

Axodendritische Verteilung der Isoformen von Tau in primären neuronalen Zellkulturmodellen der Demenz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Dr. rer. nat. **Hans Zempel**

aus Steinbach Cadolzburg

2019

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Stefan Remy
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Albert J. Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.3.2019

Aus dem Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen

Direktor: Prof. Dr. Dr. Pierluigi Nicotera

und

der Poliklinik für Epileptologie, Universitätsklinikum Bonn

Direktor: Prof. Dr. Christian E. Elger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Material und Methoden	7
1.3 Ergebnisse	9
1.3.1 Ergebnisse Publikation 1: Kultivierung primärer Neuronen bis zur Ausreifung unter kontrollierten Bedingungen	9
1.3.2 Ergebnisse Publikation 2: Transfektionsmethoden für die Analyse von Tau-Isoformen in primären Neuronenkulturen	10
1.3.3 Ergebnisse Publikation 3: Unterschiedliche axodendritische Verteilung der Tau-Isoformen	10
1.4 Diskussion der Ergebnisse	15
1.4.1 Notwendigkeit der Etablierung von niedrig-exprimierenden Systemen in neuronalen Zellmodellen von Tauopathien	15
1.4.2 Selektivität der TDB und Einfluss des dendritischen Taus	16
1.4.3 Strukturelle Besonderheiten der TDB und Konsequenzen für den Pathomechanismus von Tauopathien	18
1.4.4 Bedeutung der Erkenntnisse für die Demenzforschung und Ausblick	21
1.5 Zusammenfassung aller in dieser Arbeit zusammengeführten Veröffentlichungen	22
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	24
2. Veröffentlichungen: Titelseiten inklusive englischem Abstrakt, Keywords und Autoren	30
2.1 Publikation 1: Tracking Tau in Neurons: How to Grow, Fix, and Stain Primary Neurons for the Investigation of Tau in All Developmental Stages	30
2.2 Publikation 2: Tracking Tau in Neurons: How to Transfect and Track Exogenous Tau into Primary Neurons	31
2.3 Publikation 3: Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau are isoform-specific and determined by axon initial segment architecture	32
3. Danksagung	33

Abkürzungsverzeichnis

AD – Alzheimer Demenz

AIS – Axonales Initiales Segment

EB – End-bindend

f-Aktin – Filamentöses Aktin

FTD – Frontotemporale Demenz

FTLD-Tau – Frontotemporale Lobäre Degeneration mit Tauopathie

GSK – Glykogen Synthase Kinase

MAP – Mikrotubuli-Assoziiertes Protein

MT – Mikrotubulus

N – N-terminaler Insert

NS21 – Neuronales (Zellkultur) Supplement mit 21 Inhaltsstoffen

R – Repeat Domäne von Tau

STED – Stimulated Emission Depletion (hochauflösende Mikroskopie)

TauD2 – mit Dendra2 fusioniertes Tau Protein

TauKO – Tau Knockout

TDB – Tau Diffusionsbarriere

ZNS/CNS – Zentrales Nervensystem

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Tau ist eines der wichtigsten Mikrotubuli-assoziierten Proteine in Neuronen und stabilisiert axonale Mikrotubuli (Morris et al., 2011; Wang and Mandelkow, 2016). Tau wird allgemein als axonales Protein in ausdifferenzierten Neuronen betrachtet (Binder et al., 1985), bei der Alzheimerschen Erkrankung (Alzheimer Demenz, AD) und vielen weiteren Tauopathien wird Tau aber in das somatodendritische Kompartiment von Neuronen fehlverteilt (Ballatore et al., 2007; Braak and Braak, 1991). In Maus- und Zellkulturmodellen der AD sowie der Frontotemporalen Lobären Degeneration mit Tauopathie (FTLD-Tau) korreliert die Missverteilung von Tau mit dem Verlust von Synapsen und kognitiven sowie funktionellen Einbußen (Hoover et al., 2010; Van Der Jeugd et al., 2012; Zempel et al., 2010).

Im menschlichen zentralen Nervensystem kommt Tau in 6 Splice-Isoformen vor, die sich in der Ab- oder Anwesenheit von 2 N-terminalen Inserts (0N, 1N und 2N-Tau) und der Ab- oder Anwesenheit der 2. (von insgesamt 4) Repeat-Domäne (3R oder 4R-Tau) unterscheiden. Im erwachsenen Menschen sind die beiden 2N beinhaltenden Isoformen (also 2N3R und 2N4R) unterrepräsentiert, mit einem Anteil von jeweils 3-4 %, im Vergleich zu 16,7 % wären alle 6 Isoformen im gleichen Verhältnis vorhanden (Andreadis, 2012; Tratzuni et al., 2012) (siehe auch Tabelle 1). In adulten Mäusen wiederum sind lediglich die 4R Isoformen (also 0N4R, 1N4R, 2N4R) zu ähnlichen Anteilen exprimiert (jeweils 20-40 %), während als 3R Isoform lediglich 0N3R und nur in der Entwicklung exprimiert wird (Bullmann et al., 2009; Bullmann et al., 2010). Das Isoformverhältnis von Tau während der neuronalen Differenzierung im Menschen ist nicht hinreichend untersucht. Der Einfluss der Isoformen von Tau auf die pathologischen Prozesse neurodegenerativer Erkrankung ist unklar.

Tab. 1: mRNA und Proteinmengen der Tau Isoformen von Mensch und Maus.

Tau Klon Name	analoge Isoform N: Inserts R: Repeats	Isoform Fraktion adulter humaner mRNA (*)	Isoform Faktion (adult, human, Cortex) Protein # (**)	Isoform Faktion (adult, Maus) mRNA (***)	Isoform Faktion (adult, Maus) Protein (***)
hTau40	2N4R	3	8 (+/-7)	38	38
hTau34	1N4R	24	23	30	41
hTau24	0N4R	23	13	32	21
hTau39	2N3R	4	3	n.a.	n.a.
hTau37	1N3R	25	26	n.a.	n.a.
hTau23	0N3R	21	19	<1	<1

Die Werte in Spalte 4 ergeben summiert nicht 100 %, wahrscheinlich aufgrund von Messungenauigkeit in (Trabzuni et al., 2012). * (Andreadis, 2012) ** (Trabzuni et al., 2012), *** (Bullmann et al., 2009,2010)

Die Wichtigkeit der Isoformen ist insofern belegt, als abnormales Splicing, welches lediglich das Verhältnis der Isoformen untereinander verändert, nicht aber die Tau Menge insgesamt, ausreicht um FTLD-Tau auszulösen (Andreadis, 2012; Hutton et al., 1998; Takeda et al., 2013). Bei anderen Tauopathien bestehen die pathologischen Tau Ablagerungen (welche sich größtenteils im somatodendritischem Kompartiment ausbreiten, also missverteilt sind) aus 3R-Tau (Morbus Pick) oder 4R-Tau (Kortikobasale Degeneration, Progressive Supranukleäre Blickparese), bei AD aus 3R-Tau und 4R-Tau, und bei familiären Formen der FTLD-Tau können sie sowohl aus 3R-Tau, 4R-Tau, oder beiden bestehen (Dickson et al., 2011). Weiterhin ist das Interaktom der einzelnen Tau Isoformen unterschiedlich (Liu et al., 2016). Trotz dieser Hinweise auf einen bedeutenden Einfluss der Isoformverteilung oder einzelner Isoformen auf die Entstehung oder Entwicklung der Tau Pathologie ist die Verteilung der Isoformen nicht ausreichend untersucht.

Generell wird Tau als axonales Protein angesehen, allerdings ist der Mechanismus der zur polarisierten Verteilung von Tau führt, nicht geklärt. Folgende Mechanismen werden diskutiert: 1. Präferenzielle Bindung von Tau an axonale Mikrotubuli; 2. Schnellere Degradation von Tau im somatodendritischen Kompartiment (Hirokawa et al., 1996); 3. Transport in und Translation von Tau mRNA im Axon (Aronov et al., 2001; Aronov et al., 2002); 4. Präferenzielle Translation von Tau mRNA im Axon (Morita and Sobue, 2009); 5. Retention von Tau im Axon durch eine Barriere zwischen dem somatodendritischen und dem axonalen Zellkompartiment der Neuronen. Eine solche Barriere existiert für Tau, die

sogenannte Tau-Diffusions-Barriere (TDB) und wurde kürzlich von unserem Labor beschrieben (Li et al., 2011).

Der Großteil der Proteinsynthese findet im Zellkörper statt, daher muss Tau um seinen Zielort - das neuronale Axon - zu erreichen, das sogenannte Axon-Initiales-Segment (AIS) passieren. Das AIS koinzidiert örtlich mit der TDB (Li et al., 2011). Die molekulare Struktur des AIS und insbesondere dessen Auswirkung auf die Barrierefunktionen sind nicht hinreichend geklärt.

Das AIS selbst sowie die neuronale Polarität werden früh in der neuronalen Entwicklung *in vivo* etabliert und können *in vitro* nachgestellt werden. Mit dem Aussprossen des Axons wird Tau in etwa gleichzeitig im Axon angereichert (Dotti et al., 1988; Zempel and Mandelkow, 2014). Gleichermaßen verändert sich die Isoformzusammensetzung von Tau vom fötalen zum adulten Verhältnis, aufgrund von alternativem Splicing (Tabelle 1). Während der neuronalen Entwicklung und während neurodegenerativer Prozesse wird Tau durch verschiedene Kinasen phosphoryliert. Eine dieser Kinasen, welche auch einen Einfluss auf die Struktur des AIS hat, ist die Glykogen-Synthase-Kinase-3-beta (GSK3beta).

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe von uns entwickelten und definierten zellbiologischen Methoden die unterschiedliche Isoformverteilung von Tau und deren Einfluss auf die für neurodegenerativen Erkrankungen typische Fehlverteilung von Tau untersucht.

1.2 Material und Methoden

Zellkultur- und Transfektionsmethoden:

Dissoziierte Vorderhirnneuronen wurden aus Embryonen am Embryonaltag 16 im Falle von C57BL6JRj Wildtyp oder Tau Knockout (TauKO) Mäusen, bzw. aus Embryonen Embryonaltag 18 im Falle von Rattenneuronen, gewonnen und mit NS21 (Panbiotech) versetztem Neuronalmedium (Gibco) bis zu unterschiedlichen Differenzierungsstufen wie indiziert kultiviert (Publikation 1,3) (Zempel and Mandelkow, 2017; Zempel et al., 2017a).

Transfektionen wurden mithilfe von Lipofectamine (Invitrogen) nach Herstellerangaben und wie beschrieben durchgeführt (Publikation 2, 3) (Li et al., 2011; Zempel et al., 2017b; Zempel et al., 2017a). Für niedrige Expressionsniveaus wurden 1,2 µg DNA /construct/well einer 6-well Platte in 1ml konditioniertem Medium eingesetzt, die Hälfte (also 0,6 µg DNA und 0,5 ml konditioniertes Medium) für 12- und 24-well Platten in 0,5 ml konditioniertem Medium verwendet. Die Dauer der Transfektionen war 3 h für Zellen jünger als 14 Tage, und 6 h für Zellen älter als 14 Tage. Expressionszeiten waren 4-6 Tage für niedrige, endogen-ähnliche Expressionsniveaus mit dem Protokoll wie oben beschrieben, sowie 2-4 Tage für hohe Expressionslevel mit Standardtransfektion nach Herstellerangaben.

Mikroskopische Untersuchungsmethoden:

Hochauflösende Mikroskopieverfahren (Superresolution Microscopy/ Nanoscopy) wurden an einem gSTED System auf Basis eines TCS SP8 Mikroskops (beides Leica) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten sekundären Antikörper waren CF488 (VWR) oder Alexa488 (Dianova), mit AntifadeGold Einbettmedium (Invitrogen). Bildanalyse und Prozessierung erfolgten mittels der Herstellersoftware (Leica LAS AF und Leica LAS AF Lite). Die Mikrotubulistabilisierung während der Extraktion (zur besseren Visibilität von Mikrotubuli), welche für die Nanoskopie Aufnahmen verwendet wurden, waren: 3 min Extraktion der Zellen auf Raumtemperatur in Mikrotubulistabilisierungspuffer (PEM Puffer (2 % Polyethylene Glycol (MW: 10.000), 100 mM PIPES-KOH, pH 6.9, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA), sowie 1 % Triton-X-100 und 2 µM Taxol (alle Sigma, VWR). Zellen wurden dann mit 3,7 % Formaldehyd und 0,5 % Glutaraldehyd in PEM-Puffer für 20 min fixiert. Mitochondrien und EB3-Lebendzellbeobachtungen wurden in 2s Intervallen mit einem Leica DM6000 mithilfe von MetaMorph-Software durchgeführt und analysiert. Photokonvertierungsexperimente wurden auf einem FV-1000 konfokalen invertierten Mikroskop mit FRAP unit (Olympus) mit den photokonvertierbaren Proteinen PSCFP2 und Dendra2 durchgeführt.

Weitere Methoden:

Biochemische Standardmethoden (Western Blots, enzymatische Essays) sind im Detail in den Publikation beschrieben (Publikation 1,2,3). Dephosphorylierung von Tau wurde mit Alkalischer Phosphatase (FastAP, ThermoFisher Scientific) für 16 h durchgeführt.

Oligomeres Amyloid-beta wurde aus einer Mischung von Abeta40 und Abeta42 (im Verhältnis 7:3) in einer Konzentration von 100 μ M für 1 h bei 37 °C inkubiert (für Details siehe (Zempel et al., 2010; Zempel et al., 2013)).

Beiträge anderer Wissenschaftler:

Die Beiträge anderer Wissenschaftler, die zu den hier aufgelisteten Publikationen geführt haben sind in den Acknowledgements und den Author contributions der einzelnen Publikationen aufgeführt. Herauszuheben sind aus der AG Mandelkow insbesondere die technische Unterstützung von Julia Lüdtko in allen Arbeiten, sowie die initialen mikroskopischen Untersuchungen von Yatender Kumar zur TDB mithilfe von photokonvertierbarem Tau-Dendra2, dessen Rohdaten in Figure 1 in Publikation 3 zusammengefasst sind. Die gemeinschaftliche Fortführung dieser Experimente von Frank Denissen und dem Autor resultierten in Figure 3 und Figure 7D in Publikation 3. Jacek Biernat führte maßgeblich das Design und die Produktion verwendeter Plasmide durch.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Ergebnisse Publikation 1: Kultivierung primärer Neuronen bis zur Ausreifung unter kontrollierten Bedingungen

Primäre Neurone sind ein essentielles Werkzeug für die Erforschung physiologischer und pathologischer Prozesse des Zentralen Nervensystems. Die Kultivierung von primären Neuronen bis zu höheren Reifestufen, d.h. bis zur Ausbildung von Synapsen und neuronalen Netzwerken, erforderte bisher aufwendige Prozeduren sowie die Benutzung kostenintensiver Zellkulturmedien unbekannter Rezeptur. Wir entwickelten daher ein Protokoll basierend auf einem Zusatz bekannter Zusammensetzung (Neuronal Supplement 21, NS21), welches es erlaubt primäre Neurone bis zu 6 Wochen zu kultivieren. Dieses Protokoll erfordert lediglich eine einmalige Addition (also kein Austausch) von Zellkulturmedium nach 3-4 Tagen. Durch den Austausch des teuren B27 Supplements sowie das Reduzieren der Mediumswechsel wurden deutliche finanzielle und zeitliche Einsparungen erreicht (jeweils mindestens 30 %). Weiterhin werden Methoden für

Immunofluoresz-basierte Färbungen von Tau und assoziierten Proteinen und Strukturen beschrieben, welche die weitergehende unten aufgeführte Untersuchungen ermöglichten.

1.3.2 Ergebnisse Publikation 2: Transfektionsmethoden für die Analyse von Tau-Isoformen in primären Neuronenkulturen

Neben den Schwierigkeiten der Gewinnung und der Kultivierung von primären Neuronen, sind diese Zellen insbesondere in höheren Reifestufen äußerst schwierig ohne virale Vektoren transfizierbar. Bisherige nicht-virale Transfektionsmethoden erforderten die Kultivierung in hohen Zelldichten und in Co-Kulturen mit Gliazellen, beides erschwert mikroskopische Untersuchungen. Virale Vektoren hingegen sind schwierig zu titrieren und sind in der Herstellung aufwendig. Weiterhin sind besondere, aufwendige Richtlinien (S2 Labor) zu beachten. Wir entwickelten daher ein Liposomenbasiertes Transfektionsprotokoll, was Transfektionen und Einzelzelluntersuchungen in ausgereiften Neuronen ermöglicht. Durch schonende Transfektionen und lange Expressionszeiten konnten wir weiterhin ohne starke Überexpression die unterschiedlichen Tau Isoformen und deren subzelluläre Verteilung analysieren, sowie in ausgereiften Neuronen Lebendzellbeobachtungen vornehmen.

1.3.3 Ergebnisse Publikation 3: Unterschiedliche axodendritische Verteilung der Tau-Isoformen

Isoformselektivität der Tau-Diffusionsbarriere:

In vorherigen Studien konnten wir zeigen, dass überexprimiertes Tau, markiert mit einem photokonvertierbaren Protein (Dendra2), nicht aus dem Axon heraus zurück in den Zellkörper propagieren kann. Tau wird an einer von uns so benannten Tau-Diffusions-Barriere (TDB) zurückgehalten (Li et al., 2011). Diese Experimente wurden durchgeführt, indem ein Teil des exogenen, mit Dendra2 fusionierten Tau (TauD2), im Axon durch Photokonvertierung des Dendra2 markiert wurde. Dies ermöglichte eine Verfolgung des markierten (=photokonvertierten) Taus. In der aktuellen Studie untersuchten wir ob die verschiedenen Isoformen von Tau sich bezüglich ihrer subzellulären Lokalisation

unterschiedlich verhalten. Wir fanden, dass insbesondere die größeren Tau Isoformen (also 4R-Tau) effizienter im Axon zurückgehalten werden (~5-10 % Signalstärke im Zellkörper 1 h nach Photokonvertierung im Axon). Führt man Pathologie-relevante Mutationen, abgeleitet von genetischen Varianten der Frontotemporalen Demenz und der Supranuklearen Blickparese (deltaK280 und A152T), oder Pseudophosphorylierungen (S → E in den 4 KxGS Motifen von Tau) in das Tau Protein ein, ist die Barriereneffizienz stark eingeschränkt (~25-70 % Signalstärke im Zellkörper). Die retrograde Propagation von Tau korreliert nur zum Teil mit der Mikrotubulibindung, der Größe oder der Diffusionabilität der jeweiligen Isoform oder Mutation von Tau. Andere Faktoren müssen für die physiologische Erhaltung sowie für den Zusammenbruch bei Tau-assoziierten Demenzerkrankungen also einen wesentlichen Einfluss haben.

Für die Durchführung von Photokonvertierungsexperimenten benötigt man hohe Expressionsniveaus von Tau (ca. 20-fache Überexpression), um genügend Signalstärke für Lebendzellbeobachtung zu generieren, insbesondere nach Photokonversion nur einer kleinen Population von TauD2 (Li et al., 2011; Zempel et al., 2013). Ein alternativer Ansatz zur Untersuchung der Verteilung von transfiziertem Tau wurde durch die Entwicklung o. g. Zellkultur- und Transfektionsprotokolle ermöglicht, nämlich Expression der Tau Isoformen in niedrigeren Expressionsniveaus (1-3-fache Expression von endogenem Tau), sowie in ausgereifteren Zellen (14-21 Tage *in vitro* im modifiziertem Protokoll, vs. 8-9 Tage *in vitro* im ursprünglichem Setup). Um transfiziertes von endogenem Tau zu unterscheiden, wurden entweder Kulturen von TauKO Mäusen verwendet, oder Färbungen mithilfe von humanspezifischen anti-Tau Antikörpern (CP27) angefertigt. Um Volumen-normalisierte Werte zu errechnen, wurde ein fluoreszentes Protein (tdTomato) als Volumenmarker verwendet. Während die meisten kleineren Tau Isoformen, also 3R-Taus sowie 0N4R-Tau, nach längeren Expressionszeiten (4-6 Tage) nahezu vollständig im Axon lokalisiert waren, war insbesondere die längste Tau Isoform (also 2N4R-Tau) zu einem wesentlich Teil (~30 % mehr als 0N4R und 0N3R) im Dendrit lokalisiert. Die TDB funktioniert also mindestens für 2N4R-Tau auch in anterograder Richtung. Auch hier störten Demenz-assoziierte Mutation oder Pseudophosphorylierungen das Verteilungsmuster der längsten Isoform von Tau: Alle o. g. Pathologie-assoziierten Tau-Formen (deltaK280, A152T, KxGE) konnten die Barriere sowohl in retrograder als auch anterograder Richtung überwinden.

Interessanterweise waren die Verteilungen der unterschiedlichen Isoformen von Tau unabhängig von der Präsenz von endogenem Tau, d.h. es wurden ähnliche Resultate in TauKO wie auch in Wildtyp Neuronen gefunden. Dies bedeutet, dass die Tau Verteilungsmaschinerie sich unabhängig von der Tau Präsenz während der Entwicklung herausbildet.

Dendritisches Tau beschleunigt Dendriten- und dendritisches Dornenwachstum:

In Nagetieren und Nagetierzellkulturen, wird 3R-Tau v. a. während der 1. Entwicklungswoche exprimiert, wird aber innerhalb der 2. und 3. Woche zunehmend durch 4R-Tau Isoformen ersetzt. In verschiedenen Mausmodellen, die 2N4R-Tau überexprimieren, wurde in unterschiedlichen Lebensabschnitten erhöhte Langzeitpotenzierung an Synapsen festgestellt (Kremer et al., 2011; Sydow et al., 2011), ein elektrophysiologisches Korrelat für Lernfähigkeit. Wir untersuchten daher, ob die Überexpression verschiedener Tau-Isoformen vor der Ausbildung von dendritischen Dornen die Reifung derselbigen beeinflusst. Wir fanden, dass unreifes 0N3R-Tau elongierte Dornenhäse, aber auch reife Dornenköpfe induzierte, welche aber nicht vergleichbar mit Filopodien waren. Bei den später exprimierten Tau Formen zeigte 0N4R-Tau keinen nennenswerten Effekt, während 2N4R-Tau dagegen Dornen induzierte, die von der Morphologie durchaus mit natürlich gereiften Dornen vergleichbar waren. Die anderen Tau Isoformen induzierten weniger ausgeprägtes Dornenwachstum. Die getesteten Tau-Mutationen induzierten Dornenwachstum unterschiedlichen Ausmaßes, was bedeutet dass diese Mutationen durchaus direkten Einfluss auf Dornendynamik haben könnten. Umgekehrt induzierte ein Knockdown von allen Isoformen von Tau in der Hauptentwicklungsphase von Dornen (14-21 Tage *in vitro*) einen kompletten Verlust von Dornenwachstum, in Übereinstimmung mit (Chen et al., 2012). Die o. g. Effekte waren jedoch in Neuronen von TauKO- und Wildtyp-Mäusen nicht unterscheidbar. Dies bedeutet, dass forcierte Expression von einzelnen Isoformen von Tau (also ohne die physiologische Isoformverteilung zu beachten) zu unkontrollierten Reifungsprozessen von dendritischen Dornen führt, unabhängig von der Präsenz von endogenem Tau.

Unabhängig vom Dornenwachstum induzierte exogenes Tau auch Wachstum von Dendriten, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Während die kürzeren Isoformen und die Tau-Mutanten weniger Einfluss hatten, induzierten die 2N-Isoformen (also 2N4R und 2N3R-Tau) den größten Effekt. Insgesamt korreliert das Ausmaß des Dendritenwachstums mit der dendritischen Präsenz der unterschiedlichen Tau Isoformen, mit Ausnahme von 2N3R-Tau (lediglich mittelmäßige Präsenz). Das bedeutet, dass ein dendritisches Vorkommen von Tau, oder das 2. Insert von Tau ausreicht um dendritisches Wachstum zu induzieren.

Strukturelle Besonderheiten der AIS/TDB Barriere und Perturbation durch Amyloid-beta:

Die Position der TDB korreliert sehr gut mit der Position des AIS (Li et al., 2011). Wir testeten daher welchen Einfluss wichtige Komponenten des AIS auf den Effizienz der TDB haben. Wir fanden dass Knockdown mithilfe von shRNA von NrCam (neuronales Zell Adhesions Molekül), Nav1.x (Spannungsgesteuerte Natrium Kanäle), den Strukturproteinen des AIS betaIV-Spektrin und Ankyrin G, sowie den beiden Mikrotubuli-Enden bindenden Proteine EB1 und EB3 zu einer leichten Verminderung der retrograden, im Fall von EB1 und Ankyrin G auch der anterograden Barrierefunktion (von 2N4R-TauD2) zur Folge hatte. Keiner der Knockdowns verhinderte allerdings die anterograde physiologische Sortierung von endogenem Tau. Überexpression der AIS-Kinase GSK3beta, die auch in AD eine wichtige Rolle spielt, führte zwar zu einem Verlust der Barrierefunktion, allerdings ohne den AD-typischen Verlust von Mikrotubuli, und ohne Tau selbst an AD- und GSK3beta typischen Stellen zu phosphorylieren. Zusammenfassend konnten wir hierdurch zeigen, dass die strukturelle Zusammensetzung des AIS wichtig für die physiologische Funktion der TDB ist, AD-typische Tau-Fehlverteilung aber wahrscheinlich auf einem hiervon unabhängigen Pathomechanismus beruht.

In früheren Studien konnten wir zeigen, dass Destabilisierung von MT zu einer Störung der TDB führt (Li et al., 2011), während Stabilisierung eine pathologische Umverteilung von Tau über die TDB hinweg verhindern kann (Zempel et al., 2010; Zempel et al., 2013). Wir untersuchten daher hier im Detail die Eigenschaften von Mikrotubuli im Bereich der TDB bzw. im AIS. Mithilfe von i) Antikörperfärbungen gegen Mikrotubulimodifikationen die als Marker für stabile oder dynamische Mikrotubuli eingesetzt werden, sowie differenzielle Extraktionsmethoden, ii) Lebendzellbeobachtung von EB3-markiert mit eGFP, iii) STED-

Mikroskopie/Nanoskopie von Mikrotubuli im AIS, konnten wir zeigen dass die Mikrotubuli im Bereich der TDB sehr dynamisch sind. Bemerkenswert ist hier insbesondere die Lokalisierung der dynamischen Mikrotubuli spezifisch im AIS, die Abwesenheit von Markern für stabile Mikrotubuli, sowie die hohe Dichte sowohl von endogenem als auch exogenem EB3 innerhalb des AIS.

Die Dynamik der Mikrotubuli im AIS wird durch AD-ähnlichen Stress, induziert durch Abeta-Oligomere gestört. Abeta-Oligomere binden teilweise an das AIS, zeitgleich hierzu wird das filamentöse (f-)Aktin schneidende Protein Cofilin im AIS aktiviert, und somit die Organisation des f-Aktins im AIS wird gestört. Diese Veränderungen finden innerhalb der ersten Stunde nach Exposition der primären Neuronen mit Oligomer-Abeta statt. Die Störung der Mikrotubuli Dynamik, sowie die Verhinderung des anterograden Transport von Tau, korrelieren zeitlich aber mit der folgenden Inaktivierung von Cofilin und dem Wiederaufbau von f-Aktin. Mechanistische Experimente mit den f-Aktin modifizierenden Substanzen Latrunculin A (f-Aktin destabilisierend) und Jasplakinolid (f-Aktin stabilisierend) in Kombination mit Abeta Oligomeren zeigten, dass nicht der Verlust von f-Aktin, sondern die Repolymerisation des f-Aktins im AIS das anterograde Sortieren von Tau verhindert. Weiterführende Experimente mit transfizierten markierten Tau-Isoformen zeigten, dass 0N4R-Tau besonders gut ins Axon transloziert. Eben diese Tau-Isoform wird durch Abeta-Exposition, also AD-ähnlichem Stress, im Zellkörper zurückgehalten. Andere Tau-Isoformen zeigten keinen signifikanten Effekt auf die zelluläre Verteilung nach Abeta-Exposition, oder wurden sogar, im Fall von 2N4R-Tau, besser ins Axon sortiert. Insgesamt konnten wir mit diesen Experimenten zeigen, dass nach AD-ähnlichem Zellstress die Repolymerisation von f-Aktin im AIS zu einer Ansammlung insbesondere von 0N4R-Tau im Zellkörper führt. Wir haben somit den wahrscheinlichen Pathomechanismus der Tau-Fehlverteilung verschiedener Demenzerkrankungen sowie den Einfluss der einzelnen Tau-Isoformen aufgeklärt.

1.4 Diskussion der Ergebnisse

1.4.1 Notwendigkeit der Etablierung von niedrig-exprimierenden Systemen in neuronalen Zellmodellen von Tauopathien

In der vorliegenden Arbeit etablierten wir ein neuronales Zellkultursystem mit Hilfe von primären Nagetierneuronen, auf der Basis von Zellkulturmedien und Supplementen bekannter Zusammensetzung. Das Wissen über die genaue Zusammensetzung der zu verwendeten Materialien stellt die Basis wissenschaftlichen Arbeitens dar. Mangels Alternativen für die Langzeitkultivierung von primären Neuronen wurde bisher das Zellkultursupplement B27 eingesetzt, dessen genaue Zusammensetzung aber vom Hersteller nicht offen gelegt wird. In der vorliegenden Arbeit optimierten wir ein publiziertes Protokoll für den Ersatz von B27 durch das Neuronale Supplement 21 (NS21) für die Langzeitkultivierung von primären Neuronen, und reduzierten die Anzahl der notwendigen Mediumwechsel von 1-2x wöchentlich auf eine einmalige Addition nach 3-4 Tagen in Kultur. Hierdurch konnten wir den finanziellen und zeitlichen Aufwand, den die Langzeitkultivierung von primären Neuronen mit sich bringt, auf ein Maß reduzieren, welches diese Arbeit ermöglicht hat und auch finanzschwächeren Arbeitsgruppen ermöglicht, Langzeitkultivierung von primären Neuronen durchzuführen (Publikation 1).

Weiterhin etablierten wir ein Transfektionssystem, welches es erlaubt primäre Neuronen auch in ausgereiften Stadien mit nichtviralen Vektoren zu transfizieren. Virale Vektoren sind langwierig und aufwendig in der Herstellung, und sehr variabel in der Effizienz (Titer), was eine Titrierung des Virus nötig und Vergleichbarkeit unterschiedlicher Präparationen schwierig macht. Die Titerbestimmung ist aber nicht nur von der Viruslast der jeweiligen Präparation, sondern auch durch die Lebenszeit und die Toxizität des zu exprimierenden Proteins abhängig, was das Arbeiten mit „toxischen“ Varianten beispielsweise des Tau-Proteins abgeleitet von genetischen Varianten der Frontotemporalen Demenz nochmals erschwert. Durch die Etablierung eines liposomenbasierten Systems konnten in der vorliegenden Arbeit die zelluläre Verteilung sowie morphologische Effekte (beispielsweise Dendritenwachstum) der unterschiedlichen Isoformen von Tau und pathologische Varianten des Tau-Proteins quantitativ miteinander verglichen werden. Dies ist im vorliegenden Fall besonders wichtig, da die Verteilung von Tau je nach Expressionsstärke und -dauer unterschiedlich ist. Im Falle von Tau ist eine adäquate Expression insofern

wichtig, da Tau in zu hohen Konzentrationen Mikrotubuli über-stabilisiert und sogar zu Transportdefiziten führen kann (Stamer et al., 2002; Thies and Mandelkow, 2007). Weiterhin konnte mithilfe der beschriebenen Niedrigexpressionssysteme erstmals die axonale Sortierung aller Isoformen von Tau, sowie wichtiger pathologischer Varianten von Tau, auch ohne Photokonvertierungsmethodik oder ähnlichen Pulse/Chase Methodiken, quantitativ verglichen werden (Publikationen 2, 3).

1.4.2 Selektivität der TDB und Einfluss des dendritischen Taus

In der vorliegenden Arbeit konnten wir mit Hilfe von Photokonvertierung von markiertem Tau in hohen Expressionsniveaus sowie mit Immunfluoreszenzfärbungen von Tau in niedrigen Expressionsniveaus zeigen, dass die TDB sowohl in retrograder, als auch in anterograder Richtung funktioniert – mit unterschiedlicher Effizienz. In retrograder sowie in anterograder Richtung weist die Barriere eine höhere Effizienz für die größeren Tau-Isoformen (2N3R- und 4R-Isoformen) und insbesondere für die Isoform 2N4R auf: Bei niedrigen Expressionsniveaus werden die kleineren Isoformen (alle 3R- sowie 0N4R- und 1N4R-Tau) zwar effizienter ins Axon sortiert, werden dort aber unter Überexpressionsbedingungen weniger stark zurückgehalten als die 2N4R-Isoform. Werden nun aber FTD-abgeleitete Mutationen (also deltaK280 sowie A152T) oder AD-abgeleitete Pseudophosphorylierungen (4KxGE/4KxGA) inkorporiert, verliert die TDB an Effektivität – ebenfalls retro- sowie anterograd. Dies bedeutet das weder Größe (gleiche Größe der 2N4R Isoformen mit und ohne Mutationen/Pseudophosphorylierungen) noch Mikrotubuliaffinität (in etwa gleiche Affinität der 4R-Isoformen (Gustke et al., 1994)) die unterschiedlichen Sortierungs- und Barriereneffizienzen erklären können.

Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Sortierung von (exogenem) Tau auch in Neuronen von TauKO-Mäusen ohne Differenzen zu Wildtyp-Neuronen vollzogen wird, auch für die unterschiedlichen Isoformen. Da die Transfektionen des exogenem Tau nach weitgehendem Abschluss der Polarisierung durchgeführt wurde (>7 Tage *in vitro*), bedeutet dies, dass die Tau Sortierungsmaschinerie i) auch in Abwesenheit von Tau etabliert wird, zumindest während der initialen Phase und dem Großteil der Entwicklung der neuronalen Polarisierung, oder ii) sehr schnell aufgebaut werden kann. Eine initiale

Präsenz von Tau ab Differenzierung eines Neurons ist also nicht für die Entwicklung der TDB und der Tau-Sortierungsmaschinerie nötig. Nachdem TauKO-Neurone nur leichte Polarisierungsdefizite (1-2 Tage verspätete axonale Aussprossung (Dawson et al., 2001)) aufweisen, ist hiermit gezeigt, dass Tau zwar ein gutes Markerprotein für die erfolgreiche Polarisierung, aber kein essentieller Motor für die neuronale Zellpolarität ist.

Die deutliche unterschiedliche axodendritische Verteilung geht einher mit verschiedenen dendritischen Effekten. Die beiden 2N-Isoformen (2N3R, 2N4R) von Tau induzierten eine deutliche Dendritenverlängerung, und 2N4R-Tau induzierte eine deutlich verfrühte Ausbildung von dendritischen Dornfortsätzen, die in Ihrer Morphologie reifen Dornen ähneln. Im Gegensatz dazu induzierte 0N3R-Tau Fortsätze, die am ehesten mit unreifen Filopodien verglichen werden können. Andere Tau Isoformen sowie die eingesetzten Mutationen von Tau (Δ K280, A152T, 4KxGA, 4KxGE) induzierten intermediäre Wachstums/Reifeausprägungen von dendritischen Dornen. Diese Ergebnisse korrelieren gut sowohl mit der zeitlichen Expression während der Entwicklung (0N3R wird in unreifen Zellen, die anderen Tau Isoformen während der Reifung und in reifen Zellen, 2N4R sehr spät in der Entwicklung) (Bullmann et al., 2009; Bullmann et al., 2010) und auch mit der axodendritischen Verteilung (0N3R nur im Axon, 2N4R auch ausgeprägt im Dendrit). Obwohl bisher keine ausgeprägten Defizite in der Synapsenreifung in TauKO Neuronen von Nagetieren beschrieben sind, konnten wir zeigen, dass ein akuter Knockdown von allen Tau Isoformen mittels shRNA während der kritischen Reifungsphase von postsynaptischen Dornen (>DIV12-20) zu einem nahezu vollständigen Verlust der Dornen führt, in guter Übereinstimmung mit früheren Knockdown Studien (Chen et al., 2012). Diese Ergebnisse geben starke Hinweise auf eine zumindest unterstützende Funktion der unterschiedlichen Tau-Isoformen auf das Dendriten- und Dornwachstum, deren korrekte physiologische Reifung und Funktion, und erklären zumindest teilweise die frühe Demenzentwicklung von Patienten mit pathologischen Tau-Mutationen (Goedert et al., 2012) sowie erhöhtes LTP in transgenen Mausmodellen mit erhöhter Expression von 2N4R-Tau (Boekhoorn et al., 2006; Brachet et al., 2010; Van Der Jeugd et al., 2012).

1.4.3 Strukturelle Besonderheiten der TDB und Konsequenzen für den Pathomechanismus von Tauopathien

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass akute Manipulation durch shRNA-vermittelten Knockdown der wichtigen strukturellen Komponenten des AIS (Rasband, 2010), insbesondere von EB1 und Ankyrin G, in geringerem Umfang auch von NrCAM, Nav1.x, betaIV-Spectrin und EB3, die Sortierungs-Effizienz der TDB stört. Diese leichten Perturbationen können jedoch nicht die ausgeprägte Tau-Fehlverteilung des pathologischen Prozesses der AD oder der Frontotemporalen Demenzen erklären. Auch Überexpression von GSK3beta, einer wichtigen Kinase des AIS die auch in der AD-Pathologie eine Rolle spielen soll (Hernandez et al., 2013), kann die typische AD-Pathologie mit Mikrotubuliverlust nicht erklären: Wir zeigten dass GSK3beta durch einen andersartigen Mechanismus zu Tau-Fehlverteilung *ohne* Mikrotubuliverlust führt.

Wir untersuchten daher die Mikrotubuli Eigenschaften im Umfeld der TDB, also im AIS im Detail und konnten zeigen dass die MT im AIS sehr dynamisch und labil sind. Immunfluoreszenztechnisch visualisierbare Modifikation wie Azetylierung oder Polyglutamylierung von Mikrotubuli deuten auf langlebige oder stabile Mikrotubuli hin (Janke, 2014). Diese sind im zentralen Bereich des AIS, also dort wo die TDB lokalisiert ist, allerdings nicht vorhanden. Differentielle Detergenz-basierte Extraktionen von Neuronen, die entweder polymerisierte Mikrotubuli oder freies Tubulin präferieren, und konventionelle Fluoreszenzmikroskopie zeigten dass der Großteil des Tubulins in nicht polymerisierter Form im AIS vorliegt. In hochauflösender STED-Nanoskopie konnten Mikrotubuli im Bereich der TDB, wohl aber in anderen Bereichen, nicht ohne Hilfe von Mikrotubuli-stabilisierenden Substanzen (bspw. Taxol) visualisiert werden. Mithilfe von EB3-Lebendzellbeobachtung, welche es erlaubt die Polymerisation von Mikrotubuli darzustellen, beobachteten wir zwar eine konstante Geschwindigkeit der Mikrotubuli-Polymerisation im AIS sowie im Axon. Allerdings zeigte sich eine Dichteerhöhung von EB3 im AIS, sowohl des endogenen Proteins als auch von transfiziertem EB3-GFP, sichtbar in Form eines EB3-Clusters im Zentrum des AIS. Dies deutet auf die Notwendigkeit einer erhöhten Polymerisationsrate im AIS hin, möglicherweise um die verringerte Stabilität zu kompensieren. Die von uns beobachtete erhöhte Präsenz von EB3 im zentralen Bereich

des AIS ist gut in Übereinstimmung zu bringen mit bereits publizierten Daten (Leterrier et al., 2011), allerdings wurde die hohe Dynamik bisher nicht beschrieben. Durch die Entwicklung einer Bildgebungsroutine, die es erlaubt auch EB3-Kometen in sehr dichten Segmenten aufzulösen, konnten wir zeigen dass die EB3 Präsenz im AIS nicht statisch, sondern zumindest in großen Teilen dynamisch ist. Obwohl die Dichte der EB3-Präsenz auf das Zentrum im AIS konzentriert ist, ist die Geschwindigkeit der Ausbreitung im AIS sowie im Axon identisch. Nach AD-ähnlichem Stress, induziert durch Exposition der primären Neurone mit oligomerem Abeta in der AD-typischen Zusammensetzung (Kuperstein et al., 2010; Zempel et al., 2013), reduziert sich diese Geschwindigkeit jedoch um 20 %, spezifisch im zentralen Bereich des AIS. Da die Mikrotubuli im AIS sowieso sehr dynamisch sind, und die Geschwindigkeit der EB3-Ausbreitung (also der Mikrotubuli-Polymerisation) im sonstigen Axon (Axonaler Hügel sowie proximales Axon) identisch ist, können MT-schneidende Enzyme wie Katanin und Spastin als kausaler Faktor für eine verlangsamte MT-Polymerisation (Baas) oder MT-Verlust (Zempel et al., 2013) praktisch ausgeschlossen werden.

Durch die genauere Untersuchung des Zeitverlaufs wurde klar, dass die Verlangsamung der MT-Polymerisation (Peak ~1-3 h) deutlich später auftritt als die Abeta-Assoziation ans AIS (bereits erkennbar nach ~5 min (Zempel and Mandelkow, 2012)). Ein wichtiges zytoskelettales Element im AIS ist f-Aktin, welches im AIS und im Axon hochgeordnet in ringförmigen regelmäßigen Strukturen vorliegt (Jones et al., 2014; Leterrier et al., 2015). Direkt nach Abeta-Exposition (Peak ~15 min) konnten wir eine deutliche Abnahme des f-Aktins und eine Aktivierung des f-Aktin schneidenden Enzyms Cofilin detektieren, in guter Übereinstimmung mit (Bamburg and Bernstein, 2016; Davis et al., 2011; Whiteman et al., 2009; Whiteman et al., 2011). Diese Aktivierung sowie der Verlust des f-Aktins ist transient, bereits nach 30 min schwindet die Aktivität des Cofilins und f-Aktin regeneriert sich. Dies ist in Einklang mit dem wahrscheinlich toxischen Zeitfenster der Abeta-Oligomere, die ihre toxische Eigenschaften mit der Zeit, korrelierend mit dem Umbau in größere Aggregatsformen, verlieren (Kuperstein et al., 2010). Die Verringerung der Mikrotubulipolymerisation im AIS, gezeigt durch EB3-Imaging, korreliert zeitlich mit dem Peak der Tau-Fehlverteilung ins somatodendritische Kompartiment, und mit dem Wiederaufbau des f-Aktins im AIS. Eine mechanistische Überlegung wäre daher, dass eine

ungeordnete oder überschießende Re-Polymerisation des f-Aktins die Polymerisierung und dadurch die lediglich transient bestehenden Mikrotubuli im AIS behindern könnte. Diese wiederum sind für das normale anterograde Sortieren von Tau nötig (Li et al., 2011). Durch verschiedene Kombinationen der f-Aktin stabilisierenden- und destabilisierenden-Agenzien Jasplakinolid und Latrunculin mit Abeta konnten wir diese Hypothese mechanistisch untermauern. Konkret konnten wir zeigen, das Latrunculin als f-Aktin-Destabilisator Abeta induzierte Tau-Fehlverteilung verringert, und Jasplakinolid alleine ausreicht um Tau-Fehlverteilung zu induzieren.

Anhand Photokonvertierungsexperimente sowie durch Langzeitexpression verschiedener Tau-Isoformen zeigten wir, dass die durch Abeta-induzierte Tau-Fehlverteilung im Zellmodell isoformspezifisch ist. Beispielsweise wird die längere „dendritische“ Isoform 2N4R-Tau zumindest kurzfristig mehr als normal ins Axon sortiert, was gut korrelierbar mit dem transienten Verlust von f-Aktin im AIS und einen damit einhergehenden unspezifischen Verlust der AIS-Filterfunktion, wie bereits postuliert (Song et al., 2009). Die normalerweise stark axonal angereicherte Isoform 0N4R-Tau hingegen wird nach Abeta-Exposition weniger effizient ins Axon sortiert. Dies kann durch den Verlust der MT-Leitungsbahnen durch das AIS und damit den Verlust des spezifischen Sortierens erklärt werden. Durch den geringen Anteil des 2N4R-Tau (3 % beim Menschen, s.o. und Tabelle 1) am Gesamt-Tau erscheint bei undifferenzierter Betrachtung (beispielsweise durch einen üblichen pan-Tau Antikörper) Tau ausschließlich im Axon. Erst bei einer Akkumulation der axonalen Tau-Isoformen im Soma wird eine Verlagerung von Tau ins somatodendritische Kompartiment beobachtbar.

Insgesamt konnten wir zeigen dass die TDB maßgeblich durch die besondere Struktur des AIS, insbesondere durch die Dynamik der Mikrotubuli und Aufrechterhaltung des f-Aktins aufrechterhalten wird. Pathomechanistisch wird durch AD-ähnlichen Zellstress und anschließende aberrante Repolymerisierung von f-Aktin die Mikrotubulidynamik gehemmt, was zur axodendritischen Fehlverteilung von Tau führt. Das somatodendritische fehlverteilte Tau ist maßgeblich 0N4R-Tau, während das „dendritische“ 2N4R-Tau nach Abeta-Zellstress ins Axon fehlverteilt wird.

1.4.4 Bedeutung der Erkenntnisse für die Demenzforschung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals, dass die verschiedenen Isoformen von Tau deutlich unterschiedlich axodendritisch verteilt sind. Derzeitige Mausmodelle verschiedener Demenzerkrankungen exprimieren aber nur eine Isoform, meistens 2N4R-Tau (Götz et al., 2007; Hall and Roberson, 2012; Roberson, 2012). Diese Isoform weicht von der Verteilung der anderen Tau Isoformen ab: Diese zeigt eine erhöhte Konzentration in Dendriten, wo selbst wenig Tau zu Veränderungen in der dendritischen Entwicklung führt (längere Dendriten, verfrühte Dornenreifung). Das pathologisch fehlverteilte Tau wiederum ist größtenteils 0N4R-Tau, was in derzeitigen Mausmodellen nicht eingesetzt wird. Insofern sind heutige Mausmodelle ungeeignet für die Darstellung von Tauopathien, und generieren eventuell schon durch die physiologische Funktionen bestimmter Isoformen irreführende Ergebnisse. Tatsächlich wurde für 2N4R-Tau überexprimierende Mausmodelle eine erhöhte Langzeitpotentierung gezeigt (Kremer et al., 2011; Van Der Jeugd et al., 2012), in Einklang mit den hier gezeigten Effekten von 2N4R-Tau auf die dendritische Entwicklung.

Pathomechanistisch zeigen wir, dass die Störung der physiologischerweise sowohl antero-, als auch retrograd funktionierende TDB zu axodendritischer Tau-Fehlverteilung führt. Abeta-Zellstress führt zu Cofilin-Aktivierung, die resultierende De- und Re-Polymerisation von f-Aktin führt zu einer Störung der MT-Dynamik. Dies führt zum Verlust der MT-Leitungsbahnen im AIS, und dadurch zu Tau-Fehlverteilung. Therapeutisch könnte also durch Lockerung des AIS-Filters die pathologische Fehlverteilung von Tau und der damit folgende neuronale Funktionsverlust verhindert werden. Tatsächlich wurden in gesunden älteren Menschen Autoantikörper gegen Ankyrin-G gefunden, welche auch in AD-Mausmodellen schon therapeutisch erfolgreich eingesetzt wurden (Santuccione et al., 2013). Strukturelemente und Funktionsträger der TDB sind also potentielle therapeutische Ziele.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Notwendigkeit einer differentiellen Betrachtung der Tau-Isoformen für eine mögliche Tau-gerichtete Therapie. Tau vermittelt die Toxizität von Abeta (Ittner et al., 2010; Rapoport et al., 2002; Roberson et al., 2007), doch welche Isoform ist nicht bekannt. Durch die dendritische Verteilung von 2N4R-Tau und präferentielles Targeting von Abeta an Dendriten könnte 2N4R-Tau durchaus für die Vermittlung der Abeta-Toxizität in der AD eine Schlüsselrolle spielen. Zukünftige Therapeutika sollten nicht

nur auf die Konformation oder posttranslationalen Modifikationen von Tau, sondern auch auf die Isoformen von Tau ausgerichtet sein.

1.5 Zusammenfassung aller in dieser Arbeit zusammengeführten Veröffentlichungen

Tau ist ein neuronales Protein, welches in kausalen Zusammenhang mit der Alzheimer Demenzerkrankung (AD), der Frontotemporalen Demenz (FTD), und anderen Tauopathien gebracht wird. Als Mikrotubuli-Assoziiertes Protein (MAP) ist Tau vorwiegend in axonalen Fortsätzen von Neuronen lokalisiert. Im pathologischen Verlauf der AD wird Tau aber auch in die dendritischen Fortsätze von Neuronen umverteilt. Die polare Verteilung von Tau wird somit aufgehoben. Tau kommt im Zentralen Nervensystem von Erwachsenen in 6 Isoformen vor, die sich durch die An- oder Abwesenheit von 2 N-terminalen Einschüben (N) oder der 2. (von insgesamt 4) Repeat-Einheit (R) unterscheiden. Der Einfluss dieser 6 Isoformen von Tau auf den Prozess der pathologischen Fehlverteilung ist nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde daher die physiologische und die pathologische Verteilung der unterschiedlichen Tau-Isoformen untersucht. Als Modell wurde ein definiertes Modell der neuronalen Zellpolarität, primäre Nagetiervorderhirnneurone, verwendet.

Primäre Neurone sind ein etabliertes Modellsystem für die Untersuchung von Tau im Kontext der neuronalen Entwicklung, sowie für die Untersuchung neuronaler Krankheitsprozesse. Primäre Neuronen zu kultivieren ist jedoch aufwendig und erfordert meist die Verwendung von kostenintensiven und patent-geschützten Zellkulturmedien unbekannter Zusammensetzung. Im ersten Kapitel wird daher eine kostengünstige und simplifizierte Prozedur zum Kultivieren von primären Neuronen beschrieben, basierend auf einer mittlerweile kommerziell erhältlichen Variante eines neuronalen Zellkultursupplement (NS21) mit bekannter Zusammensetzung. Weiterhin werden Techniken für die Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung beschrieben, die für die Untersuchung der Verteilung von Tau in primären Neuronen notwendig sind.

Primäre Neurone sind mit nicht-viralen Vektoren schwierig zu transfizieren und empfindlich gegenüber zytoskelettalen Manipulationen und Lebend-Zell-Beobachtung, insbeson-

dere nach mehrwöchiger Kultivierung. In einem zweiten Kapitel wird daher eine einfache nicht-virale Transfektionsmethode beschrieben, die es ermöglicht Tau in allen neuronalen Entwicklungsstufen in ähnlich niedrigen Mengen wie endogenes Tau zu exprimieren.

Mithilfe der o. g. Methoden, insbesondere Transfektion der unterschiedlichen Tau-Isoformen des Menschen und der Maus in primären Neuronen, wurde schließlich in einem dritten Kapitel das axodendritische Verteilungsmuster von Tau untersucht. Es zeigte sich, dass die Tau Diffusionsbarriere (TDB), lokalisiert inmitten des Axon-Initialen-Segments (AIS), sowohl die retrograde als auch die anterograde Ausbreitung von Tau kontrolliert. Während die Tau-Isoformen ohne N-terminale Inserts effizient in das Axon geleitet werden, verbleibt die längste Tau-Isoform (2N4R-Tau) teilweise im Zellsoma und Dendriten, wo sie das Wachstum von Dendriten und dendritischen Dornen beschleunigt.

Die TDB (lokalisiert im AIS) wurde durch Knockdown von AIS-Komponenten (ankyrin G, EB1), oder Überexpression einer AD-assoziierten Kinase, Glykogen-Synthase-Kinase-3-beta (GSK3beta), gestört. Mithilfe von hochauflösender Nanoskopie und Lebendzellbeobachtung konnte gezeigt werden, dass die Mikrotubuli im AIS sehr dynamisch sind, eine axonale Besonderheit essentiell für die Funktion der TDB. Pathomechanistische Veränderungen im AIS nach Exposition mit Amyloid-beta (der AD-auslösende Faktor) waren Aktivierung von Cofilin und f-Aktin Umstrukturierung (beides wichtige Regulatoren des Aktin basierten Zytoskeletts), sowie eine reduzierte Dynamik des Mikrotubuli-Zellskelettsystems. Gleichzeitig brach die AIS/TDB Verteilungsfunktion zusammen, was zu AD-ähnlicher Fehlverteilung von Tau führte.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden für die Kultivierung und Transfektion von primären Neuronen entwickelt, mittels welcher dann gezeigt wurde, dass die unterschiedlichen Tau Isoformen von Mensch und Maus sich sowohl untereinander, als auch in AD-ähnlichem Stress im axodendritischen Verteilungsmuster unterscheiden. Die Tau-Isoformen beschleunigen in unterschiedlichem Ausmaß das Dendriten- und dendritisches Dornenwachstum. Weiterhin hängt die differenzielle axodendritische Verteilung der Tau Isoformen von der Integrität der TDB und des AIS ab. Zukünftige Forschung wird die spezielle Verteilung und die dendritischen Effekte insbesondere von 2N4R-Tau, welches derzeit bevorzugt für Mausmodelle eingesetzt wird, in Betracht ziehen müssen.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Andreadis, A. (2012). Tau splicing and the intricacies of dementia. *J Cell Physiol* 227, 1220–1225

Aronov, S., Aranda, G., Behar, L. and Ginzburg, I. (2001). Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci* 21, 6577–6587

Aronov, S., Aranda, G., Behar, L. and Ginzburg, I. (2002). Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci* 115, 3817–3827

Ballatore, C., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 663–672

Bamburg, J. R. and Bernstein, B. W. (2016). Actin dynamics and cofilin-actin rods in alzheimer disease. *Cytoskeleton* 73, 477–497

Binder, L. I., Frankfurter, A. and Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101, 1371–1378

Boekhoorn, K., Terwel, D., Biemans, B., Borghgraef, P., Wiegert, O., Ramakers, G. J., de Vos, K., Krugers, H., Tomiyama, T., Mori, H., et al. (2006). Improved long-term potentiation and memory in young tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy. *J Neurosci* 26, 3514–3523

Braak, H. and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239–259

Brachet, A., Leterrier, C., Irondelle, M., Fache, M. P., Racine, V., Sibarita, J. B., Choquet, D. and Dargent, B. (2010). Ankyrin G restricts ion channel diffusion at the axonal initial segment before the establishment of the diffusion barrier. *J Cell Biol* 191, 383–395

Bullmann, T., Holzer, M., Mori, H. and Arendt, T. (2009). Pattern of tau isoforms expression during development in vivo. *Int J Dev Neurosci* 27, 591–597

Bullmann, T., Hartig, W., Holzer, M. and Arendt, T. (2010). Expression of the embryonal isoform (0N/3R) of the microtubule-associated protein tau in the adult rat central nervous system. *J Comp Neurol* 518, 2538–2553

- Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y. W., Zhong, M., Xu, S. C., Chen, C. H., Li, L. and Yu, Z. P. (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochem Int* 60, 233–242
- Davis, R. C., Marsden, I. T., Maloney, M. T., Minamide, L. S., Podlisny, M., Selkoe, D. J. and Bamberg, J. R. (2011). Amyloid beta dimers/trimers potently induce cofilin-actin rods that are inhibited by maintaining cofilin-phosphorylation. *Mol Neurodegener* 6, 10
- Dawson, H. N., Ferreira, A., Eyster, M. V, Ghoshal, N., Binder, L. I. and Vitek, M. P. (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114, 1179–1187
- Dickson, D. W., Kouri, N., Murray, M. E. and Josephs, K. A. (2011). Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *J Mol Neurosci* 45, 384–389
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A. and Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8, 1454–1468
- Goedert, M., Ghetti, B. and Spillantini, M. G. (2012). Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006254
- Götz, J., Deters, N., Doldissen, A., Bokhari, L., Ke, Y., Wiesner, A., Schonrock, N. and Ittner, L. M. (2007). A decade of tau transgenic animal models and beyond. In *Brain Pathology*, pp. 91–103
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1994). Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 33, 9511–9522
- Hall, A. M. and Roberson, E. D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 88, 3–12
- Hernandez, F., Lucas, J. J. and Avila, J. (2013). GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 33 Suppl 1, S141-144
- Hirokawa, N., Funakoshi, T., Sato-Harada, R. and Kanai, Y. (1996). Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol* 132, 667–679

- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Lanier, L. M., Yuan, L. L., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B. C., Christie, M. J., Napier, I. A., et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397
- Janke, C. (2014). The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J Cell Biol* 206, 461–472
- Jones, S. L., Korobova, F. and Svitkina, T. (2014). Axon initial segment cytoskeleton comprises a multiprotein submembranous coat containing sparse actin filaments. *J Cell Biol* 205, 67–81
- Kremer, A., Maurin, H., Demedts, D., Devijver, H., Borghgraef, P. and Van Leuven, F. (2011). Early improved and late defective cognition is reflected by dendritic spines in Tau.P301L mice. *J Neurosci* 31, 18036–18047
- Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonckheere, W., Debulpaep, M., Vandersteen, A., Segers-Nolten, I., Van Der Werf, K., Subramaniam, V., et al. (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. *Embo J* 29, 3408–3420
- Leterrier, C., Vacher, H., Fache, M. P., d'Ortoli, S. A., Castets, F., Autillo-Touati, A. and Dargent, B. (2011). End-binding proteins EB3 and EB1 link microtubules to ankyrin G in the axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8826–8831
- Leterrier, C., Potier, J., Caillol, G., Debarnot, C., Rueda Boroni, F. and Dargent, B. (2015). Nanoscale Architecture of the Axon Initial Segment Reveals an Organized and Robust Scaffold. *Cell Rep.* 13, 2781–2793

- Li, X., Kumar, Y., Zempel, H., Mandelkow, E. M., Biernat, J. and Mandelkow, E. (2011). Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO J* 30, 4825–4837
- Liu, C., Song, X., Nisbet, R. and Götz, J. (2016). Co-immunoprecipitation with Tau isoform-specific antibodies reveals distinct protein interactions and highlights a putative role for 2N Tau in disease. *J. Biol. Chem.* 291, 8173–8188
- Morita, T. and Sobue, K. (2009). Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway. *J Biol Chem* 284, 27734–27745
- Morris, M., Maeda, S., Vessel, K. and Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426
- Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6364–6369
- Rasband, M. N. (2010). The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11, 552–562
- Roberson, E. D. (2012). Mouse models of frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 72, 837–849
- Roberson, E. D., Scearce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q. and Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* (80-.). 316, 750–754
- Santuccione, A. C., Merlini, M., Shetty, A., Tackenberg, C., Bali, J., Ferretti, M. T., McAfoose, J., Kulic, L., Bernreuther, C., Welt, T., et al. (2013). Active vaccination with ankyrin G reduces β -amyloid pathology in APP transgenic mice. *Mol. Psychiatry* 18, 358–368
- Song, A. H., Wang, D., Chen, G., Li, Y., Luo, J., Duan, S. and Poo, M. M. (2009). A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell* 136, 1148–1160
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156, 1051–1063

- Sydow, A., Van der Jeugd, A., Zheng, F., Ahmed, T., Balschun, D., Petrova, O., Drexler, D., Zhou, L., Rune, G., Mandelkow, E., et al. (2011). Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. *J Neurosci* 31, 2511–2525
- Takeda, T., Sato, T., Ito, T., Sumi, Y., Kobayashi, T., Kitagawa, M., Hirokawa, K. and Uchihara, T. (2013). Four-repeat tau-selective deposition in subthalamic nucleus and motor cortex in Alzheimer disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 115, 641–643
- Thies, E. and Mandelkow, E. M. (2007). Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *J Neurosci* 27, 2896–2907
- Trabzuni, D., Wray, S., Vandrovcova, J., Ramasamy, A., Walker, R., Smith, C., Luk, C., Gibbs, J. R., Dillman, A., Hernandez, D. G., et al. (2012). MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum Mol Genet* 21, 4094–4103
- Van Der Jeugd, A., Hochgräfe, K., Ahmed, T., Decker, J. M., Sydow, A., Hofmann, A., Wu, D., Messing, L., Balschun, D., D’Hooge, R., et al. (2012). Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau. *Acta Neuropathol.* 123, 787–805
- Wang, Y. and Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 5–21
- Whiteman, I. T., Gervasio, O. L., Cullen, K. M., Guillemin, G. J., Jeong, E. V, Witting, P. K., Antao, S. T., Minamide, L. S., Bamburg, J. R. and Goldsberry, C. (2009). Activated actin-depolymerizing factor/cofilin sequesters phosphorylated microtubule-associated protein during the assembly of alzheimer-like neuritic cytoskeletal striations. *J Neurosci* 29, 12994–13005
- Whiteman, I. T., Minamide, L. S., Goh de, L., Bamburg, J. R. and Goldsberry, C. (2011). Rapid changes in phospho-MAP/tau epitopes during neuronal stress: cofilin-actin rods primarily recruit microtubule binding domain epitopes. *PLoS One* 6, e20878
- Zempel, H. and Mandelkow, E. M. (2012). Linking amyloid-beta and tau: amyloid-beta induced synaptic dysfunction via local wreckage of the neuronal cytoskeleton. *Neurodegener Dis* 10, 64–72

- Zempel, H. and Mandelkow, E. (2014). Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci* 37, 721–732.
- Zempel, H. and Mandelkow, E. M. (2017). Tracking Tau in neurons: How to grow, fix, and stain primary neurons for the investigation of Tau in all developmental stages. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 327–334
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. (2010). Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 30, 11938–11950
- Zempel, H., Luedtke, J., Kumar, Y., Biernat, J., Dawson, H., Mandelkow, E. and Mandelkow, E.-M. (2013). Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TLL6 and spastin. *EMBO J.* 32, 2920-2937
- Zempel, H., Dennissen, F. J. A., Kumar, Y., Luedtke, J., Biernat, J., Mandelkow, E.-M. and Mandelkow, E. (2017a). Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau are isoform-specific and determined by axon initial segment architecture. *J. Biol. Chem.* 292, 12192-12207
- Zempel, H., Luedtke, J. and Mandelkow, E. M. (2017b). Tracking Tau in neurons: How to transfect and track exogenous tau into primary neurons. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 335–340

2. Veröffentlichungen: Titelseiten inklusive englischem Abstrakt, Keywords und Autoren

2.1 Publikation 1: Tracking Tau in Neurons: How to Grow, Fix, and Stain Primary Neurons for the Investigation of Tau in All Developmental Stages

Authors: Hans Zempel and Eva-Maria Mandelkow

Keywords: Primary neuronal cell culture, NS21, Immunostaining, Tau, Polarity

Abstract: Primary neurons have proved to be an invaluable tool for the investigation of Tau in the context of neuronal development and neurodegeneration. Culturing neurons usually is time consuming and requires multiple feeding steps and media exchanges, and either the use of proprietary media supplements or tedious preparation of complex media. Here we describe a relatively cheap and easy cell culture procedure based on a commercially available neuronal culture supplement (NS21) of known composition, as well as basic fixation techniques. Further, we demonstrate a staining technique that can be carried out in pre-coated hydrophobic multi-well plates, which minimizes antibody consumption and allows fast and convenient processing of samples for immunofluorescence microscopy of endogenous Tau in primary neurons. We also provide a protocol that allows cryopreservation of fixed cells for years without loss of Tau stainability.

Die Originalpublikation wurde aus urheberrechtlichen Gründen in der Online-Version entfernt, für diese klicken Sie bitte [hier](#).

Methods Mol Biol. **2017**;1523:327-334.

PMID: 27975260. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6598-4_20

2.2 Publikation 2: Tracking Tau in Neurons: How to Transfect and Track Exogenous Tau into Primary Neurons

Authors: Hans Zempel, Julia Luedtke, and Eva-Maria Mandelkow

Keywords: Tau, Transfection, Primary neuronal cell culture, Polarity, Neurodegeneration

Abstract: Primary neurons have proved to be an essential tool for investigating neuronal polarity in general and polarized Tau distribution in particular. However, mature primary neurons are notoriously difficult to transfect with nonviral vectors and are very sensitive both to cytoskeletal manipulation and to imaging.

Common nonviral transfections require the use of a monolayer of supportive glia or high density cultures, both of which complicate imaging. Here, we provide a simple nonviral transfection method enabling transfection of Tau to achieve expression levels comparable to endogenous Tau. This allows to investigate specific effects on, e.g., distribution and transport of Tau, without grossly affecting other cytoskeleton-based parameters such as microtubule density or microtubule-based transport.

Die Originalpublikation wurde aus urheberrechtlichen Gründen in der Online-Version entfernt, für diese klicken Sie bitte [hier](#).

Methods Mol Biol. **2017**;1523:335-340.

PMID: 27975261 DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6598-4_21

2.3 Publikation 3: Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau are isoform-specific and determined by axon initial segment architecture

Authors: Hans Zempel, Frank J. A. Dennissen, Yatender Kumar, Julia Luedtke, Jacek Biernat, Eva-Maria Mandelkow, and Eckhard Mandelkow

Keywords: AIS, Alzheimer disease, Tau protein (Tau), amyloid-beta (A β), cell polarity, microtubule, neurodegeneration, tauopathy

Abstract: Subcellular mislocalization of the microtubule-associated protein Tau is a hallmark of Alzheimer disease (AD) and other tauopathies. Six Tau isoforms, differentiated by the presence or absence of a second repeat or of N-terminal inserts, exist in the human CNS, but their physiological and pathological differences have long remained elusive. Here, we investigated the properties and distributions of human and rodent Tau isoforms in primary forebrain rodent neurons. We found that the Tau diffusion barrier (TDB), located within the axon initial segment (AIS), controls retrograde (axon-to-soma) and anterograde (soma-to-axon) traffic of Tau. Tau isoforms without the N-terminal inserts were sorted efficiently into the axon. However, the longest isoform (2N4R-Tau) was partially retained in cell bodies and dendrites, where it accelerated spine and dendrite growth. The TDB (located within the AIS) was impaired when AIS components (ankyrin G, EB1) were knocked down or when glycogensynthase kinase-3-beta (GSK3beta; an AD-associated kinase tethered to the AIS) was overexpressed. Using superresolution nanoscopy and live-cell imaging, we observed that microtubules within the AIS appeared highly dynamic, a feature essential for the TDB. Pathomechanistically, amyloid-beta insult caused cofilin activation and F-actin remodeling and decreased microtubule dynamics in the AIS. Concomitantly with these amyloid-beta induced disruptions, the AIS/TDB sorting function failed, causing AD-like Tau missorting. In summary, we provide evidence that the human and rodent Tau isoforms differ in axodendritic sorting and amyloid-beta-induced missorting and that the axodendritic distribution of Tau depends on AIS integrity.

Die Originalpublikation wurde aus urheberrechtlichen Gründen in der Online-Version entfernt, für diese klicken Sie [hier](#). J Biol Chem. **2017** Jul 21;292(29):12192-207.

PMID: 28536263. DOI: 10.1074/jbc.M117.784702.

3. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Stefan Remy für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung der Doktorarbeit.

Ich bedanke mich bei meinen langjährigen Betreuern und wissenschaftlichen Eltern Prof. E. Mandelkow und Dr. E.-M. Mandelkow, welche mir neben vielfältigen wissenschaftlich-technischen Entfaltungsmöglichkeiten zudem die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit ermöglichten – und die beinahe tägliche Inspiration zum „Wissen schaffen“.

Ich bedanke mich bei meiner langjährigen Kollegin Julia Lüdtker, die eine tragende Säule der technischen Arbeiten war, sowie bei der gesamten AG Mandelkow für das stets kooperative Arbeitsverhältnis.