

Diplomarbeit

**Einfluss von Amyloid-Beta-Oligomeren auf die
Synapsenzahl und -struktur im Gewebekulturmodell**

eingereicht von

Randos Megjidi

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Lehrstuhl für Zellbiologie, Histologie und Embryologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat. Gerd Leitinger und

Sowmya Sunkara, MSc PhD

Graz, 09. 12. 2025

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, 09. 12. 2025

Randos Megjidi eh.

Danksagungen

Ich möchte mich bei all jenen Menschen bedanken, die stets an mich geglaubt haben und immer für mich da gewesen sind, vor allem in schwierigen Zeiten.

Allen voran möchte ich größten Dank an meinen Betreuer Professor Gerd Leitinger, sowie Sowmya Sunkara aussprechen. Ihre Geduld, die beispiellose Betreuung und Unterstützung mit Ressourcen und Wissen, wie auch wertvoller Input, waren zu einem großen Teil dafür ausschlaggebend, dass diese Diplomarbeit entstehen konnte.

Mein Dank gilt auch Luca Schmid und Daniel Kummer, die mir am Institut mit ihrer Expertise und bei Fragen stets behilflich waren und unermüdlich zur Seite standen.

Vielen Dank auch an den gesamten Lehrstuhl für Histologie, Zellbiologie und Embryologie der Medizinischen Universität Graz für die Bearbeitung der Proben, der Bereitstellung des Tecnai-Elektronenmikroskopes, und das vermittelte Wissen im Rahmen von Mitarbeit und zusätzlichen Seminaren.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern Mirela und Spartak. Ohne ihre selbstlose Unterstützung wäre es mir niemals möglich gewesen, mein Medizinstudium zu beginnen, geschweige denn abzuschließen.

Zusammenfassung

Die Alzheimer-Erkrankung ist derzeit die mit Abstand häufigste Form aller demenziellen Erkrankungen weltweit. Der neurodegenerative und progrediente Verlauf stellt aufgrund vieler Faktoren, wie alternder Gesellschaft und steigender Fallzahlen, eine große Herausforderung für die medizinische Wissenschaft der Zukunft dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich die Gabe von Amyloid-Beta-Oligomeren sowie Eisen auf die Synapsenzahl sowie weitere ultrastrukturelle Merkmale im Gehirn auswirkt. Betrachtet wurden diese Aspekte im Gewebekulturmodell, wobei sowohl humane, als auch porcine Gewebeschnitte des Hippocampus mittels organotypischer Hirnschnittkultur (OBSC) kultiviert wurden. Es folgte eine Unterteilung in vier Untergruppen: eine unbehandelte Kontrollgruppe, eine mit Eisen angereicherte Gruppe, eine mit Beta-Amyloid behandelte Gruppe, sowie eine Untergruppe aus kombinierter Anreicherung von Beta-Amyloid und Eisen. Die Proben wurden in weiterer Folge mithilfe von Transmissions-Elektronenmikroskopie analysiert, wobei Parameter wie Synapsendichte, Vesikelzahl, Durchmesser der aktiven Zone und Zahl der Dense-Core-Vesikel (DCV) quantitativ gezählt wurden.

Die Resultate der Auswertung zeigten in beiden Gewebetypen eine signifikante Abnahme der Synapsendichte in den mit Beta-Amyloid und Eisen angereicherten Untergruppen, verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine besondere Ausprägung dieses Effekts zeigte sich im porcinen Gewebe. Gleichzeitig nahm auch die Vesikelzahl pro μm^3 in den behandelten Gruppen ab. Eine Zunahme an DCV konnte lediglich in den behandelten Gruppen eruiert werden. In einigen Gruppen konnten kürzere prä- und postsynaptische Membrandurchmesser als Maß für die aktive Zone, wie auch verringerte Durchmesser des synaptischen Spaltes, gefunden werden.

Die vorgelegten Befunde betonen die Rolle von Beta-Amyloid in löslicher Form, sowie Eisen als neurotoxische Faktoren, die letztlich zur Degeneration von Synapsen im Frühstadium der Erkrankung führen. Durch den Vergleich von humanem und porcinem Gewebe konnte geeignetes Material hinsichtlich der Vergleichbarkeit verwendet werden. Die Ergebnisse präsentieren teilweise neue Einblicke in frühe pathophysiologische Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung, im Zusammenhang mit ultrastrukturellen Korrelaten.

Abstract

Alzheimer's disease is currently by far the most common form of dementia worldwide. Its neurodegenerative and progressive course, due to many factors such as an aging population and increasing case numbers, poses a major challenge for future medical science. This study investigated the effects of amyloid-beta oligomers and iron on synapse count and other ultrastructural features in the brain. These aspects were examined using a tissue culture model, with both human and porcine hippocampal tissue sections cultured using organotypic brain slice culture (OBSC). The samples were then divided into four subgroups: an untreated control group, an iron-enriched group, a beta-amyloid-treated group, and a subgroup with combined beta-amyloid and iron enrichment. The samples were analyzed using transmission electron microscopy, with parameters such as synapse density, vesicle number, membrane diameters and number of dense core vesicles (DCV) being quantitatively counted.

The results of the analysis showed a significant decrease in synapse density in both tissue types in the subgroups enriched with beta-amyloid and iron, compared to the control group. This effect was especially visible in porcine tissue. Simultaneously, the number of vesicles per μm^3 also decreased in the treated groups. An increase in dense-core-vesicle numbers was only observed in the treated groups. In some groups, shorter pre- and postsynaptic membrane diameters, as measures for the active zones, as well as reduced cleft diameters, were found.

The presented findings emphasize the role of soluble beta-amyloid and iron as neurotoxic factors that ultimately lead to synaptic degeneration in the early stages of the disease. Comparing human and porcine tissue allowed the use of suitable material in terms of comparability. The results offer some new insights into early pathophysiological changes in Alzheimer's disease, in relation to ultrastructural correlates.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Abkürzungen	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 <i>Einleitende Worte zur Erkrankung</i>	1
1.2 <i>Derzeitiger Kenntnis- und Forschungsstand</i>	3
1.3 <i>Begründung der Fragestellung</i>	5
1.4 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	6
2 Material und Methoden	8
2.1 <i>Gewinnung des humanen Gehirngewebes</i>	8
2.2 <i>Gewinnung des porzinen Gehirngewebes</i>	8
2.3 <i>Organotypische Hirnschnittkultur</i>	9
2.4 <i>Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM)</i>	10
2.5 <i>Ablauf der Auswertung</i>	13
2.6 <i>Statistische Auswertung</i>	16
3 Resultate mit graphischen Darstellungen	17
3.1 <i>Erklärung der präsentierten Daten und Graphiken</i>	17
3.2 <i>Resultate der Synapsendichte pro μm^3</i>	18
3.3 <i>Resultate der Vesikelparameter pro μm^3</i>	20
3.4 <i>Resultate der gesamten Vesikelzahl pro Synapse</i>	23
3.5 <i>Resultate der gedockten Vesikelzahl pro Synapse</i>	25
3.6 <i>Resultate der DCV-Dichte pro μm^3</i>	26
3.7 <i>Resultate der Breite des synaptischen Spaltes</i>	27
3.8 <i>Resultate: Durchmesser der präsynaptischen Membran</i>	28
3.9 <i>Resultate: Durchmesser der postsynaptischen Membran</i>	29
4 Diskussion	31
4.1 <i>Antworten auf die Forschungsfragen</i>	31
4.2 <i>Vergleichende Erläuterungen</i>	32
4.3 <i>Schlussfolgerungen</i>	35
4.4 <i>Kritische Reflexion und Limitationen zur Methodik</i>	35
4.5 <i>Implikationen für Theorie und Praxis</i>	37
4.6 <i>Ausblick und Anregungen für weiterführende Arbeiten</i>	38
Literaturverzeichnis	40
Anhang	45
<i>A Tabellen der analysierten Parameter mit Resultaten</i>	45

Abkürzungen

AD – Alzheimer`s Disease / Alzheimer-Erkrankung

NFT – Neurofibrillary Tangles / Neurofibrilläre Tangles

NMDA – N-Methyl-D-Aspartat

APP – Amyloid-Precursor-Protein

PSEN1 – Presenilin-1

PSEN2 – Presenilin-2

MAPT – Microtubule-Associated Protein Tau / Mikrotubulus-Assoziiertes Protein Tau

A β – Amyloid-Beta

DNA – Desoxyribonucleic Acid / Desoxyribonukleinsäure

engl. – englisch

OBSC – Organotypic Brain Slice Culture

TEM – Transmissions-Elektronen-Mikroskop

ELMI – Elektronenmikroskop

HPF-FS – High Pressure Freezing – Freeze Substitution

ROI – region of interest

kV – Kilovolt

DCV – Dense Core Vesikel

PSD – Postsynaptic Density / Postsynaptische Dichte

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

MWU – Mann-Whitney-U-Test

p-Wert – Signifikanzwert

n – Anzahl (der Synapsen)

IQR – Interquartile Range / Interquartilsabstand

vs. – Versus

SD – Standard Deviation / Standardabweichung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielbilder der jeweiligen Untergruppen	6
Abbildung 2: Darstellung des FEI Tecnai G2 20 Elektronenmikroskops.....	11
Abbildung 3: Beispielbild der Polygoneingabe	13
Abbildung 4: Beispiel der Festlegung der relevanten Ränder bei Zählung	14
Abbildung 5: Farblich dargestellte Parameter der untersuchten Ultrastrukturen.....	15
Abbildung 6: Beispiel für eine Synapse und ein DCV	16
Abbildung 7: Beispielbilder der jeweiligen Untergruppen des humanen Gewebes.....	17
Abbildung 8: Beispielbilder der jeweiligen Untergruppen des porzinen Gewebes	18
Abbildung 9: Synapsendichte im humanen und porzinen Gewebe.....	19
Abbildung 10: Gesamte Vesikelzahl im humanen und porzinen Gewebe.....	21
Abbildung 11: Gedockte Vesikelzahl im humanen und porzinen Gewebe	22
Abbildung 12: Ungedockte Vesikelzahl im humanen und porzinen Gewebe	23
Abbildung 13: Gesamte Vesikelzahl im humanen und porzinen Gewebe pro Synapse	24
Abbildung 14: Gedockte Vesikelzahl im humanen und porzinen Gewebe pro Synapse.....	26
Abbildung 15: DCV-Zahl im humanen und porzinen Gewebe	27
Abbildung 16: Breite des synaptischen Spaltes im humanen und porzinen Gewebe	28
Abbildung 17: Präsynaptische Membranlänge im Durchmesser	29
Abbildung 18: Postsynaptische Membranlänge im Durchmesser.....	30

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Deskriptive Statistiken und Tests für die Synapsenzahl pro μm^3	45
Tabelle 2: Deskriptive Statistiken und Tests für die gesamte Vesikelzahl pro μm^3	45
Tabelle 3: Deskriptive Statistiken und Tests für die gedockte Vesikelzahl pro μm^3	45
Tabelle 4: Deskriptive Statistiken und Tests für die ungedockte Vesikelzahl pro μm^3	45
Tabelle 5: Deskriptive Statistiken und Tests für die DCV-Zahl pro μm^3	46
Tabelle 6: Deskriptive Statistiken und Tests für die gesamte Vesikelzahl pro Synapse	46
Tabelle 7: Deskriptive Statistiken und Tests für die gedockte Vesikelzahl pro Synapse.....	46
Tabelle 8: Deskriptive Statistik und Tests: Breite des synaptischen Spaltes.....	46
Tabelle 9: Deskriptive Statistik und Tests: Durchmesser der präsynaptischen Membran ...	47
Tabelle 10: Deskriptive Statistik und Tests: Durchmesser der postsynaptischen Membran....	
.....	47

1 Einleitung

1.1 Einleitende Worte zur Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankung (im Englischen auch als „*Alzheimer's-Disease*“ (AD) bezeichnet) ist mit einem Anteil von rund 60-80% die weltweit häufigste Variante aller demenziellen Erkrankungen. Der Verlauf ist progredient und neurodegenerativ, mit typischen Symptomen wie Gedächtnisverlust oder einem Abbau der kognitiven Funktionen. In fortgeschritteneren Stadien kann es zusätzlich zu Sprach- und Verhaltensstörungen kommen (1). In Europa lag die Zahl der Patient*innen im Jahr 2001 noch bei rund 7,7 Millionen. Bis zum Jahr 2040 wird mit einer wachsenden Patient*innenzahl auf bis zu 15,9 Millionen gerechnet. Diese Zahlen werden durch Faktoren wie demographische Veränderung, Alterung der Bevölkerung und dem Ausbleiben geeigneter kurativer Behandlungsmöglichkeiten erklärt. Dies macht die Alzheimer-Erkrankung auch zu einem zukünftig volkswirtschaftlichen Problem, wo die projizierten Kosten der Erkrankung in Europa bis 2030 auf bis zu 250 Milliarden Euro geschätzt werden (2).

Aus neuropathologischer Perspektive können den vorhandenen klinischen Symptomen in der Regel morphologische Korrelate zugeordnet werden. An dieser Stelle seien insbesondere die Aggregation von fehlgefaltetem Beta-Amyloid zu charakteristischem Amyloid-Beta-Plaques, wie auch hyperphosphorylierte Tau-Protein-Aggregation zu Oligomeren, später zu sogenannten neurofibrillären Tangles (oft auch als „NFT“ abgekürzt), hervorgehoben. Diese Biomarker können allerdings oft schon vor Ausprägung der klinischen Symptomatik über diagnostische Verfahren wie Positronen-Emissions-Tomographie, Liquorpunktionen oder einfache Bluttests erkenntlich gemacht werden (3). In der heutigen Literatur wird weitgehend gezeigt, dass die beiden zuvor angeführten Biomarker einen neurotoxischen Effekt aufweisen, welcher sich insbesondere in einer Degeneration und weiterer Folge einem Verlust von Synapsen niederschlägt. Insbesondere die löslichen Formen präsentieren sich als besonders neurotoxisch. Die Mechanismen dieses Prozesses zeigen sich in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur als sehr komplex. Unter anderem spielt auch der erhöhte Ca^{2+} -Einstrom durch die toxische Wirkung von

Amyloid-Beta-Oligomeren über die präsynaptische Membran eine wichtige Rolle, was über eine Überaktivierung von unter anderem NMDA-Rezeptoren zu einer sogenannten Exzitotoxizität führt. Eine weitere Kaskade an schädlichen Prozessen mit Involvierung von Aktivierung von Enzymen und oxidativem Stress, wie auch Schädigung der Mitochondrien wird ausgelöst. Dies ist letztendlich mit einem Niedergang der Synapsen und Neuronen assoziiert (4).

In diesem Zusammenhang ist der chronologische Ablauf der Involvierung der oben angeführten Biomarker für das bessere Verständnis der Pathophysiologie der Alzheimer-Erkrankung von Relevanz. Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Alzheimer-Erkrankung und Mutationen in Genen, welche mit Beta-Amyloid in Verbindung gebracht werden können. Dies wären beispielsweise Gene wie APP, PSEN1 oder PSEN2, jedoch nicht jene Gene, die für das Tau-Protein codieren. Hierbei sei MAPT als Beispiel angeführt. Dies zeigt, dass die Akkumulation von Amyloid-Beta wichtig für den Beginn der Erkrankung ist, hiermit auch in gewisser Weise einen wichtigen Marker für die frühestmöglichen Stadien von Alzheimer darstellt. Gleichzeitig ist die Ausbreitung des pathologischen Tau-Proteins im Gehirn ein aussagekräftiger Parameter für den Schweregrad der Erkrankung (5). Beta-Amyloid kann somit durchaus als initiierender Triggerfaktor der Alzheimer-Erkrankung betrachtet werden.

Das insbesondere für diese Arbeit relevante Beta-Amyloid entsteht grundsätzlich durch proteolytische Spaltung eines Vorläuferproteins, dem sogenannten „*amyloid precursor protein*“ (APP), durch Sekretasen. Dies hat die Entstehung von Beta-Amyloid-Peptiden zur Folge, wo allen voran die beiden wichtigsten Peptide A β 1-40 sowie A β 1-42 zu erwähnen sind. Letzteres weist ein deutlich aggregationsfreudigeres und neurotoxisches Verhalten auf, während ersteres zwar häufiger vorkommt, für die Pathophysiologie von Alzheimer jedoch eine nebensächliche Rolle spielt (6).

Ein abschließender Aspekt, der zum eigentlichen Thema der Arbeit hinleiten soll, ist die Assoziation des pathophysiologischen Prozesses der Alzheimer-Erkrankung mit der Eisen-Homöostase des menschlichen Gehirnes. Im Rahmen der Erkrankung wurde gezeigt, dass bei betroffenen Patient*innen eine regional unterschiedliche Akkumulation von Eisen vorliegt. Dies beschleunigt wiederum den Prozess der Akkumulation von Beta-Amyloid

sowie pathologischem Tau. Hierbei spielt das Grundprinzip der bekannten Fenton-Gleichung eine zentrale Rolle, bei der aus einer Reaktion von zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reaktive Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) entstehen, welche wiederum für den pathophysiologischen Prozess fördernde Schäden von Proteinen oder DNA bewirken. Gleichzeitig ist der Prozess der Ferroptose zu nennen, bei welchem diese Akkumulation von Eisen in Nervengewebe zu einer Überladung führt, mit dem Resultat des herbeigeführten Zelltods (7). Die Akkumulation von Eisen selbst ist momentan zentraler Punkt zahlreicher Studien und Untersuchungen. Es ist davon ausgehen, dass eine erhöhte mitochondriale Aktivität von Astrozyten einen erhöhten Energiebedarf mit vermehrter Eisenaufnahme und daraus resultierender Hochregulierung von Apo-Transferrin mit sich zieht. Dies führt vermehrt zu einem Eisentransport über die Blut-Hirn-Schranke (8). Durch gleichzeitige Hochregulation von Hepsidin, welche eine Herabregulation von Ferroportin zur Folge hat, wird der Export von Eisen aus den Zellen gehemmt, wodurch es zu einer intrazellulären Akkumulation des Metalls kommt (9,10).

Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass zahlreiche Faktoren die Entstehung von Alzheimer beeinflussen und fördern können. Neben zahlreichen anderen wichtigen Punkten, sollen an dieser Stelle Faktoren wie Diabetes, Alkoholabusus, Hypertonie, soziale Isolation, ein niedriger Bildungsgrad oder soziale Isolation genannt werden. Grundsätzlich sind das hohe Alter und genetische Prädisposition als Risikofaktoren etabliert (3).

1.2 Derzeitiger Kenntnis- und Forschungsstand

In der Grundlagenforschung wird hinsichtlich molekularer und genetischer Ätiologiesuche und Entstehung der Alzheimer-Erkrankung bevorzugt die Verwendung von Maus-Modellen angewandt. Vorteile dieses Prinzips sind unter anderem die schnelle Reproduktion und kurze Lebensdauer der Tiere, die hinsichtlich der zeitnahen Erfüllung diverser Studienprotokolle einen wesentlichen Vorteil darstellen. Hierbei entstanden im weiteren Verlauf auch verschiedene Linien, welche durch gezielte Mutationen entstanden, um einen bestimmten, für die jeweilige Fragestellung relevanten, Phänotyp zu erwirken. Damit sind Erscheinungsbilder wie Alzheimer-Plaques, NFT oder morphologische Merkmale der Neurodegeneration gemeint. Weiters geht es hier auch um die wiederholbare

Vergleichbarkeit, sowie den Ausschluss von zufälligen Auswirkungen, die durch zufälligen Einbau von Transgenen bedingt sind (11,12).

Während die Erforschung am Maus-Modell nur vereinzelte Aspekte der Erkrankung repliziert und sich auf die Grundlagenforschung limitiert, fehlt hierbei die Berücksichtigung des komplexen Gesamtbildes, welches beim Menschen ausschlaggebend ist. Dabei sind unter anderem die deutlich längere Lebensdauer und Unterschiede im Immunsystem und der Regulation des Stoffwechsels anzumerken. Beim Menschen spielen komplexere Verhaltensmuster hinsichtlich des Lebensstils, der Entstehung von Risikofaktoren oder weiteren Einflüssen eine essenzielle Rolle. Dies führt zu einer limitierenden Aussagekraft einer Vielzahl an Ergebnissen am Maus-Modell, wenn versucht wird, dies aufs menschliche Korrelat überzuführen. Insbesondere die Manifestation im späteren Alter, sowie unterschiedliche biologische Pathways seien hierbei angemerkt (13). Dies hatte in der Vergangenheit bereits öfters zur Folge, dass scheinbar erfolgreiche Therapieansätze am Maus-Modell vielversprechend schienen, zahlreiche Studien sich allerdings in der klinischen Phase am Menschen als erfolglos präsentierten (14).

Ein wesentlicher Aspekt, der bislang noch unerwähnt blieb, ist der Unterschied hinsichtlich der Neuroanatomie des Gehirnes. Während Menschen ein gyrenzephalisches Gehirn, also eines mit mehreren Gyri und Sulci, aufweisen, ist jenes einer Maus deutlich glatter. Hierbei wird auch von einem lissenzephalischen Gehirn gesprochen (15). Für Fragestellungen im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, wird alternativ daher auch die Verwendung von porzinem Gewebe etabliert, da die Neuroanatomie verglichen mit dem Menschen hierbei sehr viele Ähnlichkeiten aufweist. Allen voran die gyrenzephalischen Eigenschaften, die in beiden Spezies zu finden sind, lassen bessere Vergleiche hinsichtlich der Auswirkungen auf die neuronalen Netzwerke des Gehirns im Rahmen derartiger neurodegenerativer Erkrankungen zu (16). Die zusätzliche Verwendung von humanem Gewebe zeigt offensichtliche Vorteile wie direkte Übertragung der anzunehmenden humanen Pathomechanismen auf das vorliegende Gewebe (17), während gleichzeitig Herausforderungen hinsichtlich ethischer und rechtlicher Fragestellungen eine begrenzte Verfügbarkeit bedeuten (18). Eine Kombination beider Gewebe würde somit zusammenfassend eine nähere Abbildung der pathophysiologischen Prozesse ermöglichen, welche im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung auftreten.

1.3 Begründung der Fragestellung

Die Idee hinter dieser Arbeit ist die Klärung der Fragestellung, ob nach Beta-Amyloid-Injektion in kultiviertes Gewebe von Menschen oder Schweinen, der mit der Alzheimer-Erkrankung vergesellschaftete Synapsenverlust stattfindet. Besagte Fragestellung soll mittels Elektronenmikroskopie anhand von Präparaten, die nach Abschluss der Gewebekulturexperimente eingebettet wurden, beantwortet werden. Das Gewebe wurde hierbei vom Menschen und vom Schwein entnommen, in Gewebekultur gehalten und mittels Injektion von Beta-Amyloid-Oligomeren behandelt. Die Gewebekultur wurde in der Arbeitsgruppe evaluiert und etabliert. Im Rahmen einer Studie, die parallel zu dieser Arbeit erschien, wurde gezeigt, dass die Injektion von Beta-Amyloid zu einer Erhöhung der Zytotoxizität führt, während Amyloid in den Neuronen nachgewiesen werden konnte (19). In weiterer Folge wird nicht nur die Zahl der Synapsen selbst, sondern auch die Auswirkung auf bestimmte, für die Funktion der Synapsen wichtige ultrastrukturelle Charakteristika der synaptischen Kontakte betrachtet. Die bereits im Vorfeld erwähnte Rolle von Eisen im Rahmen des pathophysiologischen Prozesses soll ebenfalls in Form von zusätzlichen Nebenfragestellungen erörtert werden.

Während viele Studien sich vermehrt auf die funktionellen oder molekularen Aspekte der Erkrankung konzentrieren, soll der Fokus dieser Arbeit auf den ultrastrukturellen Auswirkungen von Beta-Amyloid und Eisen liegen. Der Vergleich zwischen humanem und porzinem Gewebe könnte durchaus neue Erkenntnisse im Hinblick auf die Veränderung der Synapsenzahl und -struktur geben. Weiters könnte es durch die Vergleichbarkeit zweier bislang als sehr ähnlich gehandelter Gewebearten im Rahmen dieser Arbeit zu zusätzlichen Schlüssen kommen, die aufgrund der bislang nicht regelmäßigen Durchführung derartiger Studien ausgeblieben sind.

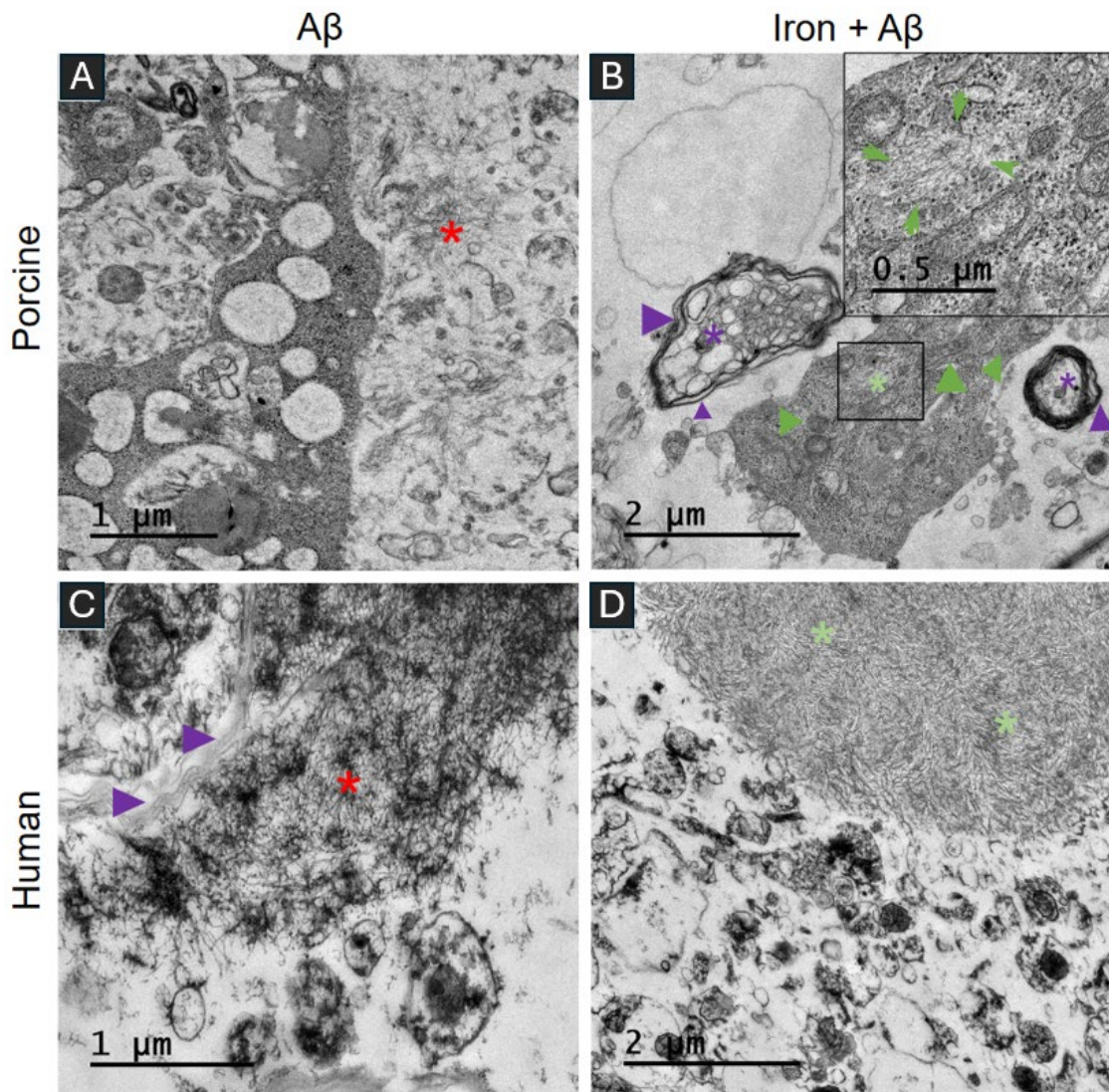


Abbildung 1: Beispielbilder der jeweiligen Untergruppen. A: Porzine Beta-Amyloid-Untergruppe; B: Porzine Untergruppe mit Eisen und Beta-Amyloid; C: Humane Beta-Amyloid-Untergruppe; D: Humane Untergruppe mit Eisen und Beta-Amyloid; Rote Sterne: Netzartige Aggregate von Beta-Amyloid; Grüne Sterne: Lang rigide Fibrillen-Aggregate innerhalb eines Perikaryons eines Neurons; Violette Sterne: Myelinisierte Axone; Violette Pfeile: Aufgetriebene Myelinscheiden der Axone; Grüne Pfeile: Mitochondrien;
Diese Abbildung wurde aus der Arbeit von Sunkara et al. (19) entnommen, mit freundlicher Genehmigung von Sowmya Sunkara und Prof. Gerd Leitinger.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die konkrete Zielsetzung dieser Arbeit ist somit die Hauptfragestellung, ob und wie sich die Synapsenzahl bei Vorliegen von Beta-Amyloid verändert. Gleichzeitig soll in weiteren Nebenfragestellungen zunächst die Auswirkung von Eisen auf die Synapsenzahl betrachtet werden, weiters auch die Veränderung im Falle eines kombinierten Vorliegens von Eisen und Beta-Amyloid. Zusätzliche Fragestellungen sollen die Auswirkung der hier

angeführten Stoffe auch auf ultrastrukturelle Synapsenstrukturen wie Vesikelzahl, Länge des Durchmessers der aktiven Zone, sowie Durchmesser des synaptischen Spaltes untersuchen. Eine weitere Fragestellung ist die Veränderung der Zahl an sogenannten Dense-Core-Vesikeln (DCV), für welche noch nicht eindeutig geklärt ist, welche Rolle sie im pathophysiologischen Prozess der Erkrankung spielen und wie sich deren Zahl dabei ändert (20). Konkret werden beide Gewebearten in vier folgende Untergruppen geteilt:

- Kontrollgruppe (ohne Anreicherung)
- Eisen-Untergruppe (Anreicherung nur mit Eisen(III)-Citrat)
- Amyloid-Untergruppe (Anreicherung nur mit Beta-Amyloid)
- Kombinierte Untergruppe (Anreicherung sowohl mit Eisen, als auch Amyloid)

Folgende Parameter sollen hierbei innerhalb einer Gewebeart und in Bezug zur Kontrollgruppe verglichen werden:

- Synapsenzahl pro μm^3
- Gesamte Vesikelzahl pro μm^3
- Gedockte Vesikelzahl pro μm^3
- Gesamte Vesikelzahl pro Synapse
- Gedockte Vesikelzahl pro Synapse
- Ungedockte Vesikelzahl pro μm^3
- Zahl der Dense-Core-Vesikel pro μm^3
- Breite des synaptischen Spaltes
- Durchmesser des Querschnittes der präsynaptischen Membranlänge, ein Maß für die aktive Zone
- Durchmesser des Querschnittes der postsynaptischen Membranlänge

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung des humanen Gehirngewebes

Das humane Gehirngewebe für die in dieser Diplomarbeit verwendeten Proben entstammt von zwei Routineautopsien, welche am Diagnostik- und Forschungsinstitut für Pathologie an der Medizinischen Universität Graz durchgeführt wurden. Es handelt sich hierbei um Individuen, die keine Vorgeschichte hinsichtlich neurologischer Erkrankungen hatten, gleichzeitig werden Alter, Geschlecht und Todesursache als nicht für diese Arbeit relevant betrachtet. Es wurden ausschließlich Gewebeproben berücksichtigt, die zum Zeitpunkt der Probeentnahme ein Post-Mortem-Intervall (PMI) von unter sechs Stunden aufwiesen. Unter dem PMI versteht man die Dauer vom Ableben der betroffenen Person, bis hin zum Zeitpunkt der Autopsie. Vom Zeitpunkt der Probeentnahme bis hin zur Kultivierung verstrichen weitere vier bis fünf Stunden.

Mithilfe des pathologischen Instituts konnte die Hippocampusregion eindeutig bestimmt werden, worauf die Proben sezirt und in Zentrifugenröhrchen mit gekühlter physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) transportiert wurden. Die Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz unter dem Votum 28-549 ex 15/16 und 31-558 ex 18/19 liegt vor. Der gesamte Prozess lief im Einklang mit den ethischen Standards gemäß der Deklaration von Helsinki 1964 sowie späteren Änderungen ab.

2.2 Gewinnung des porzinen Gehirngewebes

Das porzine Gehirngewebe wurde aus dem Gehirn von drei Schweinen gewonnen, welche von einem lokalen Schlachthaus in Graz erhalten werden konnten. Das für die weitere Verarbeitung gewöhnlicherweise nicht Verwendung findende Gehirngewebe wurde als Ganzes in jeweils zwei Hälften in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) transportiert. In diesem Zusammenhang war weiters keine spezielle Genehmigung notwendig. Nach eindeutiger Identifikation der Hippocampusregion wurden die Proben für den weiteren Prozess sezirt.

2.3 Organotypische Gehirnschnittkultur

Die organotypische Hirnschnittkultur (engl. OBSC für „*organotypic brain slice culture*“) beschreibt eine In-Vitro-Methodik, die die räumliche Struktur sowie funktionellen Netzwerke des Gehirns aufrechterhält. Dies ermöglicht bessere Untersuchungsbedingungen hinsichtlich der neurodegenerativen Prozesse, wie beispielsweise Synapsenverlust. Vereinfacht erklärt, werden hierbei semipermeable Membranen verwendet, auf welche die untersuchten Schnitte gelegt werden. Daraus ergibt sich eine Platzierung der Gewebeprobe zwischen einer porösen Membran, sowie dem Medium. Dies hat eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen zur Folge, wodurch untersuchte Strukturen über eine Dauer von bis zu Wochen erhalten bleiben (21).

Wie in der bereits erwähnten Arbeit von Sunkara et al. beschrieben (19), wurden die Gewebeproben beider Spezies zunächst mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, 0,013 M, pH 7,4) gespült. Die jeweiligen Hippocampusregionen wurden mittlerweile auf 1 cm³ große Würfel geschnitten und anschließend in Gelatine aus Schweinehaut (10%, Sigma Aldrich, G6144-100G), unter zusätzlicher Zubereitung eines Neurobasal^{TM-A}-Mediums (Thermo Fischer Scientific, 10888022), fixiert. Nachdem alles auf Eis festgeworden ist, wurden die Proben mithilfe von Cyanacrylat-Kleber am Vibratom (Leica, VT1200S) fixiert und die Bühnenhalterung mit PBS (0,013 M) gefüllt. Daraufhin erfolgte die Zubereitung der Schnitte mit einer Dicke von 150 µm sowie einem Durchmesser von etwa 3-4 mm. Etwa 3 bis 4 Schnitte wurden in Millicell-Zellkultureinsätze (30 mm, 0,4 µm Millicell, Sigma Andrich) innerhalb einer 6-Well-Zellkulturplatte gelegt. Dafür wurde Neurobasalmedium verwendet, welches mit B27, Glutamax und Neuromycin ergänzt wurde. Während des Kultivierungsprozesses wurde dieses Medium täglich getauscht. Eisen(III)-Citrat (83 µm, Sigma-Aldrich, F3388) wurde im nächsten Schritt angereichert, um eine Eisenüberladung des Gehirns zu simulieren. Zusätzlich wurde synthetisches Beta-Amyloid-Peptid Aβ₁₋₄₂ (35 µm, Hoelzel-Biotech, RPE-A-1163-2) hinzugefügt, um die Fibrillenbildung in den Gewebeschnitten zu induzieren. Im abschließenden Teil wurden die Proben bei 37°C und 5% CO₂ für fünf Tage inkubiert, ehe die Proben am sechsten Tag entnommen und nochmals mit Neurobasalmedium oder PBS gespült wurden. Mit Hilfe gelochter Mikrolöffel wurden die Proben abschließend von den Membranen gelöst.

Insgesamt ergaben sich für diese Arbeit vier Untergruppen: Eine unbehandelte Kontrollgruppe, eine mit Beta-Amyloid angereicherte Untergruppe, eine mit Eisen angereicherte Untergruppe, sowie eine Untergruppe, die sowohl mit Beta-Amyloid als auch Eisen angereichert wurde.

2.4 Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM)

Bevor die Schnitte unter dem Elektronenmikroskop (ELMI) beobachtet werden konnten, wurden sie in eine chemische Fixierungslösung gelegt. Diese bestand aus Paraformaldehyd (2%) und Glutaraldehyd (2%), welches in einen Natriumkacodylat-Puffer (0,1 M, pH 7,4) bei Raumtemperatur für zwei Stunden gelegt wurde. Anschließend erfolgte eine weitere Fixierung mit Osmiumtetroxid (1%) in derselben Pufferlösung für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden die Proben im Rahmen des Einbettungsprozesses dehydriert, indem sie unterschiedlichen Prozentsätzen an Alkohol ausgesetzt wurden. Abschließend erfolgte die Einbettung in TAAB-Embedding Medium, einem Kunstharz (TAAB, Aldermaston, UK). Nach Ruhigstellung von drei Tagen bei einer Temperatur von 60°C erfolgten die ultradünnen Schnitte mithilfe von Ultramikrotomen (Leica UC6 und Leica UC7). Die Schnittdicke belief sich hierbei auf etwa 60 bis 70 nm. Eine zusätzliche Behandlung mit Eisencitrat- sowie Platinum Blue-Lösungen wurde angewandt, um die Kontraste unter Beobachtung am ELMI zu verstärken.

Das humane Gewebe wurde zusätzlich nach der Erstfixierung mithilfe der „*High-Pressure-Freezing and Freeze Substitution*“-Methode (HPF-FS) aufbereitet. Hierbei handelt es sich um eine zusätzliche Fixierungsmethode, bei der das Gewebe einem Druck von bis zu 2000 bar und Temperaturen von -196°C ausgesetzt wird. Dabei wird die ursprüngliche Morphologie und Molekülverteilung erhalten. Im nächsten Schritt wird das gefrorene Wasser im Gewebe unter Gefriersubstitution durch Aceton ersetzt, bei gleichzeitiger Verwendung von Fixiermitteln wie Osmiumtetroxid und Uranylacetat. Durch diese Methodik sind artefaktfreie Präparationen möglich (22,23). Die fertigen Schnitte wurden abschließend vorsichtig auf TEM-Grids aus Kupfer gelegt, sodass sie für die Analyse unter dem Elektronenmikroskop bereit sind.

Die Elektronenmikroskopie erfolgte mithilfe eines Tecnai G2 20 Elektronenmikroskopes (Thermo Fisher Scientific, USA), bei einer Spannung von 120 kV. Zusätzlich wurde eine Bottom Mount-Ultrascan Kamera (Ultrascan 1000, Gatan, Pleasanton, USA) zur Gewinnung von digitalen Bildern verwendet, wie auch eine Megaview Weitwinkelkamera (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Deutschland). Für die Arbeit ergaben sich somit vier Untergruppen je Gewebeart, somit insgesamt 8 Untergruppen zu je 25 Schnittpaaren, was eine Gesamtzahl von 200 Schnittpaaren für diese Arbeit ergibt. Jeweils ein Schnittpaar wurde auf eines der oben angeführten TEM-Grids platziert, um im weiteren Verlauf analysiert werden zu können.



Abbildung 2: Darstellung des FEI Tecnai G2 20 Elektronenmikroskopes (mit freundlicher Genehmigung der Core Facility Ultrastructure Analysis der Medizinischen Universität Graz)

Für die Erzeugung der Bilder wurden diverse Softwarepakete verwendet, die an dieser Stelle beschrieben werden sollen. Mithilfe der Gatan Ultrascan 1000 Kamera, welche bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ arbeitete, konnten die Bilder erstellt werden. Die angebundene Digital Micrograph Software (Gatan, Deutschland) wurde zur Speicherung der Bilder verwendet. Mithilfe der FEI Serial Section Software (FEI, Eindhoven, Niederlande) konnten die Begrenzungen der jeweiligen Schnittpaare gespeichert werden, sodass es möglich wurde, korrespondierende Punkte an beiden Proben des Schnittpaares automatisch anzusteuern. Mittels SerialEM Software wurde ein Polygon gesetzt, das die Begrenzung der Region von Interesse (engl. *region of interest, ROI*) am ersten Schnitt darstellt. Mittels der „Add Grid of Points“ –

Funktion von SerialEM wurde ein Punktraster innerhalb der ROI ohne menschliche Einflussnahme erzeugt, um einen Selection- sowie Observer Bias zu verringern. Mithilfe dieser Software konnten außerdem vier benachbarte Bilder erzeugt und zu einer Montage zusammengefügt werden, wodurch ein für die weitere Auswertung verwendetes, größeres Bild generiert werden konnte. An jedem Punkt des Rasters wurde zunächst ein solches Bild von Schnitt 1 generiert, dann wurde mittels FEI Serial Section Software der entsprechende korrespondierende Punkt auf Schnitt 2 eingestellt. Nach einer Nachkorrektur unter *Live View* der Kamera wurde eine Montage von 2x2 Bildern bei gleicher Vergrößerung wie auf Schnitt 1 mittels Serial EM aufgenommen und der Vorgang so oft wiederholt, bis mindestens 25 Bildpaare aufgenommen waren. Abschließend wurden die erzeugten Bilder mithilfe der *ImageJ*-Software (National Institutes of Health, USA) analysiert, indem hier im Vorfeld eine Benutzerfläche erstellt wurde, die eine farbliche Markierung der untersuchten Parameter ermöglichte. Das FEI TEM Skript, welches für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde, ermöglichte die kontrollierte Bewegung des Objektisches. Die Vorgehensweise mithilfe der hier angeführten Geräte und Softwares ist angelehnt an jene einer Studie von Reichmann et al., welche im Jahr 2015 erschien (24).

Die Punkte mussten bei den oben angeführten Schritten innerhalb des Polygons liegen. Gleichzeitig musste der Abstand zwischen den jeweiligen Punkten so gewählt werden, dass bei der Erstellung der Montagebilder keine Überlappung entstehen würde, bei gleichzeitiger Berücksichtigung einer Mindestanzahl von 25 Punkten.

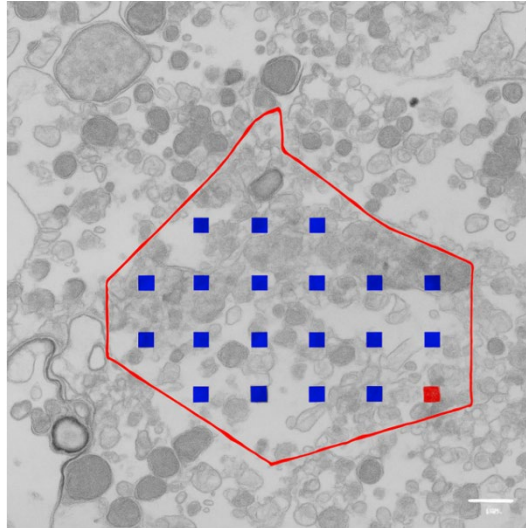


Abbildung 3: Beispielbild der Polygoneingabe in das gewünschte Feld. Das Hintergrundbild wurde vom Verfasser dieser Arbeit erstellt, das Polygon beispielhaft mithilfe von KI (OpenAI/ChatGPT) generiert.

Im Falle von Artefakten, fehlendem Gewebe oder unbefriedigender Schärfe der Bilder, wurden diese Bilder von der Analyse ausgeschlossen, sodass bei jeder Probe mindestens 25 Bilder analysiert wurden. Die weiter oben angeführten vier Bilder wurden bei einer 5000-fachen Vergrößerung erzeugt und zusammengefügt. Dies gelang mithilfe der bereits erwähnten SerialEM-Software. Daraus resultiert eine Bildlänge und – breite von jeweils 7,35 μm . Abschließend wurden die beiden erzeugten Bilder mithilfe der ImageJ-Software zu einem Stack zusammengefügt, sodass die untersuchten Ultrastrukturen optimal übereinandergelagert werden konnten. Auch dieser Teil der Bilderstellung ist an die Methodik von Reichmann et al., wie zuvor erwähnt, angelehnt (24).

2.5 Ablauf der Auswertung

Die generierten Stacks wurden im nächsten Schritt hinsichtlich folgender Parameter ausgewertet: Die Synapsenzahl, die Anzahl der gesamten Vesikel, die Anzahl der gedockten sowie ungedockten Vesikel, wie auch die Anzahl der Dense-Core-Vesikel. Hinsichtlich der Längenparameter wurde weiters der Durchmesser des synaptischen Spaltes bestimmt. Als Maß für den Durchmesser der präsynaptischen aktiven Zone wurde die Länge des Querschnitts der präsynaptischen Membran bestimmt. Weiters wurde die

Länge des Querschnittes der postsynaptischen Membran gemessen. Eine Synapse wurde dann in die Zählung aufgenommen, wenn sie nur auf dem ersten Bild (dem Referenzbild), nicht auf beiden Bildern (dem Referenzbild und dem zweiten oder *Lookup*-Bild), zu sehen war. Die Bildbeobachtung hinsichtlich gefundener Synapsen wurde sowohl in die eine Richtung, mit dem ersten Bild als Referenzbild, als auch in die andere Richtung, mit dem zweiten Bild als Referenzbild, durchgeführt. Dies wurde im weiteren Verlauf bei der Umrechnung auf das jeweilige Volumen berücksichtigt, indem dieses mit dem Faktor zwei multipliziert wurde. Gleichzeitig wurde im Vorfeld festgelegt, dass jene Synapsen, die über den Bildrand hinausragen, nur dann für die Zählung berücksichtigt werden, wenn sie den Rand auf der rechten oder unteren Seite übertreten. Trat dieser Fall für den linken oder oberen Rand ein, so wurde diese Synapse nicht gezählt. Diese Grundprinzipien finden in der Stereologie häufig Gebrauch, um eine gewisse Unvoreingenommenheit zu erzielen (25). Wurde dieselbe Synapse auf beiden Bildern vorgefunden, so wurde sie natürlich nur einmalig gezählt. Alle weiteren untersuchten Ultrastrukturen wurden nur in jenem Schnitt gezählt, auf welchem die Synapse voller getroffen wurde.

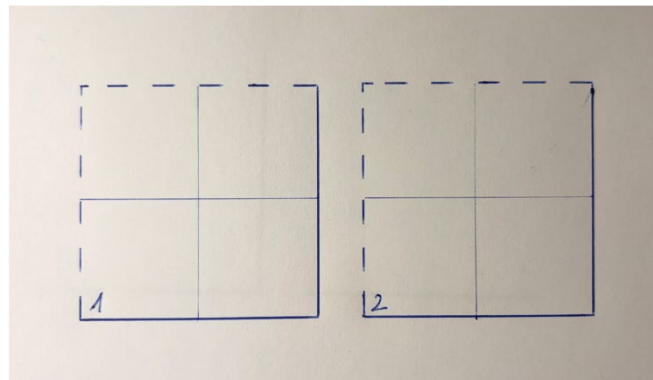


Abbildung 4: Beispiel der Festlegung der relevanten Ränder bei Zählung der Synapsen. Sollte eine Synapse eine der durchgehenden Linien übertreten, wird sie für die Auswertung gezählt. Bei Übertreten der strichlierten Linie wird sie nicht berücksichtigt.

Für die weitere Auswertung wurde ein *ObjectJ*-Plugin verwendet, welches innerhalb der bereits oben angeführten Plattform für Bildanalyse *Fiji* erstellt wurde und auf der *ImageJ2*-Software basiert. Dadurch konnte den zu untersuchenden Ultrastrukturen eine farbliche Zuordnung ermöglicht werden. Diese Auswertung wurde nun für alle erzeugten Bilder vorgenommen.

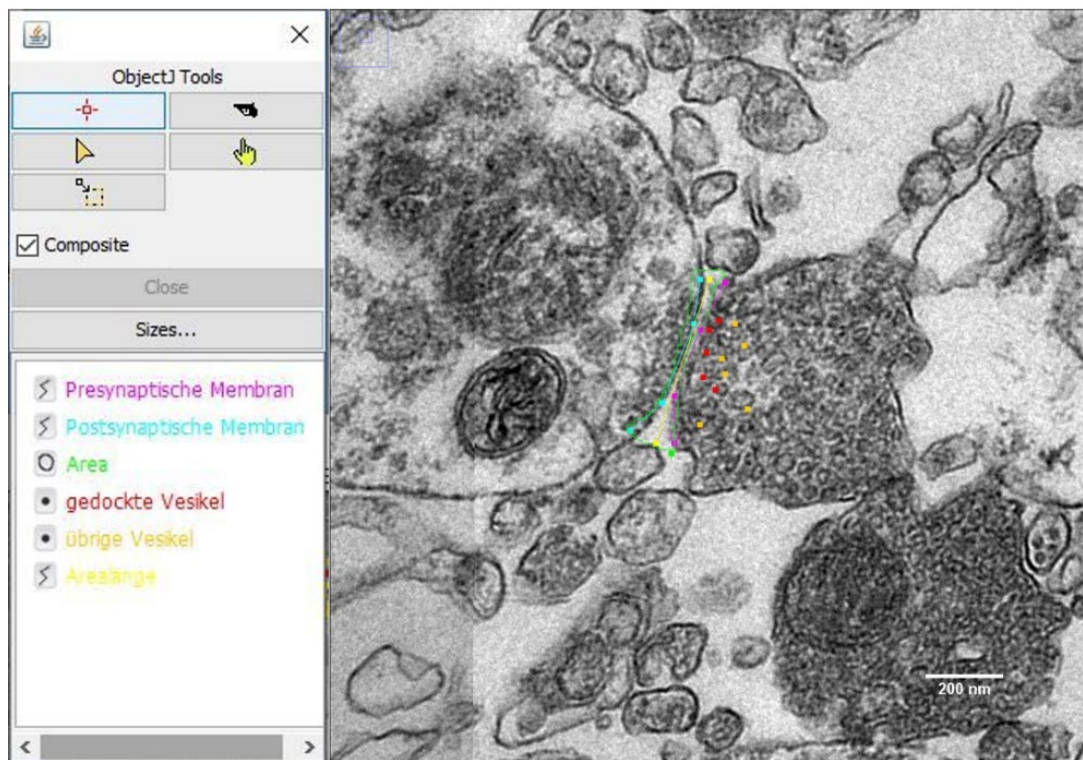


Abbildung 5: links: farblich dargestellte Parameter der untersuchten Ultrastrukturen; rechts: Beispielbild einer ausgewerteten Synapse. Die farblichen Markierungen stimmen hier mit den Bezeichnungen der farblich hinterlegten Strukturen überein. (Erstellt mit ImageJ)

Allgemeine Charakteristika einer Synapse wurden herangezogen, um diese Strukturen auch als eine solche zu erkennen und definieren. Hierbei ist das Vorliegen eines engen synaptischen Spaltes zwischen zwei aneinanderliegenden Membranen, eine Cluster-Bildung von Vesikeln im präsynaptischen Bereich, sowie das Vorliegen einer postsynaptischen Dichte (PSD) relevant (26). Die Feinunterscheidung der Vesikel in gedockte und ungedockte wurde hinsichtlich ihrer Nähe zu der präsynaptischen Membran getroffen. Alle Vesikel, die direkt an der Membran lagen, wurden als gedockte Form gewertet. Lag wiederum an diesen Vesikeln erneut ein weiteres Vesikel an, so wurde diese ebenso als gedockte gewertet. Alle anderen in unmittelbarer Nähe zur Membran liegenden Vesikel wurden in weiterer Folge als ungedockte definiert. Dense-Core-Vesikel weisen mit rund 80-100 nm einen deutlich größeren Durchmesser als gewöhnliche Vesikel auf. Charakteristisch ist auch der verstärkt elektronendichte Kern, welcher sehr zentral liegt. Anhand dieser Merkmale wurden diese Vesikel gefunden.

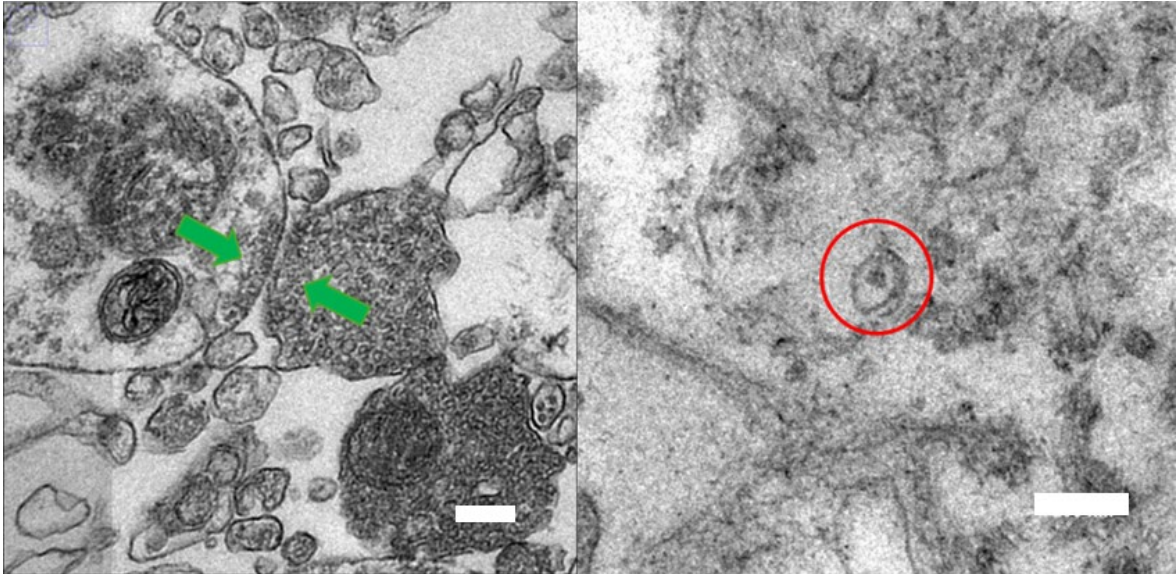


Abbildung 6: links: Beispiel für eine Synapse (mit grünen Pfeilen markiert); rechts: Beispiel für ein DCV (mit rotem Kreis markiert). Balken 200 nm.

Die ausgewerteten Strukturen konnten durch Anklicken oder Nachfahren durch die ImageJ-Software automatisch gespeichert werden. Abschließend wurden diese Werte in separate Excel-Dateien übertragen, wo sie als Rohdaten für die statistische Auswertung fungierten. Bis zum Abschluss der Auswertung wusste der Verfasser dieser Arbeit nicht über Behandlung der Probe beziehungsweise Art der Untergruppe Bescheid. Erst im Anschluss wurden die mit zufälligen Zahlen beschrifteten Ordner und Proben aufgelöst, indem die zugeordnete Untergruppe und Gewebeart gezeigt wurden.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von SPSS (Statistical Package for Social Science, IBM, Version 29). Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant, $< 0,01$ als hoch signifikant und $< 0,001$ als sehr hoch signifikant angenommen. Die Normalverteilung wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Aufgrund ausbleibender Normalverteilung und kleiner Stichprobe wurde für den Gesamtvergleich der Kruskal-Wallis-Test angewandt, für die paarweise Vergleiche zur Kontrollgruppe in weiterer Folge jeweils ein Mann-Whitney-U-Test (MWU) verwendet.

3 Resultate mit graphischen Darstellungen

3.1 Erklärung der präsentierten Daten und Graphiken

Im Rahmen dieses Kapitels wird nun ein Blick auf die Ergebnisse der durchgeführten Zählungen und Messungen geworfen. Dabei wird jeder Parameter, unter Zuhilfenahme von Balkendiagrammen, Boxplots sowie den bereits erwähnten statistischen Untersuchungsmethoden, separat betrachtet. In den Balkendiagrammen werden die vier analysierten Untergruppen des humanen und porzinen Gewebes jeweils in Zweier-Gruppierung dargestellt, während die Boxplots für die beiden Gewebe separat erstellt wurden, um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten. Die Werte aller Parameter können im Anhang (A) in tabellarischer Form zusammengefasst nachgeschlagen werden.

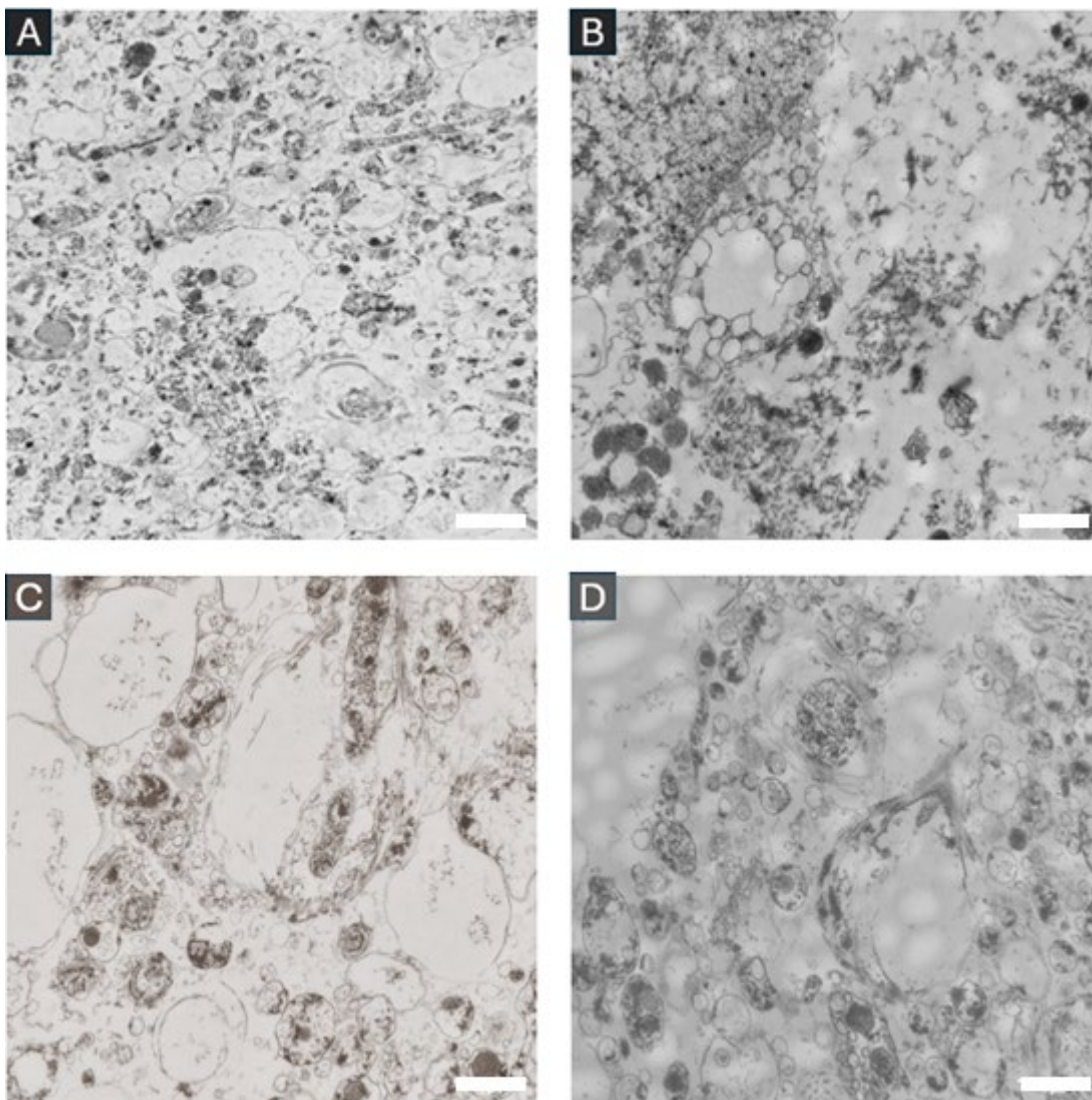


Abbildung 7: Beispielbilder der jeweiligen Untergruppen des untersuchten humanen Gewebes. A: Kontrollgruppe; B: Eisen; C: Beta-Amyloid; D: Eisen und Beta-Amyloid. Balken 1 μ m.

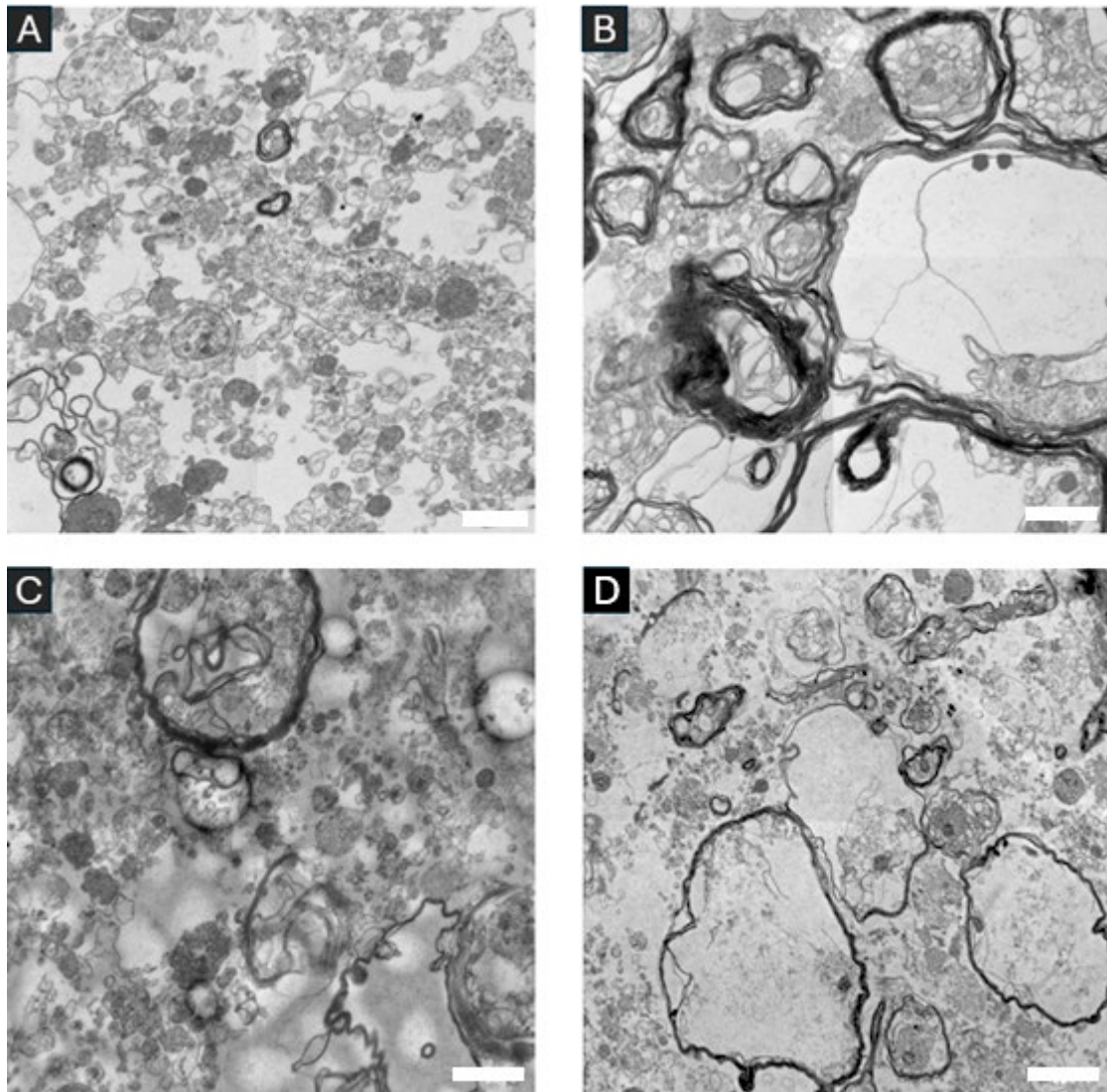


Abbildung 8: Beispielbilder der jeweiligen Untergruppen des untersuchten porcinen Gewebes. A: Kontrollgruppe; B: Eisen; C: Beta-Amyloid; D: Eisen und Beta-Amyloid. Balken 1 μm .

3.2 Resultate der Synapsendichte pro μm^3

Im Rahmen der Untersuchung der humanen Gruppe ergab sich in der Kontrollgruppe ein Mittelwert von $0,099 \pm 0,14$ Synapsen pro μm^3 , in den beiden Gruppen der Eisen- sowie Amyloid-Beta-Oligomer-Anreicherung jeweils $0,019 \pm 0,051$ Synapsen pro μm^3 , zuletzt in der Gruppe der kombinierten Amyloid- und Eisenanreicherung ein Mittelwert von $0,043 \pm 0,071$ Synapsen pro μm^3 . Nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests für nicht-normalverteilte Parameter, resultierte hiermit eine signifikante Reduktion der Synapsendichte in der Gruppe des Amyloid-Beta-Oligomers ($p < 0,05$), sowie auch des Eisens ($p < 0,05$), im Vergleich zur Kontrolle. Die Untergruppe aus kombinierter

Anreicherung von Eisen sowie Amyloid-Beta-Oligomeren zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Analoge Betrachtung der porcinen Gruppe zeigte einen Mittelwert der Kontrollgruppe von $0,08 \pm 0,1$ Synapsen pro μm^3 . In der Eisen-Untergruppe konnten hierbei keine Synapsen gefunden werden, während in der Amyloid-Beta-Oligomer-Gruppe ein Mittelwert von $0,025 \pm 0,058$ Synapsen pro μm^3 vorliegt. Die abschließende Gruppe der Kombination aus den beiden vorangehenden Stoffen ergab einen Mittelwert von $0,012 \pm 0,043$ Synapsen pro μm^3 . Die Durchführung derselbigen, wie oben angeführten, Testverfahren, ergab einen sehr hoch signifikanten Unterschied der Eisengruppe im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$), einen signifikanten Unterschied der Amyloid-Beta-Oligomer-Gruppe ($p < 0,05$), sowie einen hoch signifikanten Unterschied der Untergruppe mit Hinzufügen von Eisen und Amyloid-Beta-Oligomeren ($p < 0,01$).

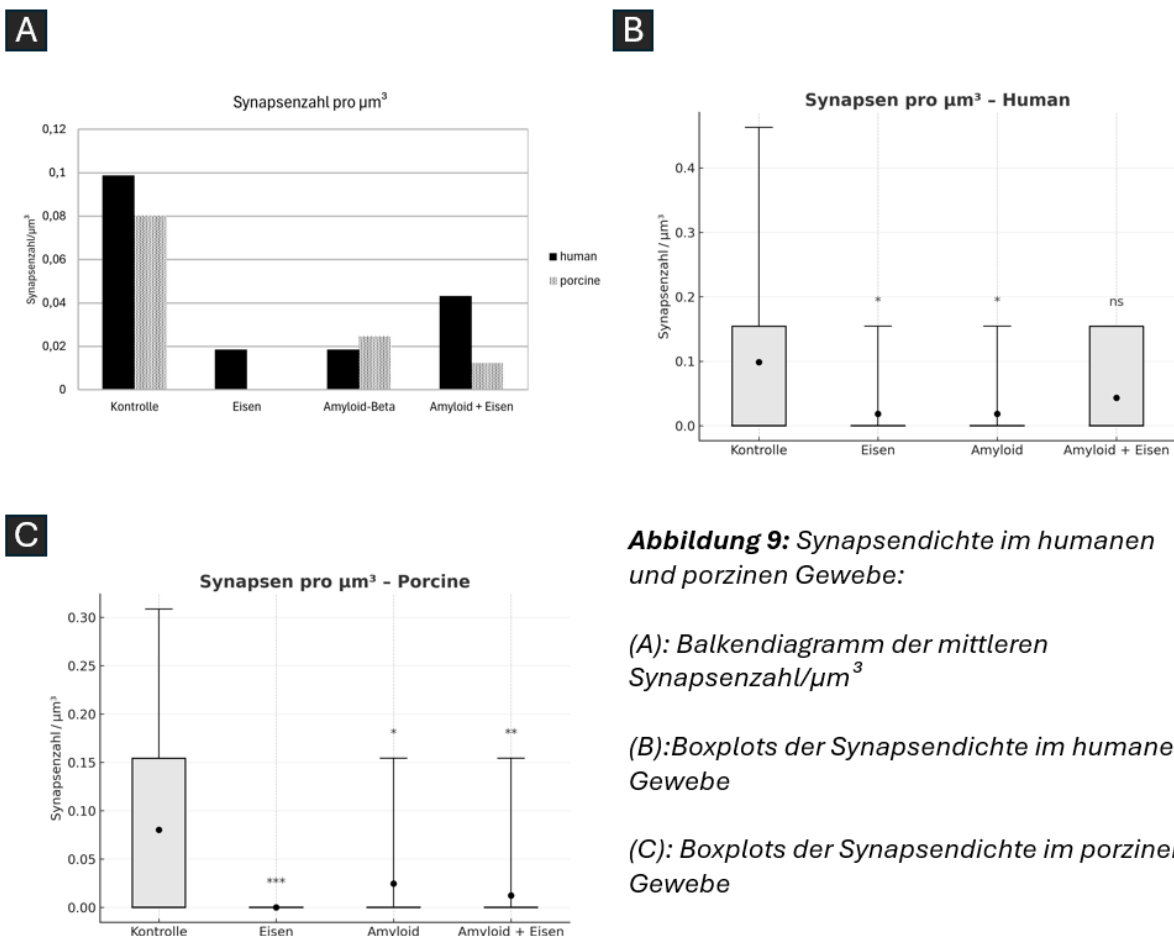


Abbildung 9: Synapsendichte im humanen und porcinen Gewebe:

(A): Balkendiagramm der mittleren Synapsenzahl/ μm^3

(B): Boxplots der Synapsendichte im humanen Gewebe

(C): Boxplots der Synapsendichte im porcinen Gewebe

3.3 Resultate der Vesikelparameter pro μm^3

Im Nachfolgenden werden die Resultate hinsichtlich der gesamten Vesikelzahl präsentiert. Auch hier erfolgt wieder die separate Betrachtung der humanen, sowie porzinen Gruppe, wo alle vier Untergruppen jeweils gegen die Kontrollgruppe verglichen werden.

In der humanen Gruppe lässt sich in der Kontrollgruppe ein Mittelwert von $0,185 \pm 0,375$ Vesikel pro μm^3 feststellen, die Eisengruppe zeigt einen Mittelwert von $0,099 \pm 0,342$ Vesikel pro μm^3 , die Amyloid-Beta-Oligomer-Gruppe einen Mittelwert von $0,099 \pm 0,353$ Vesikel pro μm^3 , während die abschließende Gruppe aus einer Kombination der beiden einen Mittelwert von $0,333 \pm 0,765$ Vesikel pro μm^3 aufweist. Dieselbe Durchführung der statistischen Auswertung, wie im Punkt der Synapsendichte zuvor, zeigte hierbei in keiner der vier Untergruppen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die porzine Gruppe zeigte in der Kontrollgruppe einen Mittelwert von $0,364 \pm 0,607$ Vesikel pro μm^3 , in der Amyloid-Untergruppe einen Wert von $0,093 \pm 0,327$ Vesikel pro μm^3 und in der kombinierten Gruppe $0,136 \pm 0,489$ Vesikel pro μm^3 . In der Eisen-Gruppe konnten keine Synapsen und somit auch keine Vesikel gefunden werden, was einem Wert von 0 Vesikel pro μm^3 entspricht. Bei der Überprüfung auf signifikante Unterschiede zeigt sich gegenüber der Eisen-Gruppe eine hoch signifikante Veränderung ($p < 0,01$). Weiters ergab die Durchführung des Mann-Whitney-U-Test einen signifikanten Unterschied der Amyloid-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$), während die kombinierte Gruppe keinen signifikanten Unterschied aufwies.

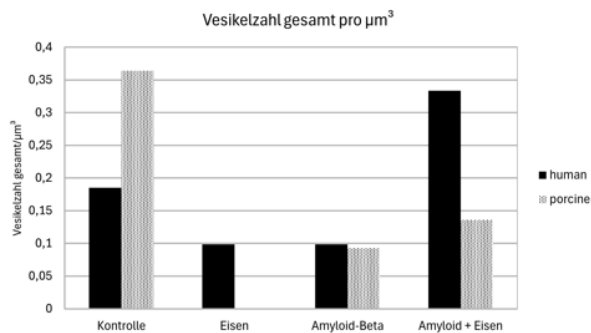
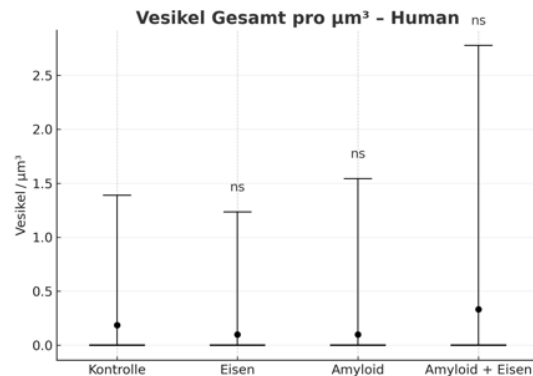
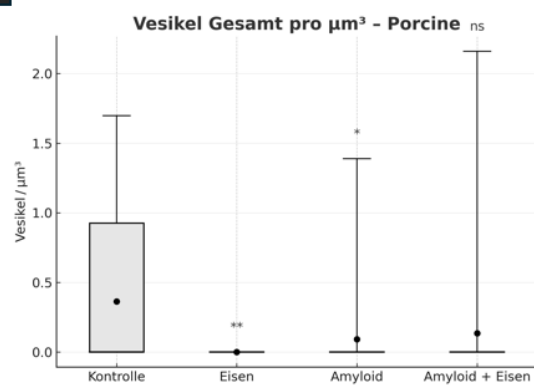
A**B****C**

Abbildung 10: Gesamte Vesikelzahl im humanen und porcinen Gewebe.

(A): Balkendiagramm der mittleren Vesikelzahl/ μm^3

(B): Boxplots der gesamten Vesikeldichte im humanen Gewebe

(C): Boxplots der gesamten Vesikeldichte im porcinen Gewebe

Im Rahmen der Auswertung erfolgte auch eine differenzierte Betrachtung der gedockten, sowie ungedockten Vesikel. Auf die Resultate dieser beiden Gruppen soll nun im Folgenden eingegangen werden, wobei mit ersterer begonnen wird.

Die gedockten Vesikel der Kontrollgruppe des humanen Gewebes zeigten einen Mittelwert von $0,124 \pm 0,236$ Vesikel pro μm^3 auf, jene der Eisen-Gruppe einen Wert von $0,043 \pm 0,151$ Vesikel pro μm^3 und jene der Amyloid-Gruppe $0,049 \pm 0,171$ Vesikel pro μm^3 . Die Untergruppe der kombinierten Anreicherung von Amyloid und Eisen zeigte einen Mittelwert von $0,222 \pm 0,567$ Vesikel pro μm^3 . Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich nach Durchführung der Überprüfung auf Signifikanzen innerhalb der einzelnen Untergruppen keine nennenswerten Unterschiede.

Die Kontrollgruppe der porcinen Gruppe zeigte einen Mittelwert von $0,204 \pm 0,353$ Vesikel pro μm^3 , jene der Amyloid-Gruppe von $0,043 \pm 0,164$ Vesikel pro μm^3 , sowie jene der kombinierten Anreicherung $0,080 \pm 0,286$ Vesikel pro μm^3 . In der porcinen Gruppe lagen keine gedockten Vesikel in der Eisen-Gruppe vor. Analoge Testung der Signifikanz

zeigte hierbei einen hoch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe sowie der Eisen-Gruppe ($p < 0,01$), wie auch einen signifikanten Unterschied zur Amyloid-Gruppe ($p < 0,05$). Die kombinierte Untergruppe aus Amyloid-Beta-Oligomeren sowie Eisen zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe.

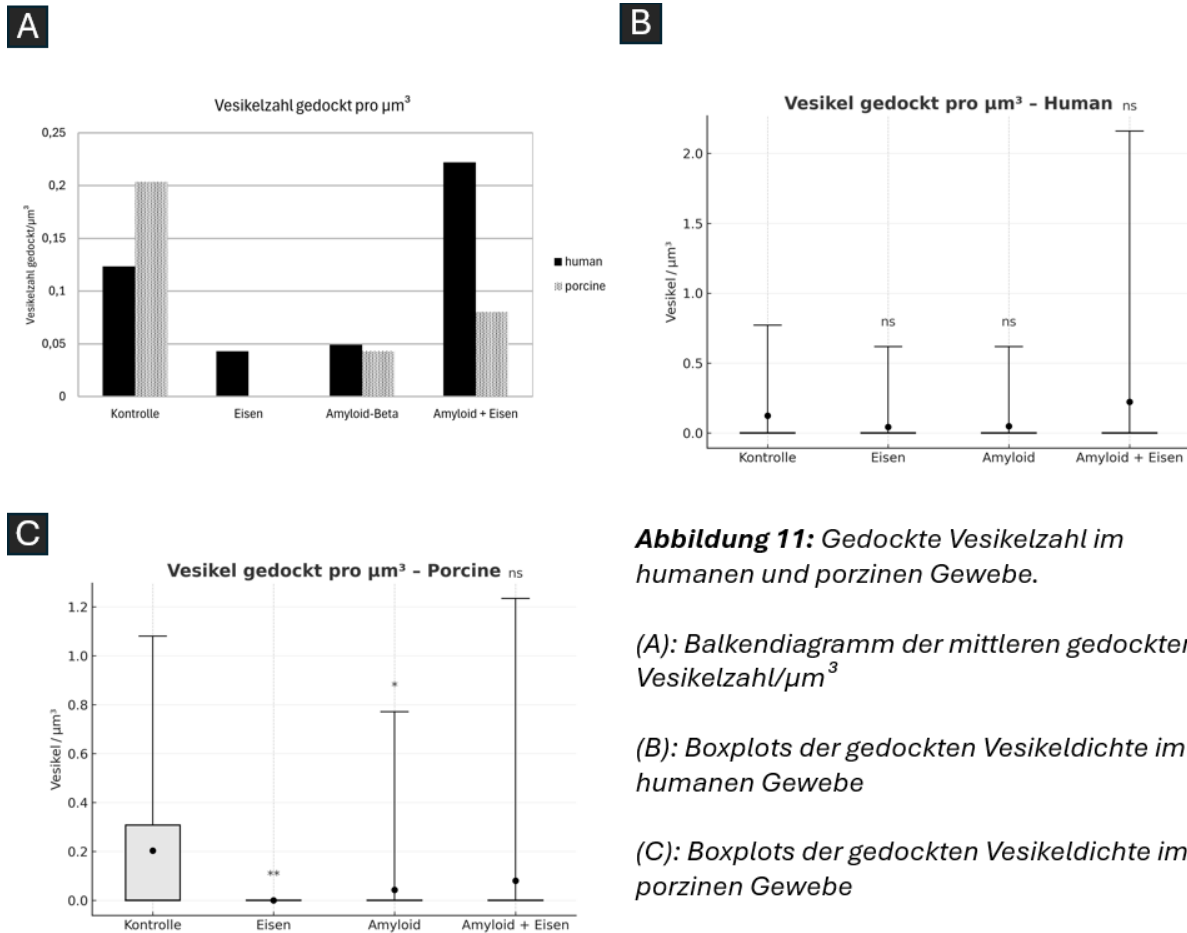


Abbildung 11: Gedockte Vesikelzahl im humanen und porcinen Gewebe.

(A): Balkendiagramm der mittleren gedockten Vesikelzahl/ μm^3

(B): Boxplots der gedockten Vesikeldichte im humanen Gewebe

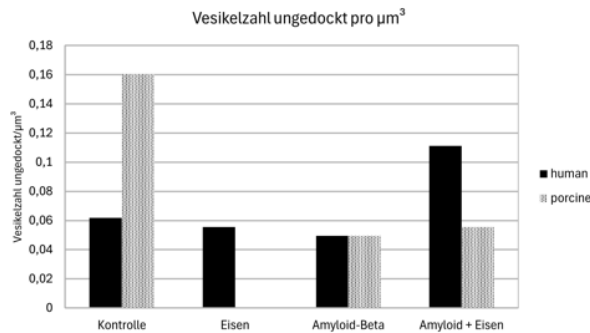
(C): Boxplots der gedockten Vesikeldichte im porcinen Gewebe

Die Analyse der ungedockten Vesikel zeigte im humanen Gewebe einen Mittelwert der Kontrollgruppe von $0,062 \pm 0,161$ Vesikel pro μm^3 . Die Eisen-Gruppe weist einen Mittelwert von $0,056 \pm 0,194$ Vesikel pro μm^3 auf, während die Amyloid-Gruppe den Mittelwert $0,049 \pm 0,193$ Vesikel pro μm^3 zeigt. Die vierte Untergruppe aus der kombinierten Variante von Amyloid und Eisen zeigte einen Mittelwert von $0,111 \pm 0,277$ Vesikel pro μm^3 . Bei der Untersuchung auf signifikante Unterschiede konnte in keiner Untergruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ein solcher gefunden werden.

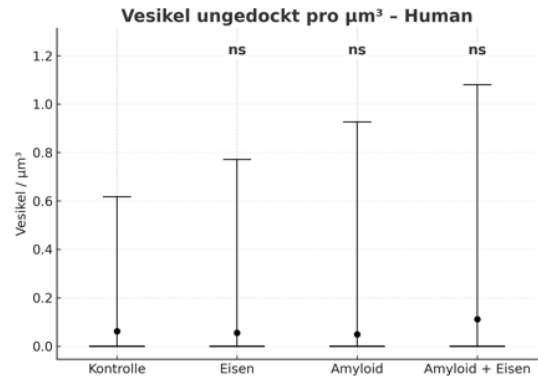
Die Analyse des porcinen Gewebes ergab in der Kontrollgruppe einen Mittelwert von $0,161 \pm 0,290$ Vesikel pro μm^3 . Für die Amyloid-Gruppe ergab sich ein Mittelwert von

0,049 ± 0,171 Vesikel pro μm^3 , während dieser Wert für die kombinierte Gruppe bei 0,056 ± 0,204 lag. Keine Vesikel konnten in der Eisen-Gruppe festgestellt werden. Diese Untergruppe war hierbei die einzige, in welcher sich im porzinen Gewebe ein signifikanter Unterschied erkennen lassen konnte, welcher sogar von hoher Signifikanz ausfiel ($p < 0,01$).

A



B



C

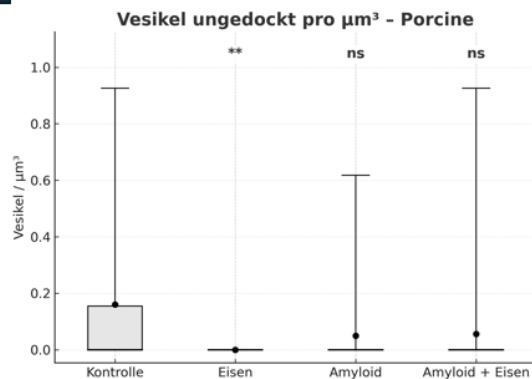


Abbildung 12: Ungedockte Vesikelzahl im humanen und porzinen Gewebe.

(A): Balkendiagramm der mittleren ungedockten Vesikelzahl/ μm^3

(B): Boxplots der ungedockten Vesikeldichte im humanen Gewebe

(C): Boxplots der ungedockten Vesikeldichte im porzinen Gewebe

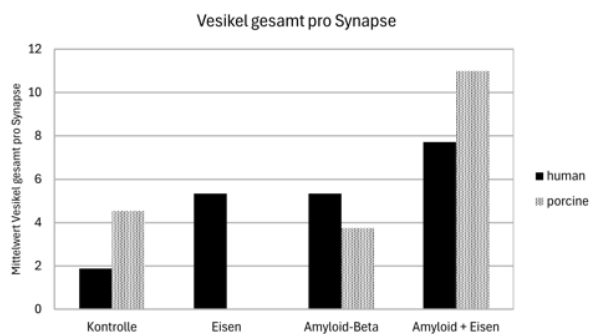
3.4 Resultate der gesamten Vesikelzahl pro Synapse

Im nächsten Schritt wurde die gesamte Vesikelzahl pro Synapse errechnet. In der humanen Untergruppe zeigte sich hierbei in der Kontrollgruppe ein Mittelwert von $1,875 \pm 2,849$ Vesikel pro Synapse, in der Eisen-Gruppe ein Mittelwert von $5,333 \pm 4,619$ Vesikeln pro Synapse, sowie in der Amyloid-Gruppe ein Mittelwert von $5,333 \pm 5,033$ Vesikeln pro Synapse. Die kombinierte Gruppe aus Eisen und Amyloid zeigte einen Mittelwert von $7,714 \pm 6,945$ Vesikeln pro Synapse. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte die kombinierte

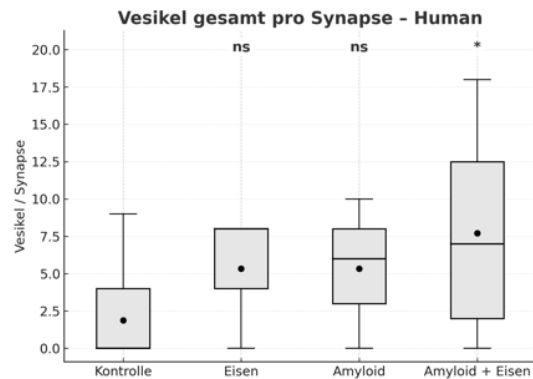
Untergruppe aus Amyloid und Eisen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der gesamten Vesikelzahl pro Synapse ($p < 0,05$).

Die porcine Gruppe zeigte in der Kontrollgruppe einen Mittelwert von $4,539 \pm 3,908$ Vesikeln pro Synapse, in der Amyloid-Gruppe betrug dieser $3,75 \pm 4,5$ Vesikel pro Synapse. Die kombinierte Gruppe aus Eisen und Amyloid ergab einen Mittelwert von $11 \pm 4,243$ Vesikeln pro Synapse. Auch in der porcinen Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der gesamten Vesikelzahl pro Synapse eruiert werden. Aufgrund fehlender Synapsen in der Eisengruppe, liegen in dieser Gruppe keine Werte für diese Untergruppe vor.

A



B



C

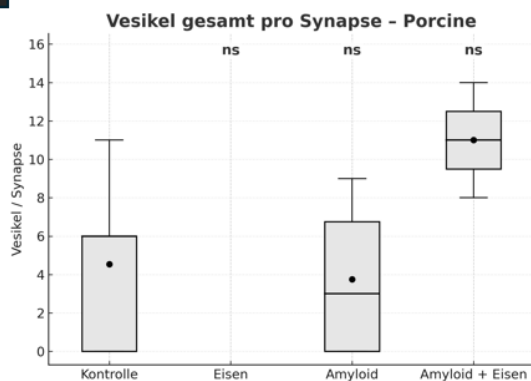


Abbildung 13: Gesamte Vesikelzahl im humanen und porcinen Gewebe, auf Synapse gerechnet

(A): Balkendiagramm der mittleren Vesikelzahl/Synapse

(B): Boxplots der gesamten Vesikeldichte im humanen Gewebe, pro Synapse

(C): Boxplots der gesamten Vesikeldichte im porcinen Gewebe, pro Synapse

3.5 Resultate der gedockten Vesikelzahl pro Synapse

Im nächsten Schritt wurde die detaillierte Analyse der ausschließlich gedockten Vesikel im Verhältnis zur vorliegenden Synapsenzahl vorgenommen. In der humanen Gruppe zeigte die Kontrollgruppe hierbei einen Mittelwert von $1,25 \pm 1,77$ gedockten Vesikeln pro Synapse, in der Eisen-Gruppe betrug dieser Wert $2,333 \pm 2,082$. Die Amyloid-Gruppe zeigte einen Mittelwert von $2,666 \pm 2,309$ gedockten Vesikeln pro Synapse, während die kombinierte Gruppe aus Eisen und Amyloid einen Wert von $5,143 \pm 5,64$ gedockten Vesikeln pro Synapse zeigte. Es zeigte sich in dieser Gruppe kein signifikanter Unterschied der respektiven Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe hinsichtlich des untersuchten Parameters.

Die Kontrollgruppe des porzinen Gewebes zeigte einen Mittelwert von $2,539 \pm 2,402$ gedockten Vesikeln pro Synapse, die Amyloid-Gruppe einen Wert von $1,75 \pm 2,363$. Die Kombination aus Eisen und Amyloid wies einen Mittelwert von $6,5 \pm 2,121$ gedockten Vesikeln pro Synapse auf. Auch in der porzinen Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der gedockten Vesikel pro Synapse im Vergleich zur Kontrollgruppe eruiert werden.

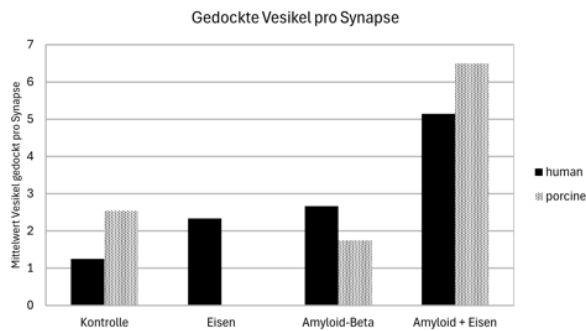
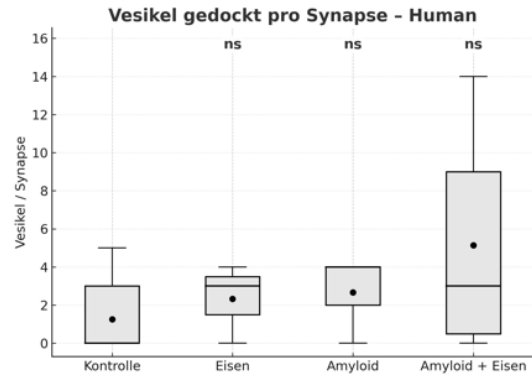
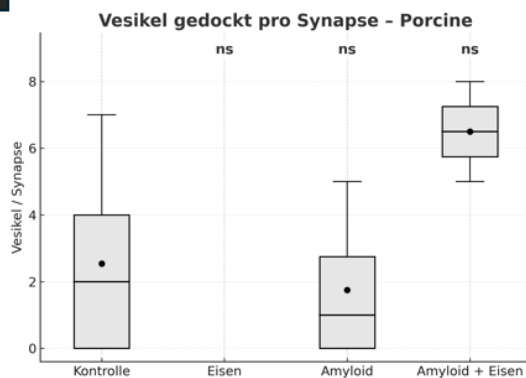
A**B****C**

Abbildung 14: Gedockte Vesikelzahl im humanen und porcinen Gewebe, auf Synapse gerechnet

(A): Balkendiagramm der mittleren gedockten Vesikelzahl/Synapse

(B): Boxplots der gedockten Vesikeldichte im humanen Gewebe, pro Synapse

(C): Boxplots der gedockten Vesikeldichte im porcinen Gewebe, pro Synapse

3.6 Resultate der DCV-Dichte pro μm^3

Die Analyse der Dense-Core-Vesikel (DCV) erfolgte ebenfalls nach demselben Schema wie die vorangegangenen Vesikelparameter. In der humanen Gruppe konnten derartige DCV lediglich in der Amyloid- sowie der kombinierten Gruppe aus Eisen und Amyloid gefunden werden. In beiden Gruppen ergab sich derselbe Mittelwert von $0,006 \pm 0,031$ DCV pro μm^3 . Verglichen zur Kontrollgruppe zeigten sich in allen Untergruppen keine signifikanten Unterschiede. Analoge Vorgehensweise erfolgte genauso für die porcine Gruppe. Hierbei konnten keine DCV in der Kontrollgruppe gefunden werden. Die Eisen-Gruppe, wie auch die kombinierte Gruppe, zeigten jeweils einen Mittelwert von $0,006 \pm 0,031$ DCV pro μm^3 , während die Amyloid-Gruppe einen Mittelwert von $0,012 \pm 0,043$ DCV pro μm^3 aufwies. Auch in der porcinen Gruppe konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Untergruppen gefunden werden.

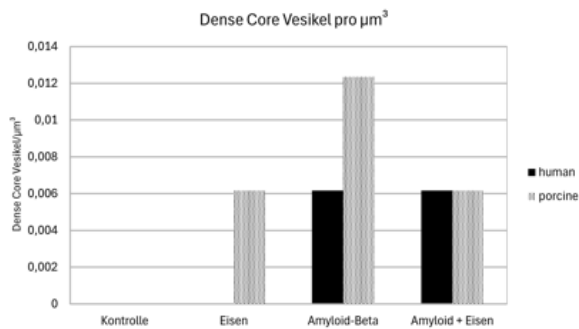
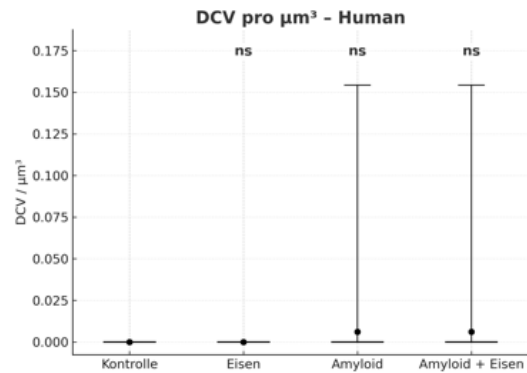
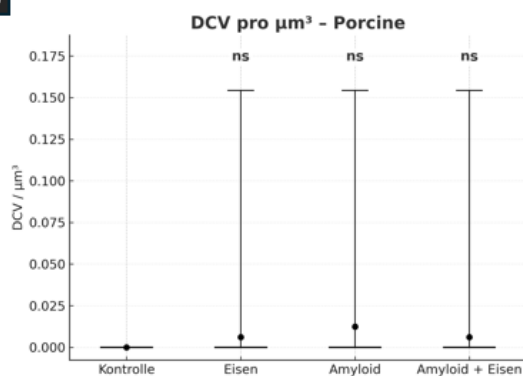
A**B****C**

Abbildung 15: DCV-Zahl im humanen und porcinen Gewebe.

(A): Balkendiagramm der mittleren DCV-Zahl/ μm^3

(B): Boxplots der DCV-Dichte im humanen Gewebe

(C): Boxplots der DCV-Dichte im porcinen Gewebe

3.7 Resultate der Breite des synaptischen Spaltes

Die Breite des synaptischen Spaltes der betrachteten Synapsen wurden nach demselben Prinzip ausgewertet. Beginnend mit der humanen Gruppe, ließ sich in der Kontrollgruppe ein Mittelwert von $0,852 \pm 0,662 \mu\text{m}$, bei einem Median von $0,6 [0,421 - 1,056] \mu\text{m}$, feststellen, die Eisen-Gruppe zeigte einen Mittelwert von $0,121 \pm 0,048 \mu\text{m}$, sowie einen Median von $0,146 [0,106 - 0,149] \mu\text{m}$. Die mit Amyloid-Beta-Oligomeren angereicherte Gruppe zeigte einen Mittelwert von $0,129 \pm 0,076 \mu\text{m}$ bei einem Median von $0,168 [0,104 - 0,172] \mu\text{m}$. Die Gruppe aus kombinierter Anreicherung beider Stoffe zeigte einen Mittelwert von $0,083 \pm 0,06 \mu\text{m}$, bei einem Median von $0,066 [0,043 - 0,119] \mu\text{m}$. Sowohl die Eisen-, als auch die Amyloid-Gruppe zeigten hierbei einen hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,01$), die kombinierte einen sehr hoch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Die Kontrollgruppe der porcinen Gruppe zeigte einen Mittelwert von $0,078 \pm 0,087 \mu\text{m}$, bei einem Median von $0,049 [0,034 - 0,077] \mu\text{m}$, während die Amyloid-Gruppe einen

Mittelwert von $0,057 \pm 0,033 \mu\text{m}$ zeigte, bei einem Median von $0,045 [0,037 - 0,065] \mu\text{m}$. Die Gruppe aus der Kombination von Eisen und Amyloid zeigte einen Mittelwert von $0,253 \pm 0,153 \mu\text{m}$, mit einem Median von $0,253 [0,199 - 0,308] \mu\text{m}$. In der Eisen-Gruppe lagen keine Synapsen vor, weshalb die Werte hierbei alle $0 \mu\text{m}$ entsprechen. In keiner der Gruppen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

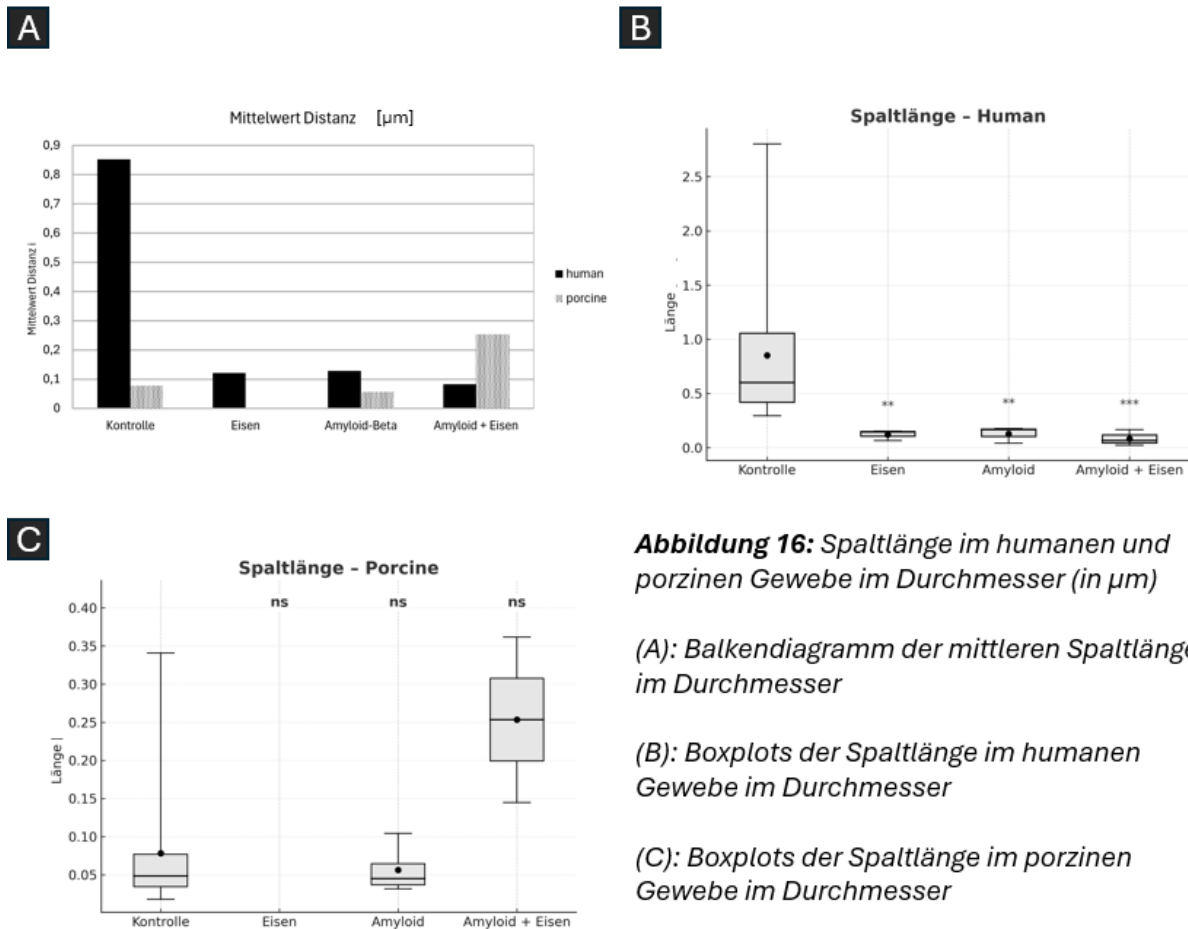


Abbildung 16: Spaltlänge im humanen und porcinen Gewebe im Durchmesser (in μm)

(A): Balkendiagramm der mittleren Spaltlänge im Durchmesser

(B): Boxplots der Spaltlänge im humanen Gewebe im Durchmesser

(C): Boxplots der Spaltlänge im porcinen Gewebe im Durchmesser

3.8 Resultate: Durchmesser der präsynaptischen Membran

Die Auswertung der Durchmesser der Querschnitte der präsynaptischen Membranen ergab in der humanen Gruppe für die Kontrollgruppe einen Mittelwert von $0,871 \pm 0,676 \mu\text{m}$, bei einem Median von $0,645 [0,432 - 1,052] \mu\text{m}$. Für die Eisen-Gruppe ergab sich ein Mittelwert von $0,49 \pm 0,182 \mu\text{m}$, bei einem Median von $0,45 [0,391 - 0,569] \mu\text{m}$. Der Mittelwert der Amyloid-Gruppe liegt bei $0,449 \pm 0,074 \mu\text{m}$, mit einem Median von $0,408$

[0,407 – 0,472] μm . Die Gruppe der kombinierten Anreicherung ergab einen Mittelwert von $0,363 \pm 0,171 \mu\text{m}$. Der Median hierbei lag bei $0,436 [0,222 – 0,493] \mu\text{m}$. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich nur in der kombinierten Untergruppe ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

Für die porcine Gruppe zeigte sich in der Kontrollgruppe ein Mittelwert von $0,371 \pm 0,092 \mu\text{m}$, mit einem Median von $0,365 [0,308 – 0,409] \mu\text{m}$. Die Amyloid-Gruppe zeigte einen Mittelwert von $0,327 \pm 0,141 \mu\text{m}$, mit einem Median von $0,311 [0,246 – 0,392] \mu\text{m}$. Die kombinierte Gruppe aus Eisen und Amyloid ergab einen Mittelwert von $0,913 \pm 0,785 \mu\text{m}$, mit einem Median von $0,913 [0,636 – 1,191] \mu\text{m}$. In der porcinen Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied der anderen Untergruppen festgestellt werden.

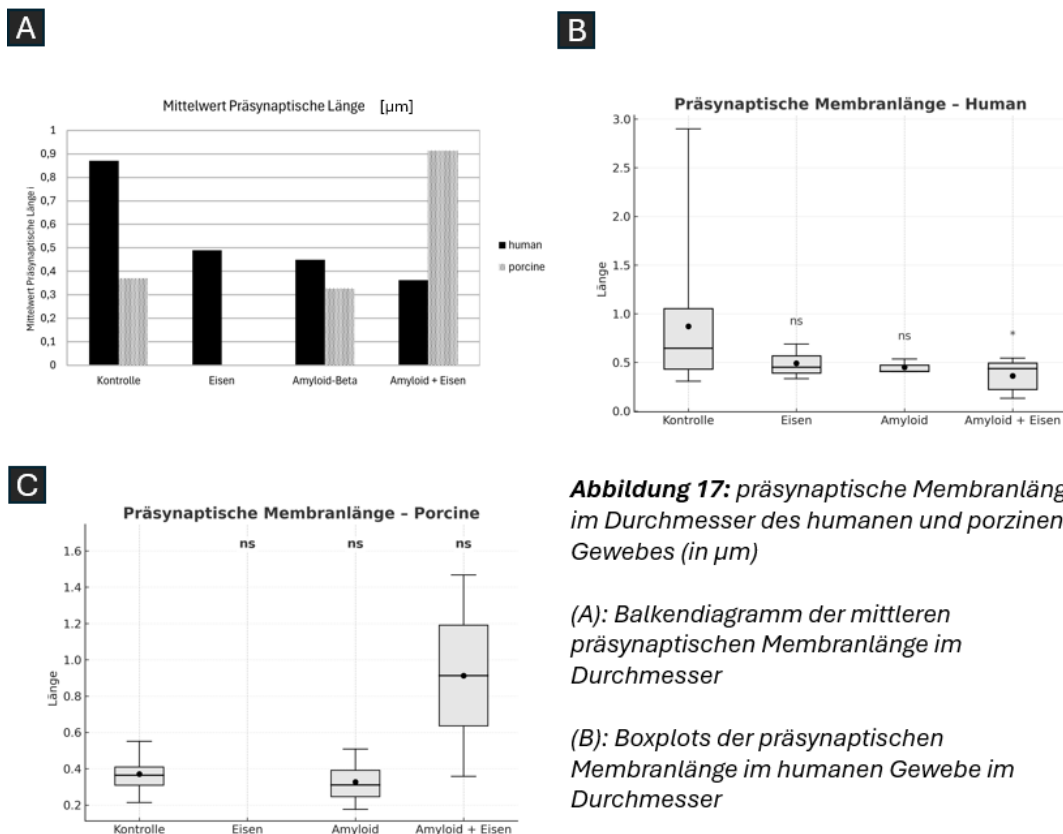


Abbildung 17: präsynaptische Membranlänge im Durchmesser des humanen und porcinen Gewebes (in μm)

(A): Balkendiagramm der mittleren präsynaptischen Membranlänge im Durchmesser

(B): Boxplots der präsynaptischen Membranlänge im humanen Gewebe im Durchmesser

(C): Boxplots der präsynaptischen Membranlänge im porcinen Gewebe im Durchmesser

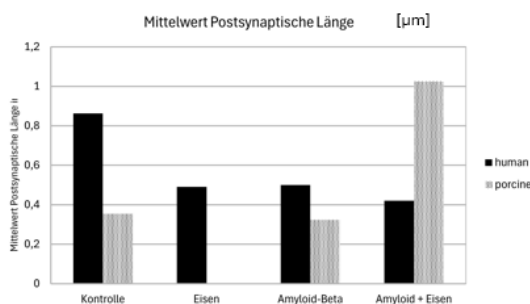
3.9 Resultate: Durchmesser der postsynaptischen Membran

Die Messung der Durchmesser der Querschnitte der postsynaptischen Membranen in den beiden Gewebegruppen ergab im humanen Gewebe für die Kontrollgruppe einen

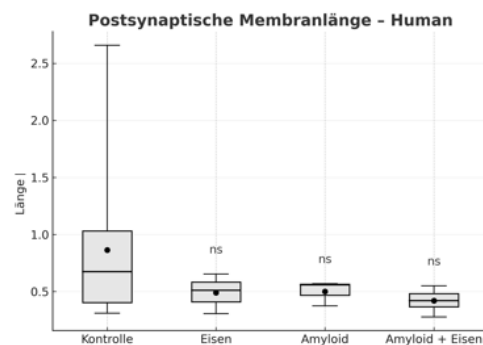
Mittelwert von $0,863 \pm 0,629 \mu\text{m}$, bei einem Median von $0,673 [0,403 - 1,032] \mu\text{m}$. Die Eisen-Gruppe zeigte einen Mittelwert von $0,491 \pm 0,174 \mu\text{m}$, mit einem Median von $0,511 [0,409 - 0,582] \mu\text{m}$. In der Amyloid-Gruppe wurde ein Mittelwert von $0,501 \pm 0,11 \mu\text{m}$ errechnet, der Median lag hier bei $0,559 [0,466 - 0,564] \mu\text{m}$. Die Untergruppe der Kombination aus Amyloid und Eisen zeigte einen Mittelwert von $0,42 \pm 0,101 \mu\text{m}$, mit einem Median von $0,419 [0,366 - 0,482] \mu\text{m}$. Keine der Untergruppen zeigte zur Kontrollgruppe verglichen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des untersuchten Parameters.

Im Vergleich dazu ergab die Kontrollgruppe des porcinen Gewebes einen Mittelwert von $0,355 \pm 0,093 \mu\text{m}$, der Median lag bei $0,369 [0,294 - 0,402] \mu\text{m}$. Der Mittelwert der Amyloid-Gruppe betrug $0,324 \pm 0,152 \mu\text{m}$, mit einem Median von $0,317 [0,228 - 0,413] \mu\text{m}$. Die kombinierte Untergruppe aus Amyloid und Eisen ergab einen Mittelwert von $1,025 \pm 0,765 \mu\text{m}$, als Median ergab sich ein Wert von $1,025 [0,755 - 1,296] \mu\text{m}$. Auch in den Untergruppen des porcinen Gewebes ergab sich somit in keiner der Untergruppen ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

A



B



C

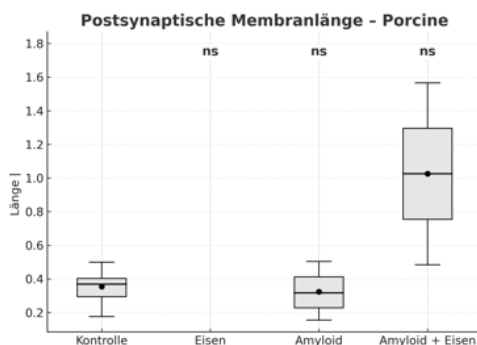


Abbildung 18: postsynaptische Membranlänge im Durchmesser des humanen und porcinen Gewebes (in μm)

(A): Balkendiagramm der mittleren postsynaptischen Membranlänge im Durchmesser

(B): Boxplots der postsynaptischen Membranlänge im humanen Gewebe im Durchmesser

(C): Boxplots der postsynaptischen Membranlänge im porcinen Gewebe im Durchmesser

4 Diskussion

4.1 Antworten auf die Forschungsfragen

Die grundlegenden Fragestellungen dieser Arbeit fokussierten sich auf die Veränderung der Zahl und Struktur der Synapsen. Humanes und porzines Gewebe wurde hinsichtlich der Lokalisation des Hippocampus präpariert und im Gewebekulturmodell mit A β ₁₋₄₂-Polymeren sowie Eisen(III)-Citrat angereichert. Durch chemische Fixierung und Anwendung der HPF-FS-Methode wurden Proben mithilfe eines Vibratoms in passende Schnittdicke gebracht. Nach zusätzlicher Kontrastierung konnten sie unter dem Elektronenmikroskop beobachtet werden. Hierbei wurden die Proben jeweils in vier Untergruppen unterteilt und verblindet. Jede Probe enthielt ein Schnittpaar. Auf den korrespondierenden Stellen wurden mithilfe einer Software Polygone gelegt. Innerhalb dieser Polygone wurde mithilfe von SerialEM-Software ein Raster gelegt, welches zufällige Punkte auswählte, an welchen aus vier Unterbildern ein größeres Montagebild erzeugt wurde. Dies verringert den Observer- wie auch Selectivity-Bias. Diese Bilder wurden alle bei 5000-facher Vergrößerung erzeugt, sodass Bilder mit einer quadratischen Seitenlänge von 7,35 μ m entstanden. Pro Untergruppe wurde versucht, mindestens 25 verwertbare Bilder zu erzeugen. Abschließend wurden diese Bilder mithilfe der ImageJ-Software und einer eigens für diese Arbeit erstellten Benutzeroberfläche ausgewertet, indem Synapsen sowie die untersuchten Ultrastrukturen markiert und ausgewertet wurden. Nach abgeschlossener Auswertung erfolgte die Auflösung der verblindeten Untergruppen.

Hinsichtlich der Struktur wurden die Durchmesser der Querschnitte der prä- sowie postsynaptischen Membranen, wie auch die Breite des Durchmessers des synaptischen Spaltes gemessen und miteinander verglichen. Die zusätzliche Analyse und Vergleich des Vorliegens von Vesikeln, sowie separate Betrachtung gedockter und ungedockter Varianten, mit zusätzlicher Zählung spezifischer Dense-Core-Vesikel, waren ebenso wesentlicher Bestandteil der Arbeit. Die Kontrollgruppe wurde hierbei sowohl im humanen als auch porzinen Gewebe, zu einer Eisen-Gruppe, einer Amyloid-Gruppe, sowie einer Gruppe aus kombinierter Anreicherung von Amyloid-Beta-Oligomeren und Eisen verglichen.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Resultate sagen, dass ein Rückgang der Synapsenzahl in den Untergruppen beider Gewebearten erkennbar ist. Auch die Vesikelzahl hat sich in den drei Untergruppen verändert, die mit der Kontrollgruppe verglichen wurden. Im humanen Gewebe zeigt sich auf μm^3 gerechnet ein Rückgang aller drei untersuchten Vesikelparameter (dies sind die Gesamtzahl, der gedockte, sowie ungedockte Anteil) in der Eisen- und Amyloid-Untergruppe, während hingegen in der kombinierten Untergruppe der gegenteilige Effekt einer Zunahme eintrat. Im porzinen Gewebe konnte ebenfalls eine Abnahme festgestellt werden. Die gesamte Vesikelzahl und die Zahl der gedockten Vesikel wurden im Anschluss auch pro Synapse ausgewertet. Hier zeigte sich im humanen Gewebe eine Zunahme beider Parameter, welche nochmals in der kombinierten Untergruppe deutlich zunahm. Im Vergleich dazu zeigte das porzine Gewebe diesen Trend nur in der kombinierten Untergruppe, während die Zahl in der Amyloid-Untergruppe leicht abnahm.

Die separate Betrachtung der Dense-Core-Vesikel zeigte ein Fehlen dieser in den Kontrollgruppen beider Gewebearten. In allen anderen Untergruppen konnten derartige Vesikel sehr wohl gefunden werden. Das porzine Amyloid-Gewebe zeigte dabei pro μm^3 die größte Dichte auf.

Abschließend wurden auch die jeweiligen Synapsen hinsichtlich der Durchmesser der Querschnitte der prä- und postsynaptischen Membranen und Breite des synaptischen Spaltes ausgewertet. Im humanen Gewebe zeigte sich hierbei in allen drei Untergruppen eine Abnahme der Parameter. Im porzinen Gewebe konnte lediglich in der kombinierten Untergruppe aus Amyloid und Eisen eine Zunahme aller drei Parameter gefunden werden.

4.2 Vergleichende Erläuterungen

Hinsichtlich der Synapsendichte pro μm^3 zeigte sich in beiden Gruppen eine deutliche Reduktion in allen drei Untergruppen. Während sowohl im humanen als auch porzinen Gewebe die Dichte in der Kontrollgruppe am höchsten war, zeigte sie sich in der porzinen Gruppe in der kombinierten Untergruppe aus Amyloid-Beta-Oligomeren und Eisen am niedrigsten. Ein ähnlicher Trend zeigte sich auch in der humanen Gruppe, wo der Mittelwert in der Kombinationsgruppe aus Amyloid und Eisen sogar, leicht erhöht war. Gleichzeitig lag allerdings auch für diesen Parameter eine hohe Streuung auf. Bis auf die

Untergruppe aus einer Kombination von Eisen und Amyloid für das humane Gewebe, zeigte sich überall ein signifikanter Rückgang der Synapsenzahl pro μm^3 . Dies ist im Einklang mit vielen bekannten Quellen, die zeigen, dass sowohl Amyloid-Beta-Oligomer als auch eine Störung des Eisen-Haushaltes im Gehirn einen toxischen Effekt auf Synapsen haben. In weiterer Folge führt dies zu einer Abnahme der Zahl (27,28).

Die Vesikelparameter des humanen Gewebes zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Amyloid- und Eisen-Gruppe einen Rückgang. Nur in einzelnen Fällen zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Interessanterweise ließ sich jedoch für die kombinierte Untergruppe ein gegenteiliger Trend erkennen. Hier stieg die Vesikelzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar an. Im porzinen Gewebe zeigte sich ein ähnlicher Unterschied, der gegenteilige Effekt der kombinierten Untergruppe blieb hier allerdings aus. Auch hier zeigte sich ein Rückgang aller drei analysierten Parameter. Die grundsätzliche Abnahme der Vesikelzahl im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung und dem damit assoziierten Vorliegen von Amyloid-Beta-Plaques, sowie einer in unterschiedlichen Regionen erhöhten Akkumulation von Eisen, wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (29–31). Eine mögliche Erklärung für das Vorliegen erhöhter Vesikelzahlen in der kombinierten Untergruppe könnten eine Störung des Wiedergewinnungsprozesses von Vesikeln im Bereich der Synapse, wie auch Probleme bei allfälligen Prozessen des Recyclings dieser sein. Im Rahmen dieses pathophysiologischen Ablaufes intensiviert sich oxidativer Stress. Weiters ist auch die Azidifizierung der Vesikel gestört, welche unter anderem für die Beladung und Reifung von Vesikeln essenziell ist. In weiterer Folge könnte dies die pathologische Akkumulation von Vesikeln erklären, die funktionell keine Rolle spielen, aber gehäuft vorkommen. Einige experimentelle Versuche im Rahmen von Studien an Ratten konnten dieses Phänomen bereits mehrmals beschreiben (32,33). Dieser scheinbar kompensatorische Mechanismus zeigt sich im Rahmen dieser Arbeit auch bei der Betrachtung der Vesikelzahlen pro Synapse. In beiden untersuchten Parametern war eine Zunahme der Vesikel insbesondere im humanen Gewebe erkennbar, die zwar nicht signifikant, aber tendenziell vorliegt.

Die separate Betrachtung der Dense-Core-Vesikel (DCV) stellte einen weiteren Teil dieser Arbeit dar. Während in keiner der beiden Kontrollgruppen ein derartiges DCV gefunden werden konnte, zeigte jede der anderen Untergruppen zumindest eines. Obwohl der Unterschied zur Kontrollgruppe jeweils keinen signifikanten Unterschied zeigte (auch aufgrund der geringen absoluten Zahl solcher Vesikel), lassen sich doch Neigungen in die

Richtung eines vermehrten Vorkommens bei pathologischen Prozessen erahnen. Dies ist durch Involvierung von Amyloid-Beta-Oligomeren oder einer vermehrten Eisenakkumulation bedingt. Nach derzeitigem Stand gibt es keine Literatur, die eine erhöhte Anzahl von DCV im Hippocampus bei Alzheimer angibt. Über die Feststellung von Chromogranin B als Marker für das Vorliegen von DCV konnte gezeigt werden, dass die Menge an Chromogranin B, welches für den Bereich des Hippocampus spezifisch ist, im Rahmen einer Alzheimererkrankung verringert ist (34). Im Gegensatz dazu zeigt Chromogranin A im Bereich von Plaque, welcher sich wiederum in der Nähe von dystrophen Neuriten befindet, ein vermehrtes Aufkommen. Es handelt sich hierbei jedoch nur um eine Umverteilung bei weiterhin verringerter Gesamtzahl (35).

Auch die Querschnitte der Synapsen selbst wurden im Rahmen dieser Arbeit betrachtet. Die Breite ihrer synaptischen Spalte (oft auch als Spaltbreite oder „*synaptic cleft*“ im Englischen bezeichnet) zeigte im humanen Gewebe eine signifikante Reduktion aller Untergruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im porzinen Gewebe zeigte vor allem die kombinierte Untergruppe aus Amyloid und Eisen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Vergrößerung des synaptischen Spaltes, welche sich jedoch als nicht signifikant äußerte. Das Veränderungsverhalten für diesen expliziten Parameter zeigt sich im Vergleich der unterschiedlichen Gewebe sehr heterogen. In der derzeitigen Literatur gibt es eine begrenzte Zahl an Arbeiten, die explizit die Breite des Spaltes analysieren (24). Gängige und bekannte Quellen beschreiben Veränderungen der dreidimensionalen Morphologie, Synapsendichte oder Kontaktflächen, ohne dabei konkret auf den von uns betrachteten Parameter einzugehen (36–38). Eine vorliegende Auswertung, welche nicht einheitlich scheint, könnte in weiterer Folge auch auf Limitationen im Rahmen der Vorbereitung oder Auswertung zurückzuführen sein, auf welche in einem der nächsten Punkte eingegangen werden soll. Die Veränderungen des Durchmessers der prä- sowie postsynaptischen Membranen im humanen Gewebe zeigten in beiden Fällen eine Tendenz zur Abnahme, die jedoch in keiner der Untergruppen signifikant war, allerdings in der Gruppe der kombinierten Anreicherung mit Amyloid und Eisen die größte Veränderung ergab. Im Gegensatz dazu zeigte die porzine Gruppe für beide Parameter in der Amyloidgruppe eine geringe Abnahme zur Kontrollgruppe, allerdings in der kombinierten Gruppe eine deutliche Zunahme. Auch hier waren die Veränderungen in allen Untergruppen nicht signifikant. Ähnliche Arbeiten beziehen sich indirekt auf Proteinverluste, Proteinfehlverteilung oder Störungen der Organisation, mit daraus resultierender

Membranschädigung sowie Degeneration der Synapsen (29,37,39). Auch hier könnten diverse Punkte, die bei den Limitationen der Arbeit angesprochen werden, ausschlaggebend sein.

4.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnte auf die eingangs definierte Hauptfrage eine Antwort gefunden werden. Die Abnahme der Synapsenzahl in den jeweiligen Untergruppen konnte gezeigt werden. Gleichzeitig konnten für die Nebenfragestellungen teilweise signifikante Veränderungen festgestellt werden, wenn auch die wünschenswerte Signifikanz bei einem Großteil der Unterpunkte ausblieb. Selbst in diesen Fällen konnten dennoch zahlreiche Tendenzen erkannt werden, die, wie oben angeführt, im Falle der Vesikel auf eventuelle kompensatorische Mechanismen hindeuten könnten. Auch das vermehrte Vorliegen von Dense-Core-Vesikel in den analysierten Untergruppen, wie auch einige signifikant verringerte Membranlängen der betrachteten Synapsen in den bearbeiteten Untergruppen, geben Anlass für eine mögliche Auswirkung von Amyloid-Beta-Oligomeren und Eisen auf die untersuchten Strukturen, bei gleichzeitig noch begrenzt bestätigender oder widersprechender Literatur.

4.4 Kritische Reflexion und Limitationen zur Methodik

Bezugnehmend auf die Methodik und Durchführung der Arbeit, gibt es auch hierbei gewisse Limitationen, die kritisch zu betrachten sind. Auf diese Punkte soll im Weiteren nun eingegangen werden.

Zuallererst ist die begrenzte Zahl an Schnittpaaren pro Untergruppe zu erwähnen, welche mit 25 Stück gering ist. Wie auch bereits im Abschnitt Resultate erkennbar ist, führt dies zu einer hohen Standardabweichung, was die Robustheit der Aussagen über die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich ihrer Präzision wesentlich beeinträchtigt, indem auch die Wahrscheinlichkeit zufällig entstandener Ergebnisse erhöht wird (40). Im Großteil der Ergebnisse unserer Auswertung ist diese Standardabweichung stellenweise höher als der eruierte Mittelwert selbst, was dazu führt, dass die Interpretation der Ergebnisse stets mit Vorsicht zu genießen ist. Ergänzend sei angemerkt, dass das Vorliegen des Präparates

lediglich von zwei humanen und drei porzinen Individuen ein viel kritischerer Punkt im Rahmen der Arbeit ist, den es zu betrachten gilt.

In weiterer Folge ist auch eine gewisse Geübtheit der Anwender*in zu berücksichtigen. Hier könnte ein geschultes Auge mit wesentlich größerer Erfahrung feine Unterschiede eher erkennen und somit potenzielle Fehlerquellen bei der Auswertung geringer halten als eine vergleichsweise unerfahrenere Person. Damit ist auch der adäquate Umgang mit erschwerten Bildbedingungen gemeint, die beispielsweise durch Artefaktentstehung im Schnittprozess, keine optimale Beleuchtung des Mikroskops, Astigmatismus der Bilder, oder nicht optimale Sättigung der Bilder entstehen (41). Für den Verfasser dieser Arbeit war eine längere Lernphase erforderlich, um den geforderten Ansprüchen zu genügen.

Ein weiterer Punkt, den es zu berücksichtigen gilt, ist der in dieser Arbeit mehrmals erwähnte Unterschied beider Spezies, die für die Beantwortung der am Anfang gestellten Fragestellungen herangezogen wurden. Das Gehirn des Schweines ähnelt jenem des Menschen insbesondere in neuroanatomischer Hinsicht, liegt hier doch auch ein gyrencephalisches Gehirn vor, in welchem weiters auch die physiologischen Vorgänge sehr ähnlich sind (42). Es ist weiterhin dennoch nicht gesichert, ob die pathophysiologischen Prozesse hinsichtlich einer ausreichend ähnlichen Genexpression und insbesondere der Entstehung von typischen Alzheimer-Fibrillen („*neurofibrillary tangles*“) ausreichend vergleichbar sind (43).

Ein wesentlicher Aspekt, der in diesem Kapitel ebenfalls behandelt werden soll, ist die Vorbereitung der unterschiedlichen Gewebearten hinsichtlich der Schnittherstellung. Während die humanen Gewebeschnitte mithilfe der HPF-Methode („*high pressure freezing*“) unter Hochdruck gefriert wurden, gab es bei den porzinen Gewebeschnitten eine chemische Bearbeitung. In der Literatur wird die HPF-Methode für Präparate, welche unter dem Elektronenmikroskop betrachtet werden, als äußerst vorteilhaft beschrieben, da sie zu einer unmittelbaren Immobilisierung der zu betrachtenden Strukturen führt. Weiters ist auch die Wahrscheinlichkeit von Artefakten wie Schrumpfung oder die Gefahr eines Verlustes ultrafeiner Strukturen deutlich verringert (44). Dadurch könnten etwaige Probleme mit der Darstellung für diese Arbeit relevanter Strukturen im porzinen Gewebe entstehen und in weiterer Folge die Auswertung beeinträchtigen.

Auch das Prinzip der organotypischen Hirnschnittkulturen (OBSC) kann gewisse Limitationen enthalten. Im Rahmen der Aufbereitung kann es basierend auf unterschiedlicher Gewebedicke oder unzureichender Vorbereitung zu Nekrosen des

Gewebes kommen. Dies basiert auf einer Minderperfusion mit Sauerstoff, was die zu untersuchenden Strukturen verändern kann. Nicht mehr realitätsgetreue Verhältnisse wären dabei die Folge (45). Auch geht mit der Dauer der Kultivierung ein gewisser Grad an nicht-physiologischen Veränderung einher. Es kann durch den Prozess zu neuronaler Apoptose, Veränderungen der Expression von Markerproteinen oder Architekturstörung kommen. Dies kann in weiterer Folge erhebliche Beeinträchtigungen hinsichtlich der Herstellung einer realistischen und vergleichbaren Umgebung in der Erforschung der Krankheitsentwicklung mit sich ziehen (21,46,47).

4.5 Implikationen für Theorie und Praxis

In Bezug auf die Theorie der Alzheimer-Erkrankung spiegelt unsere Arbeit zum Teil den heutigen Stand der grundlegenden Kenntnisse über die Krankheit wider. Elementare morphologische Charakteristika der Pathologie konnten zum Vorschein gebracht werden. Dies zeigte sich besonders in der reduzierten Zahl an Synapsen, wie auch einer heterogen veränderten Vesikelzahl, die weiter oben bereits als möglicher Kompensationsmechanismus interpretiert werden kann. Vor allem die Veränderungen der Synapsenzahl bestätigen den heutigen Stand des Verständnisses, dass Alzheimer als Störung mit dem Fokus auf Synapsen zu verstehen ist. Inwiefern sich Amyloid und Eisen gegenseitig beeinflussen, ob etwa eine Amplifizierung des schädigenden Effektes einer der beiden Stoffe, oder eine additive Wirkung vorliegt, kann anhand der vorliegenden Daten der Arbeit nicht eindeutig gesagt werden. Lediglich die erhöhte Vesikelzahl pro Synapse, welche interessanterweise in beiden Gewebegruppen in der kombinierten Untergruppe am höchsten war, könnte einen möglichen Mechanismus bestätigen, der bereits weiter oben angeführt worden ist. Veränderungen in der Membranlänge, die im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden konnten, und bislang als expliziter Parameter in Studien noch nicht angewandt wurde, könnte Kern für weitere Theorien sein, welche eine Korrelation des Fortschritts der Alzheimer-Erkrankung mit morphologischen Aspekten in Einklang bringt. Für den praktischen Bezug können aus dieser Arbeit gewisse Lehren gezogen werden. Ein wesentlicher Punkt wäre die Integration von humanem Gewebe, um etwaige Zweifel an der identen Ausprägung der Erkrankung in Geweben anderer Spezies auszuschließen. Humanes Gewebe könnte somit hinsichtlich der Validierung und Aussagekraft gewisser

Hypothesen in Zukunft eine noch wichtigere Rolle spielen, als es aus heutiger Sicht bereits tut.

Auch hinsichtlich therapeutischer Aspekte können aus dieser Arbeit gewisse Erkenntnisse gezogen werden. Der Zusammenhang zwischen Eisen und Alzheimer wurde in dieser Arbeit bereits mehrmals erwähnt. Da gewisse Trends der Resultate einen additiven Effekt von Beta-Amyloid und Eisen zeigen, könnte die Reduktion von Eisen im Gehirn einen therapeutischen Effekt, und damit auch einen möglichen kurativen Ansatz der Erkrankung mit sich bringen. In einigen Studien zeigte die Anwendung von Eisenchelation durch Stoffe wie Deferoxamin, Deferipron oder Deferasirox einen Rückgang von Tau-Pathologie sowie Beta-Amyloid. Obwohl die derzeitige Studienlage nicht konsistent ist, könnte dieser Pathomechanismus ein potenzielles Forschungsgebiet für zukünftige Therapieansätze sein (48,49).

4.6 Ausblick und Anregungen für weiterführende Arbeiten

Aus dem Prozess der Entstehung dieser Arbeit kristallisierten sich gewisse Punkte, die im Rahmen weiterer Arbeiten behandelt werden könnten. Auf diese Punkte soll in diesem abschließenden Unterpunkt eingegangen werden.

Ein wesentlicher Aspekt, auf den geachtet werden sollte, wäre die ausreichende Zahl an Stichproben, beziehungsweise Schnittpaare, wie sie in diesem Fall vorlagen. Die Vorteile dafür wurden bereits weiter oben erörtert. Gleichzeitig könnte durch die Inkludierung weiterer Areale abseits des Hippocampus eine weitere Möglichkeit des Vergleichs innerhalb dieser Regionen geschaffen werden, die eine Aussage über Verlauf und Ausprägung der Krankheit aus einem anderen Blickwinkel erlauben. Die derzeitige Literatur zeigt, dass neben dem Hippocampus auch Areale wie der parahippocampale Gyrus, unterschiedliche Bereiche des Cortex oder der Parietallappen für Untersuchungen herangezogen werden (50).

Mit der zufälligen Ausgabe der Bilder durch jene Software, welche mit dem Elektronenmikroskop verbunden war, konnte ein potenziell großer Bias eliminiert werden. Dennoch bleibt die Frage der Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Personen, welche die Auswertung vornehmen. Hierbei könnten die Etablierung und Forcierung von bestimmten

Protokollen, Trainings oder sonstigen Standardisierungen einen zentralen Punkt zukünftiger Fragestellungen einnehmen. Weiterführend könnte hierbei auch eine Etablierung von vollautomatisierten Methoden erforscht werden, die eine Reproduktion der Resultate in größerem Umfang ermöglichen würde.

Abschließend lässt sich in weiterer Folge sagen, dass eine umfassendere Miteinbeziehung von Daten unterschiedlicher Natur eine noch präzisere Aussage hinsichtlich Pathophysiologie und Verlauf der Erkrankung treffen lässt. Ca^{2+} -Imaging, elektrophysiologische Analysen, wie auch die Untersuchung von spezifischen Markern, wie jene für oxidativen Stress, spielen in der aktuellen Forschung bereits eine essenzielle Rolle (51,52), eine intensivere Integration der morphologischen Korrelate parallel zu diesen Methoden, könnte Klarheit in gewisse Fragestellungen geben, die im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig gelöst werden konnten. Gleichzeitig sollte auch die Analyse der Tau-Pathologie stets in Betracht gezogen werden, welche in der Entstehung von Alzheimer eine zentrale Rolle spielt (53). Dieser Aspekt wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Literaturverzeichnis

1. Hao M, Chen J. Trend analysis and future predictions of global burden of alzheimer's disease and other dementias: a study based on the global burden of disease database from 1990 to 2021. *BMC Med.* 1. Juli 2025;23:378.
2. Bacigalupo I, Mayer F, Lacorte E, Di Pucchio A, Marzolini F, Canevelli M, u. a. A Systematic Review and Meta-Analysis on the Prevalence of Dementia in Europe: Estimates from the Highest-Quality Studies Adopting the DSM IV Diagnostic Criteria. *J Alzheimers Dis.* 66(4):1471–81.
3. Frisoni GB, Hansson O, Nichols E, Garibotto V, Schindler SE, Van Der Flier WM, u. a. New landscape of the diagnosis of Alzheimer's disease. *The Lancet.* September 2025;406(10510):1389–407.
4. Tzioras M, McGeachan RI, Durrant CS, Spires-Jones TL. Synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 1. Januar 2023;19(1):19–38.
5. Roemer-Cassiano SN, Wagner F, Evangelista L, Rauchmann BS, Dehsarvi A, Steward A, u. a. Amyloid-associated hyperconnectivity drives tau spread across connected brain regions in Alzheimer's disease. *Sci Transl Med.* 17(782):eadp2564.
6. Querfurth Henry W., LaFerla Frank M. Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 362(4):329–44.
7. Mezzanotte M, Stanga S. Brain Iron Dyshomeostasis and Ferroptosis in Alzheimer's Disease Pathophysiology: Two Faces of the Same Coin. *Aging Dis.* 10. Juni 2024;16(5):2615–40.
8. Baringer SL, Lukacher AS, Palsa K, Kim H, Lippmann ES, Spiegelman VS, u. a. Amyloid- β exposed astrocytes induce iron transport from endothelial cells at the blood-brain barrier by altering the ratio of apo- and holo-transferrin. *J Neurochem.* Oktober 2023;167(2):248–61.
9. Chaudhary S, Ashok A, McDonald D, Wise AS, Kritikos AE, Rana NA, u. a. Upregulation of Local Hepcidin Contributes to Iron Accumulation in Alzheimer's Disease Brains. *J Alzheimers Dis JAD.* 2021;82(4):1487–97.
10. Raha AA, Biswas A, Henderson J, Chakraborty S, Holland A, Friedland RP, u. a. Interplay of Ferritin Accumulation and Ferroportin Loss in Ageing Brain: Implication for Protein Aggregation in Down Syndrome Dementia, Alzheimer's, and Parkinson's Diseases. *Int J Mol Sci.* 19. Januar 2022;23(3):1060.
11. Mckean NE, Handley RR, Snell RG. A Review of the Current Mammalian Models of Alzheimer's Disease and Challenges That Need to Be Overcome. *Int J Mol Sci.* Januar 2021;22(23):13168.
12. Alexandra Lopes P, Guil-Guerrero JL. Beyond Transgenic Mice: Emerging Models and Translational Strategies in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 10. Juni 2025;26(12):5541.

13. Granzotto A, Vissel B, Sensi SL. Lost in translation: Inconvenient truths on the utility of mouse models in Alzheimer's disease research. *eLife*. 13:e90633.
14. Singhaarachchi PH, Antal P, Calon F, Culmsee C, Delpech JC, Feldotto M, u. a. Rodent models of Alzheimer's disease: Critical analysis of current hypotheses and pathways for future research. *Prog Neurobiol*. September 2025;252:102821.
15. Kluever V, Fornasiero EF. Principles of brain aging: Status and challenges of modeling human molecular changes in mice. *Ageing Res Rev*. Dezember 2021;72:101465.
16. Hoffe B, Holahan MR. The Use of Pigs as a Translational Model for Studying Neurodegenerative Diseases. *Front Physiol*. 10. Juli 2019;10:838.
17. Lee K, Park TIH, Heppner P, Schweder P, Mee EW, Dragunow M, u. a. Human in vitro systems for examining synaptic function and plasticity in the brain. *J Neurophysiol*. 1. März 2020;123(3):945–65.
18. Samarasekera N, Salman RAS, Huitinga I, Klioueva N, McLean CA, Kretzschmar H, u. a. Brain banking for neurological disorders. *Lancet Neurol*. 1. November 2013;12(11):1096–105.
19. Sunkara S, Krishnamoorthy R, Radulović S, Leoni M, Patz S, Goessler W, u. a. Amyloid beta aggregation promoted by iron leads to neuronal loss in an ex vivo model of Alzheimer's disease [Internet]. *bioRxiv*; 2025 [zitiert 29. November 2025]. S. 2025.07.11.664035. Verfügbar unter: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2025.07.11.664035v1>
20. Ross JA, Reyes BAS, Van Bockstaele EJ. Amyloid Beta Peptides, Locus Coeruleus-Norepinephrine System and Dense Core Vesicles. *Brain Res*. 1. Januar 2019;1702:46–53.
21. Bak A, Koch H, van Loo KMJ, Schmied K, Gittel B, Weber Y, u. a. Human organotypic brain slice cultures: a detailed and improved protocol for preparation and long-term maintenance. *J Neurosci Methods*. 1. April 2024;404:110055.
22. Borges-Merjane C, Kim O, Jonas P. Functional Electron Microscopy, “Flash and Freeze,” of Identified Cortical Synapses in Acute Brain Slices. *Neuron*. 18. März 2020;105(6):992-1006.e6.
23. Imig C, López-Murcia FJ, Maus L, García-Plaza IH, Mortensen LS, Schwark M, u. a. Ultrastructural Imaging of Activity-Dependent Synaptic Membrane-Trafficking Events in Cultured Brain Slices. *Neuron*. 9. Dezember 2020;108(5):843-860.e8.
24. Reichmann F, Painsipp E, Holzer P, Kummer D, Bock E, Leitinger G. A novel unbiased counting method for the quantification of synapses in the mouse brain. *J Neurosci Methods*. Januar 2015;240:13–21.
25. Howard C, Reed M. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers; 1998.

26. Tao CL, Liu YT, Sun R, Zhang B, Qi L, Shivakoti S, u. a. Differentiation and Characterization of Excitatory and Inhibitory Synapses by Cryo-electron Tomography and Correlative Microscopy. *J Neurosci*. 7. Februar 2018;38(6):1493–510.
27. Bastin C, Bahri MA, Meyer F, Manard M, Delhay E, Plenevaux A, u. a. In vivo imaging of synaptic loss in Alzheimer's disease with [18F]UCB-H positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 1. Februar 2020;47(2):390–402.
28. Junceda S, Cruz-Alonso M, Fernandez B, Pereiro R, Martínez-Pinilla E, Navarro A. Iron Dysregulation in Alzheimer's Disease: LA-ICP-MS Bioimaging of the Distribution of Iron and Ferroportin in the CA1 Region of the Human Hippocampus. *Biomolecules*. März 2024;14(3):295.
29. Chen MK, Mecca AP, Naganawa M, Finnema SJ, Toyonaga T, Lin S fei, u. a. Assessing Synaptic Density in Alzheimer Disease With Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Positron Emission Tomographic Imaging. *JAMA Neurol*. 1. Oktober 2018;75(10):1215–24.
30. Shimohama S, Kamiya S, Taniguchi T, Akagawa K, Kimura J. Differential Involvement of Synaptic Vesicle and Presynaptic Plasma Membrane Proteins in Alzheimer's Disease. *Biochem Biophys Res Commun*. Juli 1997;236(2):239–42.
31. Krisanova N, Sivko R, Kasatkina L, Borysov A, Borisova T. Excitotoxic potential of exogenous ferritin and apoferritin: Changes in ambient level of glutamate and synaptic vesicle acidification in brain nerve terminals. *Mol Cell Neurosci*. Januar 2014;58:95–104.
32. Biasseti L, Rey S, Fowler M, Ratnayaka A, Fennell K, Smith C, u. a. Elevated amyloid beta disrupts the nanoscale organization and function of synaptic vesicle pools in hippocampal neurons. *Cereb Cortex*. 7. Februar 2023;33(4):1263–76.
33. Chen M, Zheng J, Liu G, Zeng C, Xu E, Zhu W, u. a. High Dietary Iron Disrupts Iron Homeostasis and Induces Amyloid- β and Phospho- τ Expression in the Hippocampus of Adult Wild-Type and APP/PS1 Transgenic Mice. *J Nutr*. Dezember 2019;149(12):2247–54.
34. Marksteiner J, Lechner T, Kaufmann WA, Gurka P, Humpel C, Nowakowski C, u. a. Distribution of chromogranin B-like immunoreactivity in the human hippocampus and its changes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1. Juli 2000;100(2):205–12.
35. Lassmann H, Weiler R, Fischer P, Bancher C, Jellinger K, Floor E, u. a. Synaptic pathology in alzheimer's disease: Immunological data for markers of synaptic and large dense-core vesicles. *Neuroscience*. 1. Januar 1992;46(1):1–8.
36. Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Solazzi M, Giorgetti B, Stefano GD, Casoli T, u. a. Neuronal Death versus Synaptic Pathology in Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1. Dezember 2003;1010(1):635–8.

37. Montero-Crespo M, Domínguez-Álvaro M, Alonso-Nanclares L, DeFelipe J, Blazquez-Llorca L. Three-dimensional analysis of synaptic organization in the hippocampal CA1 field in Alzheimer's disease. *Brain*. 3. März 2021;144(2):553–73.
38. Scheff SW, Price DA. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Mol Cell Basis Synaptic Loss Dysfunct Alzheimers Dis*. 1. Dezember 2003;24(8):1029–46.
39. Serrano GE, Walker J, Nelson C, Glass M, Arce R, Intorcchia A, u. a. Correlation of Presynaptic and Postsynaptic Proteins with Pathology in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2024;25(6).
40. Weiß C. *Basiswissen Medizinische Statistik*. 7. Aufl. Berlin: Springer; 2019.
41. Moradi I, Behjati M. Six common errors cause dangerous mistakes in interpretation of electron micrographs. *Microsc Res Tech*. 2012;75(5):677–82.
42. Lee SE, Hyun H, Park MR, Choi Y, Son YJ, Park YG, u. a. Production of transgenic pig as an Alzheimer's disease model using a multi-cistronic vector system. *PLoS ONE*. 6. Juni 2017;12(6):e0177933.
43. Holm IE, Alstrup AKO, Luo Y. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders. *J Pathol*. 2016;238(2):267–87.
44. Venter C, Van Der Merwe CF, Oberholzer HM, Bester MJ, Taute H. Feasibility of high pressure freezing with freeze substitution after long-term storage in chemical fixatives. *Microsc Res Tech*. September 2013;76(9):942–6.
45. Bak A, Schmied K, Jakob ML, Bedogni F, Squire OA, Gittel B, u. a. Temporal dynamics of neocortical development in organotypic mouse brain cultures: a comprehensive analysis. *J Neurophysiol*. 1. September 2024;132(3):1038–55.
46. Staal JA, Alexander SR, Liu Y, Dickson TD, Vickers JC. Characterization of Cortical Neuronal and Glial Alterations during Culture of Organotypic Whole Brain Slices from Neonatal and Mature Mice. *PLoS ONE*. 15. Juli 2011;6(7):e22040.
47. Rambani K, Vukasinovic J, Glezer A, Potter SM. Culturing thick brain slices: An interstitial 3D microperfusion system for enhanced viability. *J Neurosci Methods*. 15. Juni 2009;180(2):243–54.
48. Thorwald MA, Godoy-Lugo JA, Garcia G, Silva J, Kim M, Christensen A, u. a. Iron-associated lipid peroxidation in Alzheimer's disease is increased in lipid rafts with decreased ferroptosis suppressors, tested by chelation in mice. *Alzheimers Dement*. 29. Januar 2025;21(1):e14541.
49. Schreiner OD, Schreiner TG. Iron chelators as a therapeutic option for Alzheimer's disease—A mini-review. *Front Aging*. 2. August 2023;4:1234958.
50. Schroeter ML, Stein T, Maslowski N, Neumann J. Neural Correlates of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Systematic and Quantitative Meta-Analysis involving 1,351 Patients. *NeuroImage*. 20. Mai 2009;47(4):1196.

51. Kaar A, Weir MP, Rae MG. Altered neuronal group 1 metabotropic glutamate receptor- and endoplasmic reticulum-mediated Ca²⁺ signaling in two rodent models of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. Februar 2024;823:137664.
52. Ansari MA, Rao MS, Al-Jarallah A. Insights into early pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease: role of oxidative stress and loss of synaptic proteins. *Front Neurosci*. 8. Januar 2024;17:1273626.
53. Thal DR, Tomé SO. The central role of tau in Alzheimer's disease: From neurofibrillary tangle maturation to the induction of cell death. *Brain Res Bull*. November 2022;190:204–17.

Anhang

A Tabellen der analysierten Parameter mit Resultaten

Tabelle 1: Deskriptive Statistiken und Tests für die Synapsenzahl pro μm^3

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert \pm SD	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	0,099 \pm 0,14	–	–
human	Eisen	3	0,019 \pm 0,051	0,017	*
human	Amyloid	3	0,019 \pm 0,051	0,017	*
human	Amyloid + Eisen	7	0,043 \pm 0,071	0,206	ns
porzin	Kontrolle	13	0,08 \pm 0,101	–	–
porzin	Eisen	0	–	0,0002	***
porzin	Amyloid	4	0,025 \pm 0,058	0,027	*
porzin	Amyloid + Eisen	2	0,012 \pm 0,043	0,004	**

Tabelle 2: Deskriptive Statistiken und Tests für die gesamte Vesikelzahl pro μm^3

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert \pm SD	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	0,185 \pm 0,375	–	–
human	Eisen	3	0,099 \pm 0,342	0,167	ns
human	Amyloid	3	0,099 \pm 0,353	0,171	ns
human	Amyloid + Eisen	7	0,333 \pm 0,765	0,957	ns
porzin	Kontrolle	13	0,364 \pm 0,607	–	–
porzin	Eisen	0	–	0,002	**
porzin	Amyloid	4	0,093 \pm 0,327	0,038	*
porzin	Amyloid + Eisen	2	0,136 \pm 0,489	0,053	ns

Tabelle 3: Deskriptive Statistiken und Tests für die gedockte Vesikelzahl pro μm^3

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert \pm SD	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	0,123 \pm 0,236	–	–
human	Eisen	3	0,043 \pm 0,151	0,14	ns
human	Amyloid	3	0,049 \pm 0,171	0,157	ns
human	Amyloid + Eisen	7	0,222 \pm 0,567	0,862	ns
porzin	Kontrolle	13	0,204 \pm 0,353	–	–
porzin	Eisen	0	–	0,002	**
porzin	Amyloid	4	0,043 \pm 0,164	0,034	*
porzin	Amyloid + Eisen	2	0,08 \pm 0,286	0,052	ns

Tabelle 4: Deskriptive Statistiken und Tests für die ungedockte Vesikelzahl pro μm^3

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert \pm SD	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	0,062 \pm 0,161	–	–
human	Eisen	3	0,056 \pm 0,194	0,47	ns
human	Amyloid	3	0,049 \pm 0,193	0,429	ns
human	Amyloid + Eisen	7	0,111 \pm 0,276	0,879	ns
porzin	Kontrolle	13	0,16 \pm 0,29	–	–
porzin	Eisen	0	–	0,005	**
porzin	Amyloid	4	0,049 \pm 0,171	0,077	ns
porzin	Amyloid + Eisen	2	0,056 \pm 0,204	0,08	ns

Tabelle 5: Deskriptive Statistiken und Tests für die DCV-Zahl pro μm^3

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert \pm SD	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	0 \pm 0	–	–
human	Eisen	3	0 \pm 0	1	ns
human	Amyloid	3	0,006 \pm 0,031	0,34	ns
human	Amyloid + Eisen	7	0,006 \pm 0,031	0,34	ns
porzin	Kontrolle	13	0 \pm 0	–	–
porzin	Eisen	0	0,006 \pm 0,031	0,34	ns
porzin	Amyloid	4	0,012 \pm 0,043	0,16	ns
porzin	Amyloid + Eisen	2	0,006 \pm 0,031	0,34	ns

Tabelle 6: Deskriptive Statistiken und Tests für die gesamte Vesikelzahl pro Synapse

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert \pm SD	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	1,875 \pm 2,849	–	–
human	Eisen	3	5,333 \pm 4,619	0,191	ns
human	Amyloid	3	5,333 \pm 5,033	0,171	ns
human	Amyloid + Eisen	7	7,714 \pm 6,945	0,04	*
porzin	Kontrolle	13	4,538 \pm 3,908	–	–
porzin	Eisen	0	–	–	–
porzin	Amyloid	4	3,75 \pm 4,5	0,813	ns
porzin	Amyloid + Eisen	2	11 \pm 4,243	0,067	ns

Tabelle 7: Deskriptive Statistiken und Tests für die gedockte Vesikelzahl pro Synapse

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert \pm SD	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	1,25 \pm 1,77	–	–
human	Eisen	3	2,333 \pm 2,082	0,348	ns
human	Amyloid	3	2,667 \pm 2,309	0,235	ns
human	Amyloid + Eisen	7	5,143 \pm 5,64	0,083	ns
porzin	Kontrolle	13	2,538 \pm 2,402	–	–
porzin	Eisen	0	–	–	–
porzin	Amyloid	4	1,75 \pm 2,363	0,561	ns
porzin	Amyloid + Eisen	2	6,5 \pm 2,121	0,086	ns

Tabelle 8: Deskriptive Statistik und Tests: Durchmesser der Spaltbreite

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert \pm SD	Median [IQR]	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	0,852 \pm 0,662	0,6 [0,421 - 1,056]	–	–
human	Eisen	3	0,121 \pm 0,048	0,146 [0,106 - 0,149]	0,002	**
human	Amyloid	3	0,129 \pm 0,076	0,168 [0,104 - 0,172]	0,002	**
human	Amyloid + Eisen	7	0,083 \pm 0,06	0,066 [0,043 - 0,119]	0,000008	***
porzin	Kontrolle	13	0,078 \pm 0,086	0,049 [0,034 - 0,077]	–	–
porzin	Eisen	0	–	–	–	–
porzin	Amyloid	4	0,056 \pm 0,033	0,045 [0,037 - 0,065]	0,955	ns
porzin	Amyloid + Eisen	2	0,253 \pm 0,153	0,253 [0,199 - 0,308]	0,051	ns

Tabelle 9: Deskriptive Statistik und Tests: Durchmesser der präsynaptischen Membran

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert ± SD	Median [IQR]	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	0,871 ± 0,676	0,645 [0,432 - 1,052]	–	–
human	Eisen	3	0,49 ± 0,182	0,45 [0,391 - 0,569]	0,421	ns
human	Amyloid	3	0,449 ± 0,074	0,408 [0,407 - 0,472]	0,303	ns
human	Amyloid + Eisen	7	0,363 ± 0,171	0,436 [0,222 - 0,493]	0,033	*
porzin	Kontrolle	13	0,371 ± 0,092	0,365 [0,308 - 0,409]	–	–
porzin	Eisen	0	–	–	–	–
porzin	Amyloid	4	0,327 ± 0,141	0,311 [0,246 - 0,392]	0,477	ns
porzin	Amyloid + Eisen	2	0,913 ± 0,785	0,913 [0,636 - 1,191]	0,381	ns

Tabelle 10: Deskriptive Statistik und Tests: Durchmesser der postsynaptischen Membran

Gewebe	Untergruppe	n	Mittelwert ± SD	Median [IQR]	MWU p vs. Kontrolle	Signifikanz
human	Kontrolle	16	0,863 ± 0,629	0,673 [0,403–1,032]	–	–
human	Eisen	3	0,491 ± 0,174	0,511 [0,409–0,582]	0,254	ns
human	Amyloid	3	0,501 ± 0,11	0,559 [0,466–0,564]	0,303	ns
human	Amyloid + Eisen	7	0,42 ± 0,101	0,419 [0,366–0,482]	0,065	ns
porzin	Kontrolle	13	0,355 ± 0,093	0,369 [0,294–0,402]	–	–
porzin	Eisen	0	–	–	–	–
porzin	Amyloid	4	0,324 ± 0,152	0,317 [0,228–0,413]	0,703	ns
porzin	Amyloid + Eisen	2	1,025 ± 0,765	1,025 [0,755–1,296]	0,076	ns