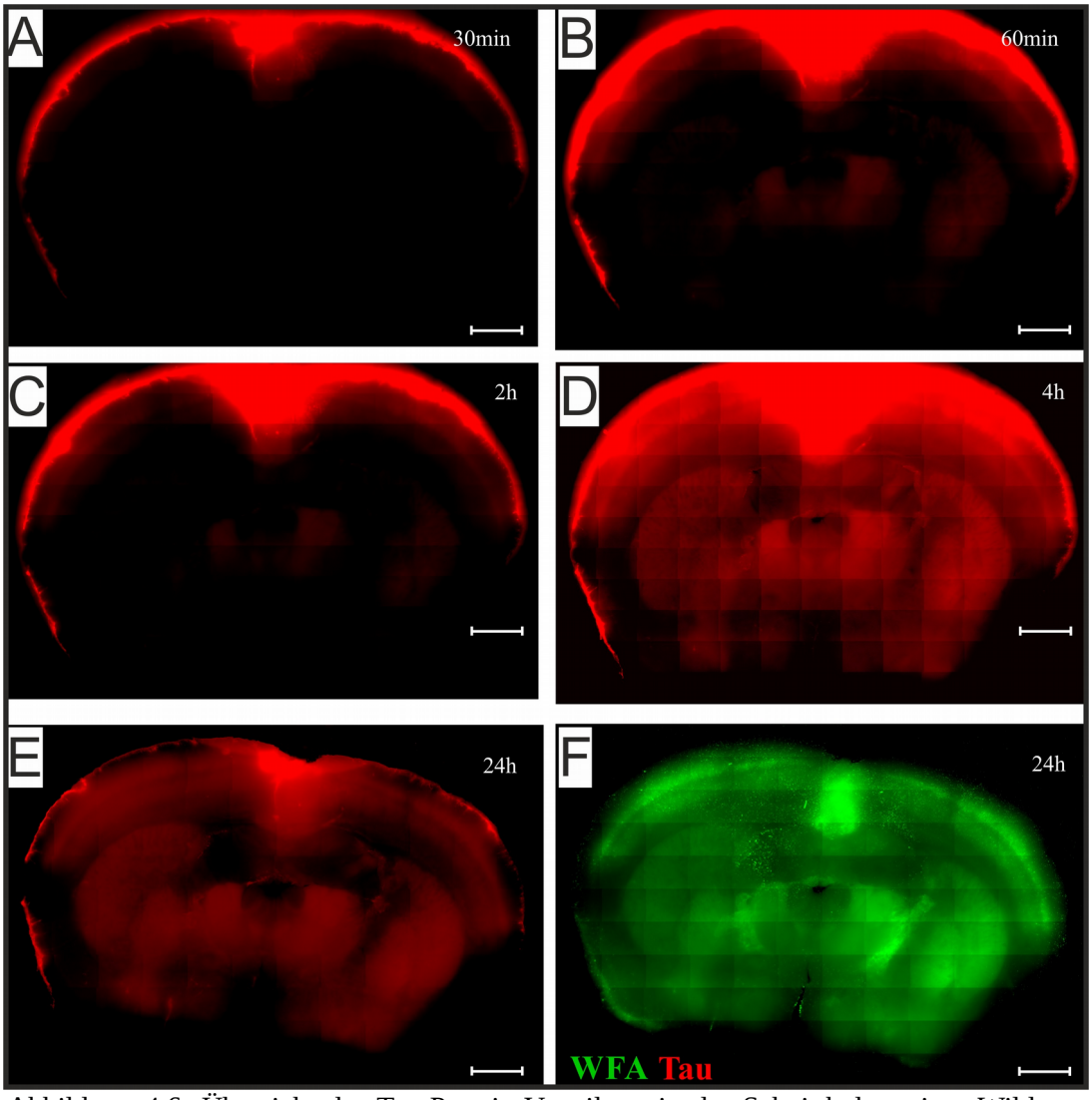

Abbildung 4.6: Übersicht der Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur einer Wildtyp-Maus nach dorsaler Zugabe von 2 µl mit *Arraylt* (rot) markiertem Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml: (A) bis (D) Tau-*Liveimaging* nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h. (E) und (F) fixierter Schnitt nach 24 h, perineuronale Netze grün markiert (*WFA),* aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 1000 µm.

Tau-Protein bildet vor den PN-tragenden Neuronen eine Ausbreitungsfront. Diese ist in Abbildung 4.7 zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, nach 1 min, nach 10 min und nach 20 min sowie in Abbildung 4.10 zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, nach 1 min und nach 15 min zu sehen. Die Ausbreitungsfront bewegt sich auf die PN-tragenden Neuronenschichten zu. Bereits nach 1 h hat sich Tau-Protein an den PN angereichert. Dabei zeigen sich keinerlei zelluläre Veränderungen. Tau-Protein umlagert die PN, in PN-freie Neuronen lagert es sich verstärkt ein. Die intrazelluläre Aufnahme von Tau-Protein in PN-freie Neurone zeigt Abbildung 4.8.

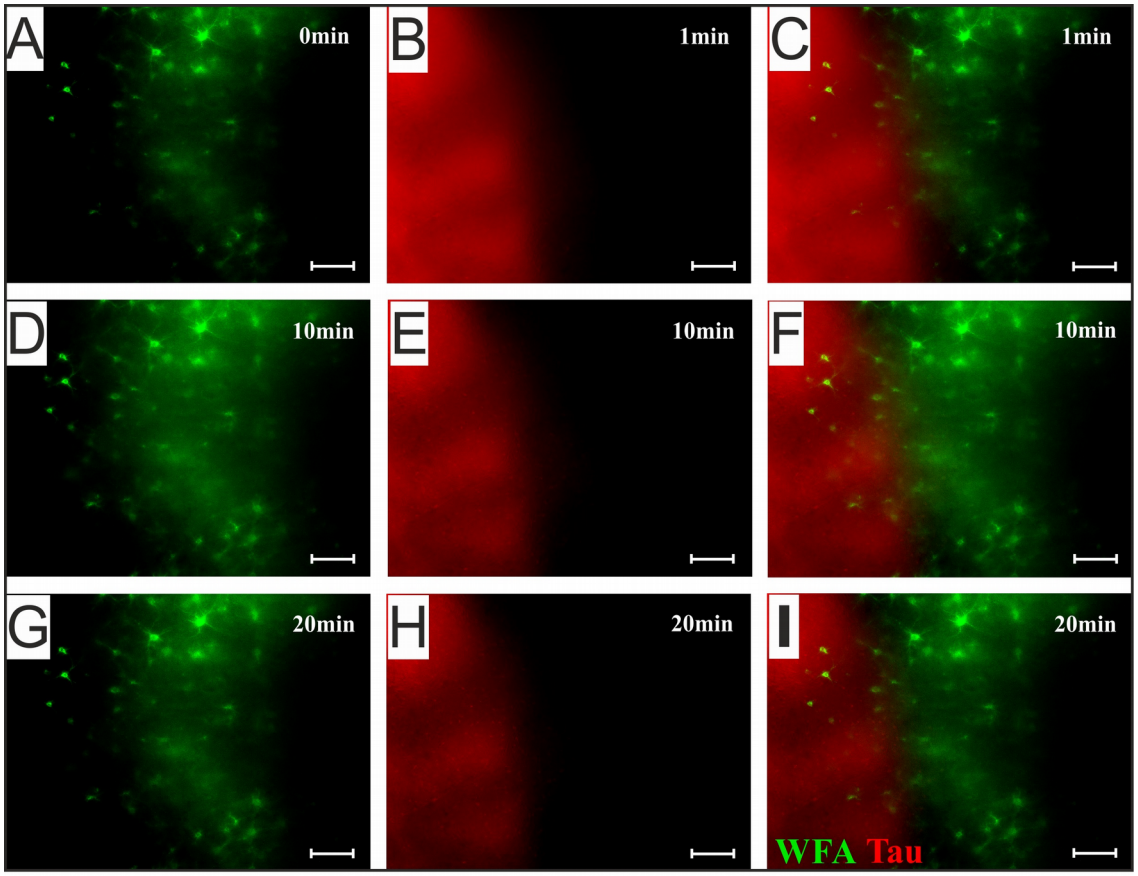

Abbildung 4.7: Ausbreitung des Tau-Proteins in Wildtypen im *barrel* Kortex: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) Tau-Ausbreitungsfront (rot markiert) und *WFA* 1 min nach Tau-Protein-Zugabe. (D) bis (F) *WFA* und Tau-Ausbreitungsfont 10 min nach Tau-Protein-Zugabe, (G) bis (I) *WFA* und Tau-Ausbreitungsfront 20 min nach Tau-Protein-Zugabe. Die Ausbreitungsfront bewegt sich auf die PN-tragenden Neuronenschichten (*WFA)* zu, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Erreicht das Tau-Protein die PN-reichen Kortexschichten, reichert es sich diffus um die PN an. Dargestellt ist das in Abbildung 4.9 und 4.10. für den Bereich des *barrel* Kortex jeweils zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, nach 1 min und nach 15 min.

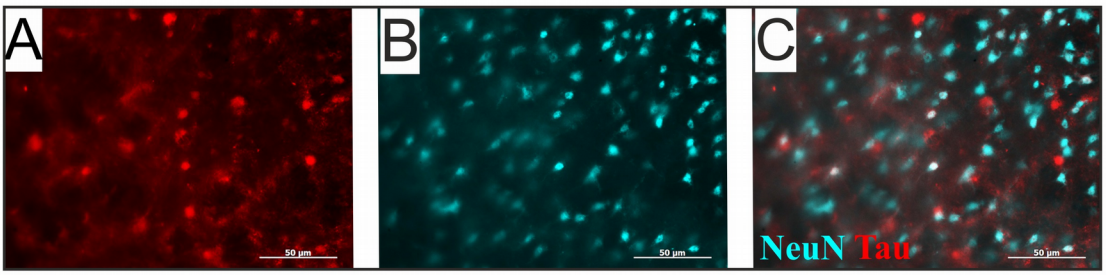

Abbildung 4.8: Neurone eines Wildtypen ohne perineuronale Netze (PN) mit Tau-Protein-Aufnahme: Tau-Protein (rot) wird von PN-freien Neuronen (*NeuN* hellblau) intrazellulär aufgenommen, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 50 µm.

Die PN-tragenden Neurone sind überwiegend frei von Tau-Protein-Einlagerungen. Das ist in Abbildung 4.14: (A), (C) und (E) im Vergleich mit den $TnR^{-/-}$ dargestellt. Die Übersicht zeigt links die PN von WT, an denen sich verstärkt Tau-Protein anreichert. Es ist zu sehen, dass die PN das Tau-Protein anziehen, dieses aber nicht vom Neuron aufgenommen wird.

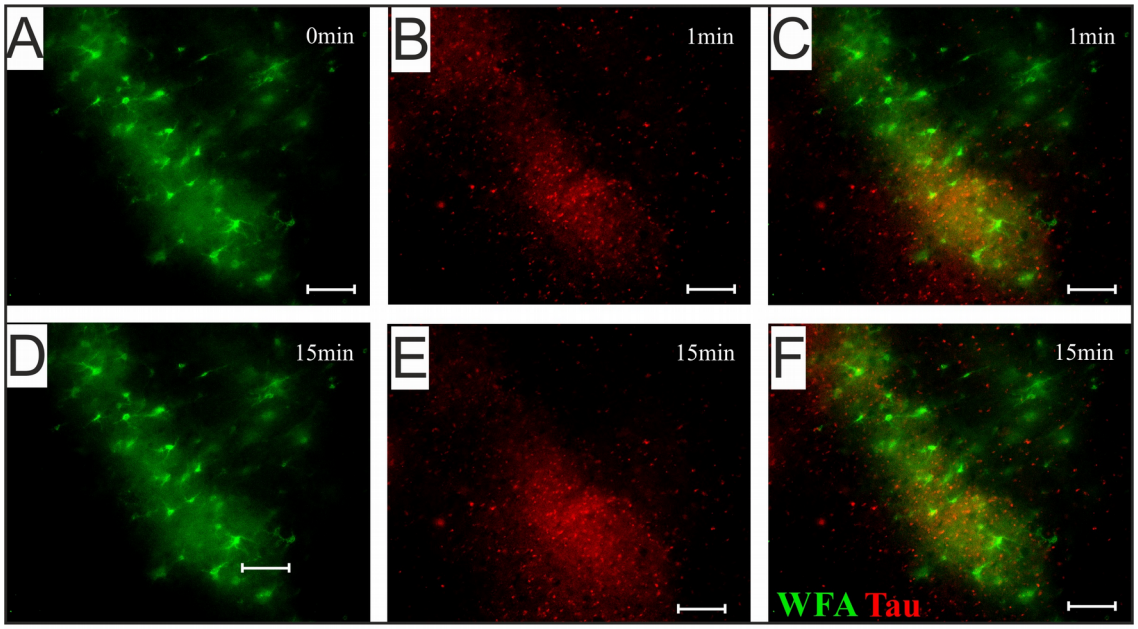

Abbildung 4.9: Tau-Protein-Anreicherungen im *barrel* Kortex einer Wildtyp-Maus: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) *WFA* und Tau-Protein-Anreicherungen (rot markiert) 1 min nach Zugabe. (D),(E) und (F) *WFA* und Tau-Protein-Anreicherungen nach 15 min. Tau-Protein reichert sich in Kortexschichten, die zahlreiche perineuronale Netze tragen, diffus um die perineuronalen Netze an, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Insgesamt lässt sich für die WT sagen, dass Tau-Protein sich nach Zugabe zunächst ungehindert über die Schnittkultur ausbreitet. Trifft es auf PN-reiche Kortexschichten, reichert es sich diffus um die PN-tragenden Neurone an. Die PN-tragenden Neurone sind nahezu frei von Tau-Protein-Einlagerungen. Je mehr PN in einer Kortexschicht vorkommen, desto länger dauert es, bis Tau-Protein in die Schnittkultur vordringt. In PN-freie Neuronen hingegen lagert sich Tau-Protein ein.

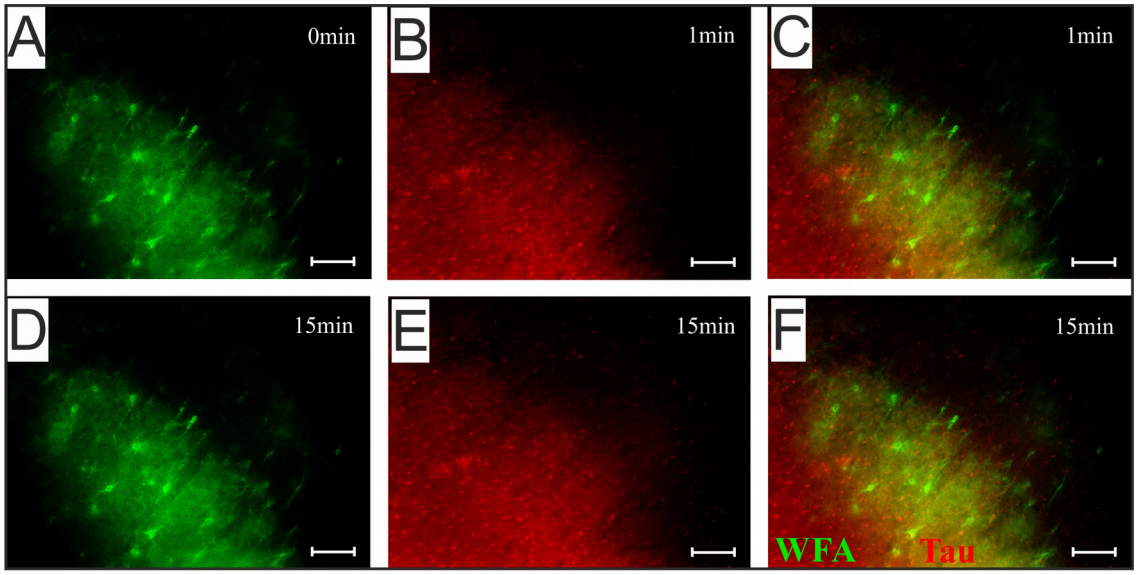

Abbildung 4.10: Tau-Protein-Ausbreitung und Anreicherung im *barrel* Kortex einer Wildtyp-Maus: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) *WFA* und sowohl die Tau-Ausbreitungsfront als auch Tau-Protein-Anreicherungen (rot markiert) 1 min nach Tau-Protein-Zugabe. (D), (E) und (F) *WFA*, Tau-Ausbreitungsfront und Tau-Protein-Anreicherungen nach 15 min. Die Ausbreitungsfront bewegt sich auf die PN-tragenden Neuronenschichten (*WFA)* zu und reichert sich in Kortexschichten, die zahlreiche perineuronale Netze tragen, diffus um die perineuronalen Netze an, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 μm.

4.2.2 Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen als *Liveimaging*

Um die Ausbreitung von Tau-Protein näher zu untersuchen, wurde auch den Schnittkulturen von $TnR^{-/-}$ markiertes Tau-Protein zugesetzt. Die Methodik dazu ist Kapitel 3.2.2 zu entnehmen. Nach Zugabe des Tau-Proteins verteilt sich dieses wie bei den WT, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, zunächst fortschreitend über den Schnitt. Von dorsal her zugegebenes Tau-Protein wird ebenso von den PN weitestgehend davon abgehalten, in die ventral gelegenen Hirnregionen vorzudringen. Es breitet sich aber wesentlich schneller in den $TnR^{-/-}$ aus als bei den WT. Schon nach 30 min hat sich Tau-Protein diffus innerhalb der PN-reichen Kortexschichten verteilt. Diese bilden eine Barriere und verzögern die Ausbreitung von Tau-Protein. Danach dringt das Tau-Protein weiter in die Schnittkultur vor. Abbildung 4.11 zeigt in Übersichtsbildern die Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur eines $TnR^{-/-}$ nach Zugabe von Tau-Protein nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h sowie den fixierten Schnitt nach 24 h.

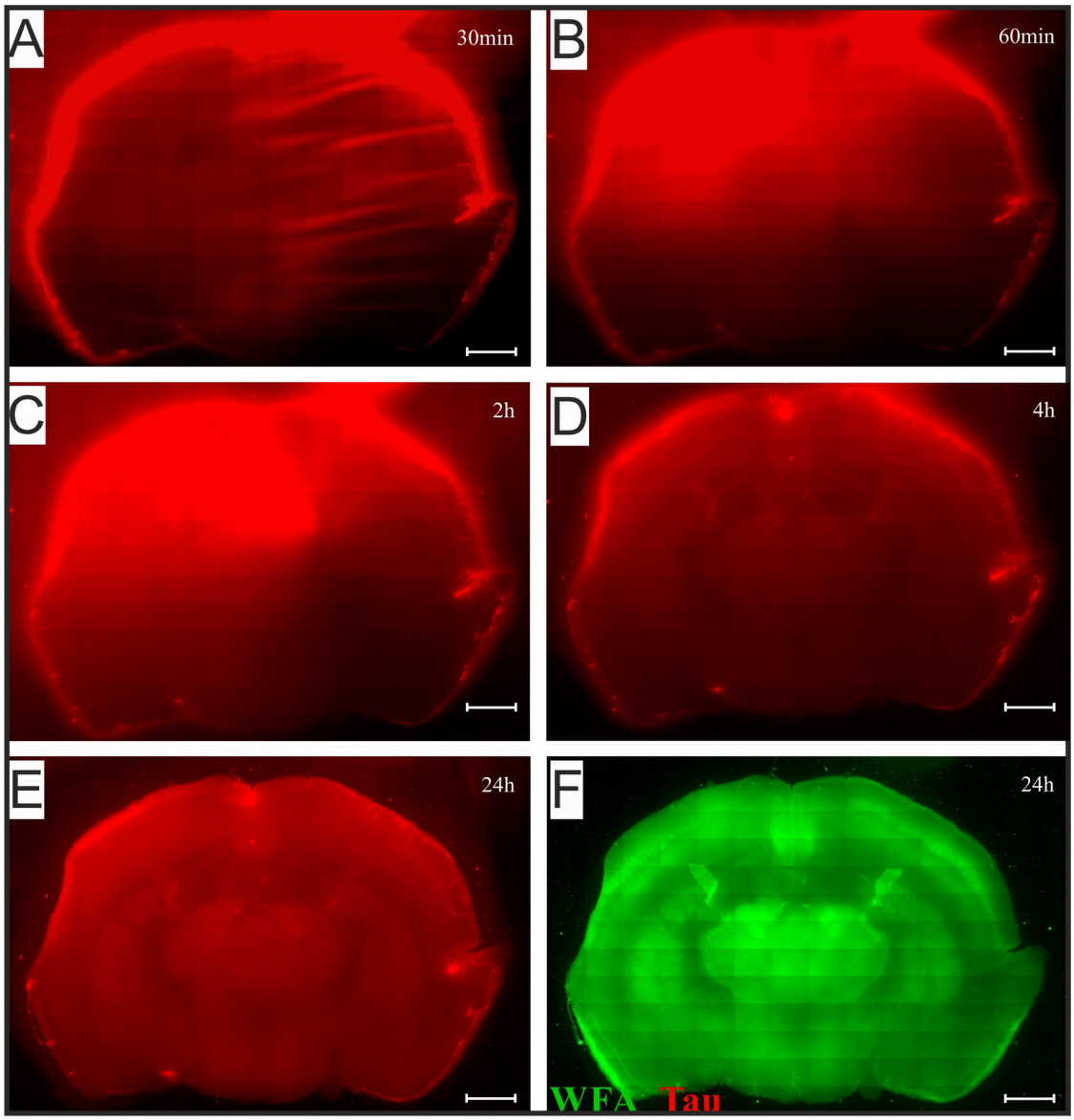

Abbildung 4.11: Übersicht der Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur einer Tenascin-R-*Knockout*-Maus nach dorsaler Zugabe von 2 µl mit *Arraylt* (rot) markiertem Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml: (A) bis (D) Tau-*Liveimaging* nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h. (E) und (F) fixierter Schnitt nach 24 h, perineuronale Netze grün markiert (*WFA)*, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 1000 µm.

Ebenso wie bei den WT bildet Tau-Protein vor den PN-tragenden Neuronen eine Ausbreitungsfront. Die Ausbreitungsfront bewegt sich auf die PN-tragenden Neuronenschichten zu. Sie ist in Abbildung 4.12 zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, nach 1 min, nach 10 min und nach 20 min zu sehen.

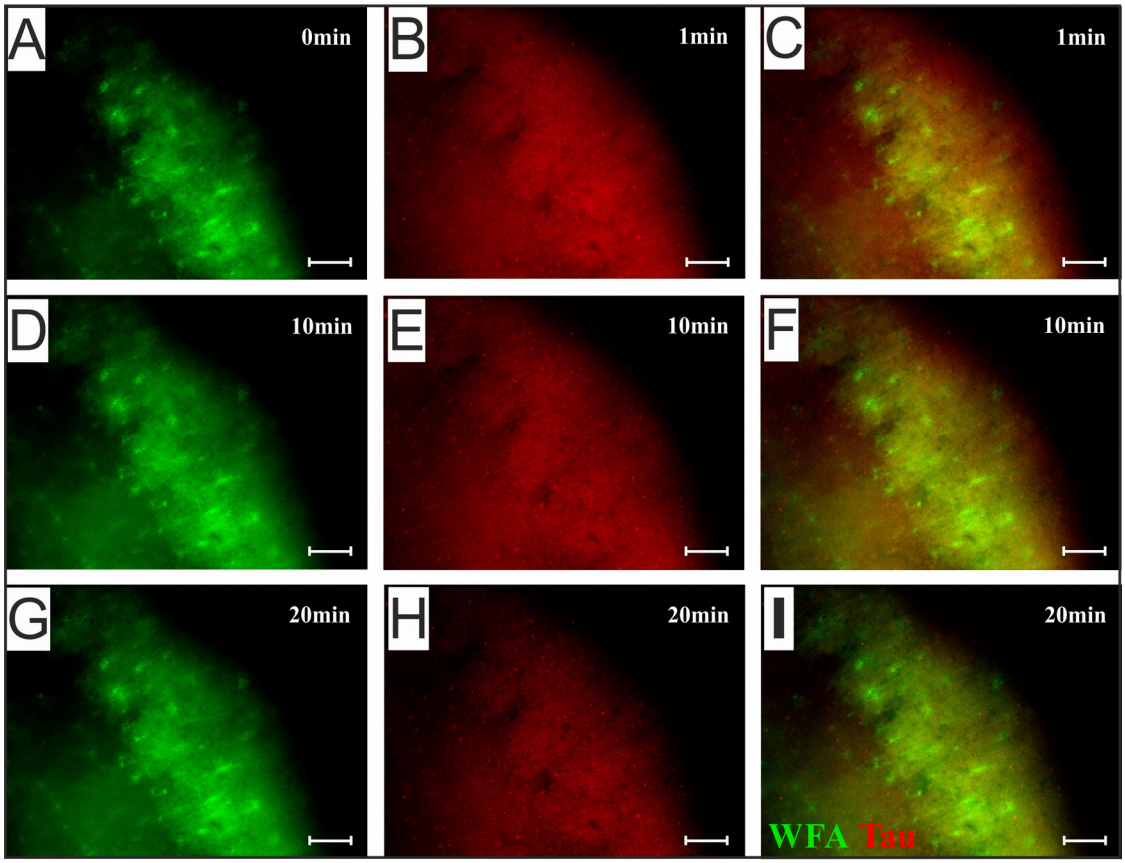

Abbildung 4.12: Tau-Ausbreitungsfront in der Schnittkultur einer Tenascin-R-*Knockout-Maus* im *barrel* Kortex: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) Tau-Ausbreitung (rot markiert) und *WFA* 1 min nach Zugabe. (D) bis (F) *WFA* und Tau-Ausbreitung 10 min nach Zugabe. (G) bis (I) *WFA* und Tau-Ausbreitung 20 min nach Zugabe. Die Ausbreitungsfront bewegt sich auf die PN-tragenden Neuronenschichten (*WFA)* zu, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Bereits nach 30 min hat sich Tau-Protein an den PN angereichert. Dabei zeigen sich keine zellulären Veränderungen. Tau-Protein umlagert diffus die PN-reichen Kortexschichten. Das ist in Abbildung 4.13 für den Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, nach 1 min, nach 10 min und nach 2 h dargestellt. Insbesondere vor PN-tragenden Kortexschichten sind zahlreiche Tau-Protein-Anreicherungen sichtbar. Nach 24 h sind auch die PN-tragenden Neurone der $TnR^{-/-}$ überwiegend frei von zugegebenem Tau-Protein, es sind aber sichtbar mehr Tau-Protein-Einlagerungen als in PN-tragenden Neuronen von WT vorhanden. Tau-Protein umlagert bei den $TnR^{-/-}$ die PN auch nicht so stark wie bei den WT. Das ist in Abbildung 4.14 im Vergleich mit den WT dargestellt. Die Übersicht zeigt links die PN von WT, an denen sich verstärkt Tau-Protein anreichert. Rechts sind die PN der $TnR^{-/-}$ dargestellt, dort hat sich Tau-Protein nicht angereichert. Die Neurone selbst sind frei von zugegebenem Tau-Protein.

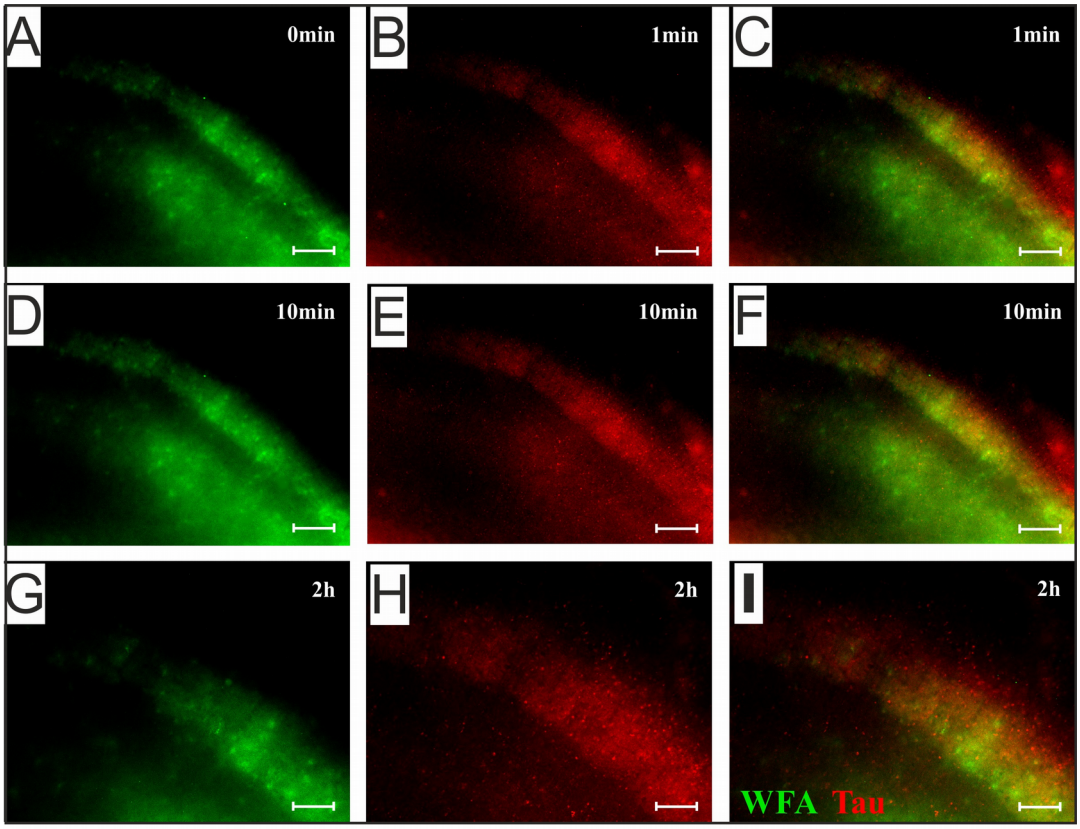

Abbildung 4.13: Tau-Protein-Anreicherungen innerhalb einer der Kortexschichten, die reich an perineuronalen Netzen ist, in einer Tenascin-R-*Knockout-Maus* im *barrel* Kortex: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) Tau-Protein-Anreicherungen (rot markiert) und *WFA* 1 min nach Zugabe. (D) bis (F) *WFA* und Tau-Protein-Anreicherungen 10 min nach Zugabe. (G) bis (I) *WFA* und Tau-Protein-Anreicherung 2 h nach Zugabe. Tau-Protein reichert sich in Kortexschichten, die zahlreiche perineuronale Netze tragen, diffus um die perineuronalen Netze an, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Zusammenfassend zeigt die Zugabe von Tau-Protein bei den $TnR^{-/-}$ ein ähnliches Bild wie bei den WT, jedoch konnte eine wesentlich schnellere Ausbreitung des Tau-Proteins beobachtet werden. Außerdem reichert sich Tau-Protein bei den $TnR^{-/-}$ nicht verstärkt an den PN an.

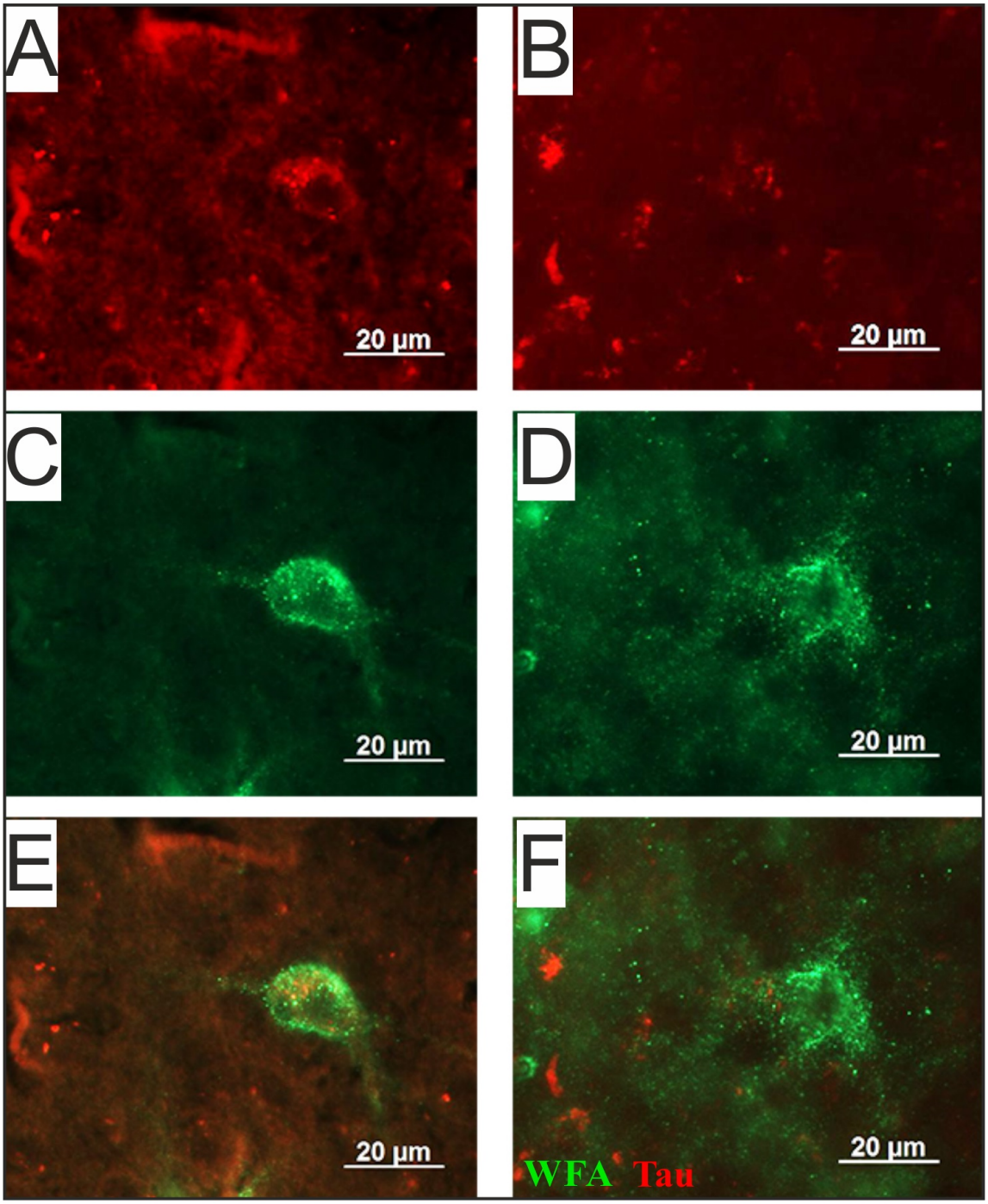

Abbildung 4.14: Tau-Protein-Anreicherungen an perineuronalen Netzen (PN) in Wildtypen (WT) und Tenascin-R-*Knockout* ($TnR^{-/-}$): (A), (C) und (E) zeigen die PN (grün markiert) von WT, an denen sich zugegebenes Tau-Protein (rot markiert) direkt an den PN angelagert hat. (B), (D) und (F) zeigen die PN von $TnR^{-/-}$ ohne Anreicherung von Tau-Protein, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 20 µm.

4.2.3 Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC als *Liveimaging*

Um die Funktion der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine bei Zugabe von Tau-Protein zu untersuchen, erfolgte deren Abspaltung vom PN mit dem Enzym Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich, USA). Somit wurde zu den WT und $TnR^{-/-}$ noch eine weitere Kondition, die WT^{ChABC} untersucht. Die Behandlung mit Chondroitinase ABC erfolgte für 20 h. Anschließend wurde den Schnittkulturen für 24 h markiertes Tau-Protein zugesetzt. Die Methodik dazu ist Kapitel 3.2.2 zu entnehmen.

Nach Zugabe des Tau-Proteins verteilt sich dieses fortschreitend über die Schnittkultur ohne PN-tragende Kortexschichten zu umlagern wie bei den WT ohne Behandlung mit Chondroitinase ABC (siehe Kapitel 4.2.1). Abbildung 4.15 zeigt eine Übersicht der Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur eines WT^{ChABC} nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h sowie den fixierten Schnitt nach 24 h. Die PN wurden hier mit *AB1031* (Anti-Aggrecan *AB1031*, 1:200, Chemicon, Limburg, Deutschland) markiert. 4 h nach Tau-Protein-Zugabe zeigen sich erst dezente Anreicherungen an PN-tragenden Neuronen. Nach 24 h hat sich nur sehr wenig Tau-Protein im Vergleich mit den WT ohne Behandlung mit Chondroitinase in den Schnittkulturen angereichert.

Zusammenfassend erfolgt die Ausbreitung des zugegebenen Tau-Proteins also wesentlich langsamer als in den WT und $TnR^{-/-}$. Anreicherungen an PN-tragende Neurone sind nicht zu sehen. Die Schnittkulturen enthalten nach Fixierung viel weniger Tau-Protein als die Schnittkulturen der WT ohne Behandlung mit Chondroitinase.

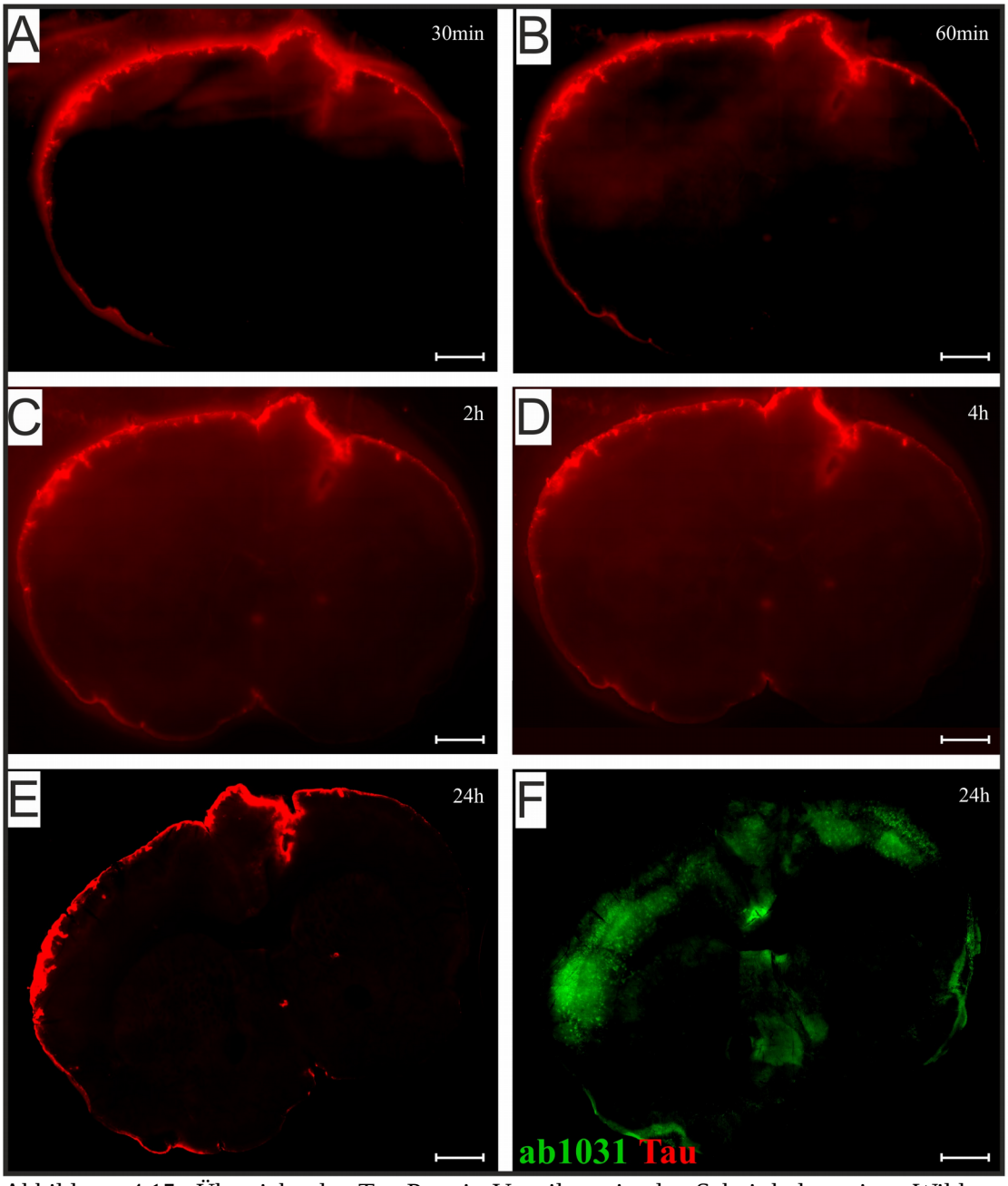

Abbildung 4.15: Übersicht der Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur einer Wildtyp-Maus nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}) und nach dorsaler Zugabe von 2 µl mit *Arraylt* (rot) markiertem Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml: (A) bis (D) Tau-*Liveimaging* nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h. (E) und (F) fixierter Schnitt nach 24 h, perineuonale Netze grün markiert (*ab1031*) aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

4.3 Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen

4.3.1 Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von fixierten organotypischen Schnittkulturen

Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von fixierten organotypischen Schnittkulturen der Wildtypen

Die quantitative Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Nicht die genaue Verteilung von PN und Tau-Protein in Bezug zum Hirnschnitt war von Interesse, sondern die Kolokalisation der beiden Markierungen (PN und Tau-Protein). Die Kolokalisation von Tau-Protein und PN über den jeweiligen Schnitt wurde durch den Mittelwert *W1* aus den Größen *P1* (PN) und *T1* (Tau-Protein) berechnet. Die *W1* der WT wurden im Wilcoxon-Test mit ihren jeweiligen Rauschwerten *R1* und *R2* verglichen (Wilcoxon-Test, p(*R1*)=0,002, p(*R2*)=0,002), siehe Tabellen 4.1 und 4.2 (Berechnungen siehe Kapitel 3.2.3). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests liegen somit deutlich unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05.

Tabelle 4.1: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen: Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

		N	**Mittlerer Rang**	**Rangsumme**
Rauschart 1 - Mittelwerte	Negative Ränge	0	,00	,00
	Positive Ränge	90	5,00	45,00
	Bindungen			
	Gesamt	9		
Rauschart 2 - Mittelwerte	Negative Ränge	0	,00	,00
	Positive Ränge	90	5,00	45,00
	Bindungen			
	Gesamt	9		

Negative Ränge: Rauschart < Mittelwerte
Positive Ränge: Rauschart > Mittelwerte
Bindungen: Rauschart = Mittelwerte

Tabelle 4.2: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen: Wilcoxon-Test – Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

	Rauschart 1 Mittelwerte	**Rauschart 2 Mittelwerte**
Z (basiert auf negativen Rängen)	-2,666	-2,666
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,008	,008
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,004	,004
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,002	,002
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002	,002

Abbildung 4.16. zeigt einen Boxplot der Mittelwerte *W1* der WT mit ihren jeweiligen Rauscharten *R1* und *R2*. Es ist zu erkennen, dass die *W1* der WT nicht auf gleicher Höhe mit den *R1* und *R2* liegen, sondern deutlich darunter. Das bedeutet, dass sich zugegebenes Tau-Protein bei den WT nicht gleichmäßig über den Schnitt verteilt, sondern sich an den PN anreichert.

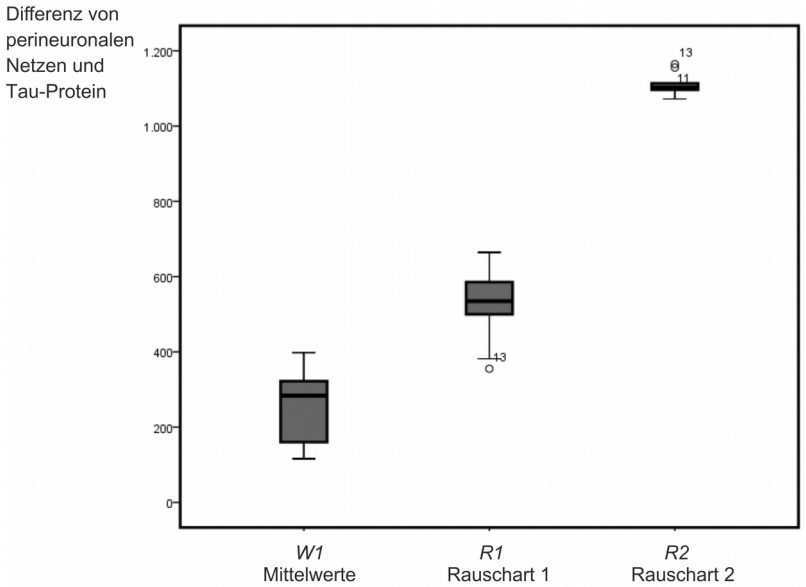

Abbildung 4.16: Boxplot der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein bei den fixierten Wildtypen: Die berechneten *W1* (Mittelwerte der Differenz von perineuronalen Netzen und Tau-Protein) unterscheiden sich signifikant von den beiden berechneten Rauscharten *R1* (Rauschart 1) und *R2* (Rauschart 2).

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass sich Tau-Protein bei den WT nicht gleichmäßig über den Schnitt verteilt, sondern sich an den PN anreichert. Damit stützen die Berechnungen im Wilcoxon-Test die Beobachtungen während des *Liveimaging*.

Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von fixierten organotypischen Schnittkulturen der Tenascin-R-*Knockout*-Mäuse

Die Berechnungen zur quantitativen Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein erfolgte auch bei den $TnR^{-/-}$ wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Die *W1* der $TnR^{-/-}$ wurden im Wilcoxon-Test mit *R1* und *R2* verglichen (Wilcoxon-Test, p(*R1*)=0,016, p(*R2*)=0,016), das ist den Tabellen 4.3 und 4.4 zu entnehmen. Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests liegen somit wie die Ergebnisse der WT unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05.

Tabelle 4.3: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout*: Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

		N	**Mittlerer Rang**	**Rangsumme**
Rauschart 1 - Mittelwerte	Negative Ränge	0	,00	,00
	Positive Ränge	6	3,50	21,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	6		
Rauschart 2 - Mittelwerte	Negative Ränge	0	,00	,00
	Positive Ränge	6	3,50	21,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	6		

Negative Ränge: Rauschart < Mittelwerte
Positive Ränge: Rauschart > Mittelwerte
Bindungen: Rauschart = Mittelwerte

Tabelle 4.4: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout*: Wilcoxon-Test – Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

	Rauschart 1 Mittelwerte	**Rauschart 2 Mittelwerte**
Z (basiert auf negativen Rängen)	-2,201	-2,201
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,028	,028
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,031	,031
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,016	,016
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,016	,016

Abbildung 4.17 zeigt einen Boxplot der Mittelwerte *W1* der $TnR^{-/-}$ mit ihren jeweiligen Rauscharten *R1* und *R2*. Auch hier ist zu erkennen, dass die *W1* der $TnR^{-/-}$ nicht auf gleicher Höhe mit den *R1* und *R2* liegen, sondern deutlich darunter. Das bedeutet, dass sich zugegebenes Tau-Protein auch bei den $TnR^{-/-}$ nicht gleichmäßig über den Schnitt verteilt, sondern sich an den PN anreichert.

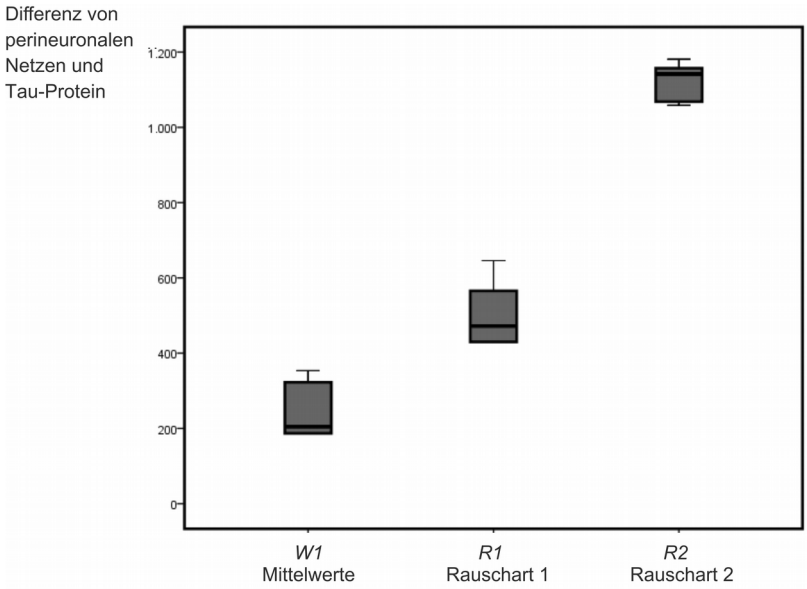

Abbildung 4.17: Boxplot der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein bei den fixierten Tenascin-R-*Knockout*: Die berechneten *W1* (Mittelwerte der Differenz von perineuronalen Netzen und Tau-Protein) unterscheiden sich signifikant von den beiden berechneten Rauscharten *R1* (Rauschart 1) und *R2* (Rauschart 2).

Um die WT und die TnR$^{-/-}$ noch untereinander vergleichen zu können, erfolgten noch weitere Berechnungen, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Die berechneten Mittelwerte *W2* der TnR$^{-/-}$ wurden daher im U-Test nach Mann-Whitney mit den *W2* der WT verglichen (U-Test nach Mann-Whitney, p(*W2*)=0,388). Das ist auch den Tabellen 4.5 und 4.6 zu entnehmen. Die Ergebnisse des U-Test nach Mann-Whitney liegen somit über der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Abbildung 4.19 zeigt einen Boxplot der korrigierten Mittelwerte (*W2*) von WT und TnR$^{-/-}$. Auch dort ist zu sehen, dass die *W2* von WT und TnR$^{-/-}$ ungefähr auf gleicher Höhe liegen. Trotz der Unterschiede zwischen WT und TnR$^{-/-}$ im Liveimaging, unterscheiden sich diese im U-Test nach Mann-Whitney nicht.

Tabelle 4.5: Vergleich der quantitativ berechneten Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen und Tenascin-R-*Knockout*: Mann-Whitney-Test - Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

	Mauslinie	**N**	**Mittlerer Rang**	**Rangsumme**
Mittelwerte	WT	9	7,17	64,50
	TnR$^{-/-}$	6	9,25	55,55
	Gesamt	15		

Tabelle 4.6: Vergleich der quantitativ berechneten Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen und Tenascin-R-*Knockout*: Mann-Whitney-Test - Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

	Mittelwerte
Mann-Whitney-U	19,500
Wilcoxon-W	64,500
Z	-,888
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,375
Exakte Signifikanz [2*(1seitige Sig.)] -nicht für Bindungen korrigiert	,388

Gruppenvariable: Mauslinie

Zusammenfassend lässt sich für die $TnR^{-/-}$ sagen, dass sich Tau-Protein nicht gleichmäßig über die Schnittkultur verteilt und sich somit an den PN anreichert. Damit stützen die Berechnungen im Wilcoxon-Test die Beobachtungen während des *Liveimaging*. Im Vergleich der WT und der $TnR^{-/-}$ im U-Test nach Mann-Whitney unterscheiden sich $TnR^{-/-}$ und WT trotz der Unterschiede im *Liveimaging* nicht.

Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von fixierten organotypischen Schnittkulturen der Wildtypen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC

Die Berechnungen zur quantitativen Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein erfolgte auch bei den WT^{ChABC} wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Ihre Mittelwerte *W1* wurden im Wilcoxon-Test mit *R1* und *R2* verglichen (Wilcoxon-Test, p(*R1*)=0,219, p(*R2*)=0,016). Dies ist den Tabellen 4.7 und 4.8 zu entnehmen. Ein Unterschied zu den WT und $TnR^{-/-}$ zeigt sich bei p(*R1*). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests liegen über der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Da *R1* die gleichmäßige Verteilung von allem sich angelagerten Tau-Protein repräsentiert, ist die Verteilung des Tau-Proteins in WT^{ChABC} als gleichmäßig anzusehen.

Tabelle 4.7: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

		N	**Mittlerer Rang**	**Rangsumme**
Rauschart 1 - Mittelwerte	Negative Ränge	3	2,00	6,00
	Positive Ränge	3	5,00	15,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	6		
Rauschart 2 - Mittelwerte	Negative Ränge	0	,00	,00
	Positive Ränge	6	3,50	21,00
	Bindungen	0		
	Gesamt	6		

Negative Ränge: Rauschart < Mittelwerte
Positive Ränge: Rauschart > Mittelwerte
Bindungen: Rauschart = Mittelwerte

Tabelle 4.8: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Wilcoxon-Test – Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

	Rauschart 1 Mittelwerte	**Rauschart 2 Mittelwerte**
Z (basiert auf negativen Rängen)	-,943	-2,201
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,345	,028
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,438	,031
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,219	,016
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,063	,016

Abbildung 4.18 zeigt einen Boxplot der Mittelwerte *W1* der WT^{ChABC} mit ihren jeweiligen Rauscharten *R1* und *R2*. Nach Behandlung mit Chondroitinase ABC liegen die *W1* nicht unter *R1* und *R2*, sondern auf der gleichen Höhe wie *R1*. Das bedeutet, dass sich zugegebenes Tau-Protein gleichmäßig über den Schnitt verteilt und sich nicht an den PN anreichert.

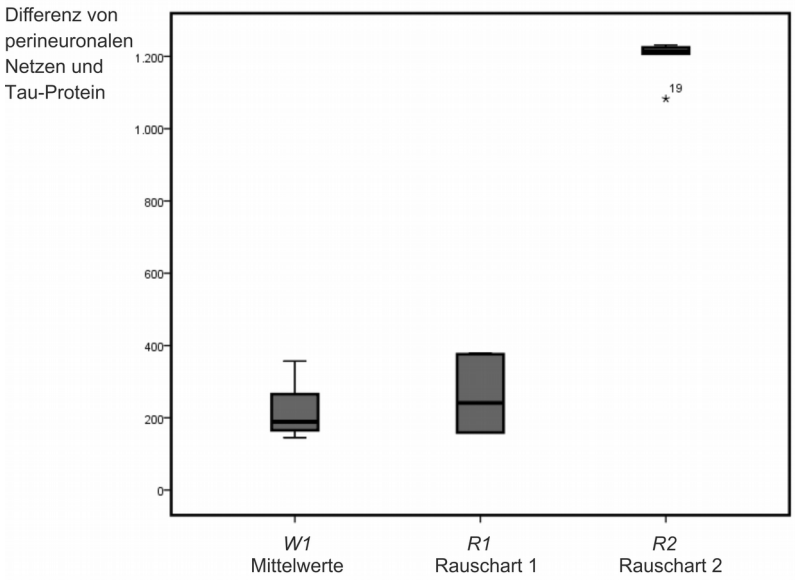

Abbildung 4.18: Boxplot der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Die berechneten *W1* (Mittelwerte der Differenz von perineuronalen Netzen und Tau-Protein) aller fixierten WT^{ChABC} unterscheiden sich signifikant von der berechneten Rauschart 2 (*R2)*. Die berechneten *W1* aller fixierten WT^{ChABC} unterscheiden sich im Unterschied zu den Wildtypen und den Tenascin-R-*Knockout* nicht von der berechneten Rauschart 1 (*R1).*

Auch die WT^{ChABC} wurden im U-Test nach Mann-Whitney mit den WT verglichen. Die Berechnungen der Mittelwerte *W2* sind Kapitel 3.2.3 zu entnehmen. Es zeigen sich folgende Ergebnisse (U-Test nach Mann-Whitney, p(*W2*)=0,003). Gezeigt ist dies in den Tabellen 4.9 und 4.10. Die Ergebnisse des U-Test nach Mann-Whitney liegen somit unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05.

Tabelle 4.9: Vergleich der quantitativ berechneten Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen (WT) und nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Mann-Whitney-Test - Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

	Mauslinie	**N**	**Mittlerer Rang**	**Rangsumme**
Mittelwerte	WT	9	5,33	48,00
	WT^{ChABC}	6	12,00	72,00
	Gesamt	15		

Tabelle 4.10: Vergleich der quantitativ berechneten Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen (WT) und nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Mann-Whitney-Test - Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

	Mittelwerte
Mann-Whitney-U	3,000
Wilcoxon-W	48,000
Z	-2,839
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,005
Exakte Signifikanz [2*(1seitige Sig.)]- nicht für Bindungen korrigiert	,003

Gruppenvariable: Mauslinie

Abbildung 4.19 zeigt einen Boxplot der korrigierten Mittelwerte (*W2*) der unterschiedlichen Mauslinien. Es ist zu sehen, dass die *W2* der Schnittkulturen, die mit Chondroitinase ABC behandelt wurden deutlich höhere Werte aufzeigen. Die WT und WT^{ChABC} unterscheiden sich also bezüglich ihrer Verteilung von zugegebenem Tau-Protein.

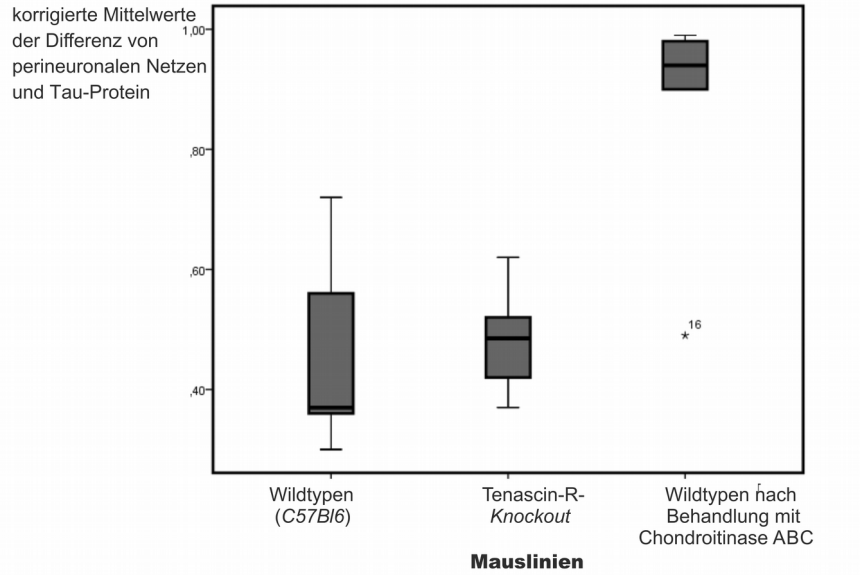

Abbildung 4.19: Boxplot der korrigierten Mittelwerte der Differenz von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein (*W2*) der genutzen Mauslinien und ihrer Konditionen: Verglichen wurden Wildtypen der Mauslinien *C57Bl6* (WT) und deren Tenascin-R-*Knockout* ($TnR^{-/-}$) sowie WT nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}). Die berechneten *W2* der WT und die berechneten W*2* der $TnR^{-/-}$ unterscheiden sich nicht. Die berechneten *W2* aller fixierten WT^{ChABC} unterscheiden sich signifikant von den berechneten W*2* der WT und den berechneten W*2* der $TnR^{-/-}$.

Zusammenfassend zeigen die WT^{ChABC} eine gleichmäßige Verteilung des zugegebenen Tau-Proteins über die Schnittkultur. Damit stützen die Berechnungen im

Wilcoxon-Test die Beobachtungen während des *Liveimaging*. Im Vergleich der WT und WT^{ChABC} im U-Test nach Mann-Whitney unterscheiden sich die WT und die WT^{ChABC} also wie im *Liveimaging* bezüglich ihrer Verteilung von zugegebenem Tau-Protein.

4.3.2 Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen während des *Liveimaging*

Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen der Wildtypen während des *Liveimaging*

Zur Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein während des *Liveimaging* erfolgten die Berechnungen analog zu den Berechnungen, die bei den fixierten Schnittkulturen angewandt wurde, siehe Kapitel 3.2.3. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Darstellung der Signifikanzentwicklung über den Zeitraum des *Liveimaging* (24 h), da markiertes Tau-Protein sich während des *Liveimaging* erst nach und nach in der Schnittkultur verteilte und zu den unter Kapitel 4.3.1. genannten Ergebnissen führte. Dazu wurden zu jeder einzelnen Aufnahme - nach 30 min, 60 min, 2 h, 4 h und 24 h - die Berechnungen analog zu den Berechnungen bei den fixierten Schnittkulturen angewandt. Die genaue Statistik ist dem Anhang zu entnehmen.

Die *W1* der WT wurden nach 30 min im Wilcoxon-Test mit *R1* und *R2* verglichen (Wilcoxon-Test,p(*R1*)=0,326,p(*R2*)=0,010). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests (p(*R2*)) liegen deutlich unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Während des *Liveimaging* ergibt sich bereits nach 30 min ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test zwischen *W1* und *R2*. Die Verteilung von Tau-Protein um PN-tragende Kortexschichten ist schon nach einer Stunde signifikant.

Nach 60 min ergibt sich (Wilcoxon-Test,p(*R1*)=0,367,p(*R2*)=0,002), nach 2 h (Wilcoxon-Test,p(*R1*)=0,037,p(*R2*)=0,002) und nach 4 h (Wilcoxon-Test,p(R1) =0,410,p(R2)=0,002.

Nach 24 h ergibt sich (Wilcoxon-Test,p(*R1*)=0,002,p(*R2*)=0,002). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests (p(*R1)*) liegen deutlich unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von

0,05. Nach 24 h ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test zwischen *W1* und *R1*.

Abbildung 4.20. zeigt die Signifikanzentwicklung als Boxplots der Mittelwerte *W1* der WT mit ihren jeweiligen Rauscharten *R1* und *R2* zu den Zeitpunkten 30 min, 60 min, 2 h, 4 h und 24 h im Vergleich mit den $TnR^{-/-}$. Es ist zu sehen, dass die *W1* der WT schon nach 30 min nicht mehr auf gleicher Höhe mit den *R2* liegen, sondern deutlich darunter. Das bedeutet, dass sich zugegebenes Tau-Protein bei den WT nicht gleichmäßig über den Schnitt verteilt, sondern sich an den PN anreichert. Nach 24 h liegen die *W1* der WT nicht mehr auf gleicher Höhe mit den *R1*, sondern deutlich darunter.

Zusammenfassend verteilt sich Tau-Protein bei den WT nicht gleichmäßig über den Schnitt, sondern reichert sich an den PN an. Das ist im Wilcoxon-Tests (p(*R2*)) schon nach 30 min zu sehen. Nach 24 h ist auch der Wilcoxon-Tests (p(*R1*)) signifikant unterschiedlich.

Quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen der Tenascin-R-*Knockout*-Mäuse während des *Liveimaging*

Ebenso wie bei den WT erfolgte bei den $TnR^{-/-}$ die Auswertung der Aufnahmen während des *Liveimagings* als Darstellung der Signifikanzentwicklung über den Zeitraum von 24 h. Die Berechnungen erfolgten analog zu den Berechnungen, die bei den fixierten Schnittkulturen angewandt wurde, siehe Kapitel 3.2.3. Die Statistik ist dem Anhang zu entnehmen.

Die *W1* der $TnR^{-/-}$ wurden nach 30 min im Wilcoxon-Test mit *R1* und *R2* verglichen (Wilcoxon-Test,p(*R1*)=0,219,p(*R2*)=0,016). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests (p(*R2)*) liegen deutlich unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Während des *Liveimaging* ergibt sich nach 30 min ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test zwischen *W1* und *R2*. Die Verteilung von Tau-Protein um PN-tragende Kortexschichten ist schon nach 30 min signifikant.

Nach 60 min ergibt sich (Wilcoxon-Test,p(*R1*)=0,422,p(*R2*)=0,016), nach 2 h (Wilcoxon-Test,p(*R1*)=0,500,p(*R2*)=0,016) und nach 4 h (Wilcoxon-Test,p(*R1*) =0,219,p(*R2*)=0,016).

Nach 24 h ergibt sich (Wilcoxon-Test,p(*R1*)=0,016,p(*R2*)=0,016). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests (p(*R1)*) liegen deutlich unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von

0,05. Nach 24 h ergibt sich auch ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test zwischen *W1* und *R1*.

Abbildung 4.20. zeigt die Signifikanzentwicklung als Boxplots der Mittelwerte *W1* der $TnR^{-/-}$ mit ihren jeweiligen Rauscharten *R1* und *R2* zu den Zeitpunkten 30 min, 60 min, 2 h, 4 h und 24 h im Vergleich mit den WT. Dabei ist zu erkennen, dass die *W1* der $TnR^{-/-}$ wie bei den WT schon nach 30 min nicht mehr auf gleicher Höhe mit *R2* liegen, sondern deutlich darunter. Das bedeutet, dass sich zugegebenes Tau-Protein bei den $TnR^{-/-}$ nicht gleichmäßig über den Schnitt verteilt, sondern sich an den PN anreichert. Nach 24 h liegen die *W1* der $TnR^{-/-}$ wie bei den WT nicht mehr auf gleicher Höhe mit den *R1*, sondern deutlich darunter.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Tau-Protein bei den $TnR^{-/-}$ nicht gleichmäßig über den Schnitt verteilt, sondern sich an den PN anreichert. Das ist im Wilcoxon-Tests (p(*R2*)) wie bei den WT schon nach 30 min zu sehen. Nach 24 h ist auch der Wilcoxon-Tests (p(*R1*)) signifikant unterschiedlich. Damit stützen die Berechnungen im Wilcoxon-Test die Beobachtungen während des *Liveimaging* nicht. Während des *Liveimaging* hatte sich das Tau-Protein bei den WT erst nach 60min diffus innerhalb der PN-reichen Kortexschichten verteilt, bei den $TnR^{-/-}$ bereits nach 30 min.

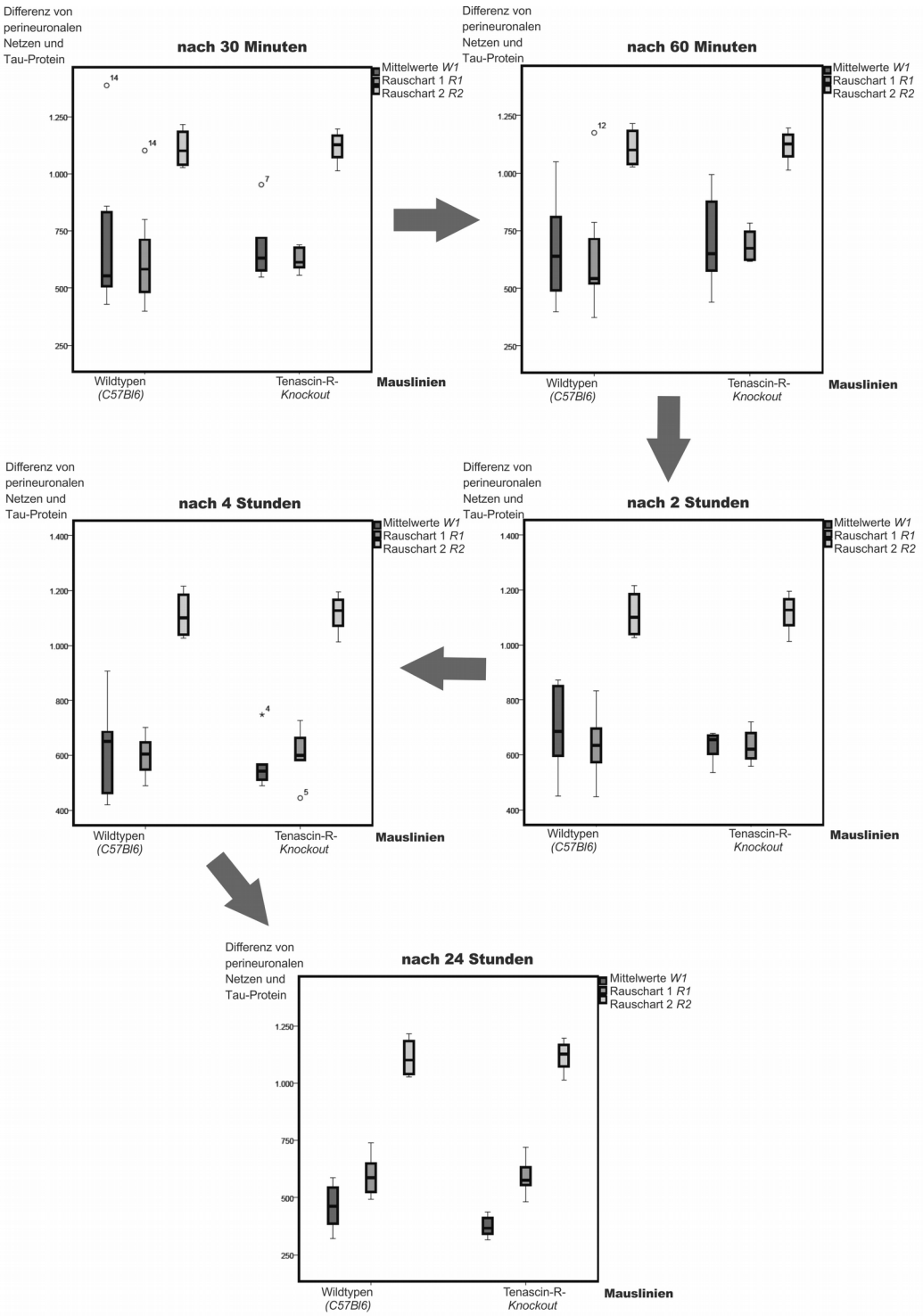

Abbildung 4.20: Darstellung der Signifikanzentwicklung in Boxplots der berechneten *W1* (Mittelwerte), *R1* (Rauschart 1) und *R2* (Rauschart 2) zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein während des *Liveimaging* bei den Wildtypen (WT) und den Tenascin-R-*Knockout* ($TnR^{-/-}$) nach 30 min, 60 min, 2 h, 4 h und 24 h: Die *W1* wurden mit ihren *R1* und *R2* zum jeweiligen Zeitpunkt verglichen. Die *W1* und *R2* sind bereits nach 30 min signifikant unterschiedlich. Die *W1* und *R1* sind nach 24h signifikant unterschiedlich.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis einer Protektion perineuronaler Netze gegenüber der Einlagerung von Tau-Protein. Des Weiteren sollte die Verteilung des Tau-Proteins sowie verschiedene PN-Typen in den genutzten Mauslinien gezeigt werden.

Mit Methodik 1, der Markierung von Gefrierschnitten mittels Immunhistochemie, sollte die Tau-Protein-Verteilung sowie verschiedene Typen von PN im adulten Mausgehirn von WT, $TnR^{-/-}$ und WT^{ChABC} dargestellt werden. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Die Gefrierschnitte der WT zeigen überwiegend gitterartige PN im Neokortex und Hippocampus. Diese sind besonders gut konturiert und zeigen einen dünnen perisomatischen Kranz.
- Die PN der $TnR^{-/-}$ zeigen sich eher diffus mit dickerem perisomatischem Kranz. Ihre Struktur ist weniger deutlich exprimiert und sie erscheinen dadurch granulärer, verglichen mit den WT. Die Markierung mit *WFA* ist schwächer ausgeprägt.
- Durch die Abspaltung der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine vom PN durch das Enzym Chondroitinase ABC kommt es zum Verlust der Darstellbarkeit mit *WFA*.
- In den verwendeten Mauslinien sowie nach Behandlung mit Chondroitinase ABC ist Tau-Protein ubiquitär in allen Zellen und Axonen vorhanden.

Mit Methodik 2, der Herstellung organotypischer Schnittkulturen aus Gehirnen von adulten Mäusen und der Zugabe von aggregiertem Tau-Protein zu verschiedenen Zeitpunkten, sollte ein möglicher Einfluss der PN auf die Verbreitung des Tau-Proteins sowie eine potentielle Schutzfunktion der PN gegenüber Tau-Protein-Einlagerung untersucht werden. Es wurden Zeitreihen angelegt, die nach Zugabe von Tau-Protein die Ausbreitung des Tau-Proteins innerhalb des Gewebes zeigen. Da das markierte Tau-Protein bereits mit Indocarbocyanin 3 (*Cy3*) gekoppelt (*Arraylt*) war, konnte die Diffusion und Anlagerung in den Schnittkulturen sofort fluoreszenzmikroskopisch (Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) nachvollzogen werden (*Liveimaging)*. Die Versuche wurden durch immunhistochemische Markierung der Schnitte mit *WFA* (Lektin *Wisteria floribunda*, Biotin markiert, Sigma, USA), *AB1031* (Anti-Aggrecan *AB1031*,

1:200, Chemicon, Limburg, Deutschland), *NeuN* (Maus-Neuronales Kernprotein, Chemicon international, USA), *PGP9.5* (Anti-ProteinGene Product 9.5, Chemicon international, USA) und verschiedenen Tau-Protein-Antikörpern ausgewertet. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Bei den WT breitete sich Tau-Protein nach Zugabe ungehindert über die Schnittkultur aus. In PN-reichen Kortexschichten reicherte es sich diffus um PN-tragenden Neurone herum an. Die PN-tragenden Neurone waren nahezu frei von intrazellulären Tau-Protein-Einlagerungen und verzögerten die Ausbreitung von Tau-Protein bis zu 2 h. In PN-freie Neuronen hingegen lagerte sich Tau-Protein ein.

- Bei den $TnR^{-/-}$ zeigte die Zugabe von Tau-Protein ein ähnliches Bild, jedoch konnte eine wesentlich schnellere Ausbreitung des Tau-Proteins beobachtet werden. Außerdem reicherte sich Tau-Protein bei den $TnR^{-/-}$ nicht verstärkt an den PN an.

- Um die Funktion der GAG-Seitenketten bei Zugabe von Tau-Protein zu untersuchen, wurden diese durch die Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase ABC vom PN abgespalten. Die Ausbreitung des zugegebenen Tau-Proteins erfolgte wesentlich langsamer. Es zeigten sich keine Anreicherungen an PN-tragende Neurone. Die Schnittkulturen enthielten viel weniger Tau-Protein verglichen mit den WT.

- Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurde die Kolokalisationen von PN und zugegebenem Tau-Protein verglichen. Die genauen Berechnungen sind Kapitel 3.2.3 zu entnehmen. Die Berechnungen mit dem Wilcoxon-Test und U-Test nach Mann-Whitney bestätigten für die fixierten Schnittkulturen die Beobachtungen während des *Liveimaging*. Tau-Protein verteilt sich bei den WT und $TnR^{-/-}$ nicht gleichmäßig über den Schnitt, sondern reichert sich an den PN an. Die WT^{ChABC} zeigten eine gleichmäßige Verteilung des zugegebenen Tau-Proteins über die Schnittkultur. WT, $TnR^{-/-}$ und WT^{ChABC} unterscheiden sich bezüglich ihrer Verteilung von zugegebenem Tau-Protein.

- Die Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein während des *Liveimaging* erfolgte als Darstellung der Signifikanzentwicklung über den Zeitraum des *Liveimaging*, d.h. 24 Stunden. Die Berechnungen im Wilcoxon-Test stützten die Beobachtungen während des *Liveimaging* nicht, da im Wilcoxon-Test (p(*R2)) W1* und *R2* bereits nach 30 min signifikant unterschiedlich waren. Die Verteilung von Tau-Protein um PN-tragende

Kortexschichten ist schon nach 30 min signifikant. Während des *Liveimaging* hatte sich das Tau-Protein bei den WT erst nach 60 min diffus innerhalb der PN-reichen Kortexschichten verteilt.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Diskussion der Verwendung organotypischer Schnittkulturen

Organotypische Schnittkulturen sind ein etabliertes Modell (**Brückner und Grosche** 2001; **Sundstrom et al.** 2005; **Morawski et al.** 2014) zur Kultivierung von Neuronen und PN. Neurone und PN haben bei dieser Methode weit größere Ähnlichkeit in Struktur und Funktion zu der *in vivo*-Situation, als in primären Einzelzellkulturen. Durch die Auswahl einer Schnittdicke von 200 µm bleiben die strukturelle Organisation innerhalb des Gewebes und die synaptische Verknüpfung der einzelnen Neurone zum Teil erhalten.

Andererseits entstehen Anschnittflächen bei der Herstellung organotypischer Schnittkulturen, die auch bei idealen Versuchsbedingungen zu einer Initialverletzung des Gewebes führen. Durch die Verletzung kommt es zum Absterben der an den Anschnittflächen liegenden Zellen. Bei ihrem Untergang setzen diese Zellen exzitotoxische Substanzen wie Glutamat und Calcium frei. Dadurch ist eine sekundäre Schädigung von intakten Zellen möglich. Die exzitotoxischen Substanzen verteilen sich im gesamten Schnitt, eine Kultivierung über längere Zeiträume ist daher schwierig (**Choi et al.** 1987; **Kostandy** 2012; **Siesjö et al.** 1989). Außerdem werden beim Schneiden der Kulturen teilweise lebensnotwendige Axone und Dendriten unterbrochen. An den Anschnittflächen kommt es zu einer Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten (**Suttkus** 2008), welche sich in der gesamten Schnittkultur ausbreiten und so die Formierung von PN beeinflussen können.

5.1.2 Diskussion der Effekte der Zugabe von exogenem Tau-Protein zu organotypischen Schnittkulturen

Um die Ausbreitung des Tau-Proteins zu untersuchen, wurde den Schnittkulturen markiertes, exogenes Tau-Protein zugesetzt. Da bei der Kultivierung von organotypischen Schnittkulturen wie oben beschrieben ähnliche Bedingungen wie im intakten Gehirn gegeben sind und die strukturelle Organisation innerhalb des Gewebes weitestgehend erhalten bleibt, ist auf Tau-Protein-Zugabe eine ähnliche Reaktion wie im intakten Gehirn zu erwarten. Ein Vergleich des zugegebenen Tau-Proteins mit der Alzheimerpathologie ist allerdings nur bedingt möglich, da es sich bei der AD um endogenes, intrazelluläres Tau-Protein handelt.

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, reichert sich Tau-Protein überwiegend um PN-tragende Neurone herum an. Eine quantitative Auswertung, wie viel Tau-Protein sich pro Neuron anlagert, war dadurch und durch die Schnittdicke von 200 µm deutlich erschwert. Daher musste eine Auswertung bezogen auf Bildausschnitte von 50 x 50 Pixeln gewählt werden, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

Nicht bei allen Schnittkulturen erfolgte ein *Liveimaging. Z*u einigen Schnittkulturen wurde Tau-Protein für die quantitative Auswertung unmarkiert zugegeben und nachträglich im fixierten Zustand immunhistochemisch markiert. Allerdings ist endogenes Tau-Protein wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben in allen Zellen und Axonen ubiquitär vorhanden. Das heißt, dass bei diesem Vorgehen auch endogenes, beim Tier bereits vorhandenes Tau-Protein immunhistochemisch markiert wurde. Dieses konnte im Nachhinein nicht mehr von exogen appliziertem Tau-Protein unterschieden werden. Da endogenes Tau-Protein aber ubiquitär vorhanden ist und seine Verteilung über den Schnitt daher als gleichmäßig anzusehen ist, ist diese Verfälschung der Ergebnisse potentiell vernachlässigbar.

5.1.3 Diskussion der Markierung mit Immunhistochemie

Die Markierung der PN mit *WFA* (Lektin *Wisteria floribunda*, Biotin markiert, Sigma, USA) ist eine etablierte (**Brückner et al.** 1996; **Brückner und Grosche** 2001; **Brückner et al.** 2004) Methode zur Darstellung der PN. *WFA* bindet an die endständige GalNAc-Komponente der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine. Die Markierung mit *WFA* ist schon vital möglich. Mithilfe der Vitalfärbung mit *WFA* gelingt die Darstellung von PN an den vitalen und unfixierten Kulturen. Schon am vitalen Gewebe sind die typische Verteilung und die Zelltyp-abhängige Ausbildung

der PN zu erkennen (**Brückner und Grosche** 2001). Wie oben beschrieben erfolgte nicht bei allen Schnittkulturen ein *Liveimaging.* Zu einigen Schnittkulturen wurde Tau-Protein unmarkiert zugegeben und Tau-Protein und PN nachträglich im fixierten Zustand immunhistochemisch markiert. Damit konnte in der quantitativen Auswertung ausgeschlossen werden, dass es zu Wechselwirkungen zwischen dem Tau-Protein und der Vitalfärbung mit *WFA* kam und deshalb die PN von Tau-Protein umlagert worden.

Nach Fixation diente die Markierung der neuronenspezifischen Enolase mit *PGP9.5* der Darstellung der Neurone. *Hoechst 33342* wurde zur Markierung der Zellkerne genutzt. Es dringt durch Zell- und Kernmembranen, bindet an DNA und markiert diese.

5.1.4 Diskussion der quantitativen Auswertung der Verteilung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen durch Umwandlung der Übersichtsbilder in Tabellen

Die quantitative Auswertung der Schnittkulturen erfolgte wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Dabei ist ein immer gleiches Vorgehen nötig, weshalb Veränderungen an den Bildern so gewählt wurden, dass sie weitestgehend durch die Programme automatisch mit gleichen Einstellungen erfolgten und nicht individuell eingestellt werden mussten. Die Auswertung in 50 x 50 Pixel-Bildausschnitten musste gewählt werden, da ein Auszählen pro Neuron durch die diffuse Ablagerung von Tau-Protein und die Dicke der Schnitte von organotypischen Schnittkulturen nur schwer möglich gewesen wäre.

Die weiteren Berechnungen im SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19) ergaben Werte, die mittels berechneter Rauschwerte in Bezug auf ihre Höhe verglichen wurden. Um die berechneten Werte weiterhin miteinander vergleichen zu können, mussten sie in Bezug auf Schnitt-freie Flächen und unterschiedlich hohe Pixelwerte von PN und Tau-Protein korrigiert werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der Ergebnisse der Wildtypen

Diskussion der Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Wildtypen

Zur Illustration von PN-Typen und Tau-Protein-Verteilung in Gehirnen von WT wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese anschließend mittels Immunhistochemie markiert und ausgewertet. Die Methodik ist Kapitel 3.2.1 zu entnehmen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.1.1 beschrieben. Die Gefrierschnitte der WT zeigen überwiegend gitterartige PN im Neokortex und Hippocampus. Sie sind besonders gut konturiert und zeigen einen dünnen perisomatischen Kranz. Durch die gute Konturierung der Dendriten erscheinen die PN der WT weit verzweigt. Dies wurde bereits in sehr vielen Säugetierspezies gezeigt, zum Beispiel durch Morawski (**Morawski et al.** 2010b) am kleinen Igeltenrek und durch Brückner und Grosche (**Brückner und Grosche** 2001) an der Ratte. Diesen weit verzweigten PN ist es möglich, in einer größeren Umgebung z.B. Kationen zu puffern und radikal-bildende Ionen zu binden. Ein derartiger Schutz gegenüber radikal-bildenden Ionen und somit gegenüber oxidativem Stress wurde durch Morawski (**Morawski et al.** 2004) und Suttkus (**Suttkus** 2013; **Suttkus et al.** 2014) gezeigt.

Diskussion der Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Wildtyp-Mäusen

Für die Untersuchung der Ausbreitung eines zugegebenen Tau-Proteins sollten Zeitreihen angelegt werden. Daher wurde den Schnittkulturen markiertes Tau-Protein zugesetzt. Die Methodik dazu ist Kapitel 3.2.2 zu entnehmen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Tau-Protein breitete sich nach Zugabe ungehindert über die Schnittkultur aus. Traf es auf PN-reiche Kortexschichten, reicherte es sich innerhalb von 1 h diffus um PN-tragende Neurone an. Die PN-tragenden Neurone waren frei von intrazellulären Tau-Protein-Einlagerungen, bildeten eine Barriere und verzögerten die Ausbreitung von Tau-Protein bis zu 2 h. In PN-freie Neuronen hingegen lagerte sich Tau-Protein ein.

Auch durch Suttkus konnte nachgewiesen werden, dass die PN die Aufnahme und Verteilung von zugegebenem Tau-Protein beschränken (**Suttkus et al.** 2016). Die Studie zeigte ebenso, dass Tau-Protein die PN-reichen Kortexschichten bereits nach

1 h erreicht, die PN-tragenden Neurone waren überwiegend frei von zugegebenem Tau-Protein.

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, sind die PN aufgrund ihres Aufbaus aus Hyaluronsäure und den Chondroitinsulfat-Seitenketten negativ geladen und besitzen einen polyanionischen Charakter (**Brückner et al.** 1993; **Morawski et al.** 2004; **Morawski et al.** 2015). Daher wird das positiv geladene Tau-Protein möglicherweise von den PN-haltigen Abschnitten der Schnittkulturen aufgrund deren polyanionischer Ladung gebunden und umlagert dementsprechend PN-tragende Neurone.

Durch die Bindung des positiv geladenen Tau-Proteins an die negativ geladenen PN ist scheinbar ein Eindringen sowie die intrazelluläre Ablagerung des Tau-Proteins in den Neuronen massiv erschwert. Aufgrund dieser Wechselwirkung wird vermutlich die weitere Ausbreitung des Tau-Protein bis zu 2 h verzögert. Das übrige Tau-Protein verteilt sich danach in der Schnittkultur und kann sich in PN-freien Neuronen einlagern. Da Tau-Protein-Einlagerungen überwiegend in PN-freien Neuronen beobachtet wurden, ist eine Schutzfunktion der PN-tragenden Neuronen in Bezug auf die Zugabe von Tau-Protein sehr wahrscheinlich.

Auch in Bezug auf andere schädigende Stoffe wie z.B. Kainat und Eisen wurde eine Schutzwirkung der PN nachgewiesen (**Suttkus** 2013). Vor oxidativem Stress sind PN-tragende Neuronen besser geschützt als PN-freie (**Morawski et al.** 2004). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD (**Brückner et al.** 1999; **Miyata et al.** 2007; **Morawski et al.** 2010a) und potentiell bei Morbus Parkinson (**Brückner et al.** 2008) sind PN-tragende Neurone weniger von Neurodegeneration betroffen. Kortikale PN-tragende Neurone bleiben größtenteils von Ablagerungen durch NFT verschont. Das deutet auf eine relative Resistenz der motorischen und primär sensorischen Areale mit einer großen Anzahl PN-tragender Neurone gegenüber NFT hin. Zwischen Anzahl von PN und amyloiden Plaques besteht keine Korrelation (**Brückner et al.** 1999; **Morawski et al.** 2010c).

Diskussion der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen der Wildtypen

Zur Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein erfolgten Berechnungen der Kolokalisation der beiden Markierungen für PN und Tau-Protein in einem Bildausschnitt, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.3.1 und Kapitel 4.3.2 dargestellt. Die *W1* der WT wurden im Wilcoxon-Test mit *R1* und *R2* verglichen (Wilcoxontest, p(*R1*)=0,002, p(*R2*)=0,002). Die Ergebnisse

des Wilcoxon-Tests liegen somit deutlich unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Da *R1* die gleichmäßige Verteilung von allem sich angelagerten Tau-Protein repräsentiert, lagert sich das zugegebene Tau-Protein folglich an die PN an. Während des *Liveimaging* ergibt sich nach 30 min ein signifikanter Unterschied im Wilcoxontest zwischen *W1* und *R2* (Wilcoxontest, p=0,010). Die Verteilung von Tau-Protein um PN-tragende Kortexschichten ist schon nach 30 min signifikant.

Die Ergebnisse im Wilcoxontest bestätigen die Beobachtungen während des *Liveimaging* für die fixierten Schnittkulturen. Tau-Protein verteilt sich nicht gleichmäßig über die Schnittkultur und lagert sich in PN-reichen Regionen an. Das geschieht höchstwahrscheinlich durch die Bindung des positiv geladenen Tau-Proteins an die PN aufgrund deren negativ geladenen Seitenketten. Die Berechnungen im Wilcoxon-Test während des *Liveimaging* stützen die Beobachtungen während des *Liveimaging* nicht, da im Wilcoxon-Test (p(*R2*)) *W1* und *R2* bereits nach 30 min signifikant unterschiedlich waren. Die Verteilung von Tau-Protein um PN-tragende Kortexschichten ist schon nach 30 min signifikant. Während des Liveimaging hatte sich Tau-Protein bei den WT erst nach 60 min diffus innerhalb der PN-reichen Kortexschichten verteilt. Der Unterschied zwischen der Berechnung und den Beobachtungen lässt sich durch die Auswertungsstrategie in Bezug auf Bildausschnitte anstatt auf einzelne Neurone erklären. Ein Auszählen pro Neuron könnte möglicherweise zu abweichenden Ergebnissen führen.

5.2.2 Diskussion der Ergebnisse der Tenascin-R-*Knockout*-Mäuse

Diskussion der Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen

Zur Illustration von PN-Typen und Tau-Verteilung in $TnR^{-/-}$ wurden Gefrierschnitte angefertigt und diese mittels Immunhistochemie markiert und ausgewertet. Die Methodik ist Kapitel 3.2.1 zu entnehmen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.1.2 beschrieben. Die PN von $TnR^{-/-}$ lassen sich noch mit *WFA* markieren, sind aber wesentlich schwächer detektierbar, verglichen mit den WT. Gefrierschnitte von $TnR^{-/-}$ zeigen überwiegend diffuse PN im Neokortex und Hippocampus. Diese haben unterschiedliche Intensitäten und zeigen einen dickeren perisomatischen Kranz. Ihre Struktur ist weniger deutlich exprimiert und sie erscheinen dadurch granulärer, verglichen mit den WT. Damit werden die Arbeiten von Brückner, Carulli und Weber bestätigt (**Brückner et al.** 2000; **Carulli et al.** 2010; **Weber et al.** 1999).

Die histologischen Veränderungen der TnR$^{-/-}$ ergeben sich aus dem *Knockout* des Tenascin-R. Tenascin-R bindet im Gehirn der WT über eine Domäne am C-Terminus der Proteoglykane, bildet mit diesen einen Komplex (**Brückner et al.** 2000) und kann somit als Strukturgeber für die PN fungieren (**Sonntag et al.** 2015). Die histologischen Veränderungen der TnR$^{-/-}$ gehen auch mit einer Reduktion der immunhistochemischen Markierbarkeit anderer Matrixkomponenten wie Hyaluronsäure, Neurocan, Brevican und Phosphacan einher (**Brückner et al.** 2000). Die strukturellen und molekularen Veränderungen der EZM bei TnR$^{-/-}$ verändern möglicherweise die Physiologie der Neuronen. Hinweisend dafür ist eine veränderte Synapsenstabilität und eine ineffizientere Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase. Für die Ionenhomöostase zeigt sich Tenascin-R als essentieller Netzbestandteil (**Suttkus et al.** 2014).

Zusammenfassend zeigen die veränderten PN der TnR$^{-/-}$ eine ineffizienteren Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase, die auch radikalbildende Ionen betreffen kann. Dadurch ist eine Abschwächung der neuroprotektiven Funktion möglich.

Diskussion der Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen

Um die Ausbreitung von Tau-Protein näher zu untersuchen, wurde den TnR$^{-/-}$ markiertes Tau-Protein zugesetzt. Die Methodik ist Kapitel 3.2.2 zu entnehmen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.2.2 beschrieben. Nach Tau-Protein-Zugabe zeigt sich für die TnR$^{-/-}$ eine wesentlich schnellere Ausbreitung des Tau-Proteins. Schon nach 30 min hat sich Tau-Protein wolkig innerhalb der PN-tragenden Kortexschichten verteilt. Die TnR$^{-/-}$ zeigen wie die WT eine potentiell durch die PN verzögerte Ausbreitung von Tau-Protein in tiefere Kortexschichten. Außerdem umlagert Tau-Protein bei den TnR$^{-/-}$ die PN nicht so stark wie bei den WT.

Ähnliche Ergebnisse konnte Suttkus (**Suttkus et al.** 2016) in aktuellen, weiteren Studien erzielen. Die TnR$^{-/-}$-Schnittkulturen wurden ebenfalls schneller von Tau-Protein durchdrungen als die Schnittkulturen von WT. Auch umlagerte Tau-Protein die PN nicht so stark wie bei den WT. In der Studie wurde nachgewiesen, dass die TnR$^{-/-}$ die wenigsten PN-tragenden Neurone im *barrel* Kortex haben und dass die TnR$^{-/-}$ wahrscheinlich daher die höchste Aufnahme von Tau-Protein in kortikale Neurone verzeichnen. Außerdem hatten alle PN-tragenden Neurone der *Knockout*-Linien – untersucht wurden Aggrecan-*Knockout*-Schnittkulturen, TnR$^{-/-}$-Schnittkulturen und HAPLN1-*Knockout*-Schnittkulturen – mehr Tau-Protein

aufgenommen als die PN-tragenden Neurone der WT. Trotzdem zeigten alle diese *Knockout*-Linien signifikant weniger Tau-Protein-Aufname in PN-tragende Neurone als in PN-freie Neurone (**Suttkus et al.** 2016).

Der Grund für die schnellere Ausbreitung und die schwächere Umlagerung der PN könnte die veränderte Struktur der PN (**Brückner et al.** 2000) und die deutlich ineffizientere Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase (**Suttkus et al.** 2014) sein. Daher kann sich Tau-Protein potentiell schneller in den PN-tragenden Neuronenschichten anreichern als bei den WT und wird nicht so stark von PN gebunden.

Diskussion der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen der Tenascin-R-*Knockout*-Mäuse

Zur Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein erfolgten Berechnungen der Kolokalisation der beiden Markierungen für PN und Tau-Protein wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben. Die *W1* der $TnR^{-/-}$ wurden im Wilcoxon-Test mit *R1* und *R2* verglichen (Wilcoxontest,p(*R1*)=0,016,p(*R2*)=0,016). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests liegen somit unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Das zugegebene Tau-Protein reichert sich folglich an die PN der $TnR^{-/-}$ an, wie auch während des *Liveimaging* zu sehen ist. Nach 30 min ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Wilcoxontest zwischen *W1* von *R2* (Wilcoxontest, p=0,016). Die Verteilung von Tau-Protein um PN-tragende Kortexschichten ist schon nach 30 min signifikant.

Die *W2* der WT wurden anschließend im U-Test nach Mann-Whitney mit den *W2* der $TnR^{-/-}$ verglichen (U-Test nach Mann-Whitney, p(*W2*)=0,388). Die Ergebnisse des U-Test nach Mann-Whitney liegen über der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Trotz der Unterschiede zwischen WT und $TnR^{-/-}$ im *Liveimaging*, unterscheiden sich diese im U-Test nach Mann-Whitney nicht.

Wahrscheinlich ist Tenascin-R nicht alleine der entscheidende Netzbestandteil für die neuroprotektive Funktion der PN bezogen auf eine Zugabe von exogenem Tau-Protein.

Als entscheidende Netzbestandteile für die neuroprotektive Funktion kommen daher weiterhin die CSPG, das Link-Protein und Hyaluronsäure in Betracht. In dieser Arbeit wurde weiterhin die Rolle der CSPG für die Neuroprotektion untersucht, indem

die negativ geladenen GAG-Seitenketten durch Zugabe des Enzyms Chondroitinase ABC entfernt wurden.

5.2.3 Diskussion der Ergebnisse von Wildtypen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC

Diskussion der Darstellung der Typen perineuronaler Netze und der Verteilung von Tau-Protein in Gefrierschnitten von Wildtypen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC

Um die Funktion der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine zu untersuchen, erfolgte deren Abspaltung vom PN mit dem Enzym Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich, USA). Somit wurde zu den WT und $TnR^{-/-}$ noch eine weitere Kondition, die WT^{ChABC} untersucht. Durch die Abspaltung der GAG-Seitenketten kommt es zum Verlust der Darstellbarkeit mit *WFA*, da *WFA* spezifische Motive auf den GAG-Seitenketten bindet (**Härtig et al.** 1999). Die Methodik ist Kapitel 3.2.1 zu entnehmen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.1.3 dargestellt.

Vor allem die abgespaltenen Seitenketten sind neben Hyaluronsäure, wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, negativ geladen. Daher ist anzunehmen, dass es nach Abspaltung der GAG-Seitenketten nur noch eingeschränkt möglich ist, Kationen zu puffern und radikalbildende Ionen zu binden. Eine Abschwächung der neuroprotektiven Funktion derartig veränderter PN ist daher wahrscheinlich.

Diskussion der Darstellung der Ausbreitung von zugegebenem Tau-Protein in organotypischen Schnittkulturen von Wildtyp-Mäusen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC

Nach Abspaltung der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine vom PN durch 20-stündige Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase ABC aus *Proteus vulgaris* (Sigma-Aldrich, USA) und anschließender 24-stündiger Zugabe von markiertem Tau-Protein zeigen die Schnittkulturen sehr wenig Anreicherung von Tau-Protein. Die Methodik ist Kapitel 3.2.2 zu entnehmen. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.2.3 dargestellt. Die Ausbreitung des positiv geladenen Tau-Proteins erfolgt wahrscheinlich deshalb langsamer, weil die Anziehung durch die negative Ladung der Chondroitinsulfat-Seitenketten wegfällt (**Giamanco et al.** 2010). Erst nach 4h zeigen sich erste Anreicherungen in den Schnittkulturen. Das ist ein wesentlicher Unterschied zu den Schnittkulturen der WT ohne Behandlung mit Chondroitinase ABC und zu den Schnittkulturen der $TnR^{-/-}$, bei sich denen Tau-Protein an den PN-tragenden Neuronen anreichert. Bei den WT^{ChABC} reichert sich kein Tau-Protein an

spezifischen Stellen an. Die fixierten Schnittkulturen enthalten viel weniger Tau-Protein, da dieses vermutlich nicht gebunden wird und bei den anschließenden Spülungen ausgewaschen wurde.

Diskussion der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen der Wildtypen nach Behandlung mit Chondroitinase ABC

Zur Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein erfolgten Berechnungen der Kolokalisation der beiden Markierungen für PN und Tau-Protein wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Die *W1* der WT^{ChABC} wurden im Wilcoxon-Test mit *R1* und *R2* verglichen (Wilcoxontest,p(*R1*)=0,219,p(*R2*)=0,016). Der Unterschied zu den WT und den $TnR^{-/-}$ zeigt sich bei p(*R1*). Die Ergebnisse des Wilcoxon-Tests liegen über der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Da *R1* die gleichmäßige Verteilung von allem sich angelagerten Tau-Protein repräsentiert, ist die Verteilung des Tau-Proteins in den Schnittkulturen der WT^{ChABC} als gleichmäßig anzusehen. Das zugegebene Tau-Protein reichert sich folglich nicht an den PN an, bei denen die GAG-Seitenketten abgespalten worden sind.

Die *W2* der WT wurden anschließend im U-Test nach Mann-Whitney mit den *W2* der WT^{ChABC} verglichen (U-Test nach Mann-Whitney,p(*W2*)=0,003). Die Ergebnisse des U-Test nach Mann-Whitney liegen unter der Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Die Verteilung des Tau-Proteins bei den WT und WT^{ChABC} unterscheidet sich somit deutlich. Dies lässt einen Verlust der neuroprotektiven Funktion der PN nach Abspaltung der negativ geladenen GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine vermuten.

In weiteren Studien wurde vor allem das durch die Behandlung mit Chondroitinase ABC betroffene Aggrecan als eine der Hauptkomponenten der EZM und als die Schlüsselkomponente der PN identifiziert (**Giamanco und Matthews** 2012; **Matthews et al.** 2002; **Suttkus et al.** 2014). Aggrecan ist das größte Mitglied der Lekticanfamile und trägt bis zu 100 negativ geladene CS-GAG-Seitenketten (**Morawski et al.** 2012; **Yamaguchi** 2000). Es interagiert mit Hyaluronsäure und charakterisiert mit dieser zusammen den polyanionischen Charakter der PN.

Heterozygot defiziente Mäuse für Aggrecan zeigen PN mit teilweisen Verlusten der neuroprotektiven Eigenschaften, wenn deren Menge an Aggrecan unter ein kritisches Level reduziert ist (**Suttkus et al.** 2014). Allerdings gelingt dieser Nachweis nur,

wenn Aggrecan mit dem Antikörper *HAG7D4* markierbar ist, welches ein Epitop am Kernprotein des Aggrecan markiert und somit unabhängig von den Seitenketten ist. Mit *WFA* markierbare PN dieser Mäuse sind signifikant weniger von Eisen-induzierter Degeneration betroffen. Durch eine Behandlung mit Chondroitinase ABC kommt es zur Abspaltung der GAG-Seitenketten und damit zum Verlust der Darstellbarkeit mit *WFA*, da *WFA* spezifische Motive auf den GAG-Seitenketten bindet (**Härtig et al.** 1999). Da die abgespaltenen Seitenketten ein wesentlicher Faktor für die neuroprotektive Funktion der PN sein könnten, könnte die *WFA*-Reaktivität als Indikator für die Anwesenheit von stark geladenen anionischen Bindungsstellen stehen und damit für die neuroprotektive Potenz der PN verantwortlich sein (**Suttkus et al.** 2014). Das ist nach Behandlung mit Chondroitinase ABC nicht mehr der Fall. Andererseits zeigte sich nach Schädigung auch eine Hochregulation von Aggrecan, was ein Anhalt für die neuroprotektive Funktion von Aggrecan selbst sein könnte (**Suttkus et al.** 2014).

Eine vermehrte Bildung von Aggrecan wurde auch im Hippocampus von AD-Patienten und im Mausmodell *APPswe/PS1dE9* nachgewiesen (**Lendvai et al.** 2013) und könnte ebenfalls auf diesen neuroprotektiven Mechanismen beruhen. Eine Hochregulation wurde ebenfalls für Versican und Neurocan in der glialen Narbe nach Schädel-Hirn-Traumata nachgewiesen. Hier konnten allerdings keine neuroprotektiven Mechanismen nachgewiesen werden. Versican und Neurocan hemmen das Auswachsen von Neuronen sowie deren Regeneration (**Bekku et al.** 2012).

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass Aggrecan mit seinen negativ geladenen Seitenketten als potentestes CSPG im Kontext schützender Prozesse fungieren könnte. Eine Abspaltung der Seitenketten durch Chondroitinase ABC geht daher mit einem Verlust der neuroprotektiven Funktionen der PN einher.

5.3 Ausblick

Die erzielten Ergebnisse weisen auf eine neuroprotektive Funktion der PN gegenüber zugegebenem Tau-Protein hin. Nach Verlust des Tenascin-R in *Knockout*-Mäusen, kommt es zu diffuseren PN, aber nur zu geringfügigen Veränderungen der Anreicherung von zugegebenem Tau-Protein. Tenascin-R ist wahrscheinlich nicht der entscheidende Netzbestandteil für die Bindung von exogenem Tau-Protein der PN und damit verbundenen neuroprotektiven Eigenschaften.

Nach Entfernen der Chondroitinsulfat-Seitenketten ergibt sich ein verändertes Bild. Die Zugabe von Tau-Protein führt nicht mehr zu Anreicherungen um PN-tragende Neurone. Der Verlust der Seitenketten bewirkt möglicherweise einen Verlust der Bindung und der neuroprotektiven Funktion gegenüber zugegebenem Tau-Protein.

Um die neuroprotektive Funktion anderer Netzbestandteile bezogen auf die Tau-Protein-Zugabe zu zeigen, könnte man die Versuche für *Knockout*-Tiere anderer Netzbestandteile wiederholen. Das könnten *Knockout*-Tiere von Link-Protein, Brevican, Neurocan und Phosphacan sein oder die enzymatischee Entfernung von Hyaluronsäure. Außerdem könnte man die Versuche mit einem Mausmodell wiederholen, welches Aspekte der AD widerspiegelt, z.B. die Tg2576-Maus, die ein etabliertes Modell für die Entwicklung amyloider Plaques bei der AD darstellt (**Morawski et al.** 2010c).

Des Weiteren könnte man die neuroprotektive Funktion der mit Tau-Protein behandelten PN-tragenden Neuronen mittels Kernfärbung und Fragmentierung der Kerne, d.h. ausbleibendem Beginn von apoptotischen und nekrotischen Prozessen dieser Zellen, nachweisen. Dafür sind primäre Neuronenkulturen denkbar, da die beobachtete Initialschädigung bei organotypischen Schnittkulturen möglicherweise die Auswertung der Schnittkulturen beeinflusst. Um Apoptose und Nekrose zu untersuchen, könnte man die bei diesen Prozessen entstehenden exzitotoxischen Substanzen wie Glutamat und Calcium messen.

Bei der AD sind PN-tragende Neurone weniger von Neurodegeneration betroffen (**Miyata et al.** 2007). Kortikale PN-tragende Neurone bleiben größtenteils von Ablagerungen durch NFT verschont (**Brückner et al.** 1999; **Morawski et al.** 2010a). Das deutet auf eine relative Resistenz der motorischen und primär sensorischen Areale mit einer großen Anzahl PN-tragender Neurone hin (**Brückner et al.** 1999; **Morawski et al.** 2004; **Morawski et al.** 2010c). Mit Kenntnis der Chondroitinsulfat-Seitenketten als protektive Strukturen könnte man daher versuchen, eine Bildung von PN mit ausgeprägten Chondroitinsulfat-Seitenketten in bevorzugt von Degeneration betroffenen Gehirnregionen wie dem entorhinalen Kortex hervorzurufen und so die durch oxidativen Stress hervorgerufene Degeneration von Neuronen in neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise der AD, einzudämmen.

6 Zusammenfassung

Perineuronale Netze (PN) sind eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix im ZNS von Fischen, Amphibien, Reptilien, Vögeln und in vielen Säugetierspezies, unter anderem der Maus und des Menschen. Die PN formen große, stabile Aggregate auf der Oberfläche von Neuronen und Dendriten, die auf der Zell-Oberfläche verankert sind. Hauptsächlich bestehen die PN aus Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat-Proteoglykanen (CSPG), Link-Protein und Tenascin-R.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis einer Protektion perineuronaler Netze vor pathologischer Tau-Protein-Einlagerung, wie sie u.a. bei der Alzheimer-Demenz vorkommt, da humanes Tau-Protein im extrazellulären Raum durch einen aktiven Prozess der Sekretion freigesetzt und endozytiert werden kann. Das stark negativ geladene PN könnte möglicherweise das positiv geladene Tau-Protein binden und so das Einschleusen des Tau-Proteins in die Zelle sowie dessen Aggregation potentiell behindern. Daher könnten nach einer Zugabe von Tau-Protein PN-tragende Neurone weniger oder kaum von einer Einlagerung von potentiell toxischem Tau-Protein betroffen sein.

Zu Beginn wurde die Verteilung des Tau-Proteins in den adulten Mäusegehirnen der verwendeten Mauslinie *C57Bl6* (Wildtyp, WT) und deren Tenascin-R-*Knockout* ($TnR^{-/-}$) mithilfe von Gefrierschnitten und Immunhistochemie untersucht. Tau-Protein ist als Mikrotubuli-assoziiertes Protein ubiquitär in allen Zellen der verwendeten Mauslinien vorhanden.

Die PN in den genutzten Mauslinien wurden mithilfe von Gefrierschnitten und Immunhistochemie dargestellt. Die Gefrierschnitte der WT zeigen überwiegend gitterartige, gut konturierte PN mit dünnem perisomatischen Kranz im Neokortex und Hippocampus. In WT bindet Tenascin-R über eine Domäne am C-Terminus der Proteoglykane und bildet einen statischen Komplex. Tenascin-R wird in den $TnR^{-/-}$

nicht exprimiert, somit verändert sich die Struktur der PN. Die Gefrierschnitte der $TnR^{-/-}$ zeigen eine aufgelockerte Struktur und diffuse PN im Neokortex und Hippocampus mit dickerem perisomatischem Kranz. Ihre Struktur ist weniger deutlich exprimiert und sie erscheinen dadurch granulärer, verglichen mit den WT. Um die Funktion der Glykosaminoglykan (GAG)-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine zu untersuchen, erfolgte deren Abspaltung vom PN mit dem Enzym Chondroitinase ABC. Somit wurde zu den beiden Mauslinien WT und $TnR^{-/-}$ noch eine weitere Kondition (mit dem Enzym Chondroitinase ABC behandelter Wildtyp (WT^{ChABC})) untersucht. Durch die Abspaltung der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine vom PN durch das Enzym Chondroitinase ABC kommt es zum Verlust der Darstellbarkeit mit *WFA*, da dieses spezifische Motive auf den GAG-Seitenketten markiert.

In den WT und $TnR^{-/-}$ sollte die Ausbreitung eines zugegebenen Tau-Proteins untersucht werden und dafür Zeitreihen angelegt werden. Daher wurden organotypische Hirnschnittkulturen angelegt und diesen markiertes Tau-Protein zugesetzt. Nach lokaler Zugabe des Tau-Proteins zwischen zwei Hirnschnittkulturen breitet sich dieses in den WT ungehindert über die Hirnschnittkultur aus. Es reichert sich diffus extrazellulär um die PN-tragenden Neurone herum an. Die PN-tragenden Neurone sind intrazellulär weitestgehend frei von Tau-Protein-Einlagerungen. Sie bilden somit potentiell eine Barriere und verzögern die Ausbreitung von Tau-Protein um bis zu 2 h. In PN-freien Neuronen hingegen lagert sich Tau-Protein intrazellulär ein.

In den $TnR^{-/-}$ ist eine Abschwächung der neuroprotektiven Funktion der PN möglich. Es zeigt sich lediglich eine schnellere Ausbreitung des Tau-Proteins. Außerdem umlagert Tau-Protein die PN nicht so stark wie bei den WT. Ansonsten entsprechen die Ergebnisse denen der WT. Wahrscheinlich ist Tenascin-R nicht allein der entscheidende Netzbestandteil für die schützende Funktion der PN bezogen auf eine Zugabe von exogenem Tau-Protein.

Die Abspaltung der GAG-Seitenketten der Proteoglykan-Proteine vom PN durch Chondroitinase ABC sollte die Bedeutung der GAG-Seitenketten als Hauptbestandteil für den polyanionischen Charakter der PN nachweisen. Vor allem die abgespaltenen Seitenketten sind neben Hyaluronsäure negativ geladen. Daher ist anzunehmen, dass es den verbleibenden Bestandteilen der PN so gut wie nicht mehr möglich ist, Kationen zu puffern und radikal-bildende Ionen zu binden. Eine Abschwächung der neuroprotektiven Funktion dieser veränderten PN ist daher wahrscheinlich. Bei den WT^{ChABC} erfolgte die Ausbreitung des zugegebenen positiv geladenen Tau-Proteins

wesentlich langsamer als bei den WT und den $TnR^{-/-}$. Es lagerte sich kein Tau-Protein ab. Die fixierten Schnittkulturen enthielten viel weniger Tau-Protein-Anreicherungen.

Zuletzt erfolgten Fixierung und quantitative Auswertung der Verteilung von PN und zugegebenem Tau-Protein in der verwendeten Mauslinie und ihren Konditionen. Dabei wurden die Kolokalisationen der beiden Markierungen für PN und Tau-Protein mit dem Wilcoxon-Test und U-Test nach Mann-Whitney berechnet. Die Ergebnisse bestätigten die Beobachtungen weitestgehend.

Die vorliegende Arbeit zeigt die neuroprotektive Funktion der PN gegenüber zugegebenem Tau-Protein und einen Wegfall dieser neuroprotektiven Funktion nach Behandlung mit dem Enzym Chondroitinase ABC. Somit könnten die Chondroitinsulfat-Seitenketten einen wesentlichen neuroprotektiven Faktor in Bezug auf die Zugabe von exogenem Tau-Protein darstellen.

Da bei der Alzheimer-Demenz PN-tragende Neurone weniger von Neurodegeneration betroffen sind, könnte man mit Kenntnis der Chondroitinsulfat-Seitenketten als protektive Strukturen versuchen, die durch oxidativen Stress hervorgerufene Degeneration von Neuronen einzudämmen.

7 Literatur-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Literaturverzeichnis

Albert, E. [1964] SENILE DEMENZ UND ALZHEIMERSCHE KRANKHEIT ALS AUSDRUCK DES GLEICHEN KRANKHEITSGESCHEHENS. *Fortschritte der Neurologie, Psychiatrie, und ihrer Grenzgebiete* 32, 625–673.

Altman, J.; Sudarshan, K. [1975] Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal behaviour* 23 (4), 896–920.

Alzheimer, A. [1907] Über eine eigenartige Krankheit der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie* 1907 (64), 146–148.

Amos, L.A. [2004] Microtubule structure and its stabilisation. *Organic & biomolecular chemistry* 2 (15), 2153–2160.

Andreadis, A.; Broderick, J.A.; Kosik, K.S. [1995] Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic acids research* 23 (17), 3585–3593.

Andreadis, A.; Brown, W.M.; Kosik, K.S. [1992] Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31 (43), 10626–10633.

Arai, H.; Noguchi, I.; Makino, Y.; Kosaka, K.; Heizmann, C.W.; Iizuka, R. [1991] Parvalbumin-immunoreactive neurons in the cortex in Pick's disease. *Journal of neurology* 238 (4), 200–202.

Arendt, T.; Stieler, J.T.; Holzer, M. [2016] Tau and tauopathies. *Brain research bulletin* 126 (Pt 3), 238–292.

Arikan, M.C.; Memmott, J.; Broderick, J.A.; Lafyatis, R.; Screaton, G.; Stamm, S.; Andreadis, A. [2002] Modulation of the membrane-binding projection domain of tau protein: Splicing regulation of exon 3. *Brain research. Molecular brain research* 101 (1-2), 109–121.

Arnold, C.S.; Johnson, G.V.; Cole, R.N.; Dong, D.L.; Lee, V.M.-Y.; Hart, G.W. [1996] The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of biological chemistry* 271 (46), 28741–28744.

Arranz, A.M.; Perkins, K.L.; Irie, F.; Lewis, D.P.; Hrabe, J.; Xiao, F.; Itano, N.; Kimata, K.; Hrabetova, S.; Yamaguchi, Y. [2014] Hyaluronan deficiency due to Has3 knock-out causes altered neuronal activity and seizures via reduction in brain extracellular space. *J. Neurosci.* 34 (18), 6164–6176.

Arrigo, G.; Gherzi, R.; Bonaglia, M.C.; Leprini, A.; Zuffardi, O.; Zardi, L. [1997] Assignment of the tenascin-R gene (Tnr) to mouse chromosome 4 band E2 by fluorescence in situ hybridization; refinement of the human TNR location to chromosome 1q24. *Cytogenetics and cell genetics* 78 (2), 145–146.

Aspberg, A.; Miura, R.; Bourdoulous, S.; Shimonaka, M.; Heinegård, D.; Schachner, M.; Ruoslahti, E.; Yamaguchi, Y. [1997] The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (19), 10116–10121.

Bahia, C.P.; Houzel, J.-C.; Picanço-Diniz, C.W.; Pereira, A. [2008] Spatiotemporal distribution of proteoglycans in the developing rat's barrel field and the effects of early deafferentation. *J. Comp. Neurol.* 510 (2), 145–157.

Ballatore, C.; Lee, V.M.-Y.; Trojanowski, J.Q. [2007] Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 8 (9), 663–672.

Bancher, C.; Jellinger, K.A.; Lassmann, H.; Fischer, P.; Leblhuber, F. [1996] Correlations between mental state and quantitative neuropathology in the Vienna Longitudinal Study on Dementia. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 246 (3), 137–146.

Bandtlow, C.E.; Zimmermann, D.R. [2000] Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol. Rev.* 80 (4), 1267–1290.

Bartels, C.; Förstl, H.; Wallesch, C.-W. [2005] Demenzen. *Thieme*. Stuttgart [u.a.] (RRN - Referenz-Reihe Neurologie).

Bekku, Y.; Saito, M.; Moser, M.; Fuchigami, M.; Maehara, A.; Nakayama, M.; Kusachi, S.; Ninomiya, Y.; Oohashi, T. [2012] Bral2 is indispensable for the proper localization of brevican and the structural integrity of the perineuronal net in the brainstem and cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 520 (8), 1721–1736.

Bergen, M. von; **Barghorn, S.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.** [2005] Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1739 (2-3), 158–166.

Berriman, J.; Serpell, L.C.; Oberg, K.A.; Fink, A.L.; Goedert, M.; Crowther, R.A. [2003] Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15), 9034–9038.

Beyreuther, K. [2002] Demenzen : Grundlagen und Klinik. Unter Mitarbeit von Karl Max Einhäupl, Hans Förstl, Alexander Kurz, Thomas Arendt, H. Bickel, H. Braak et al.: *Thieme Verlag*. Stuttgart.

Biernat, J.; Gustke, N.; Drewes, G.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. [1993] Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11 (1), 153–163.

Binder, L.I.; Frankfurter, A.; Rebhun, L.I. [1986] Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ. *Ann NY Acad Sci* 466, 145–166.

Blosa, M.; Sonntag, M.; Brückner, G.; Jäger, C.; Seeger, G.; Matthews, R.T.; Rübsamen, R.; Arendt, T.; Morawski, M. [2013] Unique features of extracellular matrix in the mouse medial nucleus of trapezoid body--implications for physiological functions. *Neuroscience* 228, 215–234.

Bolmont, T.; Clavaguera, F.; Meyer-Luehmann, M.; Herzig, M.C.; Radde, R.; Staufenbiel, M.; Lewis, J.; Hutton, M.; Tolnay, M.; Jucker, M. [2007] Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid-beta -containing brain extract and by amyloid-beta deposition in APP x Tau transgenic mice. *The American journal of pathology* 171 (6), 2012–2020.

Boyne, L.J.; Tessler, A.; Murray, M.; Fischer, I. [1995] Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J. Comp. Neurol.* 358 (2), 279–293.

Braak, H.; Braak, E. [1991] Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82 (4), 239–259.

Braak, H.; Braak, E. [1994] Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. *Neurobiol. Aging* 15 (3), 355-6; discussion 379-80.

Braak, H.; Braak, E. [1995] Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol. Aging* 16 (3), 271-8; discussion 278-84.

Braak, H.; Braak, E. [1996] Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. *Acta Neuropathol.* 92 (2), 197–201.

Braak, H.; Braak, E. [1997] Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* 18 (4), 351–357.

Braak, H.; Braak, E.; Bohl, J. [1993] Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *European neurology* 33 (6), 403–408.

Braak, H.; Braak, E.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. [1986] Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: A third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci. Lett.* 65 (3), 351–355.

Braak, H.; de Vos, R A; **Jansen, E.N.; Bratzke, H.; Braak, E.** [1998] Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog. Brain Res.* 117, 267–285.

Bracco, L. [1994] Factors Affecting Course and Survival in Alzheimer's Disease. *Arch Neurol* 51 (12), 1213.

Brakebusch, C.; Seidenbecher, C.I.; Asztely, F.; Rauch, U.; Matthies, H.; Meyer, H.; Krug, M.; Böckers, T.M.; Zhou, X.; Kreutz, M.R.; Montag, D.; Gundelfinger, E.D.; Fässler, R. [2002] Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol. Cell. Biol.* 22 (21), 7417–7427.

Bramblett, G.T.; Goedert, M.; Jakes, R.; Merrick, S.E.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.-Y. [1993] Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10 (6), 1089–1099.

Brandt, R.; Lee, G. [1993] Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *The Journal of biological chemistry* 268 (5), 3414–3419.

Brandt, R.; Léger, J.; Lee, G. [1995] Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *The Journal of cell biology* 131 (5), 1327–1340.

Brauer, K.; Härtig, W.; Bigl, V.; Brückner, G. [1993] Distribution of parvalbumin-containing neurons and lectin-binding perineuronal nets in the rat basal forebrain. *Brain Res.* 631 (1), 167–170.

Bright, J.; Hussain, S.; Dang, V.; Wright, S.; Cooper, B.; Byun, T.; Ramos, C.; Singh, A.; Parry, G.; Stagliano, N.; Griswold-Prenner, I. [2015] Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiol Aging* 36 (2), 693–709.

Brückner, G.; Brauer, K.; Härtig, W.; Wolff, J.R.; Rickmann, M.J.; Derouiche, A.; Delpech, B.; Girard, N.; Oertel, W.H.; Reichenbach, A. [1993] Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia* 8 (3), 183–200.

Brückner, G.; Bringmann, A.; Köppe, G.; Härtig, W.; Brauer, K. [1996] In vivo and in vitro labelling of perineuronal nets in rat brain. *Brain Res.* 720 (1-2), 84–92.

Brückner, G.; Grosche, J. [2001] Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. *Exp Brain Res* 137 (1), 83–93.

Brückner, G.; Grosche, J.; Hartlage-Rübsamen, M.; Schmidt, S.; Schachner, M. [2003] Region and lamina-specific distribution of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan and tenascin-R in the mouse hippocampal formation. *J. Chem. Neuroanat.* 26 (1), 37–50.

Brückner, G.; Grosche, J.; Schmidt, S.; Härtig, W.; Margolis, R.U.; Delpech, B.; Seidenbecher, C.I.; Czaniera, R.; Schachner, M. [2000] Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R.. *J. Comp. Neurol.* (428), 616–629.

Brückner, G.; Hausen, D.; Härtig, W.; Drlicek, M.; Arendt, T.; Brauer, K. [1999] Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate. *Neuroscience* 92 (3), 791–805.

Brückner, G.; Kacza, J.; Grosche, J. [2004] Perineuronal nets characterized by vital labelling, confocal and electron microscopy in organotypic slice cultures of rat parietal cortex and hippocampus. *J. Mol. Histol.* 35 (2), 115–122.

Brückner, G.; Morawski, M.; Arendt, T. [2008] Aggrecan-based extracellular matrix is an integral part of the human basal ganglia circuit. *Neuroscience* 151 (2), 489–504.

Brundin, P.; Melki, R.; Kopito, R. [2010] Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (4), 301–307.

Buée, L.; Bussière, T.; Buée-Scherrer, V.; Delacourte, A.; Hof, P.R. [2000] Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders11These authors contributed equally to this work. *Brain Res Rev* 33 (1), 95–130.

Bukalo, O.; Schachner, M.; Dityatev, A. [2001] Modification of extracellular matrix by enzymatic removal of chondroitin sulfate and by lack of tenascin-R differentially affects several forms of synaptic plasticity in the hippocampus. *Neuroscience* 104 (2), 359–369.

Bullmann, T.; Holzer, M.; Mori, H.; Arendt, T. [2009] Pattern of tau isoforms expression during development in vivo. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 27 (6), 591–597.

Bush, M.L.; Miyashiro, J.S.; Ingram, V.M. [1995] Activation of a neurofilament kinase, a tau kinase, and a tau phosphatase by decreased ATP levels in nerve growth factor-differentiated PC-12 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (6), 1861–1865.

Caceres, A.; Kosik, K.S. [1990] Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343 (6257), 461–463.

Caicedo, A.; d'Aldin, C.; Puel, J.L.; Eybalin, M. [1996] Distribution of calcium-binding protein immunoreactivities in the guinea pig auditory brainstem. *Anat. Embryol.* 194 (5), 465–487.

Cairns, N.J.; Bigio, E.H.; Mackenzie, I.R.A.; Neumann, M.; Lee, V.M.-Y.; Hatanpaa, K.J.; White, C.L.; Schneider, J.A.; Grinberg, L.T.; Halliday, G.; Duyckaerts, C.; Lowe, J.S.; Holm, I.E.; Tolnay, M.; Okamoto, K.; Yokoo, H.; Murayama, S.; Woulfe, J.; Munoz, D.G.; Dickson, D.W.; Ince, P.G.; Trojanowski, J.Q.; Mann, D.M.A. [2007] Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: Consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 114 (1), 5–22.

Calignon, A. de; **Polydoro, M.; Suárez-Calvet, M.; William, C.; Adamowicz, D.H.; Kopeikina, K.J.; Pitstick, R.; Sahara, N.; Ashe, K.H.; Carlson, G.A.; Spires-Jones, T.L.; Hyman, B.T.** [2012] Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73 (4), 685–697.

Carulli, D.; Pizzorusso, T.; Kwok, J.C.F.; Putignano, E.; Poli, A.; Forostyak, S.; Andrews, M.R.; Deepa, S.S.; Glant, T.T.; Fawcett, J.W. [2010] Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain* 133 (Pt 8), 2331–2347.

Carulli, D.; Rhodes, K.E.; Brown, D.J.; Bonnert, T.P.; Pollack, S.J.; Oliver, K.; Strata, P.; Fawcett, J.W. [2006] Composition of perineuronal nets in the adult rat cerebellum and the cellular origin of their components. *J. Comp. Neurol.* 494 (4), 559–577.

Carulli, D.; Rhodes, K.E.; Fawcett, J.W. [2007] Upregulation of aggrecan, link protein 1, and hyaluronan synthases during formation of perineuronal nets in the rat cerebellum. *J. Comp. Neurol.* 501 (1), 83–94.

Caughey, B.; Lansbury, P.T. [2003] Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 267–298.

Celio, M.R.; Blümcke, I. [1994] Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 19 (1), 128–145.

Celio, M.R.; Chiquet-Ehrismann, R. [1993] Perineuronal nets' around cortical interneurons expressing parvalbumin are rich in tenascin. *Neurosci. Lett.* 162 (1-2), 137–140.

Celio, M.R.; Spreafico, R.; De, B.S.; Vitellaro-Zuccarello, L. [1998] Perineuronal nets: past and present. *Trends Neurosci* 21 (12), 510–515.

Chai, X.; Dage, J.L.; Citron, M. [2012] Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiology of disease* 48 (3), 356–366.

Chen, J.; Kanai, Y.; Cowan, N.J.; Hirokawa, N. [1992] Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360 (6405), 674–677.

Chin, S.S.; Goldman, J.E. [1996] Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 55 (5), 499–508.

Chiquet-Ehrismann, R.; Tucker, R.P. [2011] Tenascins and the importance of adhesion modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (5).

Choi, D.W.; Maulucci-Gedde, M.; Kriegstein, A.R. [1987] Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* 7 (2), 357–368.

Cichon, S.; Mühleisen, T.W.; Degenhardt, F.A.; Mattheisen, M.; Miró, X.; Strohmaier, J.; Steffens, M.; Meesters, C.; Herms, S.; Weingarten, M.; Priebe, L.; Haenisch, B.; Alexander, M.; Vollmer, J.; Breuer, R.; Schmäl, C.; Tessmann, P.; Moebus, S.; Wichmann, H.-E.; Schreiber, S.; Müller-Myhsok, B.; Lucae, S.; Jamain, S.; Leboyer, M.; Bellivier, F.; Etain, B.; Henry, C.; Kahn, J.-P.; Heath, S.; Hamshere, M.; O'Donovan, M.C.; Owen, M.J.; Craddock, N.; Schwarz, M.; Vedder, H.; Kammerer-Ciernioch, J.; Reif, A.; Sasse, J.; Bauer, M.; Hautzinger, M.; Wright, A.; Mitchell, P.B.; Schofield, P.R.; Montgomery, G.W.; Medland, S.E.; Gordon, S.D.; Martin, N.G.; Gustafsson, O.; Andreassen, O.; Djurovic, S.; Sigurdsson, E.; Steinberg, S.; Stefansson, H.; Stefansson, K.; Kapur-Pojskic, L.; Oruc, L.; Rivas, F.; Mayoral, F.; Chuchalin, A.; Babadjanova, G.; Tiganov, A.S.; Pantelejeva, G.; Abramova, L.I.; Grigoroiu-Serbanescu, M.; Diaconu, C.C.; Czerski, P.M.; Hauser, J.; Zimmer, A.; Lathrop, M.; Schulze, T.G.; Wienker, T.F.; Schumacher, J.; Maier, W.; Propping, P.; Rietschel, M.; Nöthen, M.M. [2011] Genome-wide association study identifies genetic variation in neurocan as a susceptibility factor for bipolar disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 88 (3), 372–381.

Clark, C.M.; Xie, S.; Chittams, J.; Ewbank, D.; Peskind, E.; Galasko, D.; Morris, J.C.; McKeel, D.W.; Farlow, M.; Weitlauf, S.L.; Quinn, J.; Kaye, J.; Knopman, D.; Arai, H.; Doody, R.S.; DeCarli, C.; Leight, S.; Lee, V.M.-Y.; Trojanowski, J.Q. [2003] Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses?. *Arch Neurol* 60 (12), S. 1696–1702.

Clavaguera, F.; Bolmont, T.; Crowther, R.A.; Abramowski, D.; Frank, S.; Probst, A.; Fraser, G.; Stalder, A.K.; Beibel, M.; Staufenbiel, M.; Jucker, M.; Goedert, M.; Tolnay, M. [2009] Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature cell biology* 11 (7), 909–913.

Cleveland, D.W.; Hwo, S.Y.; Kirschner, M.W. [1977] Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *Journal of molecular biology* 116 (2), 227–247.

Couchie, D.; Mavilia, C.; Georgieff, I.S.; Liem, R.K.; Shelanski, M.L.; Nunez, J. [1992] Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (10), 4378–4381.

Crowther, R.A.; Goedert, M. [2000] Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases. *J. Struct. Biol.* 130 (2-3), 271–279.

Dawson, H.N.; Cantillana, V.; Jansen, M.; Wang, H.; Vitek, M.P.; Wilcock, D.M.; Lynch, J.R.; Laskowitz, D.T. [2010] Loss of tau elicits axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 169 (1), 516–531.

Deepa, S.S.; Carulli, D.; Galtrey, C.M.; Rhodes, K.E.; Fukuda, J.; Mikami, T.; Sugahara, K.; Fawcett, J.W. [2006] Composition of perineuronal net extracellular matrix in rat brain: a different disaccharide composition for the net-associated proteoglycans. *The Journal of biological chemistry* 281 (26), 17789–17800.

Dickson, D.W.; Kouri, N.; Murray, M.E.; Josephs, K.A. [2011] Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *Journal of molecular neuroscience : MN* 45 (3), 384–389.

Dityatev, A.; Brückner, G.; Dityateva, G.; Grosche, J.; Kleene, R.; Schachner, M. [2007] Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Dev Neurobiol* 67 (5), 570–588.

Dixit, R.; Ross, J.L.; Goldman, Y.E.; Holzbaur, E.L.F. [2008] Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science (New York, N.Y.)* 319 (5866), 1086–1089.

Drechsel, D.N.; Hyman, A.A.; Cobb, M.H.; Kirschner, M.W. [1992] Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Molecular biology of the cell* 3 (10), 1141–1154.

Drubin, D.G.; Feinstein, S.C.; Shooter, E.M.; Kirschner, M.W. [1985] Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *The Journal of cell biology* 101 (5 Pt 1), 1799–1807.

Duyckaerts, C.; Delatour, B.; Potier, M.-C. [2009] Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.* 118 (1), 5–36.

Duyckaerts, C.; Kawasaki, H.; Delaère, P.; Rainsard, C.; Hauw, J.J. [1989] Fibre disorganization in the neocortex of patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Neuropathology and applied neurobiology* 15 (3), 233–247.

Ebneth, A.; Godemann, R.; Stamer, K.; Illenberger, S.; Trinczek, B.; Mandelkow, E. [1998] Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: Implications for Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology* 143 (3), 777–794.

Egea, J.; García, A.G.; Verges, J.; Montell, E.; López, M.G. [2010] Antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans. *Osteoarthr. Cartil.* 18 Suppl 1, 24-7.

Eidenmüller, J.; Fath, T.; Hellwig, A.; Reed, J.; Sontag, E.; Brandt, R. [2000] Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins. *Biochemistry* 39 (43), 13166–13175.

Eidenmüller, J.; Fath, T.; Maas, T.; Pool, M.; Sontag, E.; Brandt, R. [2001] Phosphorylation-mimicking glutamate clusters in the proline-rich region are sufficient to simulate the functional deficiencies of hyperphosphorylated tau protein. *The Biochemical journal* 357 (Pt 3), 759–767.

Erisir, A.; Lau, D.; Rudy, B.; Leonard, C.S. [1999] Function of specific K(+) channels in sustained high-frequency firing of fast-spiking neocortical interneurons. *J. Neurophysiol.* 82 (5), 2476–2489.

Esmaeli-Azad, B.; McCarty, J.H.; Feinstein, S.C. [1994] Sense and antisense transfection analysis of tau function: Tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *Journal of cell science* 107 (Pt 4), 869–879.

Faissner, A.; Pyka, M.; Geissler, M.; Sobik, T.; Frischknecht, R.; Gundelfinger, E.D.; Seidenbecher, C.I. [2010] Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev* 63 (1-2), 26–38.

Ferrer, I.; López-González, I.; Carmona, M.; Arregui, L.; Dalfó, E.; Torrejón-Escribano, B.; Diehl, R.; Kovacs, G.G. [2014] Glial and neuronal tau pathology in tauopathies: characterization of disease-specific phenotypes and tau pathology progression. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 73 (1), 81–97.

Flach, K. [2006] Einfluss von Tau-Protofibrillen auf die Zellvitalität und Membranintegrität von Neuroblastom-Zellen. Diplomarbeit. Universität Leipzig, Leipzig. Institut für Zoologie der Fakultät für Biowissenschaften, Psychologie und Pharmazie.

Friedhoff, P.; Bergen, M. von; **Mandelkow, E.-M.; Davies, P.; Mandelkow, E.** [1998a] A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26), 15712–15717.

Friedhoff, P.; Schneider, A.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. [1998b] Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* 37 (28), 10223–10230.

Frischknecht, R.; Heine, M.; Perrais, D.; Seidenbecher, C.I.; Choquet, D.; Gundelfinger, E.D. [2009] Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* 12 (7), 897–904.

Frost, B.; Diamond, M.I. [2010] Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience* 11 (3), 155–159.

Frost, B.; Jacks, R.L.; Diamond, M.I. [2009] Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *The Journal of biological chemistry* 284 (19), 12845–12852.

Fuss, B.; Wintergerst, E.S.; Bartsch, U.; Schachner, M. [1993] Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. *The Journal of cell biology* 120 (5), 1237–1249.

Galtrey, C.M.; Fawcett, J.W. [2007] The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Res Rev* 54 (1), 1–18.

Gärtner, U.; Janke, C.; Holzer, M.; Vanmechelen, E.; Arendt, T. [1998] Postmortem changes in the phosphorylation state of tau-protein in the rat brain. *Neurobiol. Aging* 19 (6), 535–543.

Garwood, J.; Heck, N.; Reichardt, F.; Faissner, A. [2003] Phosphacan short isoform, a novel non-proteoglycan variant of phosphacan/receptor protein tyrosine phosphatase-beta, interacts with neuronal receptors and promotes neurite outgrowth. *The Journal of biological chemistry* 278 (26), 24164–24173.

Gáti, G.; Morawski, M.; Lendvai, D.; Matthews, R.T.; Jäger, C.; Zachar, G.; Arendt, T.; Alpár, A. [2010] Chondroitin sulphate proteoglycan-based perineuronal net establishment is largely activity-independent in chick visual system. *J Chem Neuroanat* 40 (3), 243–247.

Giamanco, K.A.; Matthews, R.T. [2012] Deconstructing the perineuronal net: cellular contributions and molecular composition of the neuronal extracellular matrix. *Neuroscience* 218, 367–384.

Giamanco, K.A.; Morawski, M.; Matthews, R.T. [2010] Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience* 170 (4), 1314–1327.

Goedert, M. [1999] Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases: tauopathies and alpha-synucleinopathies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 354 (1386), 1101–1118.

Goedert, M.; Cohen, E.S.; Jakes, R.; Cohen, P. [1992a] p42 MAP kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease corrected. *FEBS letters* 312 (1), 95–99.

Goedert, M.; Crowther, R.A. [1989] Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and their relevance for the study of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 10 (5), 405-6; discussion 412-4.

Goedert, M.; Jakes, R. [1990] Expression of separate isoforms of human tau protein: Correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *The EMBO journal* 9 (13), 4225–4230.

Goedert, M.; Jakes, R. [2005] Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1739 (2-3), 240–250.

Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M.G.; Crowther, R.A.; Cohen, P.; Vanmechelen, E.; Probst, A.; Götz, J.; Bürki, K. [1995] Tau protein in Alzheimer's disease. *Biochemical Society transactions* 23 (1), 80–85.

Goedert, M.; Jakes, R.; Spillantini, M.G.; Hasegawa, M.; Smith, M.J.; Crowther, R.A. [1996] Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383 (6600), 550–553.

Goedert, M.; Sisodia, S.S.; Price, D.L. [1991] Neurofibrillary tangles and beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology* 1 (3), 441–447.

Goedert, M.; Spillantini, M.G.; Crowther, R.A. [1992b] Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (5), 1983–1987.

Goedert, M.; Spillantini, M.G.; Jakes, R.; Rutherford, D.; Crowther, R.A. [1989] Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3 (4), 519–526.

Gogolla, N.; Caroni, P.; Lüthi, A.; Herry, C. [2009] Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945), 1258–1261.

Gómez-Isla, T.; Price, J.L.; McKeel, D.W.; Morris, J.C.; Growdon, J.H.; Hyman, B.T. [1996] Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16 (14), 4491–4500.

Gómez-Ramos, A.; Díaz-Hernández, M.; Rubio, A.; Díaz-Hernández, J.I.; Miras-Portugal, M.T.; Avila, J. [2009] Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 19 (10), 708–717.

Götz, J. [2001] Tau and transgenic animal models. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 35 (3), 266–286.

Greenberg, S.M.; Koo, E.H.; Selkoe, D.J.; Qiu, W.Q.; Kosik, K.S. [1994] Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (15), 7104–7108.

Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y.C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H.M.; Binder, L.I. [1986] Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13), 4913–4917.

Gundelfinger, E.D.; Frischknecht, R.; Choquet, D.; Heine, M. [2010] Converting juvenile into adult plasticity: a role for the brain's extracellular matrix. *Eur. J. Neurosci.* (31), 2156–2165.

Guo, J.L.; Lee, V.M.-Y. [2011] Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *The Journal of biological chemistry* 286 (17), 15317–15331.

Härtig, W.; Derouiche, A.; Welt, K.; Brauer, K.; Grosche, J.; Mäder, M.; Reichenbach, A.; Brückner, G. [1999] Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res.* 842 (1), 15–29.

Härtig, W.; Klein, C.; Brauer, K.; Schüppel, K.; Arendt, T.; Bigl, V.; Brückner, G. [2001a] Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiol. Aging* 22 (1), 25–33.

Härtig, W.; Singer, A.; Grosche, J.; Brauer, K.; Ottersen, O.P.; Brückner, G. [2001b] Perineuronal nets in the rat medial nucleus of the trapezoid body surround neurons immunoreactive for various amino acids, calcium-binding proteins and the potassium channel subunit Kv3.1b. *Brain Res.* 899 (1-2), 123–133.

Himmler, A. [1989] Structure of the bovine tau gene: Alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol. Cell. Biol.* 9 (4), 1389–1396.

Hirokawa, N.; Shiomura, Y.; Okabe, S. [1988] Tau proteins: The molecular structure and mode of binding on microtubules. *The Journal of cell biology* 107 (4), 1449–1459.

Hobohm, C.; Günther, A.; Grosche, J.; Rossner, S.; Schneider, D.; Brückner, G. [2005] Decomposition and long-lasting downregulation of extracellular matrix in perineuronal nets induced by focal cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci. Res.* 80 (4), 539–548.

Hobohm, C.; Härtig, W.; Brauer, K.; Brückner, G. [1998] Low expression of extracellular matrix components in rat brain stem regions containing modulatory aminergic neurons. *J. Chem. Neuroanat.* 15 (3), 135–142.

Hockfield, S.; Kalb, R.G.; Zaremba, S.; Fryer, H. [1990] Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55, 505–514.

Hong, M.; Lee, V.M.-Y. [1997] Insulin and Insulin-like Growth Factor-1 Regulate Tau Phosphorylation in Cultured Human Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 272 (31), 19547–19553.

Hong, M.; Zhukareva, V.; Vogelsberg-Ragaglia, V.; Wszolek, Z.; Reed, L.; Miller, B.I.; Geschwind, D.H.; Bird, T.D.; McKeel, D.W.; Goate, A.; Morris, J.C.; Wilhelmsen, K.C.; Schellenberg, G.D.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.-Y. [1998] Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science (New York, N.Y.)* 282 (5395), 1914–1917.

Horn, A.K.; Brückner, G.; Härtig, W.; Messoudi, A. [2003] Saccadic omnipause and burst neurons in monkey and human are ensheathed by perineuronal nets but differ in their expression of calcium-binding proteins. *J. Comp. Neurol.* 455 (3), 341–352.

Hyman, B.T.; Gómez-Isla, T. [1994] Alzheimer's disease is a laminar, regional, and neural system specific disease, not a global brain disease. *Neurobiol. Aging* 15 (3), 353-4; discussion 379-80.

Hyman, B.T.; Trojanowski, J.Q. [1997] Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the National Institute on Aging and the Reagan Institute Working Group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 56 (10), 1095–1097.

Hyman, B.T.; Van Hoesen, G.W.; **Damasio, A.R.; Barnes, C.L.** [1984] Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science (New York, N.Y.)* 225 (4667), 1168–1170.

Igaev, M.; Janning, D.; Sündermann, F.; Niewidok, B.; Brandt, R.; Junge, W. [2014] A refined reaction-diffusion model of tau-microtubule dynamics and its application in FDAP analysis. *Biophysical journal* 107 (11), 2567–2578.

Itano, N.; Kimata, K. [2002] Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB life* 54 (4), 195–199.

Ittner, L.M.; Götz, J. [2011] Amyloid-β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience* 12 (2), 65–72.

Ittner, L.M.; Ke, Y.D.; Delerue, F.; Bi, M.; Gladbach, A.; van Eersel, J.; Wölfing, H.; Chieng, B.C.; Christie, M.J.; Napier, I.A.; Eckert, A.; Staufenbiel, M.; Hardeman, E.; Götz, J. [2010] Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142 (3), 387–397.

Janke, C.; Holzer, M.; Klose, J.; Arendt, T. [1996] Distribution of isoforms of the microtubule-associated protein tau in grey and white matter areas of human brain: A two-dimensional gelelectrophoretic analysis. *FEBS letters* 379 (3), 222–226.

Jeganathan, S.; Bergen, M. von; **Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E.** [2008] The natively unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry* 47 (40), 10526–10539.

Jellinger, K.A.; Braak, H.; Braak, E.; Fischer, P. [1991] Alzheimer lesions in the entorhinal region and isocortex in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Ann NY Acad Sci* 640, 203–209.

Kadavath, H.; Jaremko, M.; Jaremko, Ł.; Biernat, J.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M. [2015] Folding of the Tau Protein on Microtubules. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 54 (35), 10347–10351.

Kampers, T.; Friedhoff, P.; Biernat, J.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. [1996] RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS letters* 399 (3), 344–349.

Kar, S.; Florence, G.J.; Paterson, I.; Amos, L.A. [2003] Discodermolide interferes with the binding of tau protein to microtubules. *FEBS letters* 539 (1-3), 34–36.

Karch, C.M.; Jeng, A.T.; Goate, A.M. [2012] Extracellular Tau levels are influenced by variability in Tau that is associated with tauopathies. *The Journal of biological chemistry* 287 (51), 42751–42762.

Kawaguchi, Y.; Kubota, Y. [1997] GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7 (6), 476–486.

Kempf, M.; Clement, A.; Faissner, A.; Lee, G.; Brandt, R. [1996] Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J. Neurosci.* 16 (18), 5583–5592.

Kfoury, N.; Holmes, B.B.; Jiang, H.; Holtzman, D.M.; Diamond, M.I. [2012] Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *The Journal of biological chemistry* 287 (23), 19440–19451.

Kim, W.; Lee, S.; Hall, G.F. [2010a] Secretion of human tau fragments resembling CSF-tau in Alzheimer's disease is modulated by the presence of the exon 2 insert. *FEBS letters* 584 (14), 3085–3088.

Kim, W.; Lee, S.; Jung, C.; Ahmed, A.; Lee, G.; Hall, G.F. [2010b] Interneuronal transfer of human tau between Lamprey central neurons in situ. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19 (2), 647–664.

Köppe, G.; Brückner, G.; Härtig, W.; Delpech, B.; Bigl, V. [1997] Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *The Histochemical journal* 29 (1), 11–20.

Kostandy, B.B. [2012] The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol. Sci.* 33 (2), 223–237.

Kovacs, G.G. [2016] Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *International journal of molecular sciences* 17 (2).

Krueger, R.C.; Kurima, K.; Schwartz, N.B. [1999] Completion of the mouse aggrecan gene structure and identification of the defect in the cmd-Bc mouse as a near complete deletion of the murine aggrecan gene. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 10 (12), 1119–1125.

Kuret, J.; Chirita, C.N.; Congdon, E.E.; Kannanayakal, T.; Li, G.; Necula, M.; Yin, H.; Zhong, Q. [2005a] Pathways of tau fibrillization. *Biochim. Biophys. Acta* 1739 (2-3), 167–178.

Kuret, J.; Congdon, E.E.; Li, G.; Yin, H.; Yu, X.; Zhong, Q. [2005b] Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microscopy research and technique* 67 (3-4), 141–155.

Kwok, J.C.F.; Carulli, D.; Fawcett, J.W. [2010] In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of neurochemistry* 114 (5), 1447–1459.

Kwok, J.C.F.; Dick, G.; Wang, D.; Fawcett, J.W. [2011] Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* 71 (11), 1073–1089.

Lafont, D.; Adage, T.; Gréco, B.; Zaratin, P. [2009] A novel role for receptor like protein tyrosine phosphatase zeta in modulation of sensorimotor responses to noxious stimuli: evidences from knockout mice studies. *Behav. Brain Res.* 201 (1), 29–40.

Lander, A.D. [1993] Proteoglycans in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology* 3 (5), 716–723.

LaPointe, N.E.; Morfini, G.; Pigino, G.; Gaisina, I.N.; Kozikowski, A.P.; Binder, L.I.; Brady, S.T. [2009] The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: Implications for filament toxicity. *J. Neurosci. Res.* 87 (2), 440–451.

Lee, G.; Neve, R.L.; Kosik, K.S. [1989] The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2 (6), 1615–1624.

Lee, V.M.-Y.; Goedert, M.; Trojanowski, J.Q. [2001] Neurodegenerative tauopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1121–1159.

Lendvai, D.; Morawski, M.; Négyessy, L.; Gáti, G.; Jäger, C.; Baksa, G.; Glasz, T.; Attems, J.; Tanila, H.; Arendt, T.; Harkany, T.; Alpár, A. [2013] Neurochemical mapping of the human hippocampus reveals perisynaptic matrix around functional synapses in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 125 (2), 215–229.

Lewis, D.A.; Campbell, M.J.; Terry, R.D.; Morrison, J.H. [1987] Laminar and regional distributions of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in Alzheimer's disease: a quantitative study of visual and auditory cortices. *J. Neurosci.* 7 (6), 1799–1808.

Lewis, J.; Dickson, D.W.; Lin, W.L.; Chisholm, L.; Corral, A.; Jones, G.; Yen, S.H.; Sahara, N.; Skipper, L.; Yager, D.; Eckman, C.; Hardy, J.; Hutton, M.; McGowan, E. [2001] Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science (New York, N.Y.)* 293 (5534), 1487–1491.

Li, J.; Gould, T.D.; Yuan, P.; Manji, H.K.; Chen, G. [2003a] Post-mortem interval effects on the phosphorylation of signaling proteins. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28 (6), 1017–1025.

Li, K.; Arikan, M.C.; Andreadis, A. [2003b] Modulation of the membrane-binding domain of tau protein: Splicing regulation of exon 2. *Brain research. Molecular brain research* 116 (1-2), 94–105.

Li, X.; Lu, F.; Wang, J.-Z.; Gong, C.-X. [2006] Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. *Eur. J. Neurosci.* 23 (8), 2078–2086.

Lindwall, G.; Cole, R.D. [1984] Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *The Journal of biological chemistry* 259 (8), 5301–5305.

Liu, C.W.; Lee, G.; Jay, D.G. [1999] Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons. *Cell motility and the cytoskeleton* 43 (3), 232–242.

Liu, F.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Hart, G.W.; Gong, C.-X. [2004] O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (29), 10804–10809.

Liu, L.; Drouet, V.; Wu, J.W.; Witter, M.P.; Small, S.A.; Clelland, C.; Duff, K. [2012] Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PloS one* 7 (2), e31302.

Lohmann, C.; Friauf, E. [1996] Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J. Comp. Neurol.* 367 (1), 90–109.

Loomis, P.A.; Howard, T.H.; Castleberry, R.P.; Binder, L.I. [1990] Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (21), 8422–8426.

Lu, J.; Li, T.; He, R.-Q.; Bartlett, P.F.; Götz, J. [2014] Visualizing the microtubule-associated protein tau in the nucleus. *Science China. Life sciences* 57 (4), 422–431.

Luna-Muñoz, J.; García-Sierra, F.; Falcón, V.; Menéndez, I.; Chávez-Macías, L.; Mena, R. [2005] Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Alz-50 antibody in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 8 (1), 29–41.

Lundell, A.; Olin, A.I.; Mörgelin, M.; al-Karadaghi, S.; Aspberg, A.; Logan, D.T. [2004] Structural basis for interactions between tenascins and lectican C-type lectin domains: evidence for a crosslinking role for tenascins. *Structure* 12 (8), 1495–1506.

Maas, T.; Eidenmüller, J.; Brandt, R. [2000] Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry* 275 (21), 15733–15740.

Maccioni, R.B.; Vera, J.C.; Dominguez, J.; Avila, J. [1989] A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch. Biochem. Biophys.* 275 (2), 568–579.

Mackenzie, I.R.A.; Neumann, M.; Bigio, E.H.; Cairns, N.J.; Alafuzoff, I.; Kril, J.; Kovacs, G.G.; Ghetti, B.; Halliday, G.; Holm, I.E.; Ince, P.G.; Kamphorst, W.; Revesz, T.; Rozemuller, A.J.M.; Kumar-Singh, S.; Akiyama, H.; Baborie, A.; Spina, S.; Dickson, D.W.; Trojanowski, J.Q.; Mann, D.M.A. [2010] Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: An update. *Acta Neuropathol.* 119 (1), 1–4.

Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. [2012] Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (7), a006247.

Matsumoto, K.; Shionyu, M.; Go, M.; Shimizu, K.; Shinomura, T.; Kimata, K.; Watanabe, H. [2003] Distinct interaction of versican/PG-M with hyaluronan and link protein. *The Journal of biological chemistry* 278 (42), 41205–41212.

Matsuo, E.S.; Shin, R.-W.; Billingsley, M.L.; van deVoorde, A.; O'Connor, M.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.-Y. [1994] Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13 (4), 989–1002.

Matthews, R.T.; Kelly, G.M.; Zerillo, C.A.; Gray, G.; Tiemeyer, M.; Hockfield, S. [2002] Aggrecan glycoforms contribute to the molecular heterogeneity of perineuronal nets. *J. Neurosci.* 22 (17), 7536–7547.

Miyata, S.; Nishimura, Y.; Nakashima, T. [2007] Perineuronal nets protect against amyloid beta-protein neurotoxicity in cultured. *Brain Res* 1150, 200–206.

Mohamed, N.-V.; Herrou, T.; Plouffe, V.; Piperno, N.; Leclerc, N. [2013] Spreading of tau pathology in Alzheimer's disease by cell-to-cell transmission. *Eur. J. Neurosci.* 37 (12), 1939–1948.

Morawski, M.; Brückner, G.; Arendt, T.; Matthews, R.T. [2012] Aggrecan: Beyond cartilage and into the brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (5), 690–693.

Morawski, M.; Brückner, G.; Jäger, C.; Seeger, G.; Arendt, T. [2010a] Neurons associated with aggrecan-based perineuronal nets are protected against. *Neuroscience* 169 (3), 1347–1363.

Morawski, M.; Brückner, G.; Jäger, C.; Seeger, G.; Kunzle, H.; Arendt, T. [2010b] Aggrecan-based extracellular matrix shows unique cortical features and conserved. *Neuroscience* 165 (3), 831–849.

Morawski, M.; Brückner, G.; Jäger, C.; Seeger, G.; Matthews, R.T.; Arendt, T. [2011] Involvement of Perineuronal and Perisynaptic Extracellular Matrix in Alzheimer’s Disease Neuropathology. *Brain Pathology* (22), 547–561.

Morawski, M.; Brückner, M.K.; Riederer, P.; Brückner, G.; Arendt, T. [2004] Perineuronal nets potentially protect against oxidative stress. *Exp Neurol* 188 (2), 309–315.

Morawski, M.; Dityatev, A.; Hartlage-Rübsamen, M.; Blosa, M.; Holzer, M.; Flach, K.; Pavlica, S.; Dityateva, G.; Grosche, J.; Brückner, G.; Schachner, M. [2014] Tenascin-R promotes assembly of the extracellular matrix of perineuronal nets via clustering of aggrecan. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 369 (1654), 20140046.

Morawski, M.; Pavlica, S.; Seeger, G.; Grosche, J.; Kouznetsova, E.; Schliebs, R.; Brückner, G.; Arendt, T. [2010c] Perineuronal nets are largely unaffected in Alzheimer model Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 31 (7), 1254–1256.

Morawski, M.; Reinert, T.; Meyer-Klaucke, W.; Wagner, F.E.; Tröger, W.; Reinert, A.; Jäger, C.; Brückner, G.; Arendt, T. [2015] Ion exchanger in the brain: Quantitative analysis of perineuronally fixed anionic binding sites suggests diffusion barriers with ion sorting properties. *Scientific reports* 5, 16471.

Mörgelin, M.; Heinegård, D.; Engel, J.; Paulsson, M. [1994] The cartilage proteoglycan aggregate: assembly through combined protein-carbohydrate and protein-protein interactions. *Biophysical chemistry* 50 (1-2), 113–128.

Morris, M.; Knudsen, G.M.; Maeda, S.; Trinidad, J.C.; Ioanoviciu, A.; Burlingame, A.L.; Mucke, L. [2015] Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* 18 (8), 1183–1189.

Morris, M.; Maeda, S.; Vossel, K.; Mucke, L. [2011] The many faces of tau. *Neuron* 70 (3), 410–426.

Mukhopadhyay, R.; Hoh, J.H. [2001] AFM force measurements on microtubule-associated proteins: The projection domain exerts a long-range repulsive force. *FEBS letters* 505 (3), 374–378.

Nagy, Z.; Vatter-Bittner, B.; Braak, H.; Braak, E.; Yilmazer, D.M.; Schultz, C.; Hanke, J. [1997] Staging of Alzheimer-type pathology: an interrater-intrarater study. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 8 (4), 248–251.

Neve, R.L.; Harris, P.; Kosik, K.S.; Kurnit, D.M.; Donlon, T.A. [1986] Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387 (3), 271–280.

Nomoto, H.; Oohashi, T.; Hirakawa, S.; Ueki, Y.; Ohtsuki, H.; Ninomiya, Y. [2002] Human BRAL1 and BCAN genes that belong to the link-module superfamily are tandemly arranged on chromosome 1q21-23. *Acta medica Okayama* 56 (1), 25–29.

Nunez, J.; Fischer, I. [1997] Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration. *Journal of molecular neuroscience : MN* 8 (3), 207–222.

Nuydens, R.; Jong, M. de; **Nuyens, R.; Cornelissen, F.; Geerts, H.** [1995] Neuronal kinase stimulation leads to aberrant tau phosphorylation and neurotoxicity. *Neurobiol. Aging* 16 (3), 465–475.

Oka, T.; Tagawa, K.; Ito, H.; Okazawa, H. [2011] Dynamic changes of the phosphoproteome in postmortem mouse brains. *PloS one* 6 (6), e21405.

Okamoto, M.; Mori, S.; Endo, H. [1994] A protective action of chondroitin sulfate proteoglycans against neuronal cell death induced by glutamate. *Brain Res.* 637 (1-2), 57–67.

Oohira, A.; Matsui, F.; Tokita, Y.; Yamauchi, S.; Aono, S. [2000] Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch. Biochem. Biophys.* 374 (1), 24–34.

Papasozomenos, S.C.; Binder, L.I. [1986] Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is present in astrocytes of the optic nerve but absent from astrocytes of the optic tract. *J. Neurosci.* 6 (6), 1748–1756.

Pelech, S.L. [1995] Networking with proline-directed protein kinases implicated in tau phosphorylation. *Neurobiol. Aging* 16 (3), 247-56; discussion 257-61.

Pelech, S.L.; Charest, D.L.; Mordret, G.P.; Siow, Y.L.; Palaty, C.; Campbell, D.; Charlton, L.; Samiei, M.; Sanghera, J.S. [1993] Networking with mitogen-activated protein kinases. *Molecular and cellular biochemistry* 127-128, 157–169.

Pesheva, P.; Probstmeier, R.; Skubitz, A.P.; McCarthy, J.B.; Furcht, L.T.; Schachner, M. [1994] Tenascin-R (J1 160/180 inhibits fibronectin-mediated cell adhesion--functional relatedness to tenascin-C. *Journal of cell science* 107 (Pt 8), 2323–2333.

Pizzorusso, T.; Medini, P.; Berardi, N.; Chierzi, S.; Fawcett, J.W.; Maffei, L. [2002] Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science (New York, N.Y.)* 298 (5596), 1248–1251.

Plouffe, V.; Mohamed, N.-V.; Rivest-McGraw, J.; Bertrand, J.; Lauzon, M.; Leclerc, N. [2012] Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PloS one* 7 (5), e36873.

Qi, H.; Cantrelle, F.-X.; Benhelli-Mokrani, H.; Smet-Nocca, C.; Buée, L.; Lippens, G.; Bonnefoy, E.; Galas, M.-C.; Landrieu, I. [2015] Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of Tau with DNA and its regulation by phosphorylation. *Biochemistry* 54 (7), 1525–1533.

Rauch, U.; Grimpe, B.; Kulbe, G.; Arnold-Ammer, I.; Beier, D.R.; Fässler, R. [1995] Structure and chromosomal localization of the mouse neurocan gene. *Genomics* 28 (3), 405–410.

Rauch, U.; Hirakawa, S.; Oohashi, T.; Kappler, J.; Roos, G. [2004] Cartilage link protein interacts with neurocan, which shows hyaluronan binding characteristics different from CD44 and TSG-6. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 22 (8), 629–639.

Rauch, U.; Meyer, H.; Brakebusch, C.; Seidenbecher, C.I.; Gundelfinger, E.D.; Beier, D.R.; Fässler, R. [1997] Sequence and chromosomal localization of the mouse brevican gene. *Genomics* 44 (1), 15–21.

Regan, P.; Whitcomb, D.J.; Cho, K. [2016] Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry.*

Reynolds, C.H.; Garwood, C.J.; Wray, S.; Price, C.; Kellie, S.; Perera, T.; Zvelebil, M.; Yang, A.; Sheppard, P.W.; Varndell, I.M.; Hanger, D.P.; Anderton, B.H. [2008] Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *The Journal of biological chemistry* 283 (26), 18177–18186.

Rhodes, K.E.; Fawcett, J.W. [2004] Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? *J. Anat.* 204 (1), 33–48.

Roder, H.M.; Ingram, V.M. [1991] Two novel kinases phosphorylate tau and the KSP site of heavy neurofilament subunits in high stoichiometric ratios. *J. Neurosci.* 11 (11), 3325–3343.

Romero, P.; Obradovic, Z.; Li, X.; Garner, E.C.; Brown, C.J.; Dunker, A.K. [2001] Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* 42 (1), 38–48.

Ross, C.A.; Poirier, M.A. [2004] Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* 10 Suppl, S10-7.

Saman, S.; Kim, W.; Raya, M.; Visnick, Y.; Miro, S.; Saman, S.; Jackson, B.; McKee, A.C.; Alvarez, V.E.; Lee, N.C.Y.; Hall, G.F. [2012] Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 287 (6), 3842–3849.

Samsonov, A.; Yu, J.-Z.; Rasenick, M.; Popov, S.V. [2004] Tau interaction with microtubules in vivo. *Journal of cell science* 117 (Pt 25), 6129–6141.

Scharf, M.T.; Mackiewicz, M.; Naidoo, N.; O'Callaghan, J.P.; Pack, A.I. [2008] AMP-activated protein kinase phosphorylation in brain is dependent on method of killing and tissue preparation. *Journal of neurochemistry* 105 (3), 833–841.

Schüppel, K.; Brauer, K.; Härtig, W.; Grosche, J.; Earley, B.; Leonard, B.E.; Brückner, G. [2002] Perineuronal nets of extracellular matrix around hippocampal interneurons resist destruction by activated microglia in trimethyltin-treated rats. *Brain Res.* 958 (2), 448–453.

Seeger, G.; Brauer, K.; Härtig, W.; Brückner, G. [1994] Mapping of perineuronal nets in the rat brain stained by colloidal iron hydroxide histochemistry and lectin cytochemistry. *Neuroscience* 58 (2), 371–388.

Seltman, R.E.; Matthews, B.R. [2012] Frontotemporal lobar degeneration: Epidemiology, pathology, diagnosis and management. *CNS drugs* 26 (10), 841–870.

Siesjö, B.K.O.; Bengtsson, F.; Grampp, W.; Theander, S. [1989] Calcium, Excitotoxins, and Neuronal Death in the Brain. *Ann NY Acad Sci* 568 (1 Calcium, Memb), 234–251.

Simón, D.; García-García, E.; Royo, F.; Falcón-Pérez, J.M.; Avila, J. [2012] Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS letters* 586 (1), 47–54.

Simons, D.J.; Land, P.W. [1987] Early experience of tactile stimulation influences organization of somatic sensory cortex. *Nature* 326 (6114), 694–697.

Song, J.; Combs, C.K.; Pilcher, W.H.; Song, L.Y.; Utal, A.K.; Coleman, P.D. [1997] Low initial tau phosphorylation in human brain biopsy samples. *Neurobiol. Aging* 18 (5), 475–481.

Sonntag, M.; Blosa, M.; Schmidt, S.; Rübsamen, R.; Morawski, M. [2015] Perineuronal nets in the auditory system. *Hear. Res.*

Spicer, A.P.; Joo, A.; Bowling, R.A. [2003] A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *The Journal of biological chemistry* 278 (23), 21083–21091.

Spicer, A.P.; Seldin, M.F.; Olsen, A.S.; Brown, N.; Wells, D.E.; Doggett, N.A.; Itano, N.; Kimata, K.; Inazawa, J.; McDonald, J.A. [1997] Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics* 41 (3), 493–497.

Spillantini, M.G.; Goedert, M. [1998] Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences* 21 (10), 428–433.

Spillantini, M.G.; Goedert, M. [2013] Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet. Neurology* 12 (6), 609–622.

Spillantini, M.G.; Goedert, M.; Crowther, R.A.; Murrell, J.R.; Farlow, M.; Ghetti, B. [1997] Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8), 4113–4118.

Spillantini, M.G.; Murrell, J.R.; Goedert, M.; Farlow, M.; Klug, A.; Ghetti, B. [2006] Mutations in the tau gene (MAPT) in FTDP-17: the family with Multiple System. *J Alzheimers Dis* 9 (3 Suppl), 373–380.

Stieber, A.; Mourelatos, Z.; Gonatas, N.K. [1996] In Alzheimer's disease the Golgi apparatus of a population of neurons without neurofibrillary tangles is fragmented and atrophic. *The American journal of pathology* 148 (2), 415–426.

Stoppini, L.; Buchs, P.-A.; Muller, D. [1991] A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods* 37 (2), 173–182.

Sundstrom, L.; Morrison, B.; Bradley, M.; Pringle, A. [2005] Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug Discov. Today* 10 (14), 993–1000.

Suttkus, A. [2008] Potentielle Neuroprotektion perineuronaler Netze extrazellulärer Matrix in organotypischen Schnittkulturen. Diplomarbeit. Universität Leipzig, Leipzig. Institut für Biologie II der Fakultät für Biowissenschaften, Psychologie und Pharmazie.

Suttkus, A. [2013] NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF PERINEURONAL NETS: DEFINING THE ESSENTIAL COMPONENTS OF EXTRACELLULAR MATRIX. Dissertation. Universität Leipzig, Leipzig. Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie.

Suttkus, A.; Holzer, M.; Morawski, M.; Arendt, T. [2016] The neuronal extracellular matrix restricts distribution and internalization of aggregated Tau-protein. *Neuroscience* 313, 225–235.

Suttkus, A.; Rohn, S.; Weigel, S.; Glöckner, P.; Arendt, T.; Morawski, M. [2014] Aggrecan, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Cell Death Dis* 5, e1119.

Takei, Y.; Teng, J.; Harada, A.; Hirokawa, N. [2000] Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *The Journal of cell biology* 150 (5), 989–1000.

Thurston, V.C.; Pena, P.; Pestell, R.; Binder, L.I. [1997] Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell motility and the cytoskeleton* 38 (1), 100–110.

Toole, B.P. [2004] Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature reviews. Cancer* 4 (7), 528–539.

Trinczek, B.; Biernat, J.; Baumann, K.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. [1995] Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Molecular biology of the cell* 6 (12), 1887–1902.

Usardi, A.; Pooler, A.M.; Seereeram, A.; Reynolds, C.H.; Derkinderen, P.; Anderton, B.H.; Hanger, D.P.; Noble, W.; Williamson, R. [2011] Tyrosine phosphorylation of tau regulates its interactions with Fyn SH2 domains, but not SH3 domains, altering the cellular localization of tau. *The FEBS journal* 278 (16), 2927–2937.

Uversky, V.N. [2002] What does it mean to be natively unfolded? *European journal of biochemistry* 269 (1), 2–12.

Uversky, V.N. [2015] Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Frontiers in aging neuroscience* 7, 18.

Uversky, V.N.; Gillespie, J.R.; Fink, A.L. [2000] Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins* 41 (3), 415–427.

Van Hoesen, G.W.; Hyman, B.T. [1990] Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* 83, 445–457.

Van Hoesen, G.W.; Hyman, B.T.; Damasio, A.R. [1991] Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus* 1 (1), 1–8.

Walker, L.C.; Diamond, M.I.; Duff, K.E.; Hyman, B.T. [2013] Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases. *JAMA neurology* 70 (3), 304–310.

Wang, D.; Fawcett, J.W. [2012] The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res.* 349 (1), 147–160.

Wang, J.; Gao, Q.-S.; Wang, Y.; Lafyatis, R.; Stamm, S.; Andreadis, A. [2004] Tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia, is regulated by an intricate interplay of cis elements and trans factors. *Journal of neurochemistry* 88 (5), 1078–1090.

Wang, Y.; Loomis, P.A.; Zinkowski, R.P.; Binder, L.I. [1993] A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *The Journal of cell biology* 121 (2), 257–267.

Wang, Y.; Zhang, Y.; Hu, W.; Xie, S.; Gong, C.-X.; Iqbal, K.; Liu, F. [2015] Rapid alteration of protein phosphorylation during postmortem: Implication in the study of protein phosphorylation. *Scientific reports* 5, 15709.

Watanabe, H.; Gao, L.; Sugiyama, S.; Doege, K.; Kimata, K.; Yamada, Y. [1995] Mouse aggrecan, a large cartilage proteoglycan: protein sequence, gene structure and promoter sequence. *The Biochemical journal* 308 (Pt 2), 433–440.

Weber, P.; Bartsch, U.; Rasband, M.N.; Czaniera, R.; Lang, Y.; Bluethmann, H.; Margolis, R.U.; Levinson, S.R.; Shrager, P.; Montag, D.; Schachner, M. [1999] Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J. Neurosci.* 19 (11), 4245–4262.

Wegner, F.; Härtig, W.; Bringmann, A.; Grosche, J.; Wohlfarth, K.; Zuschratter, W.; Brückner, G. [2003] Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABAA receptor a1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* (184), 705–714.

Wei, Y.; Qu, M.-H.; Wang, X.-S.; Chen, L.; Wang, D.-L.; Liu, Y.; Hua, Q.; He, R.-Q. [2008] Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PloS one* 3 (7), e2600.

Weingarten, M.; Lockwood, A.H.; Hwo, S.Y.; Kirschner, M.W. [1975] A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5), 1858–1862.

Williams, D.R. [2006] Tauopathies: classification and clinical update on neurodegenerative diseases associated with microtubule-associated protein tau. *Internal medicine journal* 36 (10), 652–660.

Witman, G.B.; Cleveland, D.W.; Weingarten, M.; Kirschner, M.W. [1976] Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (11), 4070–4074.

Wong, P.C.; Cai, H.; Borchelt, D.R.; Price, D.L. [2002] Genetically engineered mouse models of neurodegenerative diseases. *Nat. Neurosci.* 5 (7), 633–639.

Woody, R.W.; Clark, D.C.; Roberts, G.C.; Martin, S.R.; Bayley, P.M. [1983] Molecular flexibility in microtubule proteins: Proton nuclear magnetic resonance characterization. *Biochemistry* 22 (9), 2186–2192.

Wright, P.E.; Dyson, H.J. [1999] Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of molecular biology* 293 (2), 321–331.

Wu, J.W.; Herman, M.; Liu, L.; Simoes, S.; Acker, C.M.; Figueroa, H.; Steinberg, J.I.; Margittai, M.; Kayed, R.; Zurzolo, C.; Di Paolo, G.; Duff, K.E. [2013] Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *The Journal of biological chemistry* 288 (3), 1856–1870.

Xia, G.; Gao, Y.; Jin, S.; Subramony, S.H.; Terada, N.; Ranum, L.P.W.; Swanson, M.S.; Ashizawa, T. [2015] Genome modification leads to phenotype reversal in human myotonic dystrophy type 1 induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 33 (6), 1829–1838.

Yamada, K.; Cirrito, J.R.; Stewart, F.R.; Jiang, H.; Finn, M.B.; Holmes, B.B.; Binder, L.I.; Mandelkow, E.-M.; Diamond, M.I.; Lee, V.M.-Y.; Holtzman, D.M. [2011] In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J. Neurosci.* 31 (37), 13110–13117.

Yamaguchi, Y. [2000] Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2), 276–289.

Yan, S.D.; Chen, X.; Schmidt, A.M.; Brett, J.; Godman, G.; Zou, Y.S.; Scott, C.W.; Caputo, C.; Frappier, T.; Smith, M.A. [1994] Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (16), 7787–7791.

Yasuhara, O.; Akiyama, H.; McGeer, E.G.; McGeer, P.L. [1994] Immunohistochemical localization of hyaluronic acid in rat and human brain. *Brain Res.* 635 (1-2), 269–282.

Yoshida, H.; Ihara, Y. [1993] Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: Assembly incompetence of paired helical filament-tau. *Journal of neurochemistry* 61 (3), 1183–1186.

Zhou, X.-H.; Brakebusch, C.; Matthies, H.; Oohashi, T.; Hirsch, E.; Moser, M.; Krug, M.; Seidenbecher, C.I.; Böckers, T.M.; Rauch, U.; Buettner, R.; Gundelfinger, E.D.; Fassler, R. [2001] Neurocan Is Dispensable for Brain Development. *Mol. Cell. Biol.* 21 (17), 5970–5978.

Zimmermann, D.R.; Dours-Zimmermann, M.T. [2008] Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem. Cell Biol.* 130 (4), 635–653.

Zubenko, G.S. [1997] Molecular neurobiology of Alzheimer's disease (syndrome?). *Harvard review of psychiatry* 5 (4), 177–213.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Charakteristisches Ausbreitungsmuster der neurofibrillären Veränderungen bei der Alzheimer-Demenz nach Braak: Im linken und mittleren Bildteil sind die Veränderungen von Stadium I bis zu Stadium VI in Frontalschnitten durch den Uncusbereich der Hippocampusformation und vordere Abschnitte des Gyrus parahippocampalis dargestellt. Die Pfeile weisen auf Schlüsselmerkmale hin, die für die jeweiligen Stadien besonders typisch sind und das Bestimmen der Stadien erleichtern. Im rechten Bildteil ist die Ausbreitung der Veränderungen über eine rechte Hemisphäre in der Betrachtung von medial wiedergegeben, nach (**Braak und Braak** 1997).

Abbildung 1.2: Schema der Zusammensetzung eines perineuronalen Netzes: Der Hyaluronsäurestrang wird von Hyaluronsäuresynthetasen gebildet und auf der Oberfläche von Neuronen verankert. Die Chondroitinsulfat-Proteoglykane binden an die Hyaluronsäure, das Link-Protein stabilisiert diese Bindung und die Chondroitinsulfat-Proteoglykane werden durch Tenascin-R untereinander vernetzt, nach (**Suttkus** 2013).

Abbildung 3.1: Bildbearbeitung: Bild (A) zeigt einen fixierten Schnitt in *WFA*-Cy2-Färbung, Bild (B) den selben Schnitt in Tau-Cy3-Färbung. Mittels Photoshop (Version CS 2, Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) wurden die Bilder (A) und (B) in die Graubilder (C) und (D) umgewandelt. Aus den Graubildern wurden mittels des Programmes ACDsee (ACDsee Systems, 2000, Ltd., Version 3.0, Build 103) die Bitmaps (1bpp) (E) und (F).

Abbildung 4.1: Das grün markierte perineuronale Netz (*WFA*) ist umgeben von zahlreichen rot markierten Neuronen (*PGP9.5*) des Kortex, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 20 µm.

Abbildung 4.2: (A) und (B) zeigen gut abgrenzbare perineuronale Netze (*WFA)* in Gefrierschnitten von Wildtypmäusen im *barrel* Kortex des Somatosensorischen Kortex, in dem die Informationen der Vibrissen von Nagetieren verarbeitet werden, Neurone rot markiert (*PGP9.5*), aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Abbildung 4.3: Typen perineuronaler Netze (PN, *WFA*) in Gefrierschnitten von Wildtypen (WT) und Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen ($TnR^{-/-}$): Die PN der WT (A) und (B) zeigen eine deutlich exprimierte, gitterartige Struktur und die Dendriten erscheinen gut konturiert. Die PN der WT erscheinen somit weiter verzweigt zu sein, als die PN der $TnR^{-/-}$ (C) . Diese sehen granulärer aus und zeigen einen dickeren perisomatischen Kranz als die PN der WT, Neurone rot markiert (*PGP9.5*), aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 20 µm.

Abbildung 4.4: Typen perineuronaler Netze (PN, *WFA*) im barrel Kortex in Wildtypen (WT), nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}) und in Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen ($TnR^{-/-}$) in Gefrierschnitten: PN von WT (A) bis (H) zeigen eine deutlich exprimierte, gitterartige Struktur , wohingegen die $TnR^{-/-}$ (J) bis (L) diffusere, granuläre PN zeigen . Die PN der WT^{ChABC} (I) verlieren ihre Darstellbarkeit mit *WFA* , Neurone rot markiert (*PGP9.5*), Zellkerne blau markiert (*Hoechst 33342*), aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 50 µm.

Abbildung 4.5: Tau-Protein-Verteilung in Gefrierschnitten: Tau-Protein ist als Mikrotubuli-assoziiertes Protein ubiquitär in allen Zellen und Axonen lokalisiert, sowohl in Wildtypen (A) bis (F), als auch in Tenascin-R-*Knockout*-Mäusen, (G) bis (L), Neurone und perineuronale Netze grün markiert (*NeuN, WFA*), Tau-Protein rot markiert, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 50 µm.

Abbildung 4.6: Übersicht der Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur einer Wildtyp-Maus nach dorsaler Zugabe von 2 µl mit *Arraylt* (rot) markiertem Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml: (A) bis (D) Tau-*Liveimaging* nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h. (E) und (F) fixierter Schnitt nach 24 h, perineuronale Netze grün markiert (*WFA),* aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 1000 µm.

Abbildung 4.7: Ausbreitung des Tau-Proteins in Wildtypen im *barrel* Kortex: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) Tau-Ausbreitungsfront (rot markiert) und *WFA* 1 min nach Tau-Protein-Zugabe. (D) bis (F) *WFA* und Tau-Ausbreitungsfont 10 min nach Tau-Protein-Zugabe, (G) bis (I) *WFA* und Tau-Ausbreitungsfront 20 min nach Tau-Protein-Zugabe. Die Ausbreitungsfront bewegt sich auf die PN-tragenden Neuronenschichten (*WFA)* zu, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Abbildung 4.8: Neurone eines Wildtypen ohne perineuronale Netze (PN) mit Tau-Protein-Aufnahme: Tau-Protein (rot) wird von PN-freien Neuronen (*NeuN* hellblau) intrazellulär aufgenommen, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 50 µm.

Abbildung 4.9: Tau-Protein-Anreicherungen im *barrel* Kortex einer Wildtyp-Maus: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) *WFA* und Tau-Protein-Anreicherungen (rot markiert) 1 min nach Zugabe. (D),(E) und (F) *WFA* und Tau-Protein-Anreicherungen nach 15 min. Tau-Protein reichert sich in Kortexschichten, die zahlreiche perineuronale Netze tragen, diffus um die perineuronalen Netze an, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Abbildung 4.10: Tau-Protein-Ausbreitung und Anreicherung im *barrel* Kortex einer Wildtyp-Maus: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) *WFA* und sowohl die Tau-Ausbreitungsfront als auch Tau-Protein-Anreicherungen (rot markiert) 1 min nach Tau-Protein-Zugabe. (D), (E) und (F) *WFA*, Tau-Ausbreitungsfront und Tau-Protein-Anreicherungen nach 15 min. Die Ausbreitungsfront bewegt sich auf die PN-tragenden Neuronenschichten (*WFA)* zu und reichert sich in Kortexschichten, die zahlreiche perineuronale Netze tragen, diffus um die perineuronalen Netze an, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 *µ*m.

Abbildung 4.11: Übersicht der Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur einer Tenascin-R-*Knockout*-Maus nach dorsaler Zugabe von 2 µl mit *Arraylt* (rot) markiertem Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml: (A) bis (D) Tau-*Liveimaging* nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h. (E) und (F) fixierter Schnitt nach 24 h, perineuronale Netze grün markiert (*WFA)*, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 1000 µm.

Abbildung 4.12: Tau-Ausbreitungsfront in der Schnittkultur einer Tenascin-R-*Knockout-Maus* im *barrel* Kortex: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) Tau-Ausbreitung (rot markiert) und *WFA* 1 min nach Zugabe. (D) bis (F) *WFA* und Tau-Ausbreitung 10 min nach Zugabe. (G) bis (I) *WFA* und Tau-Ausbreitung 20 min nach Zugabe. Die Ausbreitungsfront bewegt sich auf die PN-tragenden Neuronenschichten (*WFA)* zu, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Abbildung 4.13: Tau-Protein-Anreicherungen innerhalb einer der Kortexschichten, die reich an perineuronalen Netzen ist, in einer Tenascin-R-*Knockout-Maus* im *barrel* Kortex: (A) Perineuronale Netze (*WFA)* zum Zeitpunkt der Tau-Protein-Zugabe, (B) und (C) Tau-Protein-Anreicherungen (rot markiert) und *WFA* 1 min nach Zugabe. (D) bis (F) *WFA* und Tau-Protein-Anreicherungen 10 min nach Zugabe. (G) bis (I) *WFA* und Tau-Protein-Anreicherung 2 h nach Zugabe. Tau-Protein reichert sich in Kortexschichten, die zahlreiche perineuronale Netze tragen, diffus um die perineuronalen Netze an, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Abbildung 4.14: Tau-Protein-Anreicherungen an perineuronalen Netzen (PN) in Wildtypen (WT) und Tenascin-R-*Knockout* ($TnR^{-/-}$): (A), (C) und (E) zeigen die PN (grün markiert) von WT, an denen sich zugegebenes Tau-Protein (rot markiert) direkt an den PN angelagert hat. (B), (D) und (F) zeigen die PN von $TnR^{-/-}$ ohne Anreicherung von Tau-Protein, aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 20 µm.

Abbildung 4.15: Übersicht der Tau-Protein-Verteilung in der Schnittkultur einer Wildtyp-Maus nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}) und nach dorsaler Zugabe von 2 µl mit *Arraylt* (rot) markiertem Tau-Protein in einer Konzentration von 1 mg/ml: (A) bis (D) Tau-*Liveimaging* nach 30 min, 60 min, 2 h und 4 h. (E) und (F) fixierter Schnitt nach 24 h, perineuonale Netze grün markiert (*ab1031*) aufgenommen mit Fluoreszenz-Mikroskopie, Skala 100 µm.

Abbildung 4.16: Boxplot der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein bei den fixierten Wildtypen: Die berechneten *W1* (Mittelwerte der Differenz von perineuronalen Netzen und Tau-Protein) unterscheiden sich signifikant von den beiden berechneten Rauscharten *R1* (Rauschart 1) und *R2* (Rauschart 2).

Abbildung 4.17: Boxplot der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein bei den fixierten Tenascin-R-*Knockout*: Die berechneten *W1* (Mittelwerte der Differenz von perineuronalen Netzen und Tau-Protein) unterscheiden sich signifikant von den beiden berechneten Rauscharten *R1* (Rauschart 1) und *R2* (Rauschart 2).

Abbildung 4.18: Abbildung 4.18: Boxplot der quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Die berechneten *W1* (Mittelwerte der Differenz von perineuronalen Netzen und Tau-Protein) aller fixierten WT^{ChABC} unterscheiden sich signifikant von der berechneten Rauschart 2 (*R2)*. Die berechneten *W1* aller fixierten WT^{ChABC} unterscheiden sich im Unterschied zu den Wildtypen und den Tenascin-R-*Knockout* nicht von der berechneten Rauschart 1 (*R1).*

Abbildung 4.19: Boxplot der korrigierten Mittelwerte der Differenz von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein (*W2*) der genutzen Mauslinien und ihrer Konditionen: Verglichen wurden Wildtypen der Mauslinien *C57Bl6* (WT) und deren Tenascin-R-*Knockout* ($TnR^{-/-}$) sowie WT nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}). Die berechneten *W2* der WT und die berechneten W*2* der $TnR^{-/-}$ unterscheiden sich nicht. Die berechneten *W2* aller fixierten WT^{ChABC} unterscheiden sich signifikant von den berechneten W*2* der WT und den berechneten W*2* der $TnR^{-/-}$.

Abbildung 4.20: Darstellung der Signifikanzentwicklung in Boxplots der berechneten *W1* (Mittelwerte), *R1* (Rauschart 1) und *R2* (Rauschart 2) zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein während des *Liveimaging* bei den Wildtypen (WT) und den Tenascin-R-*Knockout* ($TnR^{-/-}$) nach 30 min, 60 min, 2 h, 4 h und 24 h: Die *W1* wurden mit ihren *R1* und *R2* zum jeweiligen Zeitpunkt verglichen. Die *W1* und *R2* sind bereits nach 30 min signifikant unterschiedlich. Die *W1* und *R1* sind nach 24h signifikant unterschiedlich.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Entwicklung der perineuronalen Netze (PN) im Mausgehirn.

Tabelle 1.2: Ausprägung von perineuronalen Netzen (PN) in verschiedenen Anteilen des Rattengehirns (**Seeger** et al. 1994).

Tabelle. 3.1: Antikörper und Färbungen für die Fluoreszenzmarkierung.

Tabelle. 3.2: Verwendete Antikörper bezogen auf die einzelnen Zellbestandteile.

Tabelle 3.3: Behandlung und verwendete Antikörper bei den organotypischen Schnittkulturen.

Tabelle 4.1: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen: Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.2: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen: Wilcoxon-Test – Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.3: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout*: Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.4: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout*: Wilcoxon-Test – Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.5: Vergleich der quantitativ berechneten Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen und Tenascin-R-*Knockout*: Mann-Whitney-Test - Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.6: Vergleich der quantitativ berechneten Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen und Tenascin-R-*Knockout*: Mann-Whitney-Test - Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.7: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.8: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Wilcoxon-Test – Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.9: Vergleich der quantitativ berechneten Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen (WT) und nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Mann-Whitney-Test - Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 4.10: Vergleich der quantitativ berechneten Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen (WT) und nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (WT^{ChABC}): Mann-Whitney-Test - Statistik für Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 8.1: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen für *Liveimaging*: Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 8.2: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen für *Liveimaging* für Rauschart 1: Wilcoxon-Test – Statistik Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 8.3: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen für *Liveimaging* für Rauschart 2: Wilcoxon-Test – Statistik Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 8.4: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout* für *Liveimaging*: Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 8.5: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout* für *Liveimaging* für Rauschart 1: Wilcoxon-Test – Statistik Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Tabelle 8.6: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout* für *Liveimaging* für Rauschart 2: Wilcoxon-Test – Statistik Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

8 Anlagen

8.1 Statistik zur quantitative Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Aufnahmen von organotypischen Schnittkulturen während des *Liveimaging*

Tabelle 8.1: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen für *Liveimaging*: Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

			N	**Mittlerer Rang**	**Rangsumme**
Rauschart 1 – Mittelwerte	nach 24 h	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	9	5,00	45,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		
	nach 4 h	Negative Ränge	6	4,17	25,00
		Positive Ränge	3	6,67	20,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		
	nach 2 h	Negative Ränge	8	4,75	38,00
		Positive Ränge	1	7,00	7,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		
	nach 60 min	Negative Ränge	5	5,20	26,00
		Positive Ränge	4	4,75	19,00
		Bindungen	0		

		Gesamt	9		
	nach 30 min	Negative Ränge	6	4,50	27,00
		Positive Ränge	3	6,00	18,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		
Rauschart 2 - Mittelwerte	nach 24 h	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	9	5,00	45,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		
	nach 4 h	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	9	5,00	45,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		
	nach 2 h	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	9	5,00	45,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		
	nach 60 min	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	9	5,00	45,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		
	nach 30 min	Negative Ränge	1	3,00	3,00
		Positive Ränge	8	5,25	42,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	9		

Negative Ränge: Rauschart < Mittelwerte
Positive Ränge: Rauschart > Mittelwerte
Bindungen: Rauschart = Mittelwerte

Tabelle 8.2: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen für *Liveimaging* für Rauschart 1: Wilcoxon-Test – Statistik Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3

Rauschart 1 – Mittelwert	**nach 24 h**	**nach 4 h**	**nach 2 h**	**nach 60 min**	**nach 30 min**
Z (basiert auf negativen Rängen)	-2,666	-2,96	-1,836	-,415	-,533
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,008	,767	,066	,678	,594
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,004	,820	,074	,734	,652
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,002	,410	,037	,367	,326
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002	,043	,010	,041	,041

Tabelle 8.3: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Wildtypen für *Liveimaging* für Rauschart 2: Wilcoxon-Test – Statistik Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Rauschart 2 – Mittelwert	**nach 24 h**	**nach 4 h**	**nach 2 h**	**nach 60 min**	**nach 30 min**
Z (basiert auf negativen Rängen)	-2,666	-2,666	-2,666	-2,666	-2,310
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,008	,008	,008	,008	,021
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,004	,004	,004	,004	,020
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,002	,002	,002	,002	,010
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,002	,002	,002	,002	,004

Tabelle 8.4: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout* für *Liveimaging*: Wilcoxon-Test – Ränge, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

			N	**Mittlerer Rang**	**Rangsumme**
Rauschart 1 – Mittelwerte	nach 24 h	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	6	3,50	21,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		
	nach 4 h	Negative Ränge	2	3,00	6,00
		Positive Ränge	4	3,75	15,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		
	nach 2 h	Negative Ränge	2	5,00	10,00
		Positive Ränge	4	2,75	11,00
		Bindungen	0		

		Gesamt	6		
	nach 60 min	Negative Ränge	3	4,00	12,00
		Positive Ränge	6	3,00	9,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		
	nach 30 min	Negative Ränge	4	3,75	15,00
		Positive Ränge	2	3,00	6,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		
Rauschart 2 - Mittelwerte	nach 24 h	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	6	3,50	21,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		
	nach 4 h	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	6	3,50	21,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		
	nach 2 h	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	6	3,50	21,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		
	nach 60 min	Negative Ränge	0	,00	,00
		Positive Ränge	6	3,50	21,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		
	nach 30 min	Negative Ränge	1	3,00	3,00
		Positive Ränge	6	3,50	21,00
		Bindungen	0		
		Gesamt	6		

Negative Ränge: Rauschart < Mittelwerte
Positive Ränge: Rauschart > Mittelwerte
Bindungen: Rauschart = Mittelwerte

Tabelle 8.5: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout* für *Liveimaging* für Rauschart 1: Wilcoxon-Test – Statistik Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Rauschart 1 – Mittelwert	**nach 24 h**	**nach 4 h**	**nach 2 h**	**nach 60 min**	**nach 30 min**
Z (basiert auf negativen Rängen)	-2,201	-,943	-,105	-,314	-,943
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,028	,345	,917	,753	,345
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,031	,438	1,000	,844	,438
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,016	,219	,500	,422	,219
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,016	,063	,078	,078	,063

Tabelle 8.6: Berechnung zur quantitativen Auswertung der Verteilung von perineuronalen Netzen und zugegebenem Tau-Protein in Tenascin-R-*Knockout* für *Liveimaging* für Rauschart 2: Wilcoxon-Test – Statistik Test, Berechnungen mit SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 19), siehe Kapitel 3.2.3.

Rauschart 2 – Mittelwert	**nach 24 h**	**nach 4 h**	**nach 2 h**	**nach 60 min**	**nach 30 min**
Z (basiert auf negativen Rängen)	-2,201	-2,201	-2,201	-2,201	-2,201
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,028	,028	,028	,028	,028
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,031	,031	,031	,031	,031
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,016	,016	,016	,016	,016
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,016	,016	,016	,016	,016

8.2 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

..19.09.2018.....	...S. Bachstein.....
Datum	Unterschrift

8.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Susann Bachstein
Geburtsname	Becker
Geburtsdatum	15. 10. 1988
Geburtsort	Leipzig
Nationalität	deutsch
Anschrift	Saxoniastraße 2, 04319 Leipzig

Schulbildung

1995 - 1999	Besuch der Grundschule in Thammenhain
1999 - 2007	Besuch des Magnus-Gottfried-Lichtwer Gymnasiums Wurzen
Schulabschluss 2007	Abitur

Hochschulstudium

2007 - 2013	Studium Humanmedizin an der Universität Leipzig
15.09.2009	Abschluss des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
16.10.2013	Abschluss des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

01.01.2014 – 02.08.2016	Weiterbildungsassistentin im Neurologischen Rehabilitationszentrum Leipzig
03.08.2016 – 15.04.2017	Unterbrechung durch Mutterschutz und Elternzeit
24.04.2016 – 31.10.2017	Weiterbildungsassistentin bei Dr. med. Hagen Jung, Facharzt für Orthopädie, Straße des Friedens 18, 04668 Grimma
01.11.2017 – 31.03.2018	Weiterbildungsassistentin bei Dipl.-Med. Maren Vetterlein, Fachärztin für Pädiatrie, August-Bebel-Straße 20, 04668 Grimma
01.04.2018 – heute	Weiterbildungsassistentin bei Dr. med. Andreas Schwittay, Facharzt für Innere Medizin, Leipziger Straße 2, 04564 Böhlen

8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mich während der Bearbeitung dieser Dissertationsarbeit begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Arendt bedanken. Er ließ sich von mir überzeugen und gab mir die Möglichkeit, meine Kenntnisse und Fertigkeiten in Form dieser Dissertationsarbeit unter Beweis zu stellen. Des Weiteren scheute er keine Mühe, mich bei den statistischen Berechnungen beratend zu unterstützen.

Weiter möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Anne Suttkus für ihre Betreuung bedanken. Sie weihte mich in die Feinzüge der Methodik ein und las die hier angefertigte Arbeit mehrfach Korrektur. Besonders möchte ich nochmal Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. Markus Morawski hervorheben, der trotz geringer Zeit meine Promotionsarbeit weiter begleitete. Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Paul-Flechsig-Instituts, die mir stets alle Fragen beantwortet haben.

Zum Schluss danke ich meinem Ehemann und meiner Familie, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich in jeder ihnen möglichen Art und Weise unterstützen. Hervorzuheben ist dabei meine Schwester, Nicole Becker, die die hier angefertigte Arbeit vielfach Korrektur las und durch konstruktive Kritik maßgeblich zum Gelingen beigetragen hat.