

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Funktion des Amyloid Precursor Proteins und
dessen Spaltprodukten bei der synaptischen
Übertragung**

Christina Priller

aus

Augsburg

2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. J. Herms betreut und von Herrn Prof. Dr. M. Biel vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 17.07.2006

.....
Christina Priller

Dissertation eingereicht am	17.07.2006
1. Gutachter	Prof. Dr. J. Herms
2. Gutachter	Prof. Dr. M. Biel
Mündliche Prüfung am	24.10.2006

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis/Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1 Morbus Alzheimer.....	1
1.1.1 Krankheitsbild	2
1.1.2 Pathologie der Krankheit.....	3
1.1.2.1 Amyloid Plaques	3
1.1.2.2 Neurofibrillenbündel	4
1.1.2.3 Astrogliose.....	5
1.1.2.4 Veränderungen im glutamatergen System.....	5
1.1.2.5 Verlust von Neuronen und Synapsen	6
1.1.3 Genetisch bedingte Alzheimerfälle	6
1.2 Amyloid Precursor Protein.....	7
1.2.1 Nicht-amyloide APP-Prozessierung	9
1.2.2 Amyloide APP-Prozessierung	9
1.2.3 Mutationen des Amyloid Precursor Proteins.....	11
1.3 Präseniline	12
1.3.1 Prozessierung der Präseniline.....	12
1.3.2 Mutationen der Präseniline.....	14
1.4 Amyloid-Bildung	14
1.4.1 Intrazelluläres A β	15
1.4.2 Amyloid-Kaskaden-Hypothese	15
1.4.3 Oligomer-Hypothese	18
1.5 Synaptische Neurotransmission im Hippocampus.....	18
1.5.1 Glutamat als Neurotransmitter	19
1.5.2 Aufbau und Funktion der Synapse	21
1.5.3 Synaptische Plastizität.....	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Versuchstiere	25

2.1.1	Wildtyp-Mäuse	25
2.1.2	APP-Knockout-Mäuse.....	25
2.1.3	Transgene Präsenilin-Mäuse	26
2.1.4	Transgene APP-Mäuse	26
2.1.5	Doppeltransgene APP-und PS1-Mäuse.....	27
2.2	Genotypisierung transgener Mäuse.....	27
2.2.1	Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien.....	27
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	28
2.3	Hippocampale autaptische Primärzellkulturen.....	32
2.3.1	Herstellung einer adhärenenten Astrozytenschicht.....	33
2.3.2	Herstellung autaptischer, neuronaler Primärzellkulturen	33
2.3.3	Herstellung von A β ₄₂ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen.....	35
2.3.4	Lösungen	35
2.4	Immunfärbungen.....	37
2.4.1	Doppelimmunfluoreszenz bei autaptischen Kulturen	37
2.4.2	Immunfluoreszenz an floating sections	37
2.4.3	Lösungen	39
2.5	Nachweis von Proteinen mittels Western Blot.....	39
2.5.1	Quantifizierung von Proteinen	39
2.5.2	Vorbehandlung der Proben.....	39
2.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	40
2.5.4	Western Blot.....	40
2.5.5	Lösungen	41
2.6	Elektrophysiologie	43
2.6.1	Patch-clamp-Elektroden	44
2.6.2	Aufbau des Messplatzes	44
2.6.3	Elektrische Eigenschaften der Whole-cell-Konfiguration.....	45
2.6.4	Lösungen	46
2.6.5	Messung synaptischer Ströme an Hippocampusneuronen	47
2.6.5.1	Messung der Spontanaktivität	48
2.6.5.2	Messung AP-induzierter Ströme	48
2.6.5.2.1	Amplitude bei non-NMDA-Strömen.....	49
2.6.5.2.2	Amplitude bei NMDA-Strömen	49
2.6.5.2.3	Doppelpulsstimulation.....	49
2.6.5.2.4	Hochfrequente und repetitive Stimulation.....	50
2.6.5.3	Messung osmotisch induzierter Ströme.....	50
2.6.5.4	Applikation von A β ₄₂ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen	50
2.7	Messprotokolle.....	51

2.7.1	Non-NMDA Ströme	51
2.7.2	NMDA Ströme	52
2.7.3	(Non)-NMDA Ströme bei Akutapplikation von A β ₄₂ -Monomeren,-Oligomeren und -Fibrillen	53
2.8	Datenaufnahme und Auswertung	54
3.	Ergebnisse	55
3.1	Analyse der synaptischen Übertragung in APP-Knockout-Neuronen	55
3.1.1	Stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung	55
3.1.2	Readily releasable pool und Freisetzungswahrscheinlichkeit	58
3.1.3	Kurzzeitplastizität	60
3.1.3.1	Prolongierte repetitive Stimulation und Hochfrequenzstimulation	61
3.1.3.2	Doppelpuls-Stimulation	63
3.1.4	Effekt von DAPT auf die stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung ...	64
3.1.5	Effekt von A β ₄₂ und konditioniertem Medium auf die stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung	65
3.1.6	Synapsenanzahl	67
3.1.7	Synaptophysinexpression im Hippocampus	69
3.2	Analyse der synaptischen Übertragung in transgenen PS1- und/oder APP- Neuronen	71
3.2.1	Stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung	71
3.2.2	Readily releasable pool und Freisetzungswahrscheinlichkeit	75
3.2.3	Kurzzeitplastizität	77
3.2.3.1	Prolongierte repetitive Stimulation und Hochfrequenzstimulation	77
3.2.3.2	Doppelpuls-Stimulation	78
3.2.4	Effekt von DAPT auf die stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung ...	79
3.2.5	Effekt von A β ₄₂ -Monomeren auf die stimulierte und spontane Neurotransmitter- freisetzung	80
3.2.6	Synapsenanzahl	81
3.3	Akuteffekt von synthetischem Aβ₄₂ auf die synaptische Übertragung	83
3.3.1	A β ₄₂ -Monomere	83
3.3.1.1	Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung	84
3.3.1.2	Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität	85
3.3.2	A β ₄₂ -Oligomere	86
3.3.2.1	Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung	86
3.3.2.2	Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität	87
3.3.3	A β ₄₂ -Fibrillen	88
3.3.3.1	Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung	89
3.3.3.2	Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität	89

4. Diskussion der Ergebnisse	91
4.1 Auswirkungen des Verlustes des Amyloid Precursor Proteins auf die synaptische Übertragung	91
4.2. Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch PS1- bzw. APP- Mutationen	95
4.3 Effekt der Akutapplikation von A β ₄₂ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen	97
4.4 Bezug zur Alzheimer Erkrankung.....	98
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis.....	102
6.1 Zitierte Veröffentlichungen	102
6.2 Eigene Veröffentlichungen	119
7. Lebenslauf.....	120
8. Danksagung	122

Abbildungsverzeichnis/Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Originalaufnahme des ersten von Alois Alzheimer beschriebenen Alzheimer-Falls	2
Abb. 2: Strukturelle und funktionelle Domänen des Amyloid Precursor Proteins	8
Abb. 3: Struktur von APP und Prozessierung durch Sekretasen	10
Abb. 4: Mutationen des APP	11
Abb. 5: Struktur des PS1-Proteins in der Membran des ER	14
Abb. 6: Die Amyloid-Kaskaden Hypothese	17
Abb. 7: Ca ²⁺ -Permeabilität von AMPA-Rezeptoren	20
Abb. 8: Permeabilität des NMDA-Rezeptors.....	21
Abb. 9: Darstellung des APP-Gens und der beiden Genpromotorkonstrukte	30
Abb. 10: Auftrennung des Amplikons durch Gelelektrophorese.....	31
Abb. 11: Autaptisches Neuron auf einer Astrozyteninsel.....	34
Abb. 12: Generierung der Whole-cell-Konfiguration	44
Abb. 13: Ersatzschaltbild der Whole-cell-Konfiguration	46
Abb. 14: Darstellung des gemessenen Stroms während einer einzelnen Stimulation	49
Abb. 15: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung	56
Abb. 16: Spontanaktivität	58
Abb. 17: RRP Größe, Auffüllrate und Freisetzungswahrscheinlichkeit	60
Abb. 18: Prolongierte repetitive und Hochfrequenzstimulation.....	62
Abb. 19: Kurzzeitplastizität	64
Abb. 20: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung und Spontanaktivität	66
Abb. 21: Darstellung von Dendriten und Synapsen in autaptischen Kulturen	68
Abb. 22: Synaptophysin Färbung an Hirnschnitten	71
Abb. 23: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung	73
Abb. 24: Spontanaktivität	75
Abb. 25: RRP Größe, Auffüllrate und P _{vr}	77
Abb. 26: PRS und HFS	78
Abb. 27: Doppelpuls-Stimulation.....	79
Abb. 28: Zugabe von DAPT zu PS1mut Neuronen	80
Abb. 29: Inkubation von Non-tg Neuronen mit A β ₄₂ -Monomeren	81
Abb. 30: Darstellung von Dendriten und Synapsen in autaptischen Kulturen	82
Abb. 31: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung	84
Abb. 32: Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität	85
Abb. 33: Detektion von A β ₄₂ -Oligomeren mittels Western Blot	86
Abb. 34: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung	87
Abb. 35: Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität	88
Abb. 36: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung	89

Abb. 37: Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität	90
Abb. 38: Möglicher Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und APP-Prozessierung.....	94
Tab. 1: Primer mit den dazugehörigen Sequenzen für die jeweilige PCR.....	29
Tab. 2: Zusammenfassung der EPSC Ladung und Kinetik	57
Tab. 3: Zusammenfassung der EPSC Ladung und Kinetik	74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aβ	Amyloid- β -Peptid
AD	Alzheimer Demenz
ADDLs	A β -derived diffusible ligands, A β -Oligomere
AICD	APP intrazelluläre Domäne
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
AP	Aktionspotential
Aph-1	Anterior pharynx defective protein-1
APLP	APP-like protein
APP	Amyloid Precursor Protein, Amyloid-Vorläufer-Protein
APP23	Maus mit der schwedischen Doppelmutation (KM \rightarrow NL) im hAPP
APPs$_{\alpha}$	soluble alpha APP ectodomain, lösliche APP alpha Ektodomäne
APPs$_{\beta}$	soluble beta APP ectodomain, lösliche APP beta Ektodomäne
APPPS1	Maus mit der schwedischen Doppelmutation (KM \rightarrow NL) im hAPP und einer zusätzlichen hPS1 (L166P) Mutation
BCIP	5-Bromo-4-chloro-indoylphosphat
[Ca$^{2+}$]$_i$	Intrazelluläre Calcium-Konzentration
[Ca$^{2+}$]$_e$	Extrazelluläre Calcium-Konzentration
C$_m$	Membrankapazität
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
CTF	C-terminales Fragment
DAG	Diacylglycerin
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycin- <i>t</i> -butylester, γ -Sekretase-Blocker
DIV	Day(s) in vitro, Tag(e) in Kultur
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPSC	Excitatory postsynaptic current, exzitatorischer postsynaptischer Strom
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol
EZL	Extrazellulärflüssigkeit

FAD	Familiäre Alzheimer-Demenz
FBS	Fetal bovine serum, fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GABA	γ -Amino-Buttersäure
h	hour(s), Stunde(n)
hAPP	humanes APP
HBSS	Hank`s balanced salt solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl) piperazin-1-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
hPS1	humanes PS1
IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP₄	Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat
IZL	Intrazellulärflüssigkeit
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
KPI	Kunitz protease inhibitor
Littermates	Wurfgeschwister
LTP	Long-term potentiation, Langzeitpotenzierung
MAP-2	Microtubule-associated protein, Mikrotubuli-assoziiertes Protein-2
mEPSC	miniature EPSC, Miniatur-EPSC
min	Minute(n)
Mk-801	(5R,10S)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imin hydrogen maleat, Dizocilpin hydrogen maleat
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
mRNA	messenger RNA, Boten RNA
mV	Millivolt
NBT	Nitro-blau-tetrazolium-chlorid
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
Non-tg	Nicht-transgen
NTF	N-terminales Fragment
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCP	Phencyclidin
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
PEN-2	Presenilin enhancer protein

PFA	Paraformaldehyd
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PPD	Paired pulse depression
PPF	Paired pulse facilitation; Doppelpulsverstärkung
P_r	Probability of release, Freisetzungswahrscheinlichkeit
P_{vr}	Probability of vesicular release, vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit
PS1,2	Präsenilin1, 2
PS1mut	Maus mit der hPS1 (A246E) Mutation
PS1wt	Maus mit unverändertem hPS1 vgl. S182
R_m	Membranwiderstand
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RP	Reserve pool, Reserve-Pool
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RRP	Readily releasable pool, Pool freisetzungsbereiter Vesikel
R_s	Serienwiderstand
RT	Raumtemperatur
S182	Maus mit unverändertem hPS1 vgl. PS1wt
SDS	Sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
sog.	so genannt(e)
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
TM	Transmembrandomäne
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Mit der kontinuierlich steigenden Lebenserwartung und der immer größer werdenden Bevölkerungsgruppe der über 65-Jährigen gewinnen Demenzerkrankungen zunehmend an klinischer, sozialer und auch sozioökonomischer Bedeutung. Die Alzheimer-Demenz (AD) stellt mit etwa 60% der Fälle die häufigste Demenzform dar (Schmidtke, 2005). Aufgrund der steigenden Anzahl potentiell betroffener Menschen, ist es von herausragender Bedeutung eine entsprechende Behandlungsmöglichkeit zu finden.

Abschnitt eins der Arbeit behandelt die Pathologie der Krankheit, die beteiligten Gene bei der vererbaren Form der Alzheimer-Erkrankung und den aktuellen Forschungsstand und schließt mit der Zielsetzung der Arbeit. Abschnitt zwei beschreibt die verwendeten Methoden und Versuchstiere. Im dritten Abschnitt werden die Ergebnisse der elektrophysiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen erläutert. Diese Ergebnisse und ihre Relevanz für die Alzheimer-Erkrankung werden in Abschnitt vier diskutiert. In Abschnitt fünf werden die Hauptkenntnisse der Arbeit noch einmal zusammengefasst.

1.1 Morbus Alzheimer

Im Jahr 1906 beschrieb der Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) zum ersten Mal eine Erkrankung des Gehirns, die hauptsächlich Menschen höheren Alters betrifft und mit einem fortschreitenden Verlust der mentalen Fähigkeiten verbunden ist. Das Gehirn dieser Patienten zeigt neben einem Nervenzellverlust die Bildung von Plaques und Neurofibrillen (Abb. 1). Dieses Krankheitsbild wird seit 1910, geprägt durch Kraepelin als Morbus Alzheimer bezeichnet (Kraepelin, 1910).

In Industrieländern hat sich die Alzheimer-Krankheit nach Herz-Kreislaufkrankungen, Krebs und Schlaganfällen mittlerweile zur vierthäufigsten Todesursache entwickelt. Schätzungen zufolge leiden derzeit weltweit ca. 30 Millionen Patienten an Morbus Alzheimer. Allein in Deutschland wird von 800000 Alzheimer-Erkrankten ausgegangen. Sollte ein therapeutischer Durchbruch ausbleiben, so könnte durch die demographische Entwicklung diese Zahl bis 2030 weltweit auf etwa 60 Millionen ansteigen (Fillit et al., 2002)

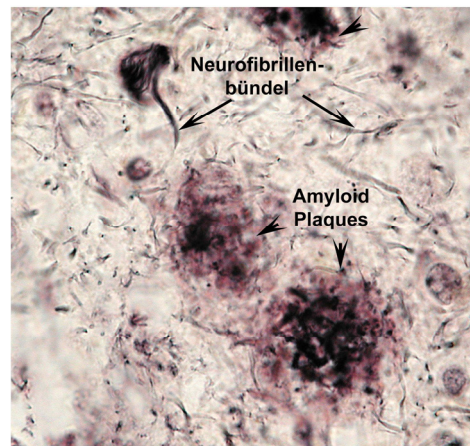


Abb. 1: Originalaufnahme des ersten von Alois Alzheimer beschriebenen Alzheimer-Falls

Gezeigt sind Neurofibrillenbündel (Pfeil) sowie neuritische Amyloid-Plaques (Pfeilspitzen).

(Silberfärbung aus den Archiven des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, München).

Der Morbus Alzheimer stellt eine ätiologisch heterogene Gruppe von klinisch und neuropathologisch sehr ähnlichen Krankheitsbildern dar. So werden präsenile, familiäre Formen von der Gruppe der senilen, sporadischen Erkrankungen unterschieden. Bei der sporadischen Form treten die ersten klinischen Symptome meist erst nach Erreichen des 65. Lebensjahres auf. Dagegen manifestiert sich die Symptomatik der seltener auftretenden familiären Form, die für ca. 1% aller Alzheimer Fälle verantwortlich ist, schon häufig vor dem 50., in Einzelfällen sogar schon vor dem 30. Lebensjahr (Haass and Selkoe, 1993; Selkoe, 1993).

1.1.1 Krankheitsbild

Die Alzheimer-Erkrankung ist durch einen schleichenden Verlust von Hirnleistungen gekennzeichnet. Uncharakteristisch z.B. mit Lernschwäche und Kopfschmerzen beginnend, äußert sie sich anfangs vor allem durch eine gestörte Merkfähigkeit. Diese „Vergesslichkeit“ betrifft zunächst jüngere Ereignisse, einschließlich der zeitlichen und örtlichen Orientierung. Später ist dann auch das Langzeitgedächtnis betroffen (Galton and Hodges, 1999). Im Vordergrund der sich langsam entwickelnden Demenz stehen des Weiteren Störungen der Sprache (zunächst Wortfindungsstörungen), der Kognition (Problemlösungs-, Rechen- und Abstraktionsvermögen) und der räumlichen Orientierung (Schmidtke, 2005).

Der Verlauf der Alzheimer-Krankheit ist unaufhaltsam progredient. Die Gedächtnisstörungen weiten sich aus und die Sprache verarmt bei zunehmenden Stereotypen immer mehr. Motorisch zeigen sich in ähnlicher Weise stereotype Bewegungen. Hinzu treten Verhaltens- und Stimmungsveränderungen. Auch Angstzustände und Depressionen kommen häufig vor. Vom Zeitpunkt der Diagnose an führt die Krankheit in der Regel nach ca. 5-8 Jahren zum Tod des Patienten (Bracco et al., 1994).

1.1.2 Pathologie der Krankheit

Das klinische Erscheinungsbild der Alzheimer-Krankheit beruht auf einer Degeneration von Nervenzellen und Synapsen. Hierbei sind vor allem cholinerge Neurone im Kortex und Hippocampus betroffen. Die cholinergen Nervenbahnen zwischen basalen Vorderhirnstrukturen, Großhirnrinde und Hippocampus spielen eine zentrale Rolle bei Lern- und Gedächtnisfunktionen, Aufmerksamkeitsverhalten und anderen kognitiven Prozessen (Price et al., 1998a). Neben der Neurodegeneration kommt es zur extrazellulären Bildung von Amyloid Plaques (1.1.2.1), sowie der intrazellulären Akkumulation abnormer fibrillärer Strukturen. Beide Veränderungen sind krankheitstypisch, jedoch nicht spezifisch. Sie sind auch bei einer Reihe anderer mit kognitiven Störungen einhergehenden Erkrankungen nachweisbar. Ihr Vorkommen bei der Alzheimer-Krankheit ist jedoch besonders ausgeprägt und zeigt eine typische Verteilung, worauf sich die neuropathologische Diagnose begründet.

1.1.2.1 Amyloid Plaques

Amyloid Plaques stellen eines der pathologischen Hauptmerkmale bei der Alzheimer Erkrankung dar. Es können zwei Arten von extrazellulären Amyloid-Ablagerungen im Parenchym von menschlichen Gehirnen unterschieden werden: neuritische (senile) und nichtneuritische (diffuse) Plaques. In den Hirnen älterer Menschen ohne Demenzercheinungen können sowohl diffuse als auch senile Plaques beobachtet werden (von Braunmühl, 1937). Amyloid Plaques bilden sich im Zwischenzellarraum und bestehen zu 90% aus einem 4-kDa-Peptid, das Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) genannt wird (Glennner and Wong, 1984). Kang et al., zeigten, dass $A\beta$ ein proteolytisches Spaltprodukt eines hochmolekularen Vorläuferproteins, des 110 bis 130 kDa *Amyloid Precursor Proteins* (APP) ist (Kang et al., 1987).

Neuritische Plaques kommen im Wesentlichen in der grauen Hirnsubstanz vor (Katzman, 1986). Sie bestehen im Zentrum aus einem stark verdichteten Kern des Amyloid-Proteins. Die durch Aggregation von A β gebildeten Amyloidfibrillen sind von dystroph veränderten Nervenzellfortsätzen umgeben. Auch reaktive Astrozyten sowie Mikroglia sind innerhalb oder in näherer Umgebung neuritischer Plaques zu finden (Selkoe, 1996). Obwohl A β die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques ist, sind weitere Moleküle bekannt, die mit diesen Plaques assoziiert sind. Als Beispiel seien hier Laminin, Glykosaminoglykane und Apolipoproteine genannt (Diaz-Nido et al., 2002; Monji et al., 2000; Strittmatter and Roses, 1995). Die Ablagerung von Amyloidfibrillen lässt sich meist auch in der Wand von Arteriolen nachweisen. Experimentellen Untersuchungen zufolge können Amyloidfibrillen in ihrem Mikromilieu unter bestimmten Bedingungen zytotoxisch wirken (Yankner et al., 1990). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Bildung und Ablagerung dieser Amyloidfibrillen im Hirngewebe zum Untergang von Neuronen beiträgt (1.1.2.5).

Diffuse Plaques enthalten keinen Amyloid-Kern. Ihre Ultrastruktur weist im Gegensatz zu neuritischen Plaques nur einen geringen Anteil an Amyloid-Fibrillen und wenige oder keine neuritischen Veränderungen auf (Terry et al., 1999).

1.1.2.2 Neurofibrillenbündel

Das zweite pathologische Merkmal im Gehirn von Alzheimer Patienten stellen intrazelluläre Aggregate dar. Diese werden in Zellkörpern, in apikalen Dendriten sowie in der Peripherie von senilen Plaques und in dystrophen Neuriten als Neurofibrillenbündel (neurofibrilläre *tangles*) und in distalen Dendriten als Neuropilfäden bezeichnet.

Neurofibrilläre *tangles* bleiben auch nach dem Absterben der Zelle erhalten und sind dann als sog. *ghost tangles* im Extrazellularraum zu finden. Die *tangles* bestehen hauptsächlich aus paarigen, doppelhelixartig gewundenen Filamenten (*paired helical filaments*) von ca. 10-12 nm und zu einem geringeren Anteil aus geraden Filamenten (*straight filaments*) von ca. 10-15 nm Durchmesser. Hauptbestandteil der *paired helical filaments* ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau. Dieses ist Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts und befindet sich bei der Alzheimer-Erkrankung in einem hyperphosphorylierten Zustand (Goedert, 1993). Die physiologische Funktion des Tau-Proteins besteht in einer Stabilisierung der am axonalen Transport beteiligten Mikrotubulstruktur. Die Wechselwirkung zwischen Mikrotubuli und

Tau wird durch den Phosphorylierungsgrad des Tau-Proteins reguliert. Infolge der bei der Alzheimer-Erkrankung auftretenden hochgradigen Phosphorylierung von Tau kommt es zu einer instabilen Wechselwirkung zwischen Mikrotubuli und Tau-Protein und damit zur Destabilisierung der axonalen Zytoskelettstruktur und zur Beeinträchtigung des axonalen Transports. Tau, das nicht mehr an Mikrotubuli binden kann, wird aus dem axonalen in das somatodendritische Kompartiment rückverlagert und aggregiert zu Neurofibrillen. Durch die Störung axonaler Transportmechanismen sowie durch die im Zusammenhang mit der Neurofibrillenbildung stehende zunehmende metabolische Beeinträchtigung der Zelle, tragen die Folgen der erhöhten Tau-Phosphorylierung sehr wahrscheinlich mittelbar zum Untergang der Neurone bei (Goedert and Jakes, 2005). Abnormale Tau-Filamente sind jedoch auch bei anderen Krankheiten (sog. Tauopathien) zu beobachten, bei denen die Alzheimer-typischen Amyloid Plaques nicht vorkommen. Mutationen des Tau-Gens verursachen keine Demenz vom Alzheimer-Typ, sondern bedingen, nach derzeitigem Stand der Forschung, Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt mit Chromosom 17 (FTDP-17) (Goedert et al., 1998; Hutton et al., 1998).

1.1.2.3 Astrogliose

Astrogliose ist gekennzeichnet durch eine große Anzahl hypertropher Astrozyten und der erhöhten Expression von Strukturproteinen, Zytokinen sowie Akute-Phase Proteinen, die zu Entzündungsreaktionen in neuritischen Plaques und deren Umfeld führen (Griffin et al., 1989; Mark et al., 1997; Selkoe, 1994a; Selkoe, 1994b; Selkoe, 1994c). Astrozyten gehören zu den Gliazellen und übernehmen wichtige Aufgaben, z.B. bei der Aufrechterhaltung des extrazellulären Ionenmilieus, dem Flüssigkeits- und Nährstofftransport zwischen Kapillaren und Nervenzellen und der Bildung der Blut-Hirn-Schranke (Kimmelberg and Norenberg, 1989). Sie werden durch eine Vielzahl verschiedener Noxen aktiviert und sind daher nicht nur bei der Alzheimer-Erkrankung zu finden (Eddleston and Mucke, 1993).

1.1.2.4 Veränderungen im glutamatergen System

Das glutamaterge System spielt bei der Entwicklung und Funktion des Gehirns, insbesondere bei Lern- und Gedächtnisvorgängen, eine wichtige Rolle. Eine Überaktivierung dieses Systems durch Glutamaterezeptoragonisten bzw. durch unterschwellige Depolarisationen führt

zur Exzitotoxizität des Neurotransmitters Glutamat. Solche Vorgänge sollen sowohl dem akuten Zelluntergang bei Ischämie, als auch dem chronischen Zelluntergang bei Chorea Huntington, der Parkinson- und der Alzheimer-Erkrankung zugrunde liegen (Kornhuber and Weller, 1997).

1.1.2.5 Verlust von Neuronen und Synapsen

Neurone und Synapsen stellen die funktionellen und strukturellen Grundkomponenten der Gehirn- und Gedächtnisaktivität dar. Alzheimer-Patienten zeigen im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Menschen eine verringerte Neuronenzahl im *Locus coeruleus* (Hoogendijk et al., 1995), im temporalen Kortex und in der CA1-Region des Hippocampus (West et al., 1994). Dem Neuronenverlust zeitlich weit voraus gehen Veränderungen an der Synapse. Einige Studien (Ball, 1977; Hyman et al., 1984) lassen vermuten, dass der Synapsenverlust im Hippocampus ein morphologisches Korrelat des Gedächtnisverlusts im alternden und Alzheimer erkrankten Gehirn darstellt. Der Schweregrad des Synapsenverlusts ist sehr viel stärker ausgeprägt als der Verlust an Neuronen in den gleichen kortikalen Bereichen. Daher erscheint die synaptische Pathologie, im Gegensatz zu senilen Plaques und Neurofibrillenbündel am besten mit dem Verlust kognitiver Fähigkeiten bei der Alzheimer-Erkrankung zu korrelieren. Experimentell lässt sich der Synapsenverlust durch eine Abnahme des präsynaptischen Markers Synaptophysin zeigen (Blennow et al., 1996; Masliah et al., 1991; Masliah et al., 1992; Terry et al., 1991). Die Alzheimer Erkrankung äußert sich somit, zumindest zu Beginn, in einem Angriff auf synaptische Strukturen (Small et al., 2001). Die Abnahme der Synapsenzahl bei Alzheimer-Patienten wird hierbei vor allem im Kortex und Hippocampus deutlich (Lassmann, 1996; Liu et al., 1996). Es ist daher sinnvoll, die synaptischen Veränderungen so früh wie möglich zu untersuchen, bevor es zum Untergang von Neuronen kommt und lange vor dem Auftreten erster Amyloid Plaques.

1.1.3 Genetisch bedingte Alzheimerfälle

Im Gegensatz zur sporadischen Alzheimer-Erkrankung (*late onset Alzheimer's Disease*) gibt es auch autosomal-dominant vererbare Fälle dieser Krankheit. Für einen großen Teil der familiären Alzheimer-Demenzen (FAD) konnten die ursächlich verantwortlichen Gene identifiziert werden. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um das APP und die Präseniline

(PS1 und PS2). Familiäre Alzheimer-Fälle weisen einen frühen Beginn (40-60 Jahre) der Erkrankung auf, stellen jedoch mit ca. 1% aller Alzheimer-Fälle nur einen sehr geringen Anteil dar (Hardy, 1997).

Es gibt jedoch auch genetische Veränderungen, die mit dem Auftreten von AD mit spätem Erkrankungsbeginn assoziiert sind. So soll das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoproteins E, einem Lipoprotein des Cholesterolfstoffwechsels, das Risiko an Alzheimer zu erkranken erhöhen (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993). ApoE4 kann an A β binden und demzufolge auch in senilen Plaques nachgewiesen werden (Wisniewski and Frangione, 1992). ApoE4-Träger entwickeln wesentlich mehr diffuse A β -Plaques als Nicht-Träger, die jedoch nicht immer mit dem Auftreten einer Alzheimer-Erkrankung assoziiert sind (Polvikoski et al., 1995).

Ein weiterer Polymorphismus auf Chromosom 12, der nahe des Gens für α_2 -Macroglobulin zu finden ist, wird ebenfalls mit dem Auftreten von Alzheimer mit spätem Erkrankungsbeginn in Verbindung gebracht (Blacker et al., 1998). Bei genauer Betrachtung der Familienanamnese von vielen Personen, die an der sporadischen Form der Alzheimer Erkrankung leiden, finden sich darin Verwandte ersten Grades mit alzheimerähnlichen Demenzformen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass sehr viel mehr sporadische Alzheimerfälle genetisch bedingt sind, die dafür verantwortlichen Gene jedoch erst noch identifiziert werden müssen (Selkoe, 2001b).

1.2 Amyloid Precursor Protein

Das *Amyloid Precursor Protein* ist ein Typ 1 integrales Membranprotein, das eine große N-terminale extrazelluläre Domäne (Ektodomäne), eine singuläre Transmembranregion und einen kurzen intrazellulären Bereich besitzt (Abb. 2).

APP wird durch ein aus 19 Exons bestehendes Gen kodiert, welches sich beim Menschen über einen Bereich von 400 kb erstreckt (Lamb et al., 1993). Durch alternatives mRNA-Spleißen der Exons 7, 8 und 15 und verschiedene posttranslationale Modifikationen werden eine Reihe von Isoformen gebildet, die bei elektrophoretischer Auftrennung entsprechende Banden im Bereich von 110 bis 140 kD zeigen. Vorwiegend werden die APP-Spleißformen mit 770 oder 751 Aminosäuren, die sich nur durch Exon 8 voneinander unterscheiden, ubiquitär im Körper exprimiert. In Neuronen wird neben diesen beiden Spleißformen überwiegend eine dritte, bestehend aus 695 Aminosäuren gebildet, welche in nichtneuronalen Zellen kaum produziert wird (Haass et al., 1991). Der Unterschied zwischen dem längeren

APP751 und der kürzeren Form APP695 besteht in einem Motiv aus 56 Aminosäuren, das homolog ist zu einer Protease-Inhibitor-domäne des Kunitz-Typs (KPI) und durch Exon 7 kodiert wird. Für die KPI-Domäne wurde in-vitro eine Funktion bei der Blutkoagulation gezeigt, wobei der Faktor XI inhibiert wird (Smith et al., 1990). Durch Spleißen von Exon 15 entsteht eine Bindungsstelle für Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykane (Pangalos et al., 1995), was auf eine Funktion bei der Zelladhäsion hindeutet. Wichtige Bereiche der Ektodomäne des APP sind neben der KPI-Domäne eine saure Domäne, ein Cystein-reicher Abschnitt, der einen Heparin, Kupfer und Zink-bindenden Bereich enthält und das Signalpeptid am N-Terminus (Storey and Cappai, 1999). Die A β Domäne liegt zu einem Teil in der Transmembrandomäne und zum anderen Teil innerhalb der extrazellulären Domäne. Der kurze intrazelluläre Bereich enthält unter anderem die NPXY-Konsensussequenz, wie sie für Clathrin-vermittelte Endozytose beschrieben wurde (Chen et al., 1990).

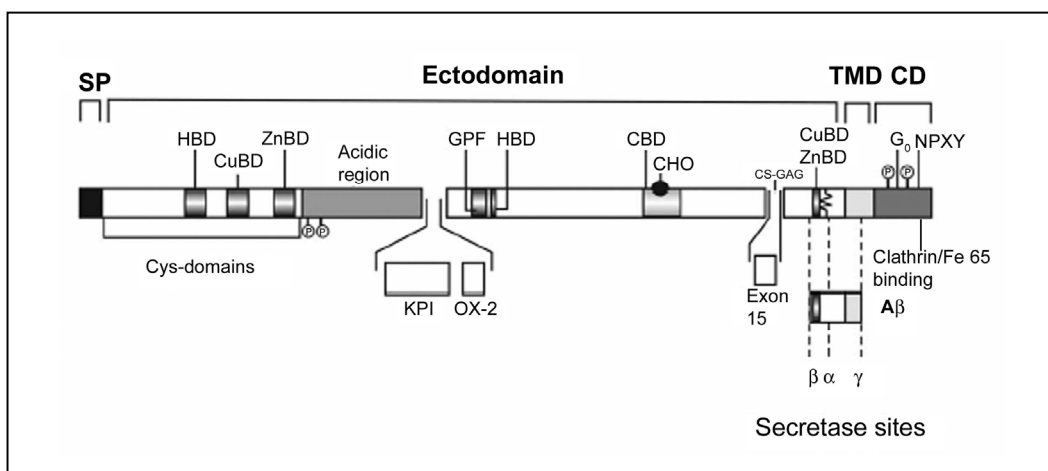


Abb. 2: Strukturelle und funktionelle Domänen des Amyloid Precursor Proteins

APP ist ein Typ 1 integrales Membranprotein mit einer großen Ektodomäne, einer singulären Transmembrandomäne (TMD) und einem zytoplasmatischen Bereich (CD), (SP, Signalpeptid; HBD, Heparin-bindende Domäne; CuBD, Kupfer-bindende Domäne; ZnBD, Zink-bindende Domäne; KPI, Kunitz-Serinprotease-Inhibitor; OX-2, OX-2 homologe Domäne; GPF, wachstumsfördernder Faktor; CBD, Kollagen-bindende Domäne; CHO, Anheftungsstelle für Kohlenhydrate, CS-GAG, Chondroitinsulfat-Glycosaminoglykan (Storey and Cappai, 1999).

Das APP gelangt während der Translation in das endoplasmatische Retikulum (ER) und über Golgi-Vesikel zur Membran. Auf diesem konstitutiv sekretorischen Weg wird es durch N-

und O-Glykosylierung (Weidemann et al., 1989), Sulphorylierung (Suzuki et al., 1994) und Phosphorylierung (Hung and Selkoe, 1994) modifiziert.

Das reife APP wird auf zwei alternativen Wegen, dem nichtamyloidogenen oder sekretorischen und dem amyloidogenen Weg, proteolytisch prozessiert.

1.2.1 Nicht-amyloidogene APP-Prozessierung

Bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung spalten α -Sekretasen (ADAM 9, 10, 12) aus der ADAM (*A disintegrin and metalloprotease*)-Familie (Kojro and Fahrenholz, 2005), das APP innerhalb der Amyloid- β -Region zwischen Aminosäure 16 und 17 (Anderson et al., 1991). Dabei entstehen ein großes, lösliches N-terminales APP-Fragment (APPs α , ~ 100-120 kDa) und ein in der Membran verankertes 10 kDa C-terminales Fragment, namens α -CTF, α -stub oder C83 (Schubert et al., 1989; Weidemann et al., 1989). Die α -Sekretase-Spaltung erfolgt intrazellulär, vorwiegend nach N- und O-Glykosylierung und Sulfatierung in einem späten Kompartiment des sekretorischen Transportwegs, sowie an der Zellmembran. Alternativ kann membrangebundenes APP an der Zelloberfläche durch sein NPXY-Motiv in der zytoplasmatischen Domäne wieder internalisiert werden. Vom ~10 kDa α -CTF spaltet die γ -Sekretase, vermutlich in den frühen Endosomen, ein weiteres Peptid P3 ab, das sezerniert wird (Haass and Selkoe, 1993).

1.2.2 Amyloidogene APP-Prozessierung

Ursprünglich betrachtete man die APP-Spaltung innerhalb der A β -Region als „normal“ und nahm an, dass „abnormale“ bzw. pathologische APP-Prozessierung zur Bildung von A β führt. Dies änderte sich jedoch, nachdem man A β im konditionierten Medium kultivierter Zellen (Haass et al., 1992; Seubert et al., 1992) sowie in der Zerebrospinalflüssigkeit kognitiv unauffälliger Personen fand (Seubert et al., 1992; Shoji et al., 1992). A β entsteht durch β - und γ -Sekretasespaltung des APP (Abb. 3). Dabei erfolgt im ersten Schritt eine Prozessierung durch β -Sekretase (Sinha et al., 1999), die auch als *Beta-site APP-cleaving enzyme* (BACE) bezeichnet wird (Vassar et al., 1999). Sie spaltet APP innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus der A β -Region, 12 Aminosäuren vor der Transmembranregion. Dadurch entsteht analog zur α -Sekretase-Spaltung lösliches APPs β , sowie ein amyloidogenes C-terminales Fragment von ~ 12 kDa, das als C99 oder β -stub bezeichnet wird. Durch

γ -Sekretase Spaltung von C99 entstehen die C-Termini von Amyloid-Peptiden unterschiedlicher Länge (39-43 Aminosäuren) (LaFerla, 2002). Die ϵ -Sekretase-Spaltung führt zur Bildung der ~ 6 kDa großen APP-intrazellulären Domäne (AICD) (Chen et al., 2002). Durch Transfektionsexperimente und Studien mit PS1/PS2-Doppel-Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Präseniline eine essentielle Komponente der γ -Sekretase darstellen und möglicherweise selbst als Protease wirken (Herreman et al., 2000; Moore et al., 2000).

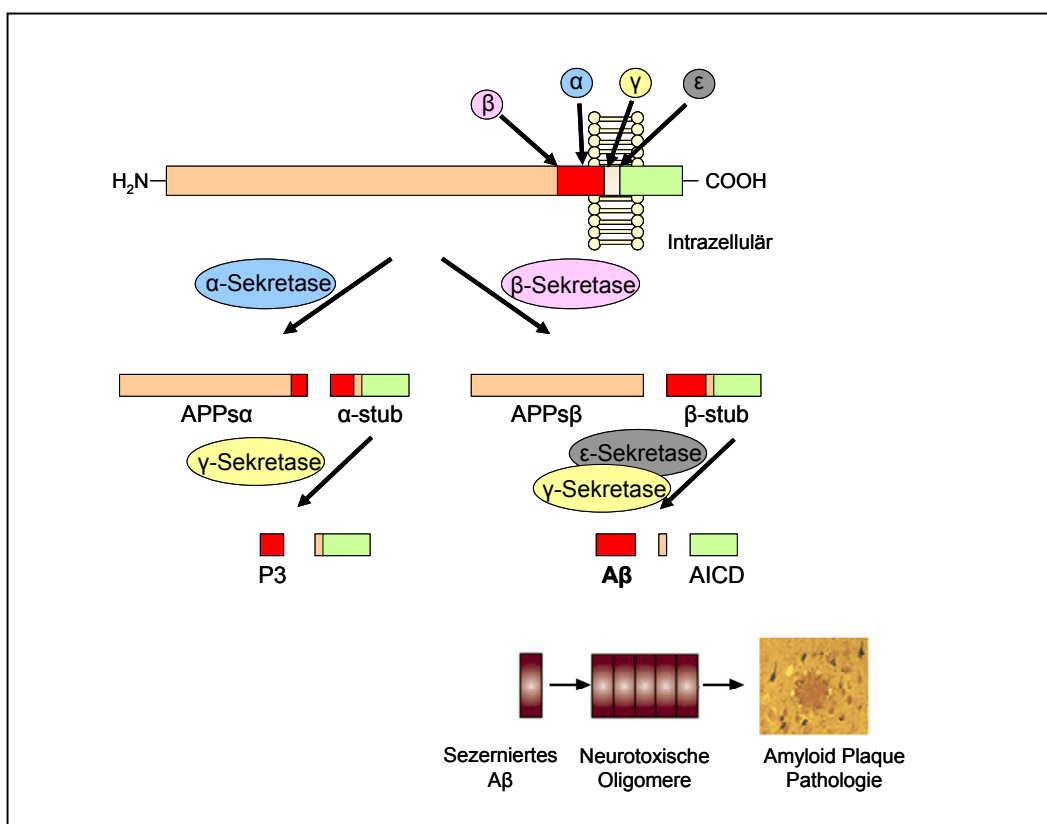


Abb. 3: Struktur von APP und Prozessierung durch Sekretasen

Das Transmembranprotein APP wird entweder durch die α -Sekretase unter Sekretion des neuroprotektiven APP α geschnitten oder aber durch die β - und γ -Sekretase unter Sekretion von A β . Dieses bildet zunächst neurotoxische Oligomere, bevor es sich in den Amyloid Plaques abgelagert (in Anlehnung an: LaFerla, 2002).

Die durch Prozessierung von APP gebildeten Spaltprodukte haben verschiedene physiologische und pathophysiologische Eigenschaften. Für beide löslichen Ektodomänen wurden neuroprotektive und neuritotrophische Eigenschaften in-vitro beschrieben (Mattson et al., 1993; Mattson, 1994). Das Amyloid β wird ebenfalls sekretiert und bildet unter

bestimmten Bedingungen unlösliche, fibrilläre Aggregate, die Hauptbestandteil der Amyloid Plaques sind. Die neurotoxischen Vorstufen der Amyloid-Plaques, die sog. A β -Oligomere, werden derzeit von einer Vielzahl von Forschern als eine der Ursachen der Alzheimer-Pathologie angesehen, worauf in 1.4.3 näher eingegangen wird.

1.2.3 Mutationen des Amyloid Precursor Proteins

Mit familiären Formen der Alzheimer-Erkrankung gekoppelte Mutationen des APP-Gens sind selten und wurden bisher nur in etwa 20 Familien identifiziert, in denen die Alzheimersche Krankheit im Alter von 45 bis 65 Jahren auftrat. Bei allen bisher identifizierten Mutationen handelt es sich um Punktmutationen, genauer gesagt um den Austausch einer Aminosäure (Abb. 4). Die Mutationen liegen innerhalb des A β selbst oder in unmittelbarer Nähe der Sekretase-Schnittstellen und beeinflussen die Prozessierung von APP (Irie et al., 2005).

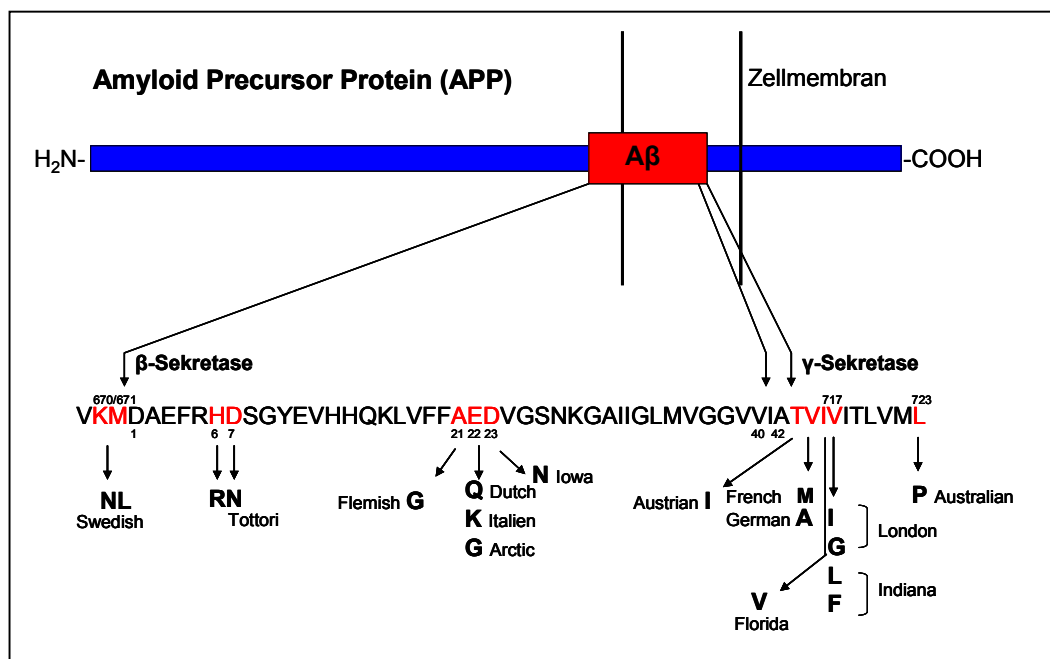


Abb. 4: Mutationen des APP

Die Abb. zeigt die Mutationen von APP, die mit familiären Formen der AD gekoppelt sind. Durch β - und γ -Sekretase-Spaltung wird A β gebildet, welches 40 oder 42 Aminosäuren umfasst. Im unteren Bildbereich ist die Aminosäuresequenz des A β dargestellt. Rot markiert sind die Aminosäuren, für die Punktmutationen gefunden wurden, welche zu vererbaren familiären Formen der Alzheimer-Erkrankung führen (Irie et al., 2005).

Während N-terminale Doppelmutationen (z.B. die schwedische APP-Doppelmutation, KM → NL) zur Erhöhung der Gesamtmenge von sekretiertem A β führt, beeinflussen C-terminale Mutationen die γ -Sekretasespaltung, wodurch es zu einer Erhöhung des relativen Anteils von A β ₄₂ kommt (Selkoe, 1996).

1.3 Präseniline

Präseniline sind hochkonservierte integrale Membranproteine mit 7-10 Transmembrandomänen (TM) (Abb. 5). Sie bestehen aus 10 Exons, welche gewebespezifisch gespleißt werden. Während PS1, das auf Chromosom 14 lokalisiert ist, ubiquitär exprimiert wird, findet man PS2 (Chromosom 1) hauptsächlich im peripheren Gewebe und nur in geringen Mengen im Gehirn (Tandon and Fraser, 2002).

1.3.1 Prozessierung der Präseniline

Erste grundlegende Untersuchungen zur Zellbiologie der PS-Proteine zeigten, dass diese als 47 bis 54 kDa Proteine in transfizierten Zellen exprimiert werden (Cook et al., 1996; Walter et al., 1996). PS-Proteine sind vor allem im ER lokalisiert und zu einem geringeren Anteil auch im Intermediärkompartiment und im frühen *cis*-Golgi (Kim et al., 2000; Walter et al., 1996). Ray et al. wiesen PS-Proteine auch an der Plasmamembran nach (Ray et al., 1999). Die biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften von PS1 und PS2 sind weitgehend identisch, ihre Phosphorylierungen unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander (Walter et al., 1996; Walter et al., 1997).

Präseniline konnten bisher nur nach Überexpression in transgenen Mäusen und transfizierten Zellen als vollständiges Protein (*full-length* PS) nachgewiesen werden (Haass, 1996; Thinakaran et al., 1996). Endogenes *full-length* PS scheint nur in kaum nachweisbaren Mengen zu existieren, da beide Präseniline proteolytisch prozessiert werden. Endoproteolyse des PS1 innerhalb der hydrophilen Schleife nahe der Transmembrandomäne 6 resultiert in der Bildung eines 27 kDa N-terminalen Fragments (NTF) und eines 17 kDa C-terminalen Fragments (CTF). Die Spaltung von PS2 führt zu einem 34 kDa NTF und einem ca. 20 kDa CTF (Thinakaran et al., 1996). Die CTFs der Präseniline können durch Caspasen weiter in 10-15 kDa Fragmente aufgespalten werden (Kim et al., 1997). Die Beobachtung, dass man *in vivo* hauptsächlich das NTF/CTF Heterodimer findet, legt die Vermutung nahe, dass es sich

bei *full-length* PS lediglich um eine unreife Vorstufe handelt und das NTF/CTF PS-Heterodimer die reife, funktionelle Form des Präsenilin Proteins darstellt (Brunkan and Goate, 2005). Untersuchungen an PS1-Knockout-Mäusen zeigen eine wesentlich geringere Bildung von A β . Gleichzeitig akkumulieren sie jedoch das nach β -Sekretase-Spaltung entstandene amyloidogene C99-Fragment (De Strooper et al., 1998). Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass PS1 direkt die proteolytische Aktivität der γ -Sekretase erhöht bzw. selbst die γ -Sekretase ist. (Haass and Selkoe, 1998). Weitere Befunde an Blastocysten, bei denen PS1 und/oder PS2 ausgeschaltet wurden und bei denen eine komplette Inaktivierung der γ -Sekretase zu beobachten war, unterstützen diese Hypothese (Zhang et al., 2000). Zusätzlich zeigten Seiffert et al., dass einige Verbindungen, die die γ -Sekretase inhibieren, spezifisch an PS1 binden (Seiffert et al., 2000). Neueren Untersuchungen zufolge, stellt man sich die γ -Sekretase als Membranproteinkomplex vor, bestehend aus den Transmembranproteinen, Präsenilin, Nicastrin, Aph-1 und Pen-2. Für die einwandfreie Funktion der γ -Sekretase, müssen alle 4 Proteine in stöchiometrischen Mengen vorhanden sein (Edbauer et al., 2002; Kimberly et al., 2003; Takasugi et al., 2003). Präseniline sind nachweislich am Trafficking von Membranproteinen (Naruse et al., 1998), an der Regulation der Stabilität von β -Catenin (Zhang et al., 1998) sowie an der γ -Sekretase-Spaltung von APP und anderen Proteinen wie z. B. Notch beteiligt. Die Entdeckung eines PS-homologen Gens (SEL-12) im Fadenwurm *C. elegans* gab deutliche Hinweise auf die physiologische Funktion der Präseniline (Levitan and Greenwald, 1995). Das SEL-12 Gen scheint wichtig für die Signaltransduktion durch Rezeptoren der Notch-Genfamilie zu sein. Gene der Notch-Familie spielen bei der Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle. Baumeister et al. konnten zeigen, dass das menschliche PS1-Gen die biologische Funktion von mutiertem SEL-12 in Würmern vollständig ersetzen kann (Baumeister et al., 1997). Folglich hat menschliches PS1 bei der Zelldifferenzierung in der Embryogenese eine biologische Funktion. PS1-Gene verloren mit Punktmutationen, die die familiäre Form der Alzheimer-Erkrankung hervorrufen, ihre biologische Funktion nahezu vollständig. Sie konnten die Funktion von SEL-12 in mutierten Würmern nicht mehr übernehmen. Demzufolge treten PS1-Mutationen an funktionell wichtigen Positionen auf.

1.3.2 Mutationen der Präseniline

Bei fast allen Mutationen, die für die Präseniline bekannt sind, handelt es sich um den Austausch einer Aminosäure. Im PS1-Gen konnten bisher mindestens 100 Punkt- sowie 2 Spleißdefekt-Mutationen gefunden werden, die mit dem frühen Auftreten der Alzheimer-Erkrankung einhergehen (Rogaeva, 2002). Geringe Konzentrationen an PS2 im Gehirn sowie die Kompensation ihrer Aktivität durch PS1 könnten erklären, warum PS2-Mutationen eher selten auftreten und im Gegensatz zu PS1-Mutationen nur unvollständig penetrant sind (Sherrington et al., 1996). Ein großer Teil der PS1-Mutationen liegt innerhalb der Transmembrandomänen. Häufungen von Mutationen treten in der Transmembranregion 2 und 6 sowie innerhalb der hydrophilen Schleife auf (Brunkan and Goate, 2005). Diese befindet sich zwischen der TM 6 und 7 des PS1-Proteins (Abb. 5).

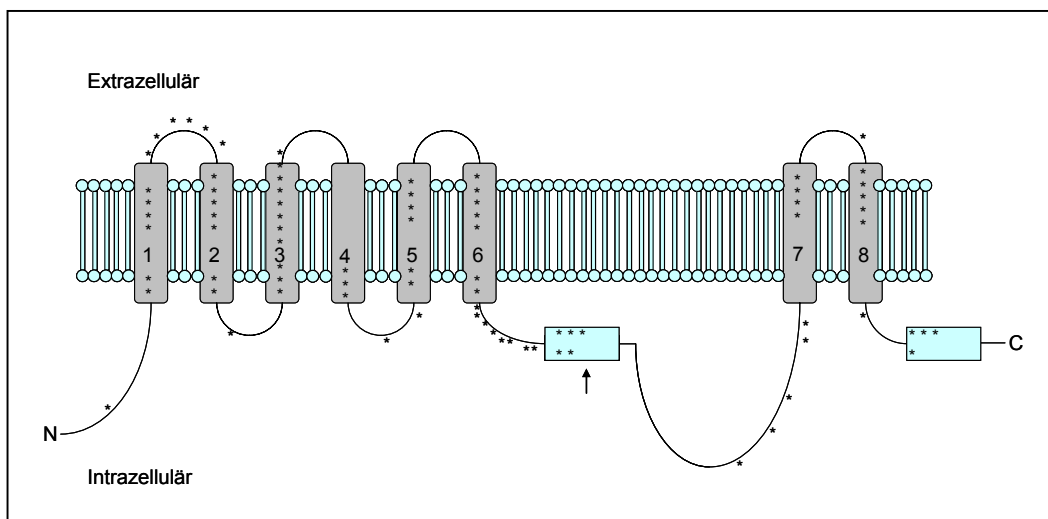


Abb. 5: Struktur des PS1-Proteins in der Membran des ER

Gezeigt sind acht Transmembrandomänen (1 bis 8) und zwei hydrophilen Regionen (ohne Nummerierung, blau) des PS1. Die Sterne geben die Positionen von PS1-Mutationen an, die mit der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung assoziiert sind. Der Pfeil deutet die Stelle an, wo die Endoproteolyse des PS1 stattfindet. Zwischen der Transmembrandomäne 6 und 7 liegt eine hydrophile Schleife vor (in Anlehnung an: Brunkan and Goate, 2005).

1.4 Amyloid-Bildung

Untersuchungen zum pathologischen Mechanismus der Alzheimer-Erkrankung bewiesen eine gesteigerte Produktion von $A\beta_{42}$ bzw. eine Erhöhung des $A\beta_{42}$ zu $A\beta_{40}$ Verhältnisses aufgrund von Mutationen in den PS-Genen. Mutationen im APP hingegen führen meist zu einer

Erhöhung des Gesamt-A β -Gehalts, sowie bei einigen Mutationen ebenfalls zu einer Erhöhung des A β_{42} : A β_{40} Verhältnisses (Borchelt et al., 1996; Citron et al., 1997; Duff et al., 1996; Scheuner et al., 1996; Tandon et al., 2000). Damit beeinflussen Mutationen in drei verschiedenen Genen (PS1, PS2 und APP) denselben pathologischen Prozess, die Bildung von A β . Diese Tatsache unterstützt die zentrale Rolle von A β bei der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung. Ein direkter Zusammenhang zwischen den PS1-Mutationen und der Bildung von A β wird auch durch eine erhöhte Anzahl von Amyloid-Plaques in den Gehirnen von Patienten mit PS1-Mutationen unterstützt (Lemere et al., 1996).

1.4.1 Intrazelluläres A β

Mit Hilfe eines hochspezifischen ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), der die Unterscheidung zwischen A β_{40} und A β_{42} ermöglicht, konnte die Entstehung von A β_{40} und A β_{42} im ER und deren dortige Akkumulation gezeigt werden (Cook et al., 1997; Hartmann et al., 1997). Ende 1997 wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt, dass die APP-Prozessierung nicht wie angenommen erst an der Zelloberfläche, sondern bereits intrazellulär erfolgt. Außerdem wurde bewiesen, dass die proteolytische Spaltung des A β_{40} und A β_{42} durch die γ -Sekretase in verschiedenen Kompartimenten der Zelle erfolgt. Das ER ist dabei das erste Kompartiment, in dem A β_{42} akkumuliert wird, wohingegen sich A β_{40} hauptsächlich im *trans*-Golgi-Netzwerk anreichert (Hartmann et al., 1997). Die Präseniline, die neben der Zellmembran hauptsächlich in den Membranen des ER und des Golgi-Apparates lokalisiert sind, befinden sich somit in einer geeigneten Position für die Prozessierung von APP.

1.4.2 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

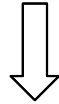
Da es sehr viele Argumente für eine zentrale Rolle von A β in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung gibt, wurde auf diesem Gebiet intensiv geforscht. Anfang der 90er Jahre stellten zwei grundlegende Erkenntnisse den fehlenden Link zwischen A β und der Neurodegeneration bei der Alzheimer-Erkrankung her. Zum einen zeigten Yankner und Cotman und ihre Arbeitsgruppen, dass Lösungen aus synthetischem A β toxisch gegenüber ZNS-Neuronen sein können (Busciglio et al., 1992; Pike et al., 1993). Des Weiteren fanden sie heraus, dass nur „gealterte“ A β -Lösungen, nicht jedoch frische Lösungen, die nur A β -Monomere enthielten, toxisch wirkten (Loo et al., 1993; Lorenzo and Yankner, 1994). Diese gealterten Lösungen

enthielten hauptsächlich Amyloid-Fibrillen, die eine vergleichbare Struktur aufwiesen wie Fibrillen, die man in senilen Plaques von Alzheimer-Patienten findet. Aus diesen Erkenntnissen resultierte letztendlich die sog. „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ (Abb. 6). Danach wird die Ablagerung von A β als zentrales Ereignis und Ursache für die Neurodegeneration bei der Alzheimer-Erkrankung angesehen. Im Rahmen dieser Hypothese wird die Entstehung der Alzheimer-typischen Plaques durch erhöhte Konzentration von fibrillärem A β_{42} im Vergleich zu löslichem A β_{40} begünstigt. Untersuchungen ergaben, dass ein Übergang der löslichen in die unlösliche Form mit einer Konformationsänderung von der α -Helix- zur β -Faltblattstruktur assoziiert ist. Dieser Übergang wird vom carboxyterminalen Ende aus induziert. Folglich aggregieren A β -Peptide, die ein verkürztes C-terminales Ende besitzen, deutlich langsamer als z.B. das lange A β_{42} (Jarrett et al., 1993). Die Geschwindigkeit der Aggregation ist sowohl abhängig von der Konzentration des Peptids als auch von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung (Barrow et al., 1992; Garzon-Rodriguez et al., 1997). Das längere A β_{42} wird bereits in früheren Stadien der AD in den sog. „diffusen Plaques“ gefunden (Yamaguchi et al., 1989). Derzeit wird angenommen, dass die reifen neuropathogenen neuritischen Plaques durch zunehmende Einlagerung von A β_{40} sowie fibrillärem A β_{42} in diffuse Plaques entstehen (Selkoe, 1999; Selkoe, 2001a). Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist unter Forschern jedoch umstritten. Hauptkritikpunkte sind: Erstens, eine nur teilweise Korrelation zwischen der Anzahl seniler Plaques und dem Ausmaß der Demenz, zweitens der Nachweis von Amyloid-Ablagerungen fern der Bereiche des Neuronenverlustes und drittens das Auftreten von v.a. diffusen Plaques auch bei älteren, gesunden Menschen (Terry et al., 1999).

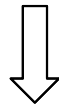
Missense Mutationen in APP, PS1 und PS2- Genen



veränderte APP- Prozessierung



erhöhte Produktion von A β ₄₂



Ablagerung von A β ₄₂ als diffuse Plaques



Einlagerung von A β ₄₀ in diffuse A β ₄₂-Plaques



Bildung neuritischer Amyloid-Plaques



Schädigung und Verlust von Nervenzellen



DEMENZ

Abb. 6: Die Amyloid-Kaskaden Hypothese

Beschrieben ist die hypothetische Abfolge pathologischer Schritte, die bei der Alzheimerschen Erkrankung zu Demenz führen (in Anlehnung an: Selkoe, 2001b).

1.4.3 Oligomer-Hypothese

Die Oligomer-Hypothese besagt, dass lösliche, runde A β ₄₂-Oligomere, sog. ADDLs (*A β -derived diffusible ligands*) mit als Hauptverursacher der neurologischen Pathologie bei der Alzheimer-Erkrankung angesehen werden (Lambert et al., 1998). Die ersten Hinweise dafür, dass die A β -Toxizität nicht von der Bildung fibrillärer Aggregate abhängt, stammen aus Untersuchungen einer Arbeitsgruppe an der Universität von Südkalifornien (Oda et al., 1994; Oda et al., 1995). Diese beobachteten, dass ApoJ, ein Protein, welches von Gliazellen sezerniert wird und eine Chaperon-ähnliche Funktion hat, die Bildung von fibrillären A β -Aggregaten verhindern kann. Dies hatte jedoch keine verminderte Zelltoxizität zur Folge. Es zeigte sich vielmehr eine erhöhte Toxizität, was auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Oligomerbildung schließen lässt. Oligomere als lösliche Neurotoxine könnten als „missing link“ der unzureichenden Korrelation zwischen der Anzahl seniler Plaques und dem Ausmaß der Demenz dienen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass sich Oligomere schon bei sehr geringen A β -Konzentrationen bilden und somit vermutlich in sehr frühen Stadien der Erkrankung, lange vor der Plaque-Bildung, eine entscheidende Rolle spielen (Klein, 2002).

1.5 Synaptische Neurotransmission im Hippocampus

Die Hippocampus-Formation ist im Vergleich zu anderen Gehirnarealen relativ einfach aufgebaut. Sie wird in vier Regionen unterteilt: den Gyrus dentatus, den eigentlichen Hippocampus (*cornu ammonis*, Regionen CA1, CA2 und CA3), den subikulären Komplex (*subiculum, präsubiculum, parasubiculum*) und den entorhinalen Kortex (Benninghoff and Drenckhahn, 2004). Der Hippocampus erhält seine Afferenzen v.a. über den Tractus perforans aus dem entorhinalen Kortex. Nach Umschaltung auf die Körnerzellen im *Gyrus dentatus* projizieren deren Axone als die sog. Moosfasern auf die Pyramidenzellen der CA3 Region. Diese ziehen ihrerseits über die sog. Schaffer-Kollaterale zu den großen CA1-Pyramidenzellen. Die Fortsätze der CA1-Zellen verlaufen über das *subiculum* zurück zum entorhinalen Kortex.

Der Hippocampus spielt eine wichtige Rolle bei bestimmten Formen des Lernens (deklaratives Gedächtnis) und der Erinnerung. Dabei nimmt er vermutlich selbst nicht an der längerfristigen Informationsspeicherung teil, sondern ist vielmehr Teil des

Kurzzeitgedächtnisses (Thompson, 2001). Der Synapsenverlust und fortschreitende Neurodegeneration bei der Alzheimer Erkrankung betreffen hauptsächlich den Hippocampus, wodurch dieser häufig Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen ist.

1.5.1 Glutamat als Neurotransmitter

Der wichtigste erregende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem ist Glutamat. Dieses spielt insbesondere im zerebralen Kortex eine bedeutende Rolle und kann zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) führen. Die übrigen Synapsen stellen inhibitorische Synapsen mit dem Neurotransmitter GABA (γ -Amino-Buttersäure) dar. Bei vielen grundlegenden physiologischen Hirnfunktionen sowie bei komplexen integrativen Leistungen, wie Schmerzverarbeitung, Motorik, Lernen und Gedächtnis, ist Glutamat entscheidend. Glutamat wirkt auf zwei Klassen von membrangebunden Rezeptoren: metabotrope und ionotrope Glutamat Rezeptoren (Abb. 7 und 8). Die metabotropen Rezeptoren verändern über G-Proteine verschiedene intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge, wie z.B. $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Hierbei wird über ein G-Protein die Aktivität des Enzyms Phospholipase C (PLC) erhöht. Die aktivierte PLC katalysiert dann die Spaltung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in die beiden sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). DAG kann in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen und Lipiden die Sensitivität der Proteinkinase C (PKC) gegenüber Ca^{2+} dramatisch erhöhen. Dieser Komplex von PKC mit DAG, Ca^{2+} und Lipiden ist in der Lage, eine Reihe von Proteinen zu phosphorylieren. IP₃ ist wasserlöslich und fungiert als second messenger. Diffundiert es in das Zytoplasma, kann es an der Membran des ER an den IP₃-Rezeptor binden und damit die Freisetzung von Ca^{2+} aus internen (IP₃-sensitiven) Speichern auslösen. Sowohl DAG als auch IP₃ werden schnell abgebaut. Dabei kann IP₃ zu freiem myo-Inositol dephosphoryliert, oder durch eine spezifische Ca^{2+} -aktivierte Kinase zu Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat (IP₄) weiterphosphoryliert werden.

Die Aktivierung der ionotropen Glutamatrezeptoren ändert die Membranleitfähigkeit für Ionen und damit das Membranpotential. Die ionotropen Rezeptoren werden in zwei Hauptklassen unterteilt, die non-N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und NMDA-Rezeptoren. Zu den non-NMDA-Rezeptoren gehören die α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionat (AMPA) und die Kainat-Rezeptoren. AMPA-Rezeptoren bilden Tetramere aus den

Untereinheiten GluR1 bis GluR4. Sie vermitteln alle Formen der schnellen Neurotransmission und erlauben den Durchfluss monovalenter Ionen wie Na^+ und K^+ . AMPA-Rezeptoren können allerdings auch Ca^{2+} -permeabel sein. Die Ca^{2+} -Permeabilität wird durch die Zusammensetzung der Untereinheiten der Kanäle reguliert. AMPA-Rezeptoren, denen die GluR2-Untereinheit fehlt, sind neben anderen bivalenten Kationen auch für Ca^{2+} durchlässig (Pellegrini-Giampietro et al., 1997).

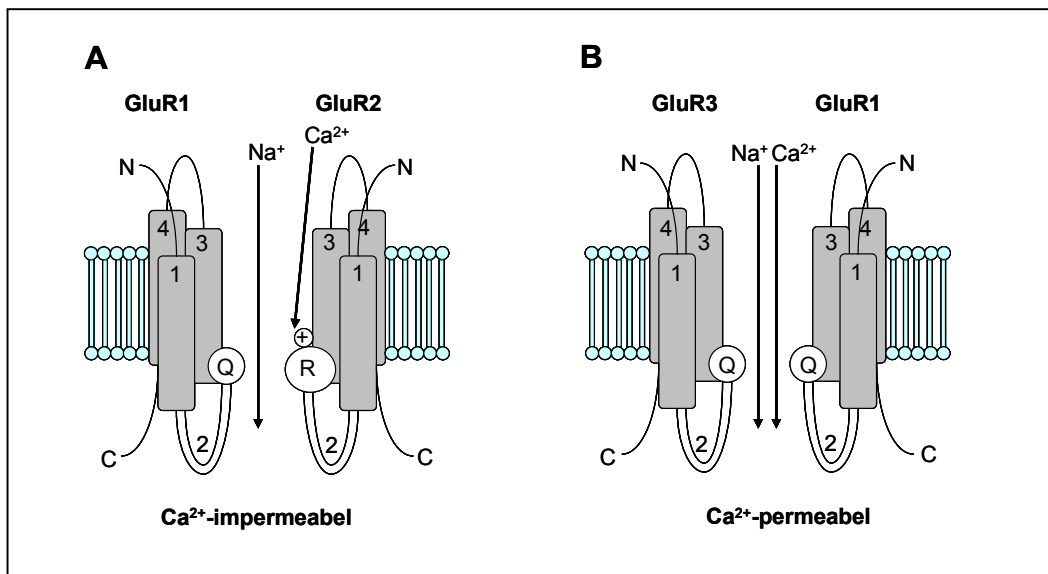


Abb. 7: Ca^{2+} -Permeabilität von AMPA-Rezeptoren

A, Die GluR2-Untereinheit bildet mit der GluR1 oder GluR3-Untereinheit AMPA-Kanäle, die Ca^{2+} -impermeabel sind. Die GluR2-Untereinheit limitiert den Ca^{2+} -Durchfluss aufgrund eines positiv geladenen Arginins (R) anstelle eines Glutamins (Q).

B, Die AMPA-Kanäle, die sich aus den Untereinheiten GluR1 und/oder GluR3 zusammensetzen, sind permeabel für Ca^{2+} . Dargestellt sind jeweils nur zwei der vier Untereinheiten (Pellegrini-Giampietro et al., 1997).

NMDA-Rezeptoren bestehen aus fünf Untereinheiten, welche in drei Familien eingeteilt werden. Sie erlauben sowohl den Fluss von ein- als auch zweiwertigen Ionen, also auch den Durchfluss von Ca^{2+} (siehe Abb. 8). Da zur Rezeptoraktivierung sowohl Glutamat als auch Glycin gleichzeitig als Agonisten vorhanden sein müssen, sind diese Rezeptoren einzigartig unter allen Neurotransmitterrezeptoren. An der Funktion dieser Rezeptoren sind zusätzlich verschiedene modulierende Bindungsstellen beteiligt, die auf Polyamine, Phosphorylierung, Redoxeinflüsse oder Protonen reagieren. Im Ionenkanal des NMDA-Rezeptors befindet sich

eine Mg^{2+} -Bindungsstelle. Unter den Bedingungen des Ruhemembranpotentials wird der Ionenkanal durch physiologische Konzentrationen von Mg^{2+} in einer spannungs- und benutzungsabhängigen Weise blockiert. Mg^{2+} verlässt den Ionenkanal, wenn der Rezeptor durch seine beiden Agonisten aktiviert wird und die Zellmembran depolarisiert ist. Nur unter diesen Bedingungen können Ca^{2+} -Ionen über den NMDA-Rezeptor das Zellinnere erreichen. Im Bereich der Mg^{2+} -Bindungsstelle liegt die sog. Phencyclidin (PCP)-Bindungsstelle. Hier binden nichtkompetitive NMDA-Rezeptorantagonisten, wie Mk-801 oder PCP (Kandel et al., 1991; Kornhuber and Weller, 1997).

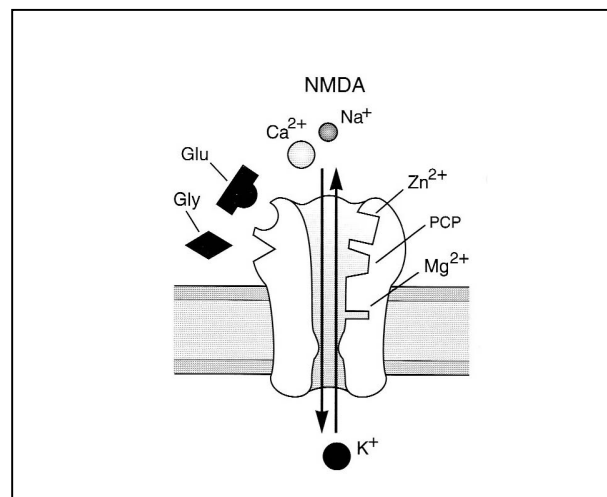


Abb. 8: Permeabilität des NMDA-Rezeptors

Der NMDA-Rezeptor ist ein unspezifischer Kationenkanal, der permeabel für Ca^{2+} , Na^+ und K^+ ist und Bindungsstellen für Glycin, Zink, Phencyclidin und Mg^{2+} aufweist. Diese beeinflussen die Funktion des Kanals in unterschiedlicher Weise (Kandel et al., 1991).

1.5.2 Aufbau und Funktion der Synapse

Bei der synaptischen Übertragung an einer chemischen Synapse werden durch einen Ca^{2+} vermittelten Prozess Neurotransmittermoleküle aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt entleert. Diese diffundieren zur postsynaptischen Membran und binden dort an bestimmte Rezeptoren. Als Reaktion darauf kommt es vor allem über die Erhöhung der Na^{2+} -Ionen Leitfähigkeit zu einem schnellen Einstrom positiver Ladung und somit zur Auslösung eines Aktionspotentials. Diese Depolarisation vom negativen Ruhepotential zu positiven Potentialen breitet sich über die ganze Zelle aus. In der präsynaptischen Endigung führt sie zu einer Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, deren Dichte in der sog. „aktiven Zone“

der Synapse besonders hoch ist. Durch die schlagartig erhöhte Ca^{2+} Konzentration kommt es zur Exozytose von Neurotransmitter gefüllten Vesikeln, die in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran angelagert sind. Dieser, sofort zur Fusion mit der Plasmamembran bereitstehende Anteil an Neurotransmitter-Vesikeln, wird auch *Readily releasable pool* (RRP) genannt. Der größere Teil der Neurotransmittermoleküle befindet sich in synaptischen Vesikeln kurz hinter der Plasmamembran und wird als *Reserve pool* (RP) bezeichnet. Er dient der Wiederauffüllung des RRP, wenn dieser durch den oben beschriebenen Prozess geleert wurde. Die leeren synaptischen Vesikel werden über Endozytose wieder in die Präsynapse aufgenommen und dort recycelt. Wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter im Gehirn ist das Glutamat. Es bindet an non-NMDA (AMPA/Kainat) und NMDA-Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Normalerweise ist der NMDA-Rezeptor durch Mg^{2+} -Ionen blockiert und wird erst nach ausreichender Depolarisation der postsynaptischen Membran funktionstüchtig. Deutlich erhöhte extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentrationen unterdrücken die NMDA-Ströme auch bei starker Depolarisation (Bekkers and Stevens, 1993). Der durch diese beiden Rezeptortypen ausgelöste Kationen-Einstrom wird als exzitatorischer postsynaptischer Strom (*excitatory postsynaptic current*, EPSC) bezeichnet.

Neben den, durch Aktionspotentiale (AP) induzierten EPSCs, weisen Neurone auch ohne Stimulation eine Grundaktivität auf. Diese entsteht durch die spontane Freisetzung einer konstanten Transmittermenge aus einem mit der präsynaptischen Membran verschmelzenden Vesikel. Die daraus resultierenden postsynaptischen Ströme, die sog. *miniature*-EPSCs (mEPSC), bilden die Spontanaktivität. Diese kleinste, aus einem einzigen Vesikel stammende Menge an Neurotransmittern nennt man ein Transmitterquant. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit eines Quants wird durch die präsynaptische Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst (Borst and Sakmann, 1996). Ohne aktionspotential-induzierte Stimulation ist die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sehr niedrig, so dass nur einzelne Quants in Form spontaner Ereignisse freigesetzt werden. Durch ein AP erhöht sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ etwa um den Faktor 1000 wodurch es zur Freisetzung von zahlreichen Transmitter-Vesikeln kommt. Diese führen postsynaptisch zur Auslösung eines wesentlich größeren EPSCs (Zucker and Regehr, 2002).

1.5.3 Synaptische Plastizität

Unter synaptischer Plastizität versteht man die Regulierbarkeit der Synapse bezüglich der Effektivität ihrer synaptischen Übertragung. Man unterscheidet die Langzeit- von der Kurzzeitplastizität. Die langandauernde Veränderung der synaptischen Effektivität ist von entscheidender Wichtigkeit für Entwicklung und Lernen. Ein experimentelles Korrelat ist die sog. Langzeitpotenzierung (LTP), bei deren Funktionsweise die NMDA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen.

Kurzzeitplastizität kann sich entweder in einer Verstärkung (*Facilitation*) oder in einer Abschwächung (*Depression*) der synaptischen Übertragung äußern (Zucker and Regehr, 2002). Treffen zwei Aktionspotentiale in einem kurzen Intervall auf die präsynaptische Endigung, so kann es sein, dass der zweite Reiz eine stärkere oder schwächere postsynaptische Reaktion auslöst. Im Falle der stärkeren Reaktion spricht man von Doppelpulsverstärkung (*Paired-pulse facilitation*, PPF). Sie ist durch die sog. Rest- Ca^{2+} -Hypothese erklärbar: Die durch das erste Aktionspotential erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist bei Eintreffen des zweiten AP immer noch über der Ruhekonzentration; somit addiert sich das neu einströmende Ca^{2+} zum restlichen Ca^{2+} , wodurch sich die Freisetzungswahrscheinlichkeit für die Neurotransmittervesikel erhöht. Daher werden beim zweiten Reiz mehr Vesikel entleert und der postsynaptische Strom ist verstärkt (Katz and Miledi, 1968).

Bei der Abschwächung der synaptischen Übertragung, der *Paired-pulse depression* (PPD) wird generell ein anderes Model bevorzugt: Der erste Reiz leert den RRP, wodurch dem kurz darauf eintreffenden, zweiten Impuls nicht mehr genügend Vesikel zur Verfügung stehen und die Neurotransmitterfreisetzung zwangsläufig geringer ist. Das Resultat ist dann eine geringere postsynaptische Reaktion (Betz, 1970). Eine weitere Ursache der PPD könnte in der Desensibilisierung postsynaptischer Rezeptoren oder in der Feedbackaktivierung präsynaptischer Rezeptoren liegen (Zucker and Regehr, 2002).

Ob eine Zelle nun eine Verstärkung oder eine Abschwächung der synaptischen Übertragung zeigt, hängt von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) sowie von der Neuronenpopulation und deren spezifischen Charakteristika, sowie der Größe ihres RRP oder dem Vermögen diesen wieder aufzufüllen, ab (Murthy et al., 1997). In hippocampalen Kulturen ist unter physiologischen Bedingungen die PPD die vorherrschende Form synaptischer Kurzzeitplastizität (Mennerick and Zorumski, 1995).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der Untergang von synaptischen Endigungen wird als ein frühes pathophysiologisches Korrelat der Demenz der Alzheimer-Erkrankung angesehen. Eine zentrale pathogenetische Rolle wird dabei dem *Amyloid Precursor Protein* zugeschrieben, ein transmembranes, vor allem synaptisches Protein unbekannter Funktion, dessen Abbauprodukte im Gehirn von Partienten mit einer Alzheimerschen Erkrankung akkumulieren.

Ziel der Doktorarbeit ist es zum einen, genauere Erkenntnisse über die physiologische Funktion dieses Proteins an der Synapse zu bekommen. Zum anderen soll analysiert werden, ob und auf welche Weise Abbauprodukte dieses Proteins die synaptische Übertragung schädigen.

Im ersten Teil der Arbeit wird die physiologische Rolle von APP anhand der Untersuchung von Knockout-Mäusen bearbeitet. Dazu soll anhand elektrophysiologischer Methoden die Frage geklärt werden, ob sich der Knockout des APP auf die synaptische Übertragung auswirkt. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf Veränderungen in der Amplitude stimulierter EPSCs, der Kurzzeitplastizität sowie des Pools an synaptischen Neurotransmitter-Vesikeln gelegt. Als Modell dienen autaptische Primärzellkulturen aus dem Hippocampus von neugeborenen Mäusen. Des Weiteren sollen immunhistochemische Untersuchungen zur Synapsenanzahl und Dendritengröße durchgeführt werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage des Effektes von APP Spaltprodukten. Anhand der Untersuchung von transgenen Mäusen mit Mutationen im APP und/oder PS1 sowie der Applikation von synthetisch hergestellten A β -Oligomeren sollen mögliche Effekte auf die synaptische Übertragung aufgezeigt werden.

2. Material und Methoden

Im ersten Abschnitt des Material und Methodenteils werden die verwendeten Mauslinien und deren Genotypisierung beschrieben, der zweite Abschnitt beschäftigt sich hauptsächlich mit der Herstellung der autaptischen Zellkultur und den untersuchten elektrophysiologischen und immunhistochemischen Parametern.

2.1 Versuchstiere

Zur Analyse der synaptischen Übertragung an autaptischen neuronalen Primärzellkulturen wurden transgene APP und PS1 Mauslinien verwendet. Ein Teil der transgenen Tiere (PS1(A246E), PS1 (S182)) stammte aus der Arbeitsgruppe von Prof. F. van Leuven (Zentrum für Humangenetik, Leuven, Belgien). Die APP^{-/-} Mäuse stammten von Prof. Dr. U. Müller (Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie, Heidelberg). Der andere Teil der Tiere) stammte von Dr. M. Staufenbiel (APP23) (Novartis Pharma Ltd. Basel, Schweiz) und von Dr. M. Jucker (APPPS1) (Hertie Institut für klinische Hirnforschung, Tübingen). Nach Überführung der Tiere wurden diese in der zentralen Tierhaltungseinrichtung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der LMU in München unter Standardbedingungen gehalten.

2.1.1 Wildtyp-Mäuse

Als Kontrollmäuse für die jeweiligen *Patch-clamp* Messungen dienen C57BL/6 x 129Ola, FVB/N und C57BL/6J Mäuse, je nach genetischem Hintergrund der jeweiligen transgenen Linie.

2.1.2 APP-Knockout-Mäuse

Bei der APP-Knockout (KO) Mauslinie wurde durch *cre/lox* vermittelte Rekombination ein 200 kb großer, die Exons 3 bis 17 umfassender Abschnitt des APP-Gens deletiert (Abb. 9A,B). Die Herstellung erfolgte mittels Blastozysteninjektion von ES-Zellen auf C57BL/6 x 129Ola Hintergrund (Li et al., 1996).

Homozygote APP-KO Mäuse sind lebensfähig und fertil, allerdings ca. 15-20% leichter als Wildtyp-Mäuse (Magara et al., 1999). Als einzige morphologische Veränderung wurde bei

APP-KO Mäusen eine Agenesie des Balkens beobachtet (Muller, 1999). Weiterhin wurde für die Knockout-Mäuse eine Hypersensitivität gegenüber Krämpfen beschrieben, die durch intraperitoneale Kainatinjektion induziert wurde (Steinbach et al., 1998).

2.1.3 Transgene Präsenilin-Mäuse

In Experimenten wurden Untersuchungen an transgenen PS1 Mäusen durchgeführt, die entweder humanes Wildtyp PS1 (S182, PS1wt), oder humanes PS1 mit der A246E Punktmutation (PS1mut), homozygot, unter der Kontrolle des neuronenspezifischen Thy-1 Genpromotors exprimierten (Dewachter et al., 2000) (siehe Abb. 9D).

Die Herstellung erfolgte mittels Pronukleus-Injektion des Konstrukts in Eizellen von FvB/N Weibchen. Das transgene humane PS1 Protein wird im Hirn dieser Mäuse zum gleichen Grad exprimiert wie das endogene Maus PS1 Protein. Western Blot Untersuchungen zeigen eine proteolytische Prozessierung des humanen Transgens in C- und N-terminale Fragmente. Histologisch zeigen die Hirne dieser transgenen PS1 Mäuse auch im fortgeschrittenen Alter von 2 Jahren keine Auffälligkeiten. Bei Lern- und Verhaltenstests (*water maze test*) unterscheiden sich diese Mäuse nicht gegenüber nichttransgenen Tieren (Schneider et al., 2001).

Insgesamt zeigen die transgenen PS1 Mäuse keinen deutlichen Phänotyp oder pathologische Defekte. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Untersuchungen von Patienten, die eine PS1 Mutation aufweisen. In den meisten Fällen zeigen sich in den Hirnen dieser Patienten bereits ab einem Alter von 40 Jahren deutliche Plaqueablagerungen.

2.1.4 Transgene APP-Mäuse

Transgene APP-Tiere exprimieren heterozygot humanes APP (Isoform 751) mit der schwedischen Doppelmutation K670N/M671L (APP23) ebenfalls unter dem neuronenspezifischen Thy-1 Genpromotor (siehe Abb. 9C). Sie wurden durch Pronukleus-Injektion zunächst auf dem C57BL/6J x DBA2 Mischhintergrund generiert und anschließend für mindestens 9 Generationen auf den C57BL/6J Hintergrund rückgekreuzt (Phinney et al., 1999; Sturchler-Pierrat et al., 1997). Sie zeigen eine 7-fache Überexpression des Transgens, hauptsächlich im zerebralen Kortex und im Hippocampus. Bereits im Alter von 6 Monaten lassen sich im Neokortex und Hippocampus erste A β Ablagerungen nachweisen. Diese

werden begleitet von Entzündungsreaktionen sowie einer reduzierten Anzahl von Neuriten und Synapsen. Erstmals konnte bei diesen Mäusen auch eine altersabhängige Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, jedoch keine voll ausgebildeten Neurofibrillenbündel nachgewiesen werden (Sturchler-Pierrat et al., 1997).

Bei Lern- und Verhaltenstests (*water maze test*) fand man altersabhängige Defizite, verglichen mit Kontrollmäusen (Kelly et al., 2003).

2.1.5 Doppeltransgene APP-und PS1-Mäuse

Zur Herstellung der transgenen APP/PS1 Mauslinie wurde die cDNA für humanes Präsenilin1 mit der L166P Mutation und humanes APP (Isoform 751) mit der schwedischen Doppelmutation KM760/761NL in einen pTSC Vektor kloniert und unter dem neuronenspezifischen murinen Thy-1 Promotor exprimiert. Die Generierung der Mäuse erfolgte ebenfalls durch Injektion der Konstrukte in den männlichen Vorkern von Oozyten des C57BL/6J Stammes (unpubliziert). Western Blot Analysen zeigen eine ca. 2-fache Überexpression des transgenen humanen APP gegenüber dem endogenen Maus APP. Die Besonderheit an diesen heterozygoten doppeltransgenen Mäusen ist, dass sie bereits im Alter von 6 Wochen erste A β Ablagerungen im Neokortex und nach ca. 3 Monaten dann im Hippocampus zeigen. Bei Lern- und Verhaltenstests konnte man im Alter von 8 Monaten ein signifikant beeinträchtigt *reversal learning (spatial maze test)* feststellen (unpubliziert).

2.2 Genotypisierung transgener Mäuse

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, amplifiziert werden können (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Anhand der resultierenden, vervielfältigten DNA-Stränge und ihrer Länge können transgene Tiere identifiziert werden.

2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien

Dafür wurde chromosomale DNA aus Mausschwanzbiopsien mit Hilfe des E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach der Vorschrift des Herstellers präpariert. Zuerst wurde den Mäusen mit einem sterilen Skalpell ca. 0,5 bis 1 cm der

Schwanzspitze abgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um keine gegebenenfalls falsch-positiven Signale in der PCR-Reaktion zu erhalten, durfte bei der Biopsie der Schwanzspitze verschiedener Tiere keine Übertragung von Fremd-DNA in die Reaktionsgefäße erfolgen.

Unter Zugabe von 180 µl Lysispuffer und 25 µl OBTM Protease wurden die Schwanzproben 12 h bei 55°C und 550 rpm in einen Schüttel-Thermoblock (Eppendorf) inkubiert. Verbliebene feste Bestandteile wurden anschließend abzentrifugiert (10000 x g, 5 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte durch die Zugabe eines Gemisches aus 200 µl BL-Puffer und 210 µl absolutem Ethanol und einer anschließenden gründlichen Durchmischung auf dem Vortexer (Scientific Industrie). Dieses Gemisch wurde auf eine in einem 2 ml Auffangröhrchen platzierte HiBind[®]-DNA-Säule gegeben und für eine Minute bei 8000 x g und RT zentrifugiert. Die Säule mit der isolierten DNA wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt und zweimal mit je 600 µl Waschpuffer gewaschen (mit anschließender Zentrifugation, 1 min 8000 x g, RT). Danach erfolgt die Elution der DNA durch Zugabe von zweimal 200 µl Elutionspuffer (zuvor erwärmt auf 70 °C) und anschließender Zentrifugation bei 8000 x g. Die auf diese Weise isolierte chromosomale DNA aus Mausschwanzbiopsien konnte bis zur Genotypisierung mittels PCR-Methode bei 4°C gelagert werden. Alle verwendeten und aufgeführten Puffer waren Bestandteil des E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit (PeqLab, Erlangen).

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Um DNA mit Hilfe der PCR amplifizieren zu können, benötigt man Oligonucleotidprimer. Das sind kurze DNA-Fragmente, die komplementär zu definierten DNA-Bereichen sind und bestimmte, zu amplifizierende DNA-Segmente als Start- und Stoppsignal flankieren. In Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) können DNA-Polymerasen unter geeigneten Versuchsbedingungen die Primer zu Sequenzen verlängern, die zur einzelsträngig denaturierten DNA komplementär sind, so dass am Ende alle DNA-Moleküle doppelsträngig vorliegen. Der Doppelstrang wird durch Erhitzen wieder aufgespalten und nach erneuter Anlagerung der Primer kann die Polymerase, unter entsprechenden Temperaturbedingungen wiederum komplementäre Stränge bilden. Dieser temperaturgesteuerte Mechanismus wird im

Thermocycler (Eppendorf) mehrere Male wiederholt, so dass am Ende mehrere Kopien des gewünschten DNA-Stranges vorliegen.

Um die $APP^{-/-}$ - bzw. Wildtyp-Sequenz zu detektieren, wurden in zwei unterschiedlichen PCR-Reaktionen für das Knockout-Allel die Primer $APP^{-/1}$ und 2, sowie für das Wildtyp-Allel die Primer $APP^{-/2}$ und 3 eingesetzt. Zur Identifizierung des APP-Transgen-Allels wurden die Primer APP^{swe1} und 3 verwendet. Die transgenen PS1 Allele wurden mit Hilfe der Primer PS1-1 und PS1-5 identifiziert. In Tab. 1 sind die Sequenzen der verwendeten Primer dargestellt. Alle Primer wurden über die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

Primer	Sequenz
<i>APP^{-/1}</i>	5'-CGA GAT CAG CCT CTG TTC CAC A-3'
<i>APP^{-/2}</i>	5'-ATC ACC TGG TTC TAA TCA GAG GCC C-3'
<i>APP^{-/3}</i>	5'-GAG ACG AGG ACG CTC AGT CC AGG G-3'
<i>PS1-1</i>	5'-ATT TTG GTG TGG TGG GAA TG-3'
<i>PS1-5</i>	5'-TCA CCT TTG GGC TTG TTT TC-3'
<i>APP^{swe1}</i>	5'-ATG CCA TCT TTG ACC GAA AC-3'
<i>APP^{swe3}</i>	5'-CTC CAC CAC ACC ATG ATG AA-3'

Tab. 1: Primer mit den dazugehörigen Sequenzen für die jeweilige PCR

Die Primerbindungsstellen, die resultierenden PCR-Produkte und die Amplikonlängen sind schematisch in Abb. 9 gezeigt.

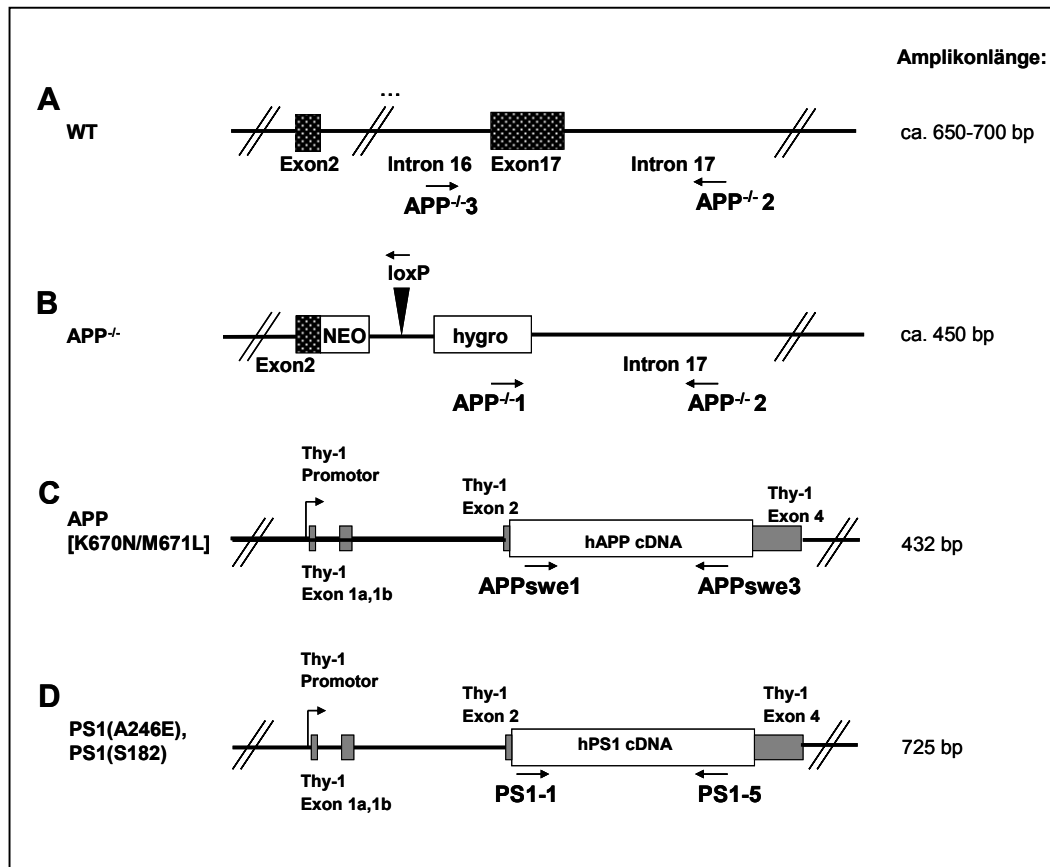


Abb. 9: Darstellung des APP-Gens und der beiden Genpromotorkonstrukte

A, Wildtyp-APP-Gen. B, Unterbrechung des APP-Allels bei der APP-Knockout-Maus durch cre/lox vermittelte Rekombination. C, Thy-1 Genpromotorkonstrukt zur Herstellung der transgenen APP(K670N/M671L) Mäuse. D, Thy-1 Genpromotorkonstrukt zur Herstellung der transgenen PS1 (A246E und S182) Mäuse. Rechts sind die resultierenden Amplikonlängen dargestellt, die durch die jeweilige Primerkombination erhalten werden.

Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen (die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Analyse einer DNA-Probe):

2,5 x Hot Master Mix (Eppendorf)	10,00 µl
Primer 1 (25 pmol/µl)	0,25 µl
Primer 2 (25 pmol/µl)	0,25 µl
H ₂ O bidest	13,50 µl
DNA (200 ng/µl)	1,00 µl

Die einzelnen Reaktionsansätze wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und in einen Thermocycler (Eppendorf) gegeben. Folgende PCR-Programme wurden verwendet:

PCR 1: WT/APP^{-/-}	PCR 2: hAPP	PCR 3: hPS1
96°C 2 min	96°C 2 min	96°C 2 min
94°C 1 min	94°C 1 min	94°C 1 min
60°C 1 min	54°C 1 min	53°C 1 min
72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 1 min
} 35x	} 35x	} 35x
72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min
4°C Lagerung	4°C Lagerung	4°C Lagerung

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden in einem 1%-igen Agarosegel, das 0,003% Ethidiumbromid enthielt durch Gelelektrophorese bei einer Spannung von 80 mV aufgetrennt. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte mittels UV-Licht (Abb. 9). Als Standard diente eine 1 kb Leiter (New England Biolabs, MA, USA).

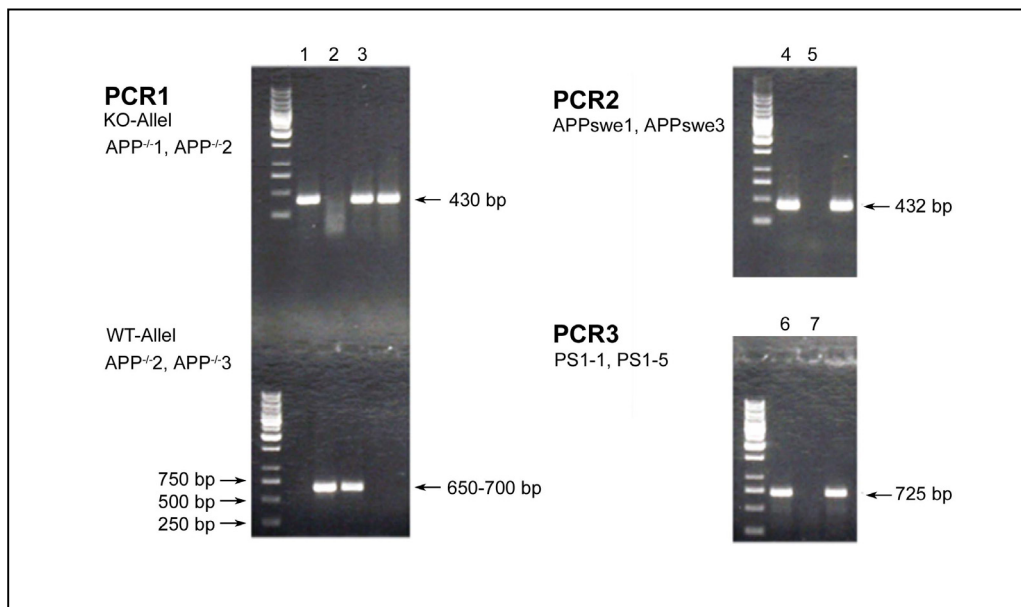


Abb. 10: Auftrennung des Amplikons durch Gelelektrophorese

Anhand des Bandenmusters lässt sich der Genotyp der einzelnen Tiere identifizieren: Spur 1: APP^{-/-}; Spur 2: WT von APP^{-/-}; Spur 3: APP^{+/-}; Spur 4: APP23 bzw. APPPS1; Spur 5: WT von APP23 bzw. APPPS1; Spur 6: PS1[A246E], PS1(S182) oder APPPS1; Spur 7: WT von PS1(A246E), PS1(S182) oder APPPS1.

2.3 Hippocampale autaptische Primärzellkulturen

Zur Analyse der synaptischen Übertragung wurden neuronale Primärzellkulturen aus den Hippocampi junger Mäuse der Linien PS1(A246E), PS1(S182), FvB, APP23 x C57BL/6J, APP^{-/-} x C57Bl6/129Ola und APPPS1 x C57BL/6J präpariert und auf sog. „Astrozyteninseln“ (siehe 2.3.1 - 2.3.2) kultiviert. Autapsen sind Synapsen zwischen dem Axon und den Dendriten des gleichen Neurons. Der Hauptvorteil autaptischer Kulturen gegenüber konventionellen Präparationen ist, dass diese monosynaptische Präparationen darstellen. Sie erlauben die Untersuchung derselben Gruppe von Synapsen unabhängig von der Stimulationsmethode und dies in Abwesenheit komplexer polysynaptischer Verknüpfungen. Autaptische Zellen lassen sich auch im intakten Gehirn nachweisen (Cobb et al., 1997). Ihre Funktion liegt möglicherweise in einer negativen Rückkopplung. So könnten z.B. inhibitorische Interneurone ohne Zwischenschaltung weiterer Neurone hemmend auf sich selbst wirken (Bacci et al., 2003; Bekkers, 2003).

Runde Glasplättchen (*coverslips* Ø 18mm) dienen zur Anzucht der Astrozyten in 12 *well*-Platten. Die Deckgläschen wurden zunächst 1 h in Aceton entfettet und anschließend für 12 h in 1N HCl auf einem Laborschüttler geschüttelt. Am nächsten Tag wurde mit destilliertem Wasser und 70% EtOH gespült und die *coverslips* anschließend in 96% EtOH gelagert.

Für die Vorbereitung der 12 *well*-Platten wurden die *coverslips* einzeln abgeflammt, in die Vertiefungen gelegt und mit einer 0,15%-igen Agarose-Lösung beschichtet. Um den Astrozyten einen optimalen Haftuntergrund sowie die Möglichkeit der „Inselbildung“ zu bieten, wurde ein Gemisch aus Poly-D-Lysin, Collagen und Essigsäure mit Hilfe eines speziell angefertigten Stempels in Form vieler kleiner Punkte (*dots*) auf die *Coverslips* aufgebracht. Derartig vorbehandelte 12 *well*-Platten ließen sich bei 4°C über mehrere Wochen lagern.

2.3.1 Herstellung einer adhärennten Astrozytenschicht

Bevor die Astrozyten auf die runden Glasplättchen ausgesät werden konnten, mussten diese zuerst präpariert und in Gewebekulturflaschen (Nunc-GmbH, Wiesbaden) kultiviert werden. Dafür wurden pro Gewebekulturflasche (80 cm²) zwei Hirne von neugeborenen Wildtyp-Mäusen verwendet. Die Tiere wurden dekapitiert und die beiden Hemisphären in warmer HBSS (*Hank's balanced salt solution*) herauspräpariert und vom Hirnstamm und den Meningen befreit. Alle nun folgenden Schritte erfolgten – soweit möglich – unter sterilen Bedingungen. Die Hemisphären wurden in mit Trypsin versetzter HBSS (37°C, 4,5 ml HBSS + 0,5 ml Trypsin) 5 min mit einer Pipette trituriert. Die Enzymreaktion wurde mittels Zugabe von DMEM (5% FBS) (37°C) gestoppt. Die so entstandene Zellsuspension wurde zentrifugiert (3 min, 1000 rpm, RT), der Überstand abgenommen und das Pellet in DMEM (5% FBS) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Gewebekulturflaschen bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach ca. 10 Tagen hatten die Astrozyten einen adhärennten Rasen gebildet.

Anschließend wurden die Astrozyten über Nacht in einem Schüttler bei 37°C geschüttelt um anhaftende Neurone sowie Zelldebris zu entfernen. Das Übertragen der Astrozyten von den Kulturflaschen auf die vorbehandelten *coverslips* erfolgte durch eine maximal 5-minütige Trypsinierung in den Gewebekulturflaschen bei 37°C. Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von DMEM (5% FBS) konnte die Zellsuspension aufgenommen und zentrifugiert werden (3 min, 1000 rpm, RT). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in DMEM (5% FBS) gelöst und die Zellzahl bestimmt. Dann wurden die Zellen in einer Konzentration von 7500 Zellen/ml in 12 *well*-Platten pipettiert. Sobald sich auf den aufgestempelten Punkten der *coverslips* runde „Astrozyteninseln“ (nach ca. 5-7 Tagen) ausgebildet hatten, wurde das Wachstum der Astrozyten durch Zugabe von 10 µl einer Lösung, bestehend aus 8,1 mM FUDR (5-Fluoro-2'-deoxyuridin) und 20,4 mM Uridin in DMEM, gestoppt. Einen Tag später war es dann möglich, Hippocampusneurone auf diese „Inseln“ auszusäen.

2.3.2 Herstellung autaptischer, neuronaler Primärzellkulturen

Die Herstellung hippocampaler, autaptischer Kulturen erfolgte nach einem Protokoll von Bekkers und Stevens bzw. Rosenmund und Stevens aus den Hirnen neugeborener Mäuse

(Bekkers and Stevens, 1991; Rosenmund and Stevens, 1996). Die Tiere wurden dekapitiert und die Hippocampi in eisgekühlter HBSS herauspräpariert. Dabei war es wichtig, die Meningen zu entfernen, da diese die weitere Dissoziation der Neuronen behinderten. Alle anschließenden Schritte erfolgten unter der Sterilbank. Die Hippocampi wurden in sterilfiltrierter, temperierter DMEM-Enzym-Lösung für eine Stunde im Wasserbad inkubiert. Ein Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch Absaugen der Enzym-Lösung und Zugabe einer Enzym-Inhibitor-Lösung für 5 min im Wasserbad. Diese wurde dann wieder abgesaugt, die Hippocampi in DMEM (5% FBS) trituriert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Neuronen in einer Konzentration von 5000 Zellen/ml in NBA Medium verdünnt und in die 12 *well*-Kulturschalen mit den fertigen „Astrozyteninseln“ ausgesät. Nach 18-20 Tagen in Kultur konnten mit den Neuronen Experimente durchgeführt werden. Idealerweise wuchs auf jeder Insel nur 1 Neuron, das mit seinem Axon und seinen Dendriten eigene Synapsen, sog. Autapsen, ausbildete.

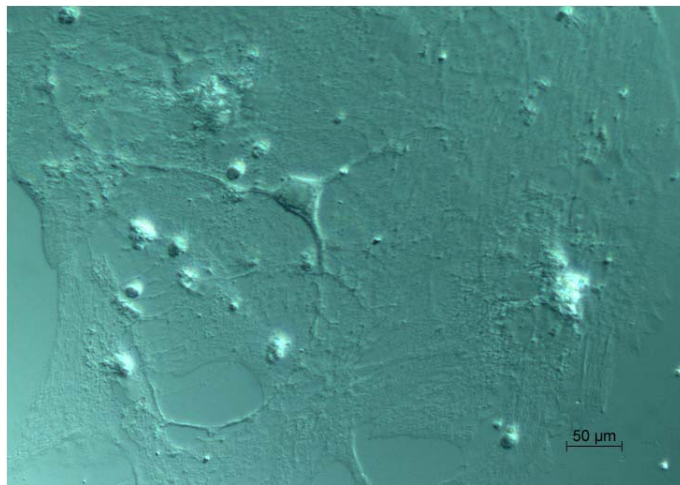


Abb. 11: Autaptisches Neuron auf einer Astrozyteninsel

2.3.3 Herstellung von A β ₄₂-Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen

Für die Untersuchung der Akutwirkung von A β wurden A β ₄₂-Oligomere und A β ₄₂-Fibrillen nach einem Protokoll von Stine, Jr. et al. hergestellt (Stine, Jr. et al., 2003). Zuerst wurde das lyophilisierte A β ₄₂-Peptid (Bachem, Bubendorf, Schweiz) mit 100% 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma, Taufkirchen) zu 1 mM verdünnt und aliquotiert. Dann wartete man bis das flüchtige HFIP unter dem Abzug verdampft war und zentrifugierte anschließend 30 min bei RT in einer Speedvac® (Eppendorf), um die letzten Lösungsmittelrückstände zu entfernen. Das reine, klare Peptid wurde dann bei -80°C gelagert. Um A β ₄₂-Oligomere zu erhalten, wurde ein A β ₄₂-Peptid-Aliquot zu 5 mM in DMSO und anschließend zu 100 μ M in Extrazellulärlösung (EZL, siehe 2.6.4) verdünnt und 24 h bei 4 °C inkubiert. Die A β ₄₂-Fibrillen wurden ebenso zunächst zu 5 mM in DMSO und dann zu 100 μ M in 10 mM HCl verdünnt und 24 h bei 37 °C inkubiert.

Die A β ₄₂-Monomere wurden, ohne anschließende Inkubation, kurz vor der Messung zuerst in DMSO (5 mM) and dann in EZL (100 μ M) verdünnt und unmittelbar danach appliziert.

2.3.4 Lösungen

DMEM (5% FBS)		NBA-Medium	
DMEM (4,5 g/l Glukose)	459 ml	NBA	480 ml
FBS inaktiviert	25 ml	B27 Supplement	10 ml
Glutamax 100x	5 ml	Glutamax 100x	5 ml
MITO in 10 ml Aqua dest.	1 ml	Penicillin/ Streptomycin 10000 I.E.	5 ml
Penicillin/ Streptomycin 10000 I.E.	5 ml		
N2- Supplement 100x	5 ml		

DMEM-Enzymlösung		Enzym-Inhibitor-Lösung	
Cystein	1 mg	Albumin	12,5 mg
CaCl ₂ (100 mM)	0,05 ml	Trypsin-Inhibitor	12,5 mg
EDTA (50 mM)	0,05 ml	DMEM (5% FBS)	5 ml
Papain 300 U/ml	0,165 ml		
DMEM (4,5 g/l Glukose)	5 ml		

HBSS		FUDR-Lösung	
HBSS	500 ml	5-Fluoro-2'-deoxyuridin	25 mg
Gentamicin (50 mg/ml)	0,5 ml	Uridin	62,5 mg
Fungizone (250 µg/ml)	0,5 ml	DMEM (4,5 g/l Glukose)	12,5 ml
Penicillin/ Streptomycin 10000 I.E.	5 ml		

2.4 Immunfärbungen

Um die Synapsendichte im Hippocampus zu untersuchen, wurden sowohl Färbungen an autaptischen Kulturen als auch an 50 µm dicken coronalen Hirnschnitten durchgeführt. Die Hirnschnitte wurden in der jeweiligen Wasch- bzw. Färbelösung schwimmend angefärbt und werden daher im Folgenden als *floating sections* bezeichnet.

2.4.1 Doppelimmunfluoreszenz bei autaptischen Kulturen

Für die zytologischen Untersuchungen wurden Glasplättchen mit autaptischen Kulturen (18-20 *days in vitro*, DIV) durch Einlegen in 4% (m/v) Paraformaldehyd (PFA) in Phosphat-Puffer (PBS) für 20 min bei 4 °C fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen 30 min mit einer Blockierlösung abgesättigt. Die Glasplättchen wurden 1 h bei RT mit anti-Mikrotubuli-assoziiertem Protein 2 (MAP-2, 1:100, Chemicon, Hampshire UK) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschritt und die Inkubation mit FITC (Fluorescein)-konjugiertem *goat anti rabbit* Antikörper (1:100, Sigma, Taufkirchen) 1 h bei RT. Anschließend wurde wieder gewaschen und eine weitere Stunde mit Blockierlösung inkubiert. Danach wurde der fluoreszenzmarkierte monoklonale Synaptophysin Antikörper zugegeben (1: 1000, Synaptic Systems, Göttingen) und ebenfalls 1 h bei RT stengelassen. Nach dem Waschen wurden die Glasplättchen mit Wasser gespült und mit einem Einbettmedium für Fluoreszenzfärbungen (Fluorescent Mounting Medium, Dako, Hamburg) auf einem Objektträger fixiert.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte an einem Axiovert 200M Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem 40er Objektiv (40x/0,6 Korr LD Plan-Neofluar, Zeiss) und mit Hilfe der Axiovision 4.5 Software (Zeiss). Die Dendritenlänge sowie die Anzahl an Synapsen wurde mit der analySIS Software (Soft Imaging System, Münster) bestimmt.

2.4.2 Immunfluoreszenz an *floating sections*

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die Hirne von Mäusen herauspräpariert und in 4% PFA über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden mit Hilfe eines Vibratoms (VT 1000S, Leica, Wetzlar) 50 µm dicke, coronale Schnitte angefertigt. Diese wurden nach einem Blockierungsschritt mit Antibody Diluent (Ventana Medical Systems inc., Illkirch, France) über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen anti-Synaptophysin Antikörper (1:300,

Chemicon, Hampshire, UK) gefärbt. Nach dem Waschen erfolgte eine weitere Inkubation mit biotinyliertem *swine-anti-rabbit* IgG (1:150, Dako, Hamburg) und die abschließende Fluoreszenzmarkierung mit Indocarbocyanin (Cy3) gekoppeltem Streptavidin (1:25, Dianova, Hamburg). Die Schnitte wurden gewaschen, entwässert (2 min EtOH 70%, 2 min EtOH 100%, 1 min Xylol) und mit Einbettmedium (Coverquick, Labonord, Frankreich) auf einem Objektträger fixiert.

Die Aufnahme von Bildern der Schnitte erfolgte mit einem 40er Objektiv (40x/0,8 IR, LD Achroplan, Zeiss) an einem konfokalen Mikroskop der Firma Zeiss (Axioskop 2FS mit LSM510) und der dazugehörigen Software (LSM510 Version 3.2). Der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Absorptionsmaximum: 550 nm, Emissionsmaximum: 570 nm) wurde mit einem HeNe-Laser bei 543 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz mit einem Longpass Filter LP560 detektiert. Es wurden z-Stapel aus bestimmten Hippocampusregionen (*stratum radiatum* und *stratum moleculare*) mit einer Rahmengröße von 230 µm x 230 µm (1024 x 1024 Pixel, 0,22 µm/Pixel) aufgenommen. Die z-Distanz eines jeden z-Stapels betrug 10-15 µm und ergab 20 bis 30 Bilder im Abstand von jeweils 0,5 µm. Alle z-Stapel wurden unter denselben Bedingungen aufgenommen und anschließend mit Hilfe der Funktion *Maximum intensity projection* projiziert. Die Messung der Signalintensität, zur Beurteilung von Synaptophysin-positiven Strukturen, wurde mit Hilfe eines selbstgeschriebenen Programms von B. Krebs durchgeführt (PictureAnalyzer, B. Krebs, ZNP, München). Dabei wurde ein immer gleich bleibender Schwellenwert gesetzt, so dass alle Objekte unterhalb dieses Wertes als Hintergrund und nur Objekte mit Werten oberhalb des Schwellenwertes als Synaptophysin-positiv erkannt wurden.

2.4.3 Lösungen

Paraformaldehydlösung 4%		Blockierlösung	
PFA	4 g	Bovine serum albumin (BSA)	2%
H ₂ O	50 ml	Normal goat serum (NGS)	10%
NaOH	3 Tr	Triton X-100	0,3%
rühren und auf 55°C erhitzen, bis die Lösung klar ist		PBS 1x	ad 10 ml
PBS 2x	ad 100 ml		

2.5 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

Nach der Herstellung von A β ₄₂-Oligomeren musste deren Oligomerisierung über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) und anschließendem Western Blot überprüft werden. Nur so konnte sichergestellt werden, dass bei den Akutexperimenten (3.3) auch tatsächlich A β ₄₂-Oligomere appliziert wurden.

Die Bestimmung des Synaptophysingehalts in Paraffinschnitten (3.1.7) erfolgte ebenfalls mittels Western Blot.

2.5.1 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt der Oligomerpräparationen wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt. Dazu wurde zunächst eine BSA-Verdünnungsreihe von 0,125 – 2 mg/ml im entsprechenden Probenpuffer hergestellt. 1 ml Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad, München; 1:5 in H₂O verdünnt) wurde in eine Küvette gegeben und jeweils 1 μ l der Verdünnungen zugefügt. Nach 2 min bei RT wurde die Absorption mit einem Photometer (Ultrospec 3000, Amersham, Freiburg) bei 595 nm bestimmt. Die Proteinproben wurden analog vermessen und anhand der Verdünnungsreihe quantifiziert.

2.5.2 Vorbehandlung der Proben

Der Nachweis von Proteinen aus Hirnschnitten erfolgte nach einer kürzlich von Krebs et al. publizierten Methode (Krebs et al., 2006). Dafür wurden Paraffinschnitte (coronal, 4 μ m) zunächst entparaffiniert (2 x 10 min in Xylol, 2 x 5 min in EtOH 100%, 2 x 2 min in EtOH

70%) und mit Kresylviolett angefärbt. Anschließend wurde das Gewebe um den zu untersuchenden Bereich (Hippocampus) mit einem Skalpell entfernt und der Hippocampus in Probenpuffer (2.6.5) aufgenommen. Nach vollständiger Lyse der Probe wurde diese 10 min bei 95°C und anschließend 60 min bei 55°C auf dem Heizblock (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer, Wien, Österreich) inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen.

Die Oligomerproben wurden nach der Proteinbestimmung ohne vorheriges Aufkochen in Probenpuffer (*NuPage sample buffer*, Invitrogen) verdünnt und auf das Gel aufgetragen.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) (Weber and Osborn, 1969). Dieses anionische Detergens überdeckt die Eigenladung von Proteinen. Es wird bei der Probenvorbereitung im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben und die Probe anschließend auf 95°C erhitzt um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Zusätzlich können durch den Einsatz von reduzierenden Thiolverbindungen (β -Mercaptoethanol, Dithiothreitol (DTT)) Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten werden (Richter, 2003). Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit einer Molmasse von 3-200 kDa wurde ein 12%-iges BisTris Gel (NuPage, Invitrogen) verwendet. Nach dem Befüllen der Geltaschen wurde die Elektrophorese in MES bzw. MOPS/SDS Laufpuffer gestartet. Die Anfangsspannung betrug 80 V für ca. 10 min bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Die weitere Elektrophorese konnte mit 150 V fortgesetzt werden bis die Bromphenolblau-Front das untere Ende des Gels erreichte. Als Molmassenstandard wurde eine vorgefärbte Proteinmischung von Invitrogen (SeeBlue®) verwendet.

2.5.4 Western Blot

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore, Schwalbach) übertragen. Zuvor wurde diese 30 s in MeOH eingeweicht und mit Wasser abgespült. Der Transfer des Gels erfolgte für 1,5 h in einem Elektroblocher (peqlab, Erlangen) bei 80 mA, nachdem dessen Platten zuvor mit Wasser angefeuchtet wurden. Um den Transfer zu ermöglichen, musste die PVDF-Membran nach oben und unten durch jeweils zwei, mit Transferpuffer befeuchtete

Filterpapiere isoliert werden. Die freien Bindungsstellen, der aus dem Elektroblocher entnommenen Membran, wurden für 30 min bei RT mit Absättigungspuffer inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Inkubation der Membran mit dem in Absättigungspuffer verdünnten Primärantikörper [1:5000 anti-Synaptophysin, polyklonal, Chemicon; 1:3000 anti- β -Aktin, polyklonal Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, bzw. 1:3000 anti-A β ₁₋₁₇ (6E10) monoklonal, Sigma, Taufkirchen] für 12 h bei 4°C auf dem Schüttelinkubator (Elmi Ltd. Riga, Lettland).

Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran mehrmals mit Absättigungspuffer gewaschen. Der Nachweis spezifisch gebundener Antikörper erfolgte entweder durch Inkubation mit einem polyklonalen *goat anti-rabbit* oder einem *goat anti-mouse* IgG Sekundärantikörper, gebunden an alkalische Phosphatase (1:2000 in Absättigungspuffer; 45 min, RT; Dako, Hamburg). Durch anschließende Inkubation in alkalischem Puffer sowie Nitro-blau-tetrazolium-chlorid (NBT, Roche, Mannheim) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP, Roche, Mannheim) kam es zu einer Farbreaktion, die in der Ausbildung eines violett-blauen Farbstoffkomplexes sichtbar wurde. Alternativ erfolgte die Detektion mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 *Amersham ECL mouse* in Absättigungspuffer, Amersham, Freiburg) und nachfolgender Darstellung der Banden mit ECL Reagens (Amersham, Freiburg). Die Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, wodurch Lumineszenz entsteht. Diese kann auf einem speziellen Film detektiert werden (Hyperfilm, Amersham).

2.5.5 Lösungen

Probenpuffer	
Tris-HCl (Merck)	1,0244 g
Glycerin	10%
SDS	2%
DTT	5%
H ₂ O	ad 100 ml
pH 6,8	

20x MES/SDS Laufpuffer		20xMOPS/SDS Laufpuffer	
MES	195,2 g	MOPS	209,2 g
Tris Base	121,2 g	Tris Base	121,2 g
SDS	20,0 g	SDS	20,0 g
EDTA freie Säure	6,0 g	EDTA freie Säure	6,0 g
H ₂ O	ad 1000 ml	H ₂ O	ad 1000 ml

Transferpuffer		0,01 M PB-Puffer	
TRIS Base	3,03 g	NaCl	8,18 g
Glycin	14,4 g	KCl	0,22 g
SDS	10%	H ₂ O	ad 1000 ml
Methanol	10%	pH 7,4	
H ₂ O	ad 1000 ml		

Absättigungspuffer		Alkalischer Puffer	
I-Block Pulver (Tropix)	2 g	Tris Base	36,36 g
Tween 20	0,1%	NaCl	5,84 g
0,01 M PB-Puffer	ad 1000 ml	MgCl ₂	1,02 g
		H ₂ O	ad 1000 ml

NBT-Stock		BCIP-Stock	
NBT	50 mg	BCIP	50 mg
DMF 70%	1 ml	DMF 70%	1 ml

2.6 Elektrophysiologie

Die von Neher und Sackmann 1976 entwickelte *Patch-clamp*-Technik ermöglicht es, sowohl transmembrane Ströme der gesamten Zellmembran von Neuronen als auch den Strom durch einzelne Ionenkanäle zu messen und ebenfalls das Membranpotential der *gepatchten* Zelle zu modulieren. Die *Patch-clamp*-Technik stellt ein spezielles Spannungs-Klemm-Verfahren (*Voltage-clamp*) dar, deren Hauptaufgabe es ist, Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern. Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential gemessen und mit der Sollspannung verglichen wird. Kommt es zu einer Abweichung zwischen Soll- und gemessener Spannung wird ein Regler aktiviert, der einen entgegengerichteten Strom in die Zelle injiziert. Dieser Kompensationsstrom repräsentiert den Ionenstrom durch eine Membran. Er ist genauso groß wie dieser und kann mittels des *Patch-clamp*-Aufbaus gemessen werden. Bei der *Patch-clamp*-Technik wird eine spitzgezogene Glaskapillare (Spitzendurchmesser: 1-2 μm) unter visueller Kontrolle in sehr engen Kontakt mit der Zellmembran gebracht (*Cell-attached*-Konfiguration). Die Glaspipette ist gefüllt mit einer artifiziellen Intrazellulärflüssigkeit und bildet zusammen mit einer chlorierten Silberelektrode die *Patch*-Elektrode. Die stabile Membran-Glas-Verbindung mit Widerständen im Gigaohm-Bereich (*Gigaohm-Seal*) bewirkt durch die elektrische Abschirmung des Membranflecks (*patch*) von seiner Umgebung ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Die Stabilität der Verbindung zwischen Elektrode und der Membran erlaubt es, mechanische Manipulationen der Membran durchzuführen, ohne den hochohmigen Abdichtwiderstand zu zerstören. So wird bei der *Whole-cell*-Konfiguration (*Ganzzell-Anordnung*), die bei allen Experimenten angewandt wurde, das Membranstück unterhalb der Pipettenöffnung durch ruckartiges Ansaugen herausgerissen und man erhält einen niederohmigen Zugang zum Zellsoma (Abb. 12). Während dieser Konfiguration tauscht sich das Zytoplasma durch Diffusion schnell mit der Pipettenlösung aus und es ergibt sich ein definiertes Ionenverhältnis im Innern der Zelle, das durch die Art der Intrazellulärlösung bestimmt wird. Man kann solche Ergebnisse von Ganzzellmessungen als Mittelung vieler simultan aktiver Ionenkanäle auffassen. Messbar ist das makroskopische Strommuster einer Zelle, ohne dass man den Beitrag einzelner Ionenkanäle aufschlüsseln kann. Im Optimalfall bleibt der seitliche Leckwiderstand, erhalten und somit der Leckstrom gering, so dass der Ionenstrom durch die gesamte verbleibende

Zellmembran messbar wird. Vom Operationsverstärker (im Vorverstärker integriert) werden Spannungsänderungen des Membranpotentials registriert und durch Initiierung eines Kompensationsstromes über die *Patch*-Pipette ausgeglichen. Im günstigsten Fall stellt dieser Kompensationsstrom das Äquivalent des transmembranen Ionenstromes dar.

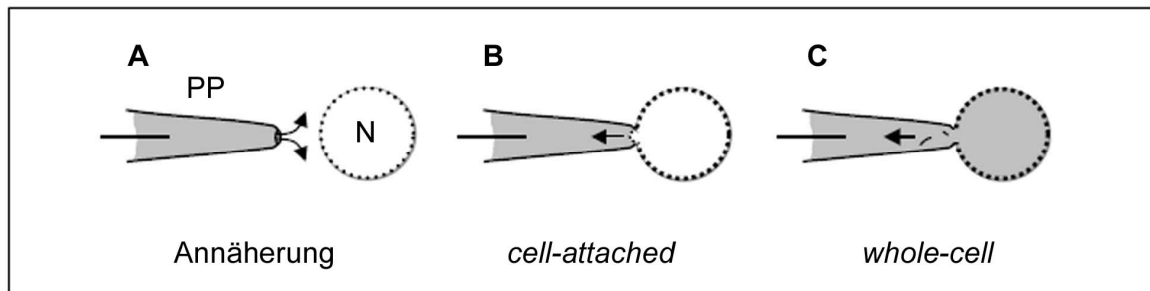


Abb. 12: Generierung der Whole-cell-Konfiguration

Das Annähern der Pipette an die Zelle (A) muss unter angelegtem Überdruck geschehen, um ein Verschmutzen der Öffnung zu vermeiden. Nachdem der Giga-Seal unter leichtem Unterdruck etabliert wurde (B), wird die Zellmembran unter Beibehaltung des Giga-Seals durch kurzes kräftiges Saugen durchbrochen und das Zytoplasma tauscht sich mit der IZL aus (C). PP: *Patch*-Pipette, N: Neuron.

2.6.1 Patch-clamp-Elektroden

Die Elektroden wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (Innendurchmesser 0,9 mm, Außendurchmesser 1,5-1,8 mm, KIMAX-51°, Kimble Products) mittels eines Vertikalpullers (PA-10, E.S.F., Göttingen) in zwei Zugschritten gefertigt. Für die Ganzzelleableitungen von autaptischen Hippocampusneuronen wurden Pipetten mit einem Widerstand von 3-4 M Ω verwendet.

2.6.2 Aufbau des Messplatzes

Die optische Einheit bestand aus einem inversen Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen), ausgestattet mit einem 20er Objektiv (20x/0,4 Korr, LD Achromat, Zeiss). Zur Überwachung der Messung wurde das mikroskopische Bild mittels einer Digitalkamera (CF 15/4, KAPPA, Gleichen) auf einem Monitor abgebildet. Das zu untersuchende Präparat wurde in die mit Extrazellulärlösung durchspülte Badkammer platziert (Durchflussrate 1,5 - 2 ml/min), die über dem Objektiv durch zwei Mikromanipulatoreinheiten in horizontaler Ebene justiert werden konnte. Die *Patch-clamp*-Einheit bestand aus einem motorgesteuerten Mikromanipulator (LN SM1, Luigs & Neumann, Ratingen), der über eine Aufnahme für den

Vorverstärker verfügte, und der eigentlichen *Patch-clamp*-Apparatur. Der Vorverstärker besaß eine Aufnahme für den Pipettenhalter, in den die *Patch*-Pipetten eingesetzt wurden, und verfügte über einen Erdungseingang für die Badelektrode. Der Operationsverstärker, der den Kompensationsstrom reguliert, ist Teil des Vorverstärkers. Ausgehend vom Vorverstärker wurde das analoge Stromsignal zum *Patch-clamp*-Verstärker (EPC 9, HEKA, Lambrecht) geleitet. Der EPC 9 wurde über ein leistungsfähiges Computersystem (Macintosh, G4) angesteuert. Mittels der speziell für *Patch-clamp*-Messungen entwickelten Software (Pulse 8.50, HEKA) konnte das analog aufgenommene Signal durch den AD-Wandler des EPC 9 digitalisiert dargestellt werden.

Der Messplatz war mit einem zweiten Mikromanipulator ausgestattet (Patchman, Eppendorf), der über eine Aufnahmevorrichtung für Quarzglas kapillaren (Innendurchmesser 430 μm , Polymicro Tech, USA) verfügte. Diese Kapillaren waren über Schläuche mit einem ventilgesteuerten System zum schnellen Austausch von Lösungen (Warner Instruments, USA) verbunden. Dabei konnte jedes Ventil manuell oder extern über einen Stimulationsgenerator (Tib 14, HEKA) angesteuert werden. Der gesamte Messbereich (Mikroskop, Vorverstärker, Mikromanipulator) stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC), um Vibrationen zu vermeiden, die ein Verrutschen der Messpipette oder des zu untersuchenden Präparats zur Folge hätten. Zudem sorgte ein Faraday'scher Käfig für die nötige elektromagnetische Abschirmung, um übermäßiges elektrisches Rauschen während der Messungen zu verhindern.

2.6.3 Elektrische Eigenschaften der Whole-cell-Konfiguration

Die Zellmembran lässt sich elektrisch durch ihren Widerstand (R_m) und eine dazu parallel angeordnete Kapazität (C_m) darstellen (Abb. 13). Im *Whole-cell*-Modus, bei dem die Pipette mit dem Zellsoma leitend verbunden ist, liegt zwischen Silberdraht und Soma ein Widerstand, der Serienwiderstand R_s an. Im Idealfall entspricht dieser dem Pipettenwiderstand. Da sich jedoch nach dem Durchbrechen der Membran Fragmente derselben im Mündungsbereich der Pipette befinden, erhöht sich der Serienwiderstand erheblich. Eine Erhöhung des Serienwiderstandes führt dazu, dass sich die Umladung des Kondensators (C_m) und der Kompensationsmechanismus zur Regulation der Spannung verlangsamen und somit Leitfähigkeitsveränderungen zeitverzögert und verzerrt wiedergegeben werden. Dadurch kann

es passieren, dass das Potential der Zelle für eine gewisse Zeit vom Sollwert abweicht, was zu unerwünschten Depolarisationen der Zellmembran führt. Der *Patch-clamp*-Verstärker verfügt über Schaltkreise, die diese Erhöhung des Serienwiderstandes kompensieren. Während der Messungen kann ein erneutes Verschließen der Membran unter der *Patch*-Pipette (*resealing*) ebenfalls zu einer Erhöhung des Serienwiderstandes führen. Aufgrund dieser Tatsache musste während der laufenden Messung ständig der Serienwiderstand überprüft werden, um im Falle eines *resealing* die *Whole-cell*-Konfiguration wieder herzustellen oder gegebenenfalls die Messung abzubrechen (Numberger and Draguhn, 1996).

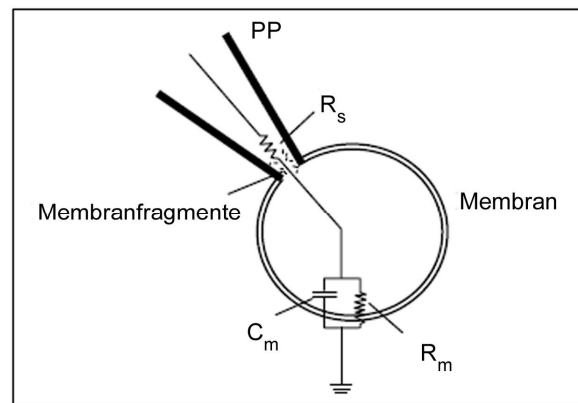


Abb. 13: Ersatzschaltbild der Whole-cell-Konfiguration

Nach dem Durchbrechen der Zellmembran erhöht sich der Serienwiderstand durch Membranfragmente. PP: *Patch*-Pipette, R_s : Serienwiderstand, C_m : Membrankapazität, R_m : Membranwiderstand (aus Numberger and Draguhn, 1996).

2.6.4 Lösungen

EZL für non-NMDA-Ströme	Konzentration (mM)
NaCl	140
HEPES	10
Glucose	10
CaCl ₂	1 bzw. 4
MgCl ₂	4
KCl	2,4
Bicuculline	0,015
	pH 7,3 (NaOH), 300 mOsm

EZL für NMDA-Ströme	Konzentration (mM)
NaCl	140
HEPES	10
Glucose	10
CaCl ₂	4
KCl	2,4
CNQX	0,005
Glycin	0,02
Bicuculline	0,015
	pH 7,3 (NaOH), 300 mOsm

IZL für (non)-NMDA-Ströme	Konzentration (mM)
NaCl	10
K ⁺ -Glukonat	125
MgCl ₂	4,6
EGTA	1
Kreatinphosphat	15
Phosphokreatinkinase	20 U/ml
Na ₂ -ATP	4
	pH 7,3 (NaOH), 300 mOsm

2.6.5 Messung synaptischer Ströme an Hippocampusneuronen

Alle Messungen wurden bei exzitatorischen Neuronen durchgeführt, inhibitorische Zellen wurden durch den Zusatz von Bicuculline (GABA_A-Antagonist, 15 µM) blockiert. Die Glasplättchen mit den Neuronen wurden in kleinere Stücke zerteilt und in die mit Extrazellulärlösung (RT) gefüllte Badkammer gelegt. Synaptische Ströme wurden nur an Neuronen gemessen, die alleine auf einer Astrozyteninsel lagen und nur mit sich selbst Synapsen (= Autapsen) ausbildeten (siehe Abb. 11).

Nach Herstellung des Giga-Seals befand sich die Zelle im *Cell-attached*-Modus. Nach dem Ausgleichen kapazitiver Ladeströme (*c-fast*-Kompensation) und Einstellen des Membranpotentials auf -70 mV wurde die *Whole-cell* Konfiguration herbeigeführt. War die

Membran unter der *Patch*-Pipette durch ruckartiges Ansaugen durchbrochen, so wurde die Erhöhung des Serienwiderstandes durch die Serienwiderstandskompensation und die kapazitiven Ladeströme durch die *c-slow*-Kompensation des *Patch-clamp*-Verstärkers ausgeglichen. Anschließend wurde kurz in die Stromklemmanordnung (*Current-clamp*-Modus) des *Patch-clamp*-Verstärkers umgeschaltet und durch Justierung des Stromes auf 0 mV das Ruhemembranpotential bestimmt. Es wurden nur Zellen verwendet, deren Ruhemembranpotential < -50 mV war.

2.6.5.1 Messung der Spontanaktivität

Die Spontanaktivität wurde unter Zusatz von Tetrodotoxin (TTX, 200 nM) für 60 s bei -70 mV aufgezeichnet. Der Zusatz von TTX dient der Blockade spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle, so dass keine Aktionspotentiale, die die Messung stören würden, ausgelöst werden können.

Anschließend wurden die Daten gefiltert und ein *Template* (Vorlage) eines idealen mEPSCs erstellt. Die Spontanaktivität wurde daraufhin mit dem *Template*-Detektions-Programm von Axograph 4.5 (Molecular Devices, USA) ausgewertet.

2.6.5.2 Messung AP-induzierter Ströme

Die Induktion eines APs erfolgte durch kurzzeitige Depolarisation (1 ms) der Zellmembran ausgehend vom Ruhemembranpotential von -70 mV auf 0 mV. Dadurch kommt es zur Vesikelausschüttung zwischen Prä- und Postsynapse des autaptischen Neurons. Die Transmitterbindung an die non-NMDA- bzw. NMDA-Rezeptoren der Postsynapse führt zu einem Na^+ -Ioneneinstrom. Dieser wird definitionsgemäß negativ dargestellt und ist mittels der *Whole-cell* Ableitung als EPSC messbar (Abb. 14)

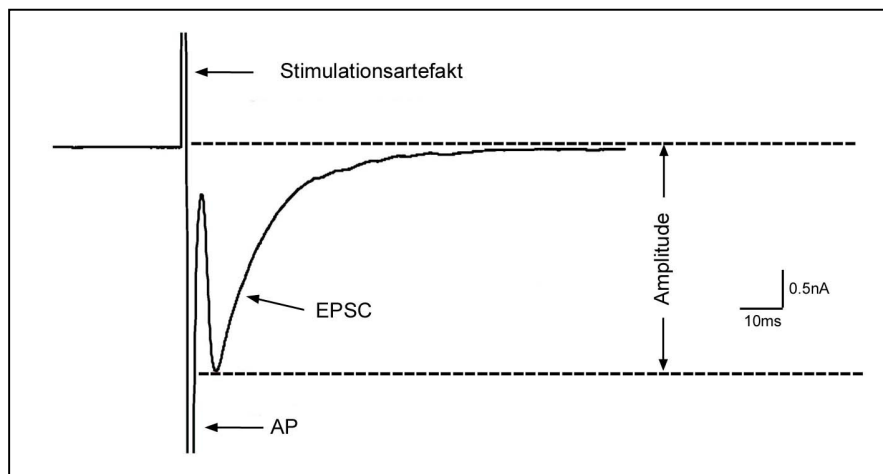


Abb. 14: Darstellung des gemessenen Stroms während einer einzelnen Stimulation

Das AP ist durch einen schnellen Einstrom positiver Ladung in die Zelle gekennzeichnet. Noch während dessen Rückbildung führt das darauf folgende EPSC durch die Öffnung postsynaptischer Kationenkanäle ebenfalls zu einem negativen Ausschlag. Dieser Ionenstrom ist langsamer und die maximale Stromstärke ist geringer.

2.6.5.2.1 Amplitude bei non-NMDA-Strömen

Ausgehend vom Ruhemembranpotential (-70 mV) wurde 5 x auf 0 mV mit einer Frequenz von 1 Hz depolarisiert und die Amplitude der resultierenden EPSCs aufgezeichnet.

2.6.5.2.2 Amplitude bei NMDA-Strömen

NMDA-Ströme wurden unter Zusatz von 5 μM CNQX, 20 μM Glycin, 15 μM Bicuculline sowie in Abwesenheit von externem Mg^{2+} durch 5 depolarisierende (0 mV) Pulse bei einer Frequenz von 0,1 Hz gemessen.

2.6.5.2.3 Doppelpulsstimulation

Zur Untersuchung der Kurzzeitplastizität wurden die Zellen durch gepaarte Pulse (*paired-pulse*) in Intervallen von 25-500 ms stimuliert.

Abhängig von der $[\text{Ca}^{2+}]_e$ kann man hierbei entweder eine *Paired-pulse facilitation* ($[\text{Ca}^{2+}]_e$ niedrig) oder eine *Paired pulse depression* ($[\text{Ca}^{2+}]_e$ hoch) beobachten. Aus diesem Grund wurden alle Versuche zur Doppelpulsstimulation sowohl bei niedriger (1 mM) als auch bei hoher (4 mM) extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durchgeführt. Die Amplitude der EPSCs wurde mit dem Programm Pulse 8.6 (HEKA) gemessen und als Verhältnis des zweiten zum ersten Stimulus gegen die Intervalllänge aufgetragen.

2.6.5.2.4 Hochfrequente und repetitive Stimulation

Die hochfrequente und die repetitive Stimulation stellten weitere Parameter zur Untersuchung der Kurzzeitplastizität einer Synapse dar. Dazu wurden die Zellen mit 5 Pulsen mit einer Frequenz von 50 Hz (Hochfrequenzstimulation, HFS), oder mit 30 Einzelpulsen mit einer Frequenz von 10 Hz (Prolongierte repetitive Stimulation, PRS) stimuliert und die resultierenden EPSCs aufgenommen. Bei der Auswertung wurden die Amplituden der Einzelsignale ins Verhältnis zur Amplitude des ersten EPSCs gesetzt.

2.6.5.3 Messung osmotisch induzierter Ströme

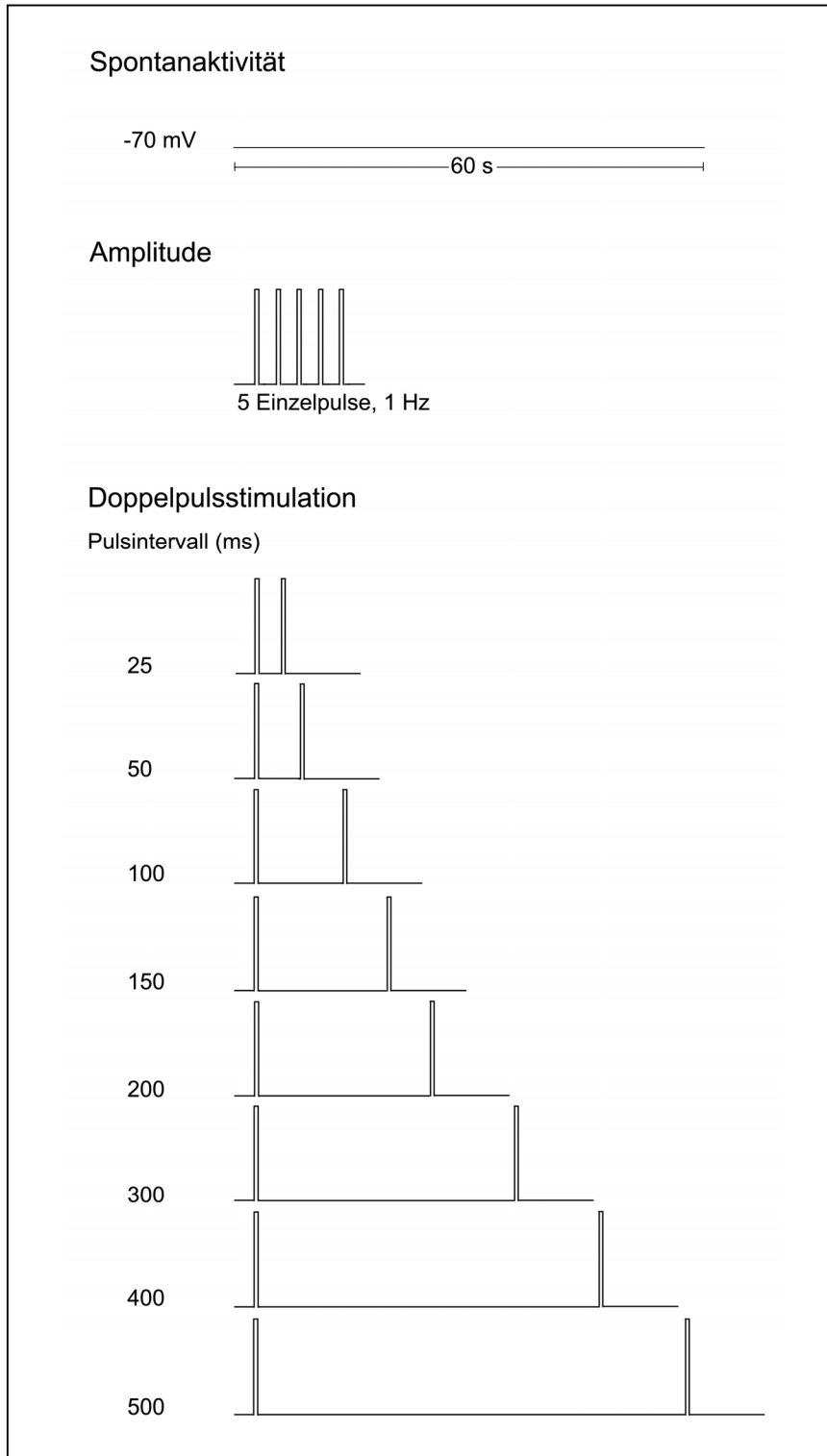
Um die Größe des RRP an synaptischen Vesikeln zu untersuchen, wurde mit Hilfe eines Systems zum schnellen Austausch von Lösungen (VC-9 Perfusion Valve Control System, Warner Instruments, USA) über eine Quarzkapillare, zweimal über die Zeit von 4 s, im Abstand von 3 s, eine 500 mM hyperosmolare Saccharoselösung appliziert. Die Quarzkapillare befand sich dabei ca. 2 mm von der untersuchten Zelle entfernt. Für die Auswertung wurde die Fläche unter der Kurve (*Area under the curve* (AUC)) mit der Axograph Software bestimmt.

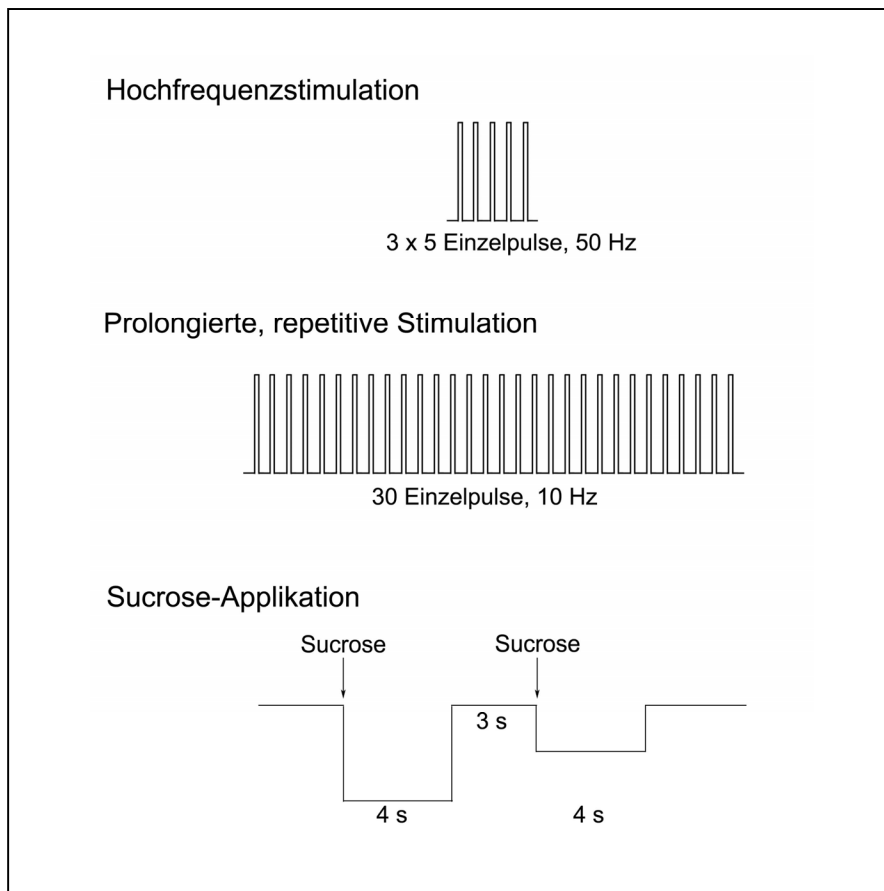
2.6.5.4 Applikation von A β ₄₂-Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen

Zur Untersuchung der Akutwirkung von extrazellulären A β ₄₂-Peptiden auf die synaptische Übertragung wurden *Patch-clamp*-Messungen vor und nach Applikation von Peptiden, die in EZL gelöst waren, durchgeführt. Anfangs wurde durch 5-malige Depolarisation mit einer Frequenz von 1 Hz (non-NMDA-Ströme) oder 0,1 Hz (NMDA-Ströme) die Amplitude der EPSCs gemessen. Es folgte eine Doppelpulsstimulation mit einem Pulsabstand von 50 und 100 ms. Anschließend wurde über 180 ms die Spontanaktivität aufgezeichnet. Nach 60 s wurden manuell 10 μ l der jeweiligen A β ₄₂-Peptidlösung über eine Schlauchkapillare, die in der Nähe der untersuchten Zelle positioniert war, appliziert (Endkonzentration: 1 μ M). Es folgte wiederum die Messung der Amplitude stimulierter EPSCs und die Doppelpulsstimulation.

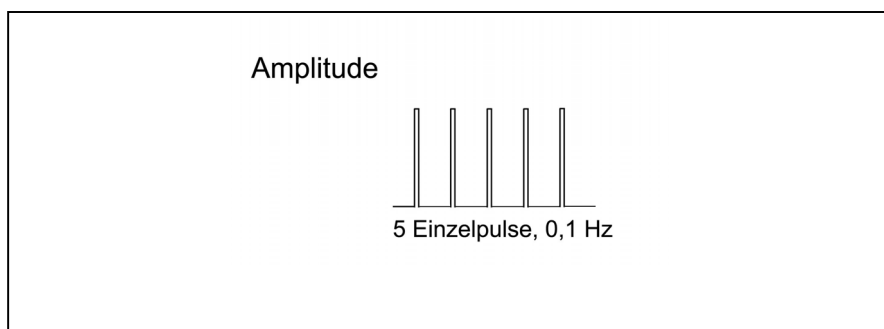
2.7 Messprotokolle

2.7.1 Non-NMDA Ströme

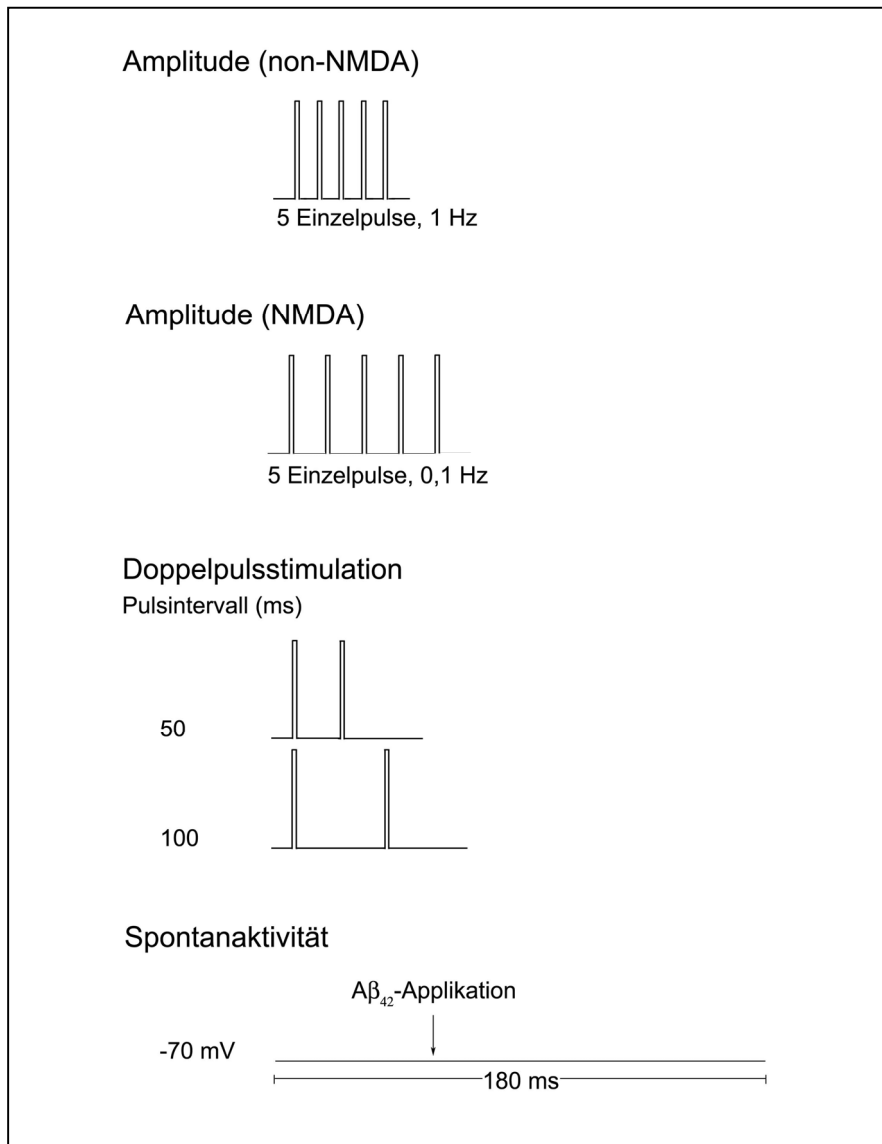




2.7.2 NMDA Ströme



2.7.3 (Non)-NMDA Ströme bei Akutapplikation von A β ₄₂-Monomeren,-Oligomeren und -Fibrillen



2.8 Datenaufnahme und Auswertung

Die Datenaufnahme der *Patch-clamp*-Messungen erfolgte über das Programm Pulse 8.50 (HEKA). Die Auswertung und Darstellung der aufgenommenen Daten wurde mit den Programmen Axograph 4,5 (Molecular Devices, USA), Pulse Fit (HEKA) und dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL (Microsoft) durchgeführt. Die statistische Auswertung zur Prüfung der Signifikanz der erhobenen Mittelwerte erfolgte mit dem EXCEL-Statistik-Unterprogramm WinStat. Unterschiede zweier Mittelwerte wurden als signifikant eingestuft, wenn sie einen p-Wert $< 0,05$ aufwiesen. Außerdem wurde bei allen Mittelwerten als Fehler der Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben (Standard error of the mean, SEM) (Sachs, 1997).

3. Ergebnisse

Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse der elektrophysiologischen und immunhistochemischen Untersuchung der APP-Knockout-Maus dargestellt werden. Im Anschluss daran folgt die Analyse der PS1 bzw. APP-transgenen Tiere. Abschließend soll die Auswirkung synthetisch hergestellter A β -Peptide auf die synaptische Übertragung gezeigt werden.

3.1 Analyse der synaptischen Übertragung in APP-Knockout-Neuronen

Die amyloidogene Prozessierung von APP hat möglicherweise eine physiologische Rolle bei der synaptischen Übertragung. Das Spaltprodukt A β könnte hierbei als Teil eines negativen Feedbackmechanismus fungieren, dessen Aufgabe es ist, die neuronale Aktivität zu regulieren (Kamenetz et al., 2003). Falls dies zutrifft, sollte sowohl der Verlust von APP, als auch dessen vermehrte Bildung Einfluss auf die synaptische Übertragung haben. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden zunächst elektrophysiologische Untersuchungen an Neuronen von APP-Knockout-Mäusen sowie im Folgenden an Neuronen von transgenen APP- bzw. Präsenilin-Mäusen durchgeführt. Alle elektrophysiologischen Arbeiten wurden an autaptischen, hippocampalen Neuronen (18-20 DIV) durchgeführt.

Für die Untersuchung der APP-Knockout-Mäuse wurden Wurfgeschwister (*Littermates*), die homozygote APP^{-/-}-oder Wildtyp-Tiere waren, verwendet.

3.1.1 Stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung

Die *Patch-clamp*-Messungen erfolgten im *Whole-cell*-Modus. Hierbei wurden die Zellen 1 ms von -70 mV auf 0 mV depolarisiert und die Amplitude des daraus resultierenden EPSCs gemessen. Bicuculline in der Badlösung blockierte die inhibitorischen Ströme. Die hohe Mg²⁺ Konzentration verhinderte eine NMDA-Rezeptor Aktivierung. Der am Zellsoma gemessene Strom ist dadurch nahezu vollständig AMPA-Rezeptor vermittelt und summiert sich aus den an jeder Autapse entstehenden EPSCs (Abb. 15A). Der Vergleich der Amplituden zeigte eine 1,7-fache höhere AMPA-EPSC-Amplitude bei APP-Knockout (KO) Zellen im Vergleich zu Wildtyp (WT) Zellen ($2,33 \pm 0,34$ nA für WT und $4,05 \pm 0,26$ nA für KO; *p < 0,05; Abb. 15B). Um herauszufinden, ob die Amplitude von NMDA-Strömen ebenfalls verändert ist, wurde diese unter Zusatz von Bicuculline, Glycin, CNQX und in Abwesenheit von

extrazellulärem Mg^{2+} bei 4 mM $[Ca^{2+}]_e$ gemessen (Abb. 15C). Es zeigte sich, dass bei APP-Knockout-Zellen die Amplitude der NMDA-Ströme im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen ca. 47% größer war ($1,46 \pm 0,19$ nA für WT und $2,14 \pm 0,24$ nA für KO; * $p < 0,05$; Abb. 15D).

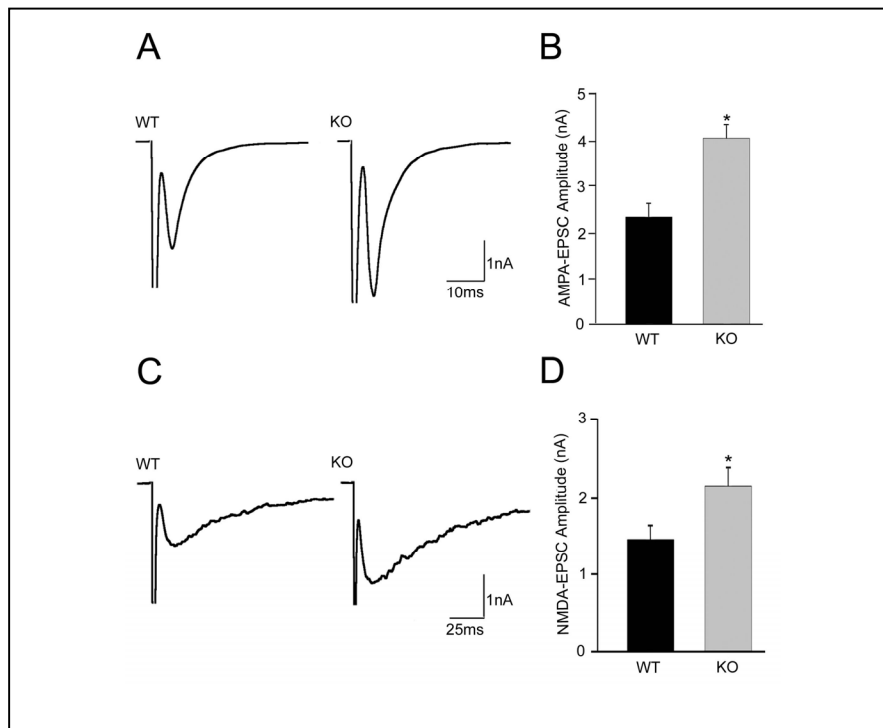


Abb. 15: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung

A, Typischer Verlauf eines AMPA-EPSCs von Wildtyp- und APP-Knockout-Neuronen. B, AMPA-EPSC Amplitude von Wildtyp- ($n = 24$) und APP-Knockout-Neuronen ($n = 23$). C, Typischer Verlauf eines NMDA-EPSCs von Wildtyp- und APP-Knockout-Neuronen. D, NMDA-EPSC Amplitude in Wildtyp- ($n = 35$) und APP-Knockout-Neuronen ($n = 33$). Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6-10 Mäusen pro Genotyp an 3-5 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; * $p < 0,05$.

Alternativ zur Amplitude der EPSCs kann auch deren Ladung dargestellt werden. Diese war bei APP-Knockout erwartungsgemäß ebenfalls signifikant erhöht (Tab. 2). Die Auswertung der Kinetik der AMPA- und NMDA-EPSCs anhand der Anstiegszeit (*Rise time*, 10-90%) und der Abfallzeit τ (Tau) ergab keine Unterschiede bei den zwei Genotypen (Tab. 2).

APP-Knockout-Zellen zeigen also eine erhöhte exzitatorische Neurotransmission. Die Ursachen könnten z.B. eine größere Empfindlichkeit postsynaptischer Rezeptoren, eine

erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel oder eine größere Anzahl Synapsen sein.

	EPSC Ladung (C)	Anstiegszeit (ms)	Abfallkonstante τ (ms)
AMPA EPSC			
WT	22.84 \pm 3.28	1.88 \pm 0.14	5.87 \pm 0.38
KO	45.11 \pm 4.43*	2.30 \pm 0.18	6.63 \pm 0.32
NMDA EPSC			
WT	129.93 \pm 19.29	7.94 \pm 0.71	69.76 \pm 5.11
KO	89.13 \pm 21.19*	7.33 \pm 0.63	58.03 \pm 5.40

Tab. 2: Zusammenfassung der EPSC Ladung und Kinetik

Dargestellt sind die Mittelwerte von 20-31 Zellen pro Genotyp mit dem Standardfehler des Mittelwertes; *p < 0,05.

Um die Empfindlichkeit postsynaptischer Rezeptoren genauer zu analysieren, wurden mEPSCs hinsichtlich ihrer Frequenz und Amplitude untersucht (Abb. 16A, B). Es zeigte sich, dass die mEPSC-Frequenz bei APP-defizienten Neuronen wesentlich höher war als bei Wildtyp-Neuronen ($3,16 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$ bei WT und $7,61 \pm 1,12 \text{ s}^{-1}$ bei KO; *p < 0,05; Abb. 16C). Die durchschnittliche mEPSC-Amplitude war jedoch unverändert ($23,69 \pm 1,23 \text{ pA}$ bei WT und $22,92 \pm 0,97 \text{ pA}$ bei KO; p > 0,05; Abb. 16D), was auf eine unveränderte Empfindlichkeit und Anzahl postsynaptischer Rezeptoren schließen lässt (Manabe et al., 1992).

Indem man die Ladung eines stimulierten EPSCs durch die eines einzelnen mEPSCs teilt, kann man berechnen, wie viele Vesikel bei einem AP-ähnlichen Stimulus freigesetzt werden. Hierfür wurden nur Zellen verwendet, bei denen sowohl stimulierte EPSCs als auch mEPSCs gemessen wurden. Die Anzahl an Vesikeln, die bei einem stimulierten EPSC freigesetzt werden, war bei APP-Knockout-Neuronen erwartungsgemäß ebenfalls erhöht (306 ± 67 bei WT und 593 ± 78 bei KO; *p < 0,05; Abb. 16E).

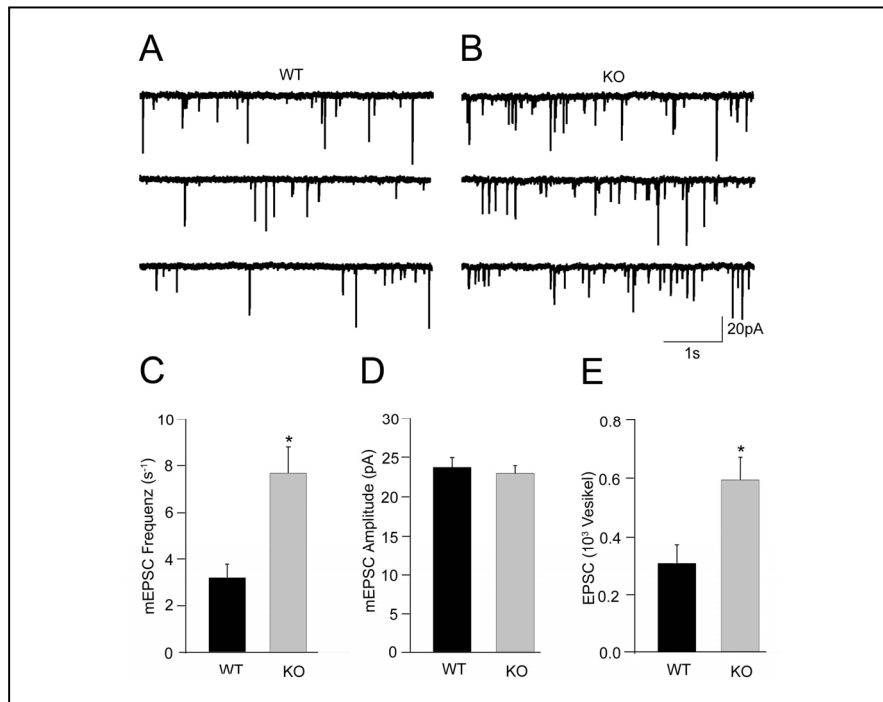


Abb. 16: Spontanaktivität

A und B, Aufzeichnung einiger mEPSCs von Wildtyp- und APP-Knockout-Neuronen. C, mEPSC-Frequenz von Wildtyp- (n = 25) und APP-Knockout (n = 23) Neuronen. D, mEPSC-Amplitude von Wildtyp- (n = 25) und APP-Knockout (n = 23) Neuronen. E, Anzahl an Vesikel pro EPSC von Wildtyp- (n = 10) und APP-Knockout (n = 11) Neuronen. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6-8 Mäusen pro Genotyp an 3-4 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; *p < 0,05.

3.1.2 Readily releasable pool und Freisetzungswahrscheinlichkeit

Die synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit P_r ist abhängig von der Größe des RRP und der Freisetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen Vesikel P_{vr} (Dobrunz, 2002). Daher wurde zunächst die Größe des RRP von APP-Knockout und Wildtyp-Neuronen untersucht. Die Tatsache, dass die Frequenz der mEPSCs bei APP-Knockout-Neuronen signifikant erhöht war, deutete bereits auf einen größeren RRP bei APP-Knockout-Neuronen hin. Die Bestimmung der Größe des RRP erfolgte durch Messung der Zellantwort auf die gepulste (3-4 s) Applikation hyperosmolarer Saccharoselösung (500 mM). Diese Art der Behandlung induziert, vermutlich durch Deformation der Zellmembran, bedingt durch die hyperosmolare Saccharoselösung, die Ausschüttung des gesamten Pools an freisetzungsbereiten Vesikel (RRP) einer Zelle. Man erhält einen vorübergehenden Einwärtsstrom, gefolgt von einer

steady-state-Komponente (Rosenmund and Stevens, 1996) (Abb. 17A). Indem die Ladung dieses Einwärtsstroms durch die Ladung eines einzelnen mEPSCs der gleichen Zelle geteilt wird, lässt sich berechnen, wie viele Vesikel sich im RRP einer Zelle befinden. Im Vergleich zu Kontrollzellen zeigten APP-Knockout-Neurone signifikant mehr freisetzungsbereite Vesikel (5356 ± 867 bei WT und 16351 ± 2936 bei KO; $**p < 0,005$; Abb. 17B). Nach Applikation der Saccharoselösung wurde 3 s gewartet und anschließend nochmals Saccharose appliziert. Dies diente dazu, eventuelle Defekte im Wiederbefüllen des RRP aufzudecken. Diese Wiederbefüllungsrate (*Refilling rate*) wurde durch Ermittlung des Verhältnisses der Ladung der zweiten Saccharoseantwort zur Ladung der ersten Saccharoseantwort bestimmt. Die *Refilling rate* des RRP war bei den beiden Genotypen jedoch nicht verändert ($0,52 \pm 0,02$ bei WT und $0,57 \pm 0,03$ bei KO, Abb. 17C). Als nächstes wurde die vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit (P_{vr}) analysiert, um beurteilen zu können, ob die Effizienz der AP-induzierten Vesikelfreisetzung durch den Verlust von APP beeinträchtigt wird. Dazu wurde die Anzahl Vesikel, die bei einem AP freigesetzt werden, durch die Anzahl an Vesikel im RRP der gleichen Zelle geteilt. APP-Knockout und Wildtyp-Neurone unterschieden sich nicht signifikant in ihrer vesikulären Freisetzungswahrscheinlichkeit ($5,4 \pm 0,5\%$ bei WT und $4,2 \pm 0,5\%$ bei KO; $p > 0,05$; Abb. 17D). Die erhaltenen P_{vr} -Werte entsprechen im Wesentlichen Werten aus anderen Studien mit autaptischen Hippocampusneuronen (Reim, 2001). Die synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit ist, wie bereits erwähnt, abhängig von der Größe des RRP und der vesikulären Freisetzungswahrscheinlichkeit. Sie kann auch direkt durch Applikation von (5R,10S)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imin hydrogen maleat (Mk-801), einem nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten, bestimmt werden. Durch 100 Stimuli bei einer Frequenz von 0,2 Hz und gleichzeitiger Applikation von Mk-801 kann die Abnahme der EPSC Amplitude bzw. die Blockierungsrate aktivierter NMDA-Rezeptoren gemessen werden. Eine schnelle Kinetik, d.h. eine rasche Blockierung aktivierter NMDA-Rezeptoren, spiegelt hierbei eine hohe synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit wider. APP-Knockout und Wildtyp-Zellen zeigten beide die typische Amplitudenreduktion unter Mk-801 Applikation. In Abb. 17E wurde die Amplitude der Folge-EPSCs ins Verhältnis zur Amplitude des ersten EPSCs gesetzt und gegen die Stimulus-Anzahl aufgetragen. APP-Knockout und Wildtyp-Zellen zeigten hierbei zwei Kurven mit ähnlicher Kinetik, was auf eine effiziente und intakte Freisetzung synaptischer

Vesikel hindeutet. Die unter 3.1.1 beobachtete erhöhte Amplitude stimulierter EPSCs bei APP-Knockout-Neuronen ist demnach nicht auf eine erhöhte synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit zurückzuführen.

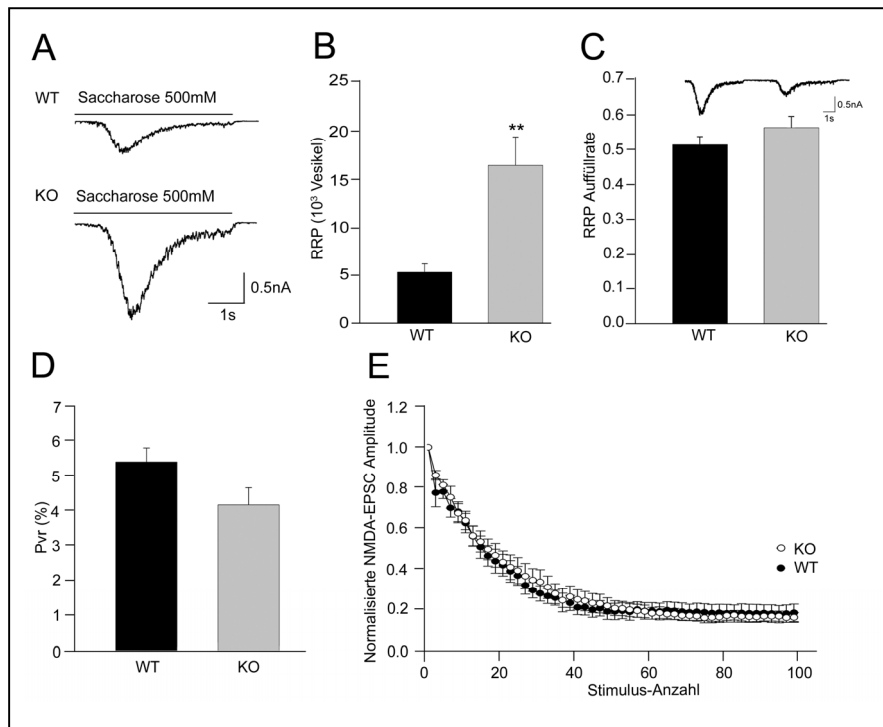


Abb. 17: RRP Größe, Auffüllrate und Freisetzungswahrscheinlichkeit

A, Beispielhafte Saccharoseantwort von Wildtyp- und APP-Knockout-Neuronen. Saccharose wurde für 4 s appliziert, was durch den schwarzen Balken markiert wird. B, Anzahl Vesikel im RRP von Wildtyp- (n = 10) und APP-Knockout (n = 11) Neuronen. C, Auffüllrate des RRP dargestellt als Verhältnis der zweiten Saccharoseantwort zur ersten Antwort, die 3 s vorher gemessen wurde. Das Insert zeigt eine Beispielmessung. D, Durchschnittliche vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit (P_{vr}) von Wildtyp- (n = 10) und APP-Knockout (n = 11) Neuronen. E, Analyse der Mk-801 Blockierungsrate in Wildtyp- (n = 13) und APP-Knockout (n = 10) Neuronen. Dargestellt ist die NMDA-EPSC Amplitude normalisiert auf die erste Antwort in Anwesenheit von Mk-801 gegen die Stimulus-Anzahl der stimulierten EPSCs. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6 Mäusen pro Genotyp an 3 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; **p < 0,05.

3.1.3 Kurzzeitplastizität

Die Kurzzeitplastizität beschreibt Veränderungen der synaptischen Übertragung, die mehrere Millisekunden bis hin zu mehreren Minuten anhalten können (Zucker and Regehr, 2002). Die

repetitive Stimulation, die Hochfrequenzstimulation sowie die Doppelpulsstimulation dienen der Beurteilung der Kurzzeitplastizität von Synapsen.

3.1.3.1 Prolongierte repetitive Stimulation und Hochfrequenzstimulation

Die repetitive Stimulation stellt eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der Freisetzungswahrscheinlichkeit (P_r) und der Größe des RRP dar (Schneppenburger et al., 1999). Für die prolongierte repetitive Stimulation wurden die Zellen mit 30 Pulsen bei einer Frequenz von 10 Hz, bei der Hochfrequenzstimulation mit 5 Pulsen bei einer Frequenz von 50 Hz stimuliert (Abb. 18A, C). Beide Protokolle wurden bei 4 mM $[Ca^{2+}]_e$ durchgeführt. Sowohl in Wildtyp als auch in APP-Knockout-Neuronen nahm die relative EPSC Amplitude (normalisiert auf die Amplitude des ersten EPSCs) kontinuierlich ab (Abb. 18B). Dabei war der Kurvenabfall bei APP-Knockout-Zellen weniger steil als bei Wildtyp-Zellen. Dies deutet auf mehr Vesikel im RRP und somit auf ein langsames „Erschöpfen“ des RRP hin. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Ähnlich verhielt es sich bei der Hochfrequenzstimulation. Auch hier war der Abfall der Kurve bei APP-Knockout-Neuronen geringer und der Endpunkt der Messung höher als bei Wildtyp-Zellen (Abb. 18D).

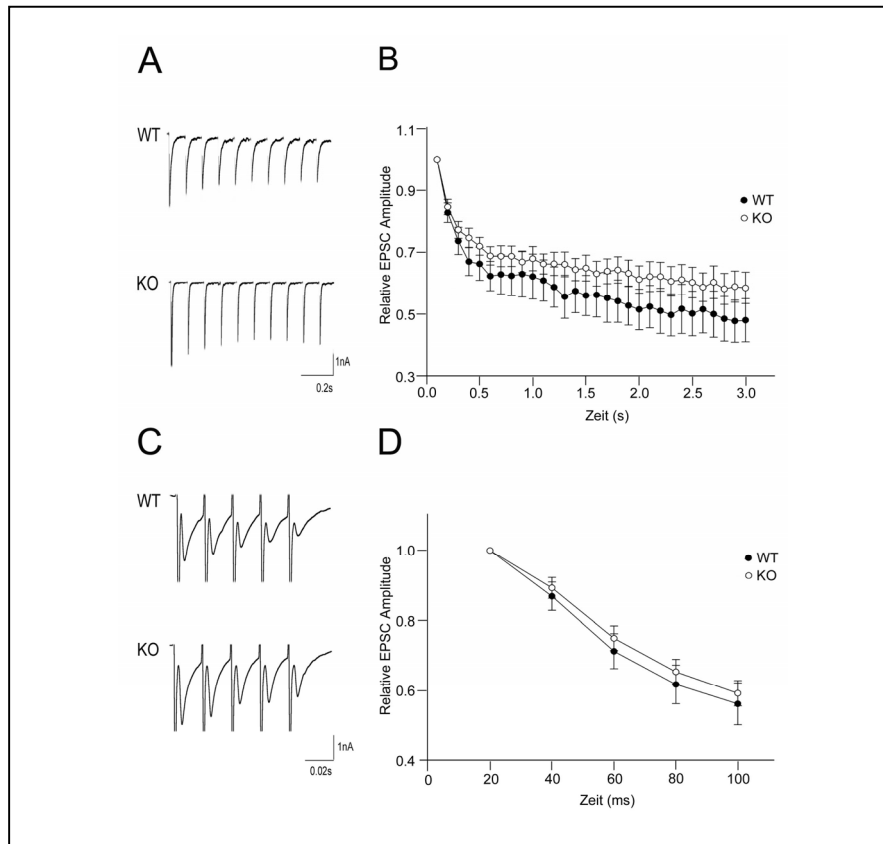


Abb. 18: Prolongierte repetitive und Hochfrequenzstimulation

A, Beispielhafte Darstellung der ersten 10 EPSCs einer 10 Hz Stimulation. B, Durchschnittliche EPSC-Amplitude von Wildtyp- (n = 19) und APP-Knockout (n = 16) Neuronen während einer 10 Hz Stimulation normalisiert auf die Amplitude des ersten EPSCs. C, Beispielhafte Darstellung der ersten 5 EPSCs einer 50 Hz Stimulation. D, Durchschnittliche EPSC-Amplitude von Wildtyp- (n = 22) und APP-Knockout (n = 23) Neuronen während einer 50 Hz Stimulation normalisiert auf die Amplitude des ersten EPSCs. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6-10 Mäusen pro Genotyp an 3-5 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.1.3.2 Doppelpuls-Stimulation

Ein weiteres etabliertes elektrophysiologisches Modell zur Messung der Kurzzeitplastizität ist die Doppelpulsstimulation. Dafür wurde ein autaptisches Neuron zweimal in variierenden Abständen ebenfalls durch eine 1 ms dauernde Depolarisation stimuliert. Die Amplitudenhöhe der beiden EPSCs wurde bestimmt und die zweite Amplitude ins Verhältnis zur ersten gesetzt: Ein Verhältnis größer eins beschreibt eine PPF, (Abb. 19A), ein Wert kleiner eins eine PPD (Abb. 19C). Die Ausprägung des jeweiligen Effekts ist vom Stimulations-Intervall abhängig. Kürzere Abstände zwischen den Pulsen weisen in aller Regel eine größere Amplitudendifferenz auf als längere Intervalle, weil sich die EPSCs untereinander stärker beeinflussen. Veränderungen in der Kurzzeitplastizität deuten häufig auf eine veränderte synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit hin. Eine Abfolge von APs führt zur *Facilitation* bei Synapsen mit niedriger anfänglicher Freisetzungswahrscheinlichkeit und zur *Depression* bei Synapsen mit hoher anfänglicher Freisetzungswahrscheinlichkeit. Dieser Effekt ist jedoch auch von der $[Ca^{2+}]_e$ abhängig. So führt eine Doppelpulsstimulation bei niedrigem extrazellulärem Ca^{2+} meist zur *Facilitation* und bei hoher $[Ca^{2+}]_e$ zur *Depression*. Der Vergleich von APP-Knockout-Neuronen mit denen von Wildtyp-Mäusen erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der PPF (Abb. 19B).

Analog zu den Experimenten im niedrig-Calcium Milieu wurde das gleiche Doppelpulsstimulationsprotokoll (2.7.1) auch bei 4 mM $[Ca^{2+}]_e$ durchgeführt. In der Ausprägung der PPD konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und APP-Knockout-Neuronen festgestellt werden (Abb. 19D). Der Verlust des APP-Gens in diesen Neuronen hat somit keine Auswirkungen auf die Kurzzeitplastizität.

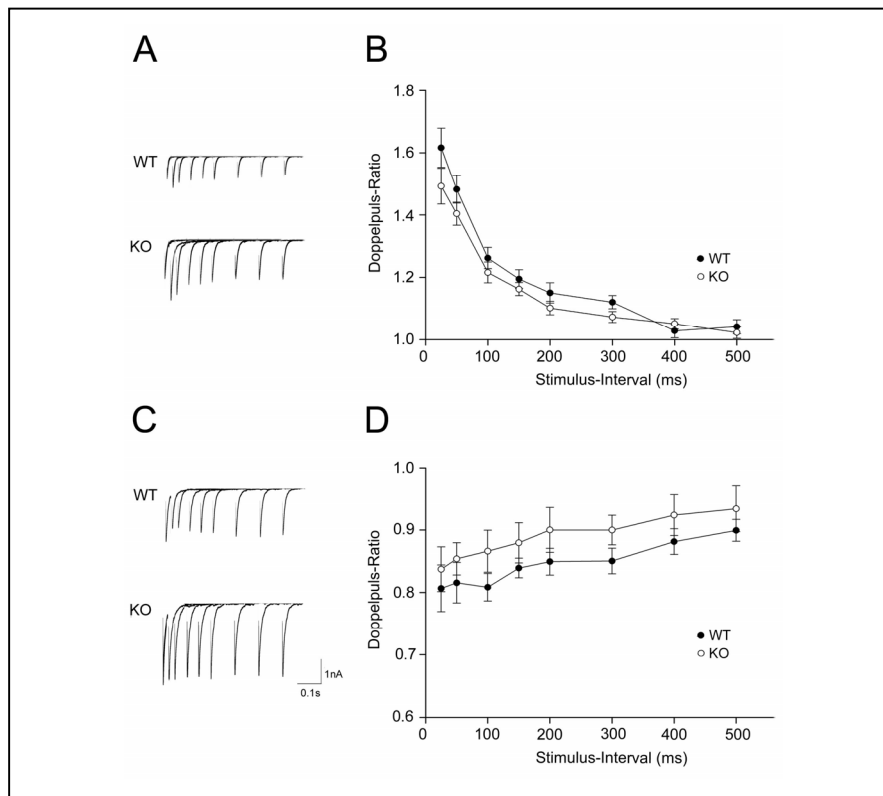


Abb. 19: Kurzzeitplastizität

A, Typischer Verlauf einer Doppelpuls-Stimulation von Wildtyp- und APP-Knockout-Neuronen bei 1 mM [Ca²⁺]_e. B, *Paired-pulse facilitation* bei 1 mM [Ca²⁺]_e: der Graph beschreibt das Doppelpuls-Ratio (Verhältnis der Amplitude vom zweiten zum ersten EPSC) als Funktion von 8 unterschiedlichen Stimulus-Intervallen bei Wildtyp- (n = 22) und APP-Knockout (n = 21) Neuronen. C, Typischer Verlauf einer Doppelpuls-Stimulation von Wildtyp- und APP-Knockout-Neuronen bei 4 mM [Ca²⁺]_e. D, *Paired-pulse depression* bei 4 mM [Ca²⁺]_e: der Graph beschreibt das Doppelpuls-Ratio (Verhältnis der Amplitude vom zweiten zum ersten EPSC) als Funktion von 8 unterschiedlichen Stimulus-Intervallen bei Wildtyp- (n = 11) und APP-Knockout (n = 13) Neuronen. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6-8 Mäusen pro Genotyp an 3-4 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.1.4 Effekt von DAPT auf die stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung

APP-Knockout-Neurone weisen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen keine APP-Spaltprodukte auf. Um herauszufinden, ob die erhöhte EPSC-Amplitude bei APP-Knockout-Neuronen durch den Verlust von γ -Sekretase Spaltprodukten bedingt ist, wurde deren Aktivität in Wildtyp-Neuronen durch Zugabe von 1 μ M N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycin

t-butylester (DAPT, γ -Sekretase-Inhibitor) blockiert. Die mit DAPT behandelten Wildtyp-Neurone zeigten im Vergleich zu unbehandelten Neuronen signifikant höhere AMPA-EPSC Amplituden ($2,76 \pm 0,30$ nA bei WT und $3,66 \pm 0,30$ nA bei mit DAPT behandelten WT Neuronen; $*p < 0,05$; Abb. 20A). Die Frequenz der Spontanaktivität war bei Wildtyp-Neuronen, die mit DAPT behandelt wurden erhöht ($4,01 \pm 1,10$ s⁻¹ bei WT und $10,18 \pm 1,8$ s⁻¹ bei mit DAPT behandelten WT Neuronen; $*p < 0,05$; Abb. 20B), was darauf hinweist, dass der APP-Knockout-Phänotyp durch Behandeln von Wildtyp-Neuronen mit DAPT imitiert werden kann.

3.1.5 Effekt von A β ₄₂ und konditioniertem Medium auf die stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung

Wenn die Herstellung des APP-Knockout-Phänotyps mittels Zugabe von DAPT zu Wildtyp-Neuronen durch eine verminderte Produktion und Sekretion von A β bedingt ist, dann sollte es auch umgekehrt möglich sein, die synaptische Übertragung durch Zugabe von A β ₄₂-Monomeren oder konditioniertem Wildtyp-Medium zu APP-Knockout-Neuronen zu beeinträchtigen. Es wurde zunächst überprüft, ob sich eine zweitägige Inkubation von APP-Knockout-Neuronen mit A β ₄₂-Monomeren in annähernd physiologischer Konzentration (10 nM) (Seubert et al., 1992) auf die synaptische Übertragung auswirkt. Bei dieser geringen A β ₄₂-Konzentration ist die Ausbildung von A β ₄₂-Oligomeren relativ unwahrscheinlich, so dass ein möglicher Effekt allein auf die Monomerwirkung zurückzuführen wäre. In der Tat zeigten mit A β ₄₂ behandelte APP-Knockout-Neurone leichte, jedoch nicht signifikant reduzierte AMPA-EPSC Amplituden im Vergleich zu unbehandelten APP-Knockout-Neuronen ($4,25 \pm 0,53$ nA bei KO und $3,43 \pm 0,40$ nA bei mit A β ₄₂ behandelten KO Neuronen; $p > 0,05$; Abb. 20A). Die Frequenz der Spontanaktivität war ebenfalls geringfügig kleiner in mit A β ₄₂ behandelten APP-Knockout-Neuronen ($7,45 \pm 1,02$ s⁻¹ bei KO und $5,43 \pm 1,08$ s⁻¹ bei mit A β ₄₂ behandelten KO Neuronen; $p > 0,05$; Abb. 20B). Die Inkubation von APP-Knockout-Zellen mit konditioniertem Wildtyp-Medium, das nach 16 Tagen Kulturzeit zusammen mit frischem Medium zu den Knockout-Zellen gegeben wurde, ergab ähnliche Ergebnisse. Sowohl die AMPA-EPSC Amplitude, ($4,29 \pm 0,36$ nA bei KO und $3,18 \pm 0,49$ nA bei mit konditioniertem WT-Medium behandelten KO Neuronen; $p > 0,05$; Abb. 20A) als auch die Frequenz der Spontanaktivität, waren bei, mit konditioniertem WT Medium

behandelten Neuronen leicht reduziert ($7,29 \pm 1,17 \text{ s}^{-1}$ bei KO und $6,03 \pm 1,05 \text{ s}^{-1}$; $p > 0,05$; Abb. 20B).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl monomeres $A\beta_{42}$ als auch konditioniertes Wildtyp-Medium die Amplitude stimulierter AMPA-EPSCs sowie die Frequenz der Spontanaktivität bei APP-Knockout-Neuronen tendenziell leicht, jedoch nicht signifikant, verringern. Ganz im Gegensatz zum signifikanten Effekt von DAPT auf Wildtyp-Neurone.

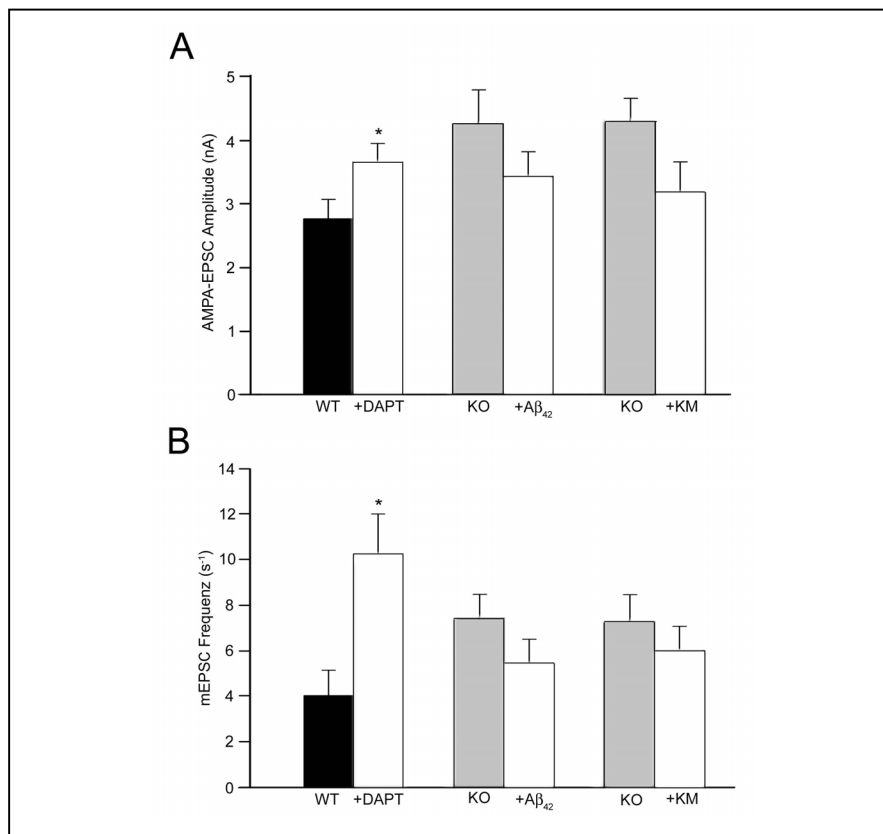


Abb. 20: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung und Spontanaktivität

A, AMPA-EPSC Amplitude von Wildtyp-Neuronen ($n = 15$) verglichen mit DAPT behandelten Wildtyp-Neuronen ($n = 15$), oder von APP-Knockout-Neuronen ($n = 15$) verglichen mit APP-Knockout-Neuronen, die entweder mit $A\beta_{42}$ ($n = 15$) oder konditioniertem Medium von Wildtyp-Kulturen ($n = 15$) behandelt wurden. B, mEPSC-Frequenz von Wildtyp-Neuronen ($n = 15$) verglichen mit DAPT behandelten Wildtyp-Neuronen ($n = 15$), oder von APP-Knockout-Neuronen ($n = 15$) verglichen mit APP-Knockout-Neuronen, die entweder mit $A\beta_{42}$ ($n = 15$) oder konditioniertem Medium von Wildtyp-Kulturen ($n = 15$) behandelt wurden. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6 Mäusen pro Genotyp an 3 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; * $p < 0,05$.

3.1.6 Synapsenanzahl

Basierend auf der erhöhten Amplitude stimulierter EPSCs und des größeren RRP bei APP-Knockout-Neuronen stellte sich die Frage, ob sich die Abwesenheit von APP auf die Synapsenanzahl auswirkt. Daher wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Antikörpern durchgeführt, die zum einen gegen das ubiquitär in Neuronen vorkommende Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP-2) und zum anderen gegen Synaptophysin, einem gut charakterisierten präsynaptischen Marker (Augustin et al., 1999), gerichtet waren (Abb. 21A). Zuerst wurde die Gesamtdendritenlänge von autaptischen Neuronen bestimmt. Hierbei zeigte sich eine um 29% erhöhte Dendritenlänge bei APP-Knockout-Neuronen im Vergleich zu Wildtyp-*Littermates* ($1929 \pm 113 \mu\text{m}$ bei WT und $2486 \pm 101 \mu\text{m}$ bei KO; $***p < 0,0005$; Abb. 21B). Die Auswertung der Synapsenanzahl ergab bei APP-Knockout-Neuronen eine signifikant höhere Synapsenzahl als bei Wildtyp-Neuronen (209 ± 13 bei WT und 312 ± 20 bei KO; $***p < 0,0005$; Abb. 21C). Bezog man die Anzahl an Synapsen auf eine bestimmte Dendritenlänge ($10 \mu\text{m}$) ergab sich kein signifikanter Unterschied bei den einzelnen Genotypen ($1,19 \pm 0,07$ bei WT und $1,25 \pm 0,06$ bei KO; $p > 0,05$; Abb. 21D). Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass autaptische Neurone in Abwesenheit von APP mehr bzw. längere Dendriten und daher auch mehr Synapsen ausbilden. Durch diesen Befund lassen sich die erhöhte Amplitude stimulierter EPSCs, der größere RRP und die erhöhte Frequenz der Spontanaktivität bei APP-Knockout-Neuronen erklären.

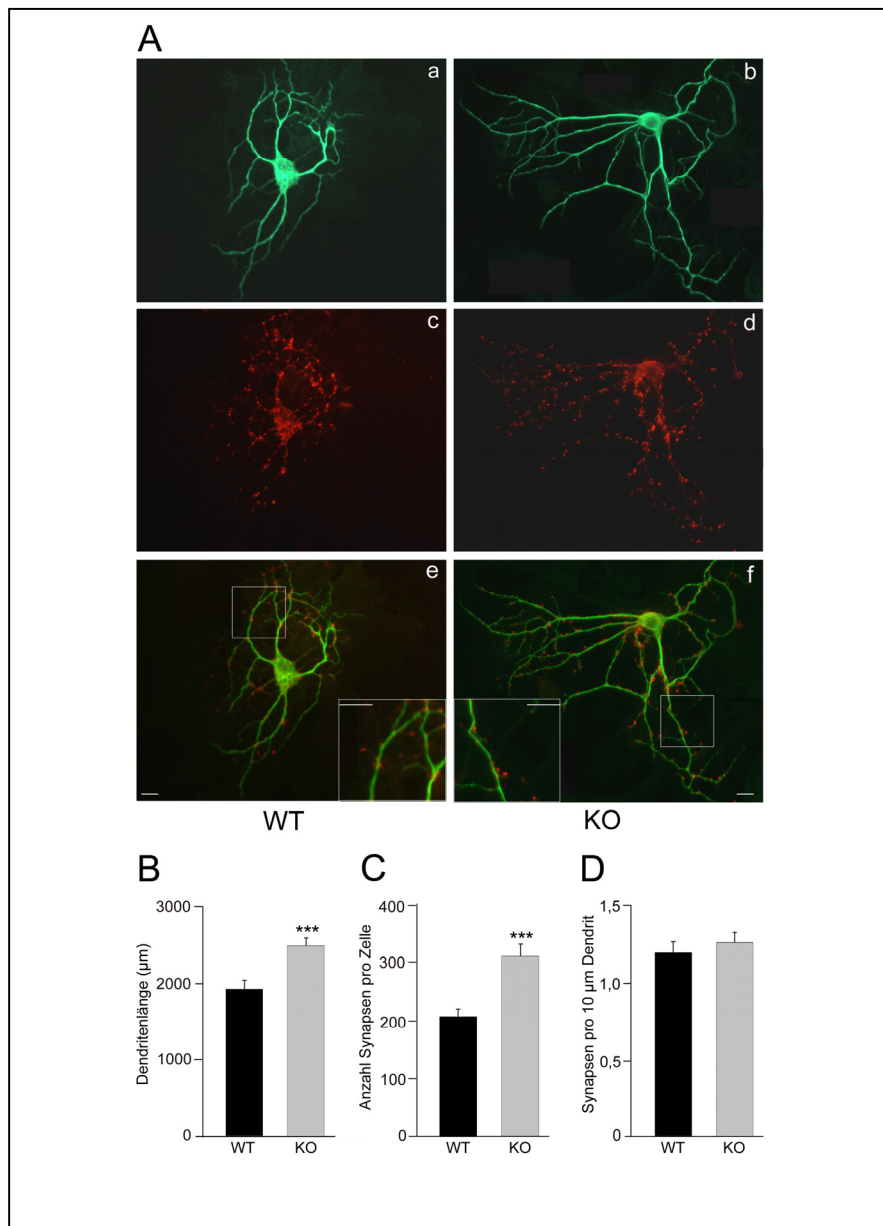


Abb. 21: Darstellung von Dendriten und Synapsen in autaptischen Kulturen

A, Immunfärbung eines autaptischen Neurons. Aa und Ab, MAP-2 Färbung zur Beurteilung der Größe von Wildtyp- und APP-Knockout-Neuronen. Ac und Ad, Färbung der gleichen Zelle mit einem Synaptophysin-Antikörper zur Bewertung der Synapsenanzahl. Ae und Af, Kombinierte Aufnahme einer anti-MAP-2 und anti-Synaptophysin Färbung. Balken entspricht 25 μm. B, Gesamtdendritenlänge von Wildtyp- (n = 55) und APP-Knockout- (n = 62) Neuronen. C, Durchschnittliche Synapsenanzahl pro Zelle von Wildtyp- (n = 55) und APP-Knockout- (n = 62) Neuronen. D, Anzahl Synapsen pro 10 μm Dendrit bei Wildtyp- (n = 55) und APP-Knockout (n = 62)- Neuronen. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 10 Mäusen pro Genotyp an 5 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; ***p < 0,0005.

3.1.7 Synaptophysinexpression im Hippocampus

Um herauszufinden, ob sich eine vermehrte Synapsenanzahl auch *in vivo* zeigt, wurden immunhistochemische Färbungen an 50 µm dicken, coronalen Hirnschnitten von jungen (20 Tage) und alten (11 Monate) APP-Knockout und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Schnitte wurden hierbei in den entsprechenden Wasch-bzw. Färbelösungen schwimmend (*floating sections*) angefärbt. Die Synaptophysin-Intensität wurde in zwei Regionen des Hippocampus, im *stratum radiatum* und im besonders synapsenreichen *stratum moleculare*, mit Hilfe eines konfokalen Laser Scan Mikroskops untersucht (Abb. 22A). Die durchschnittliche Farbintensität Synaptophysin-positiver Endigungen im *stratum radiatum* war bei 20 Tage alten APP-Knockout-Mäusen um 17 % höher als bei Wildtyp-Mäusen (77,04% ± 3,05% bei WT und 90,13% ± 1,95% bei KO; *** $p < 0,005$; Abb. 22B). Bei 11 Monate alten Tieren zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (85,77% ± 2,19 % bei WT und 88,50% ± 3,44 % bei KO; $p > 0,05$; Abb. 22B). Die Auswertung der Synaptophysin-Intensität im *stratum moleculare* zeigte ein ähnliches Bild, auch hier war die Intensität bei 20 Tage alten APP-Knockout-Mäusen höher als bei Wildtyp Tieren (75,87% ± 3,66% bei WT und 92,81% ± 1,00% bei KO; ** $p < 0,005$; Abb. 22C). Die adulten (11 Monate) Mäuse hingegen zeigten keinen Unterschied in der Synaptophysin-Intensität im *stratum moleculare* (69,73% ± 4,58 % bei WT und 72,90% ± 4,97 % bei KO; $p > 0,05$; Abb. 22C). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der unter 3.1.6 beschriebenen erhöhten Synapsenbildung in jungen hippocampalen APP-Knockout-Neuronen.

Um den histologisch beobachteten Unterschied in der Synaptophysin-Expression in Wildtyp und APP-Knockout-Mäusen weiter zu bestätigen, wurden Western Blots aus der Hippocampusregion durchgeführt. Abb. 22D zeigt einen typischen Blot aus dem Hippocampus von einer Wildtyp (linke Bahn) und einer APP-Knockout-Maus (rechte Bahn). Synaptophysin (SYN), das bei 38 kDa (untere Bande) detektiert wird, zeigte ein stärkeres Signal in der Probe der APP-Knockout-Maus. Als Kontrolle der gleichen Menge an eingesetztem Gewebe, diente β -Aktin (42 kDa). Die densitometrische Bestimmung der relativen Synaptophysin-Bandenintensität (normalisiert auf den β -Aktin-Gehalt) zeigte eine signifikant höhere Intensität bei APP-Knockout-Mäusen (0,38 ± 0,01 bei WT und 0,44 ± 0,01 bei KO, * $p < 0,05$; Fig. 22E).

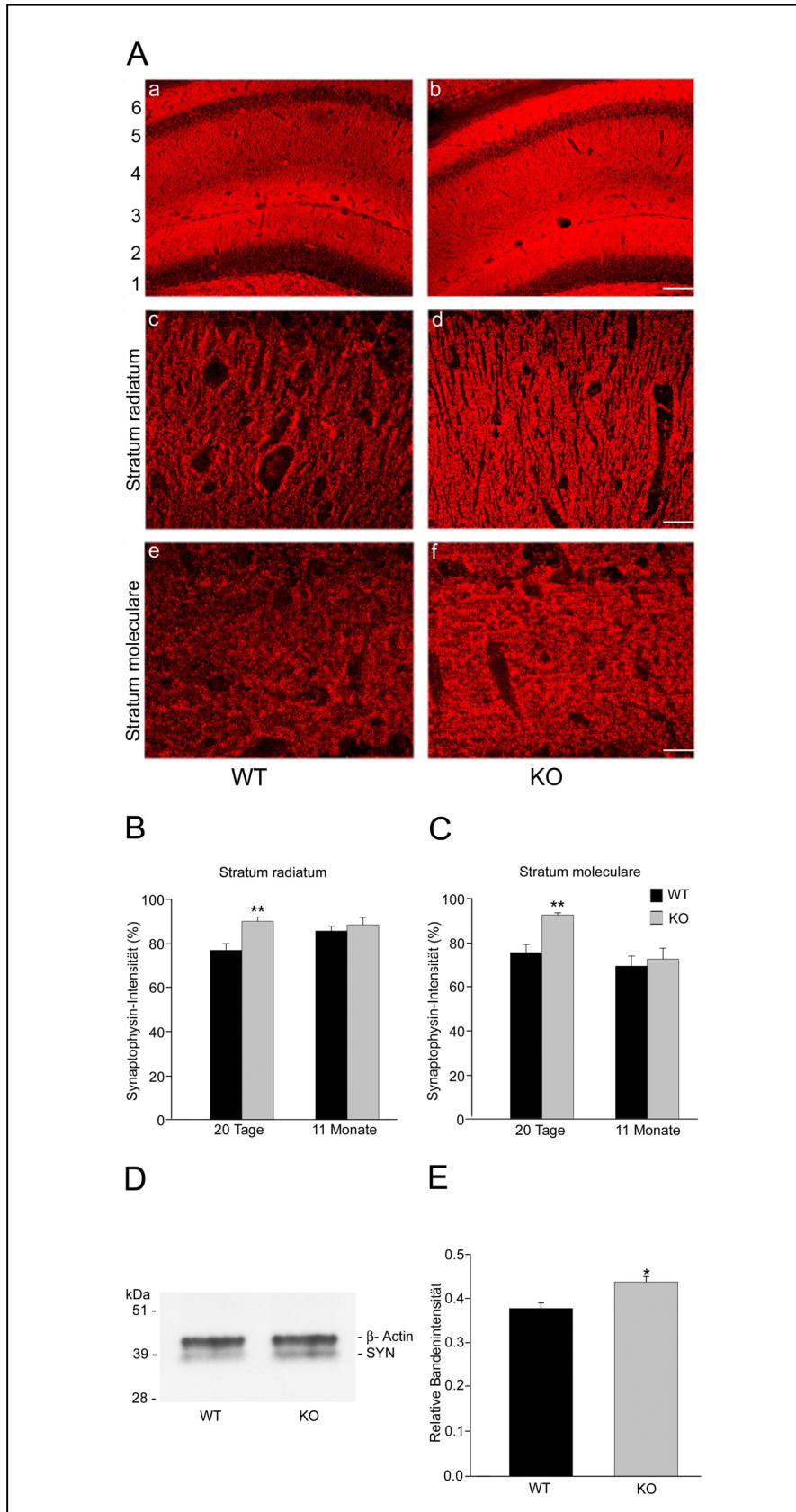


Abb. 22: Synaptophysin Färbung an Hirnschnitten

A, Synaptophysin-positive Endigungen im Hippocampus der Maus. Aa und Ab, Überblick über den Hippocampus von Wildtyp- und APP-Knockout-Mäusen: (1) *stratum granulosum*, (2) *stratum moleculare*, (3) *stratum lacunosum*, (4) *stratum radiatum*, (5) *stratum pyramidale*, (6) *stratum oriens*. Maßstab balken 100 μm . Ac und Ad, Synaptophysin-Färbung des *stratum radiatum* von Wildtyp- und APP-Knockout-Mäusen. Ae und Af, Synaptophysin-Färbung des *stratum moleculare* von Wildtyp- und APP-Knockout-Mäusen. Maßstab balken 25 μm . B, Durchschnittliche Synaptophysin-Fluoreszenzintensität im *stratum radiatum* von Wildtyp- (n = 8 Bereiche) und APP-Knockout- (n = 8 Bereiche) Mäusen. C, Durchschnittliche Synaptophysin-Fluoreszenzintensität im *stratum moleculare* von Wildtyp- (n = 8 Bereiche) und APP-Knockout- (n = 8 Bereiche) Mäusen. D, Western Blot Analyse der Synaptophysin- (SYN, untere Bande) und β -Aktin- (obere Bande) Expression in Hippocampusschnitten (4 μm) von Wildtyp- und APP-Knockout-Mäusen. E, Relative, auf den β -Aktin-Gehalt normalisierte Bandenintensität der Synaptophysinexpression. Die Proben der APP-Knockout-Mäuse (n = 3) zeigen eine höhere Synaptophysinexpression verglichen mit Wildtyp-Tieren (n = 3). Die Messungen erfolgten an 2-3 Mäusen pro Genotyp aus 2-3 voneinander unabhängigen *Littermate*-Würfen; **p < 0,005; *p < 0,05.

Die Ergebnisse der Western Blots bestätigen somit die schon aus den Fluoreszenzfärbungen erkennbare höhere Expression von Synaptophysin bei jungen APP-Knockout-Tieren. Es ist daher wahrscheinlich, dass der beobachtete elektrophysiologische APP-Knockout-Phänotyp auf einer vermehrten Ausbildung von Synapsen beruht.

3.2 Analyse der synaptischen Übertragung in transgenen PS1- und/oder APP-Neuronen

Wenn der Verlust des APP und damit die Abwesenheit von Amyloid-Peptiden zu den unter 3.1 beschriebenen Auswirkungen auf die synaptische Übertragung und Synapsenbildung führt, stellt sich die Frage, ob eine Überexpression von mutiertem PS1 und/oder APP die synaptische Übertragung ebenfalls beeinflusst. Mutationen im PS1 und APP führen zu einer vermehrten Bildung von Amyloid-Peptiden. Während bei PS1-Mutationen vermehrt das amyloidogene $\text{A}\beta_{42}$ gebildet wird und sich somit das Verhältnis $\text{A}\beta_{42}$ zu $\text{A}\beta_{40}$ erhöht, nimmt bei APP-Mutationen v.a. die Gesamtkonzentration an $\text{A}\beta$ zu.

3.2.1 Stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung

Als Versuchstierlinien für die elektrophysiologischen Untersuchungen an PS1 transgenen Mäusen dienten nicht-transgene FvB/N Wildtyp-Mäuse (Non-tg) sowie Mäuse, die entweder

das unveränderte humane PS1 (S182, im Folgenden als PS1wt bezeichnet) oder das humane PS1 mit der A246E Mutation (PS1mut) überexprimierten. Die Untersuchungen an Mäusen mit einer Mutation im APP wurden an *Littermates* aus C57Bl/6 Wildtyp-Tieren (WT1) und Mäusen, die humanes APP mit der schwedischen Doppelmutation (670/671 KM→NL) (APP23) überexprimieren durchgeführt. Zusätzlich wurden noch *Littermates* aus wiederum C57Bl/6 Wildtyp-Tieren (WT2) und Mäusen, die neben der schwedischen Doppelmutation im hAPP zusätzlich noch humanes PS1 mit der L166P Mutation (APPPS1) überexprimieren, untersucht. Die *Patch-clamp* Messungen wurden im *Whole-cell* Modus an kultivierten, autaptischen Hippocampusneuronen durchgeführt. Bei der Messung stimulierter EPSCs (siehe Beispiel Abb. 23A) zeigte sich bei Neuronen, die mutiertes humanes PS1 (PS1mut) exprimieren, eine 30% kleinere Amplitude von AMPA-EPSCs im Vergleich zu PS1wt Neuronen und eine um fast die Hälfte verminderte Amplitude gegenüber Non-tg Neuronen ($3,66 \pm 0,42$ nA bei Non-tg, $3,24 \pm 0,42$ nA bei PS1wt und $2,16 \pm 0,22$ nA bei PS1mut; * $p < 0,05$; Abb. 23B). Neurone, die mutiertes humanes APP (APP23) exprimieren, wiesen lediglich eine geringfügige, jedoch nicht signifikante, Verminderung auf ($3,66 \pm 0,39$ nA bei WT1 und $3,40 \pm 0,33$ nA bei APP23 $p > 0,05$; Abb. 23C). Die AMPA-EPSC Amplitude von APPPS1 Neuronen hingegen war wesentlich kleiner als die der Littermate-Kontrolle WT2 und auch kleiner als die Amplitude von APP23 Neuronen ($3,05 \pm 0,21$ nA bei WT2 und $2,35 \pm 0,17$ nA bei APPPS1; $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,005$; Abb. 23B).

Ähnlich verhielt es sich mit der Amplitude von NMDA-EPSCs (siehe Beispiel Abb. 23C). Auch hier war eine signifikante Reduktion bei Neuronen mit mutiertem PS1 gegenüber Zellen mit Wildtyp PS1 und nicht-transgenen Neuronen zu beobachten ($2,14 \pm 0,28$ bei Non-tg, $1,68 \pm 0,19$ bei PS1wt und $0,77 \pm 0,08$ bei PS1mut; * $p < 0,05$; Abb. 23D). Die Amplitude von APP23 Neuronen war ähnlich wie die der Littermate Kontrolle WT1 ($1,52 \pm 0,12$ nA bei WT und $1,64 \pm 0,26$ nA bei APP23, $p > 0,05$; Abb. 23D). APPPS1 Neurone hingegen wiesen sowohl gegenüber ihren WT2 Kontrollen als auch gegenüber APP23 Neuronen signifikant kleinere NMDA-EPSC Amplituden auf ($1,75 \pm 0,19$ nA bei WT2 und $0,92 \pm 0,17$ nA bei APPPS1; $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,005$; Abb. 23D).

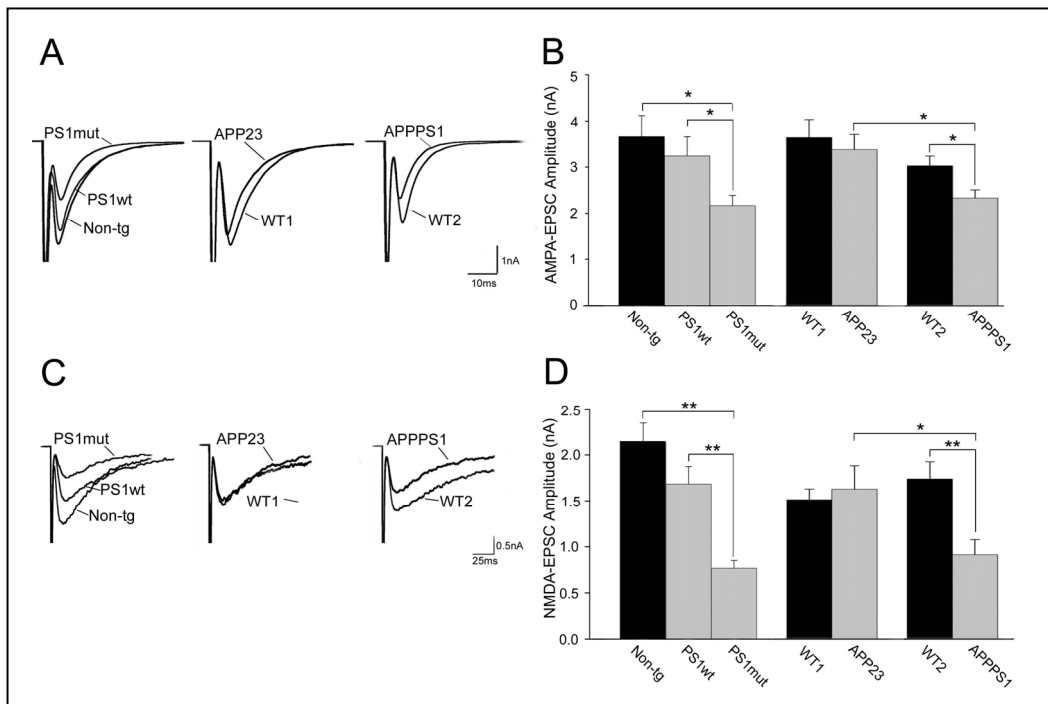


Abb. 23: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung

A, Typischer Verlauf eines AMPA-EPSCs bei den verschiedenen Linien. B, AMPA-EPSC Amplitude von Non-tg (n = 19), PS1wt (n = 30), PS1mut (n = 41), sowie WT1 (n = 27), APP23 (n = 32), WT2 (n = 34) und APPPS1 (n = 37) Neuronen. C, Typischer Verlauf eines NMDA-EPSCs bei den verschiedenen Linien. D, NMDA-EPSC Amplitude von Non-tg (n = 15), PS1wt (n = 32), PS1mut (n = 27) Neuronen, sowie WT1 (n = 24), APP23 (n = 23), WT2 (n = 28) und APPPS1 (n = 28). Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6-10 Mäusen pro Genotyp an 3-5 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; **p < 0,005; * p < 0,05.

Dementsprechend war auch die Ladung stimulierter EPSCs bei PS1mut Neuronen geringer als bei PS1wt Neuronen und nicht-transgenen Zellen. Beim Vergleich der Anstiegszeit (10-90%) und der Abfallkonstanten τ ergaben sich keine Unterschiede bei den verschiedenen Genotypen (Tab. 3).

	EPSC Ladung (C)	Anstiegszeit (ms)	Abfallkonstante τ (ms)
AMPA EPSC			
Non-tg	39.39 \pm 8.04	2.06 \pm 0.19	7.25 \pm 0.97
PS1wt	41.94 \pm 6.99	2.14 \pm 0.24	8.20 \pm 0.67
PS1mut	20.78 \pm 2.72*	2.15 \pm 0.21	6.72 \pm 0.44
NMDA EPSC			
Non-tg	175.09 \pm 24.83	7.66 \pm 0.95	61.19 \pm 3.55
PS1wt	131.78 \pm 16.72	8.03 \pm 1.09	63.95 \pm 4.89
PS1mut	67.47 \pm 8.79**	7.01 \pm 0.92	60.88 \pm 4.39

Tab. 3: Zusammenfassung der EPSC Ladung und Kinetik

Dargestellt sind die Mittelwerte von 20-30 Zellen pro Genotyp mit dem SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

Um mögliche Veränderungen postsynaptischer Rezeptoren genauer zu analysieren, wurden mEPSCs hinsichtlich ihrer Frequenz und Amplitude untersucht (Abb. 24A). Es zeigte sich, dass die mEPSC-Frequenz bei PS1mut Neuronen wesentlich geringer war als in PS1wt und Non-tg Neuronen ($8,03 \pm 1,52 \text{ s}^{-1}$ bei Non-tg, $7,95 \pm 1,53 \text{ s}^{-1}$ bei PS1wt und $3,02 \pm 0,59 \text{ s}^{-1}$ bei PS1mut Neuronen; * $p < 0,05$; Abb. 24B). APP23 Neurone zeigten eine nahezu unveränderte Frequenz verglichen mit WT1 ($10,40 \pm 1,61 \text{ s}^{-1}$ bei WT1 und $9,31 \pm 1,41 \text{ s}^{-1}$ bei APP23; $p > 0,05$; Abb. 24B). Die Frequenz von APPPS1 Neuronen war zwar etwas geringer als die von WT2 und APP23, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant ($8,43 \pm 1,44 \text{ s}^{-1}$ bei WT2 und $6,22 \pm 1,18 \text{ s}^{-1}$ bei APPPS1; $p > 0,05$; Abb. 24B).

Die Amplitude spontaner Ereignisse verhielt sich bei Non-tg, PS1wt und PS1mut sehr ähnlich ($24,34 \pm 0,87 \text{ pA}$ bei Non-tg, $23,36 \pm 0,92 \text{ pA}$ bei PS1wt und $25,06 \pm 1,12 \text{ pA}$ bei PS1mut Neuronen; $p > 0,05$; Abb. 23C). Beim Vergleich von APP23 versus WT1 ($22,86 \pm 0,85 \text{ pA}$ bei WT1 und $20,85 \pm 0,69$ bei APP23, $p > 0,05$; Abb. 24C) und APPPS1 versus WT2 und APP23 konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Amplitude spontaner Ereignisse festgestellt werden ($20,36 \pm 0,51 \text{ pA}$ bei WT2 und $22,16 \pm 1,08$ bei APPPS1, $p > 0,05$; Abb. 24C). Dies lässt auf eine unveränderte Empfindlichkeit und Anzahl postsynaptischer Rezeptoren schließen (Manabe et al., 1992).

Die Anzahl an Vesikeln, die bei einem stimulierten EPSC freigesetzt werden, war bei PS1mut Neuronen, wie die kleinere Amplitude stimulierter EPSCs vermuten ließ, ebenfalls verringert (526 ± 148 bei Non-tg, 481 ± 111 bei PS1wt und 169 ± 68 bei PS1mut Neuronen; * $p < 0,05$;

Abb. 24D). APP23 Neurone setzten nur unwesentlich weniger synaptische Vesikel pro stimuliertem EPSC frei als WT1 Neurone (501 ± 76 bei WT1 und 458 ± 72 bei APP23; $p > 0,05$; Abb. 24D). APPPS1 Neurone hingegen wiesen sowohl gegenüber WT2 als auch gegenüber APP23 Neuronen signifikant weniger freigesetzte synaptische Vesikel pro stimuliertem EPSC auf (473 ± 87 bei WT und 255 ± 40 bei APPPS1; $*p < 0,05$; Abb. 24D).

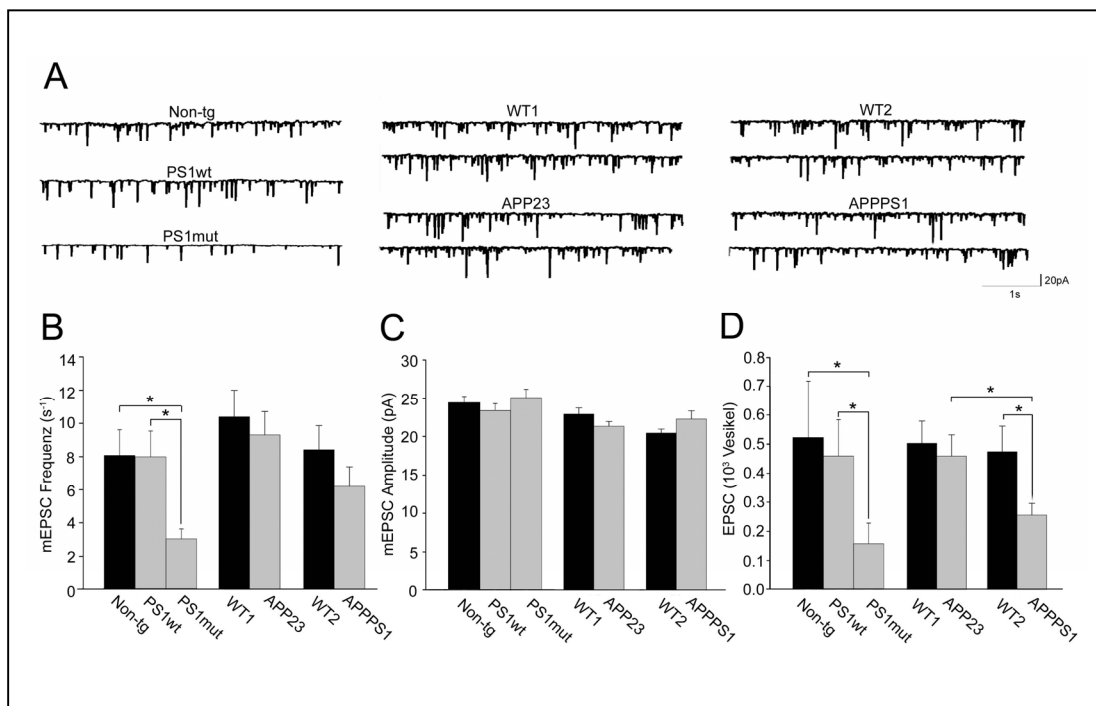


Abb. 24: Spontanaktivität

A, Aufzeichnung einiger mEPSCs der verschiedenen transgenen Linien. B, mEPSC-Frequenz von Non-tg (n = 22), PS1wt (n = 24), PS1mut (n = 30), sowie WT1 (n = 25), APP23 (n = 26), WT2 (n = 22) und APPPS1 (n = 26) Neuronen. C, mEPSC Amplitude von Non-tg (n = 22), PS1wt (n = 24), PS1mut (n = 30) sowie WT1 (n = 25), APP23 (n = 26), WT2 (n = 22) und APPPS1 (n = 26) Neuronen. E, Anzahl an Vesikel pro EPSC von Non-tg (n = 25), PS1wt (n = 23), PS1mut sowie WT1 (n = 23), APP23 (n = 24), WT2 (n = 12) und APPPS1 (n = 15) Neuronen. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 10 Mäusen pro Genotyp an 5 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; $*p < 0,05$.

3.2.2 Readily releasable pool und Freisetzungswahrscheinlichkeit

Die synaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit P_r ist abhängig von der Größe des RRP und der Freisetzungswahrscheinlichkeit der einzelnen Vesikel P_{vr} . Daher wurde zunächst die Größe des RRP der PS1 und/oder APP transgenen Neuronen untersucht (siehe Abb. 25A). Bei

der Bestimmung des RRP zeigten PS1mut Neuronen signifikant weniger freisetzungsbereite Vesikel in ihrem RRP als Non-tg und PS1wt Neurone ($24,7 \pm 5,6 \times 10^3$ bei Non-tg, $16,1 \pm 3,2 \times 10^3$ bei PS1wt und $8,1 \pm 2,1 \times 10^3$ bei PS1mut; $p < 0,05$; Abb. 25B). Keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an RRP Vesikel zeigten sich bei WT1 und APP23 Neuronen ($17,2 \pm 3,0 \times 10^3$ bei WT1 und $18,5 \pm 3,7 \times 10^3$ bei APP23, $p > 0,05$, Abb. 25B). APPPS1 Neurone hingegen wiesen signifikant weniger RRP Vesikel sowohl gegenüber WT2 als auch gegenüber APP23 Neuronen auf ($20,5 \pm 4,5 \times 10^3$ bei WT und $9,0 \pm 1,5 \times 10^3$ bei APPPS1, $p < 0,05$; Abb. 25B). Die Auffüllrate des RRP war bei den verschiedenen Genotypen nicht verändert ($0,57 \pm 0,05$ bei Non-tg, $0,55 \pm 0,02$ bei PS1wt, $0,57 \pm 0,04$ bei PS1mut, sowie $0,57 \pm 0,06$ bei WT1, $0,59 \pm 0,03$ bei APP23, $0,49 \pm 0,03$ bei WT2 und $0,55 \pm 0,03$ bei APPPS1 $p > 0,05$; Abb. 25C)

Bei der vesikulären Freisetzungswahrscheinlichkeit ergaben sich weder bei den PS1-transgenen ($4,24\% \pm 0,89\%$ bei Non-tg, $4,25\% \pm 0,67\%$ bei PS1wt und $4,41\% \pm 1,37\%$ bei PS1mut Zellen; $p > 0,05$; Abb. 25D) noch bei den APP-transgenen Neuronen ($3,15\% \pm 0,45\%$ bei WT1 und $3,04\% \pm 0,46\%$ bei APP23; $p > 0,05$; Abb. 25D) signifikante Unterschiede. Auch die APPPS1 doppeltransgenen Neurone ($3,27\% \pm 0,48\%$ bei WT2 und $3,81\% \pm 0,62\%$ bei APPPS1; $p > 0,05$; Abb. 25D) wiesen keine wesentlichen Unterschiede gegenüber WT2 *Littermates* auf.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die präsynaptischen Vesikel keinen Freisetzungsdefekt aufweisen und dass die reduzierte Amplitude stimulierter EPSCs bei PS1mut und APPPS1 Neuronen möglicherweise auf einen verringerten RRP zurückzuführen ist.

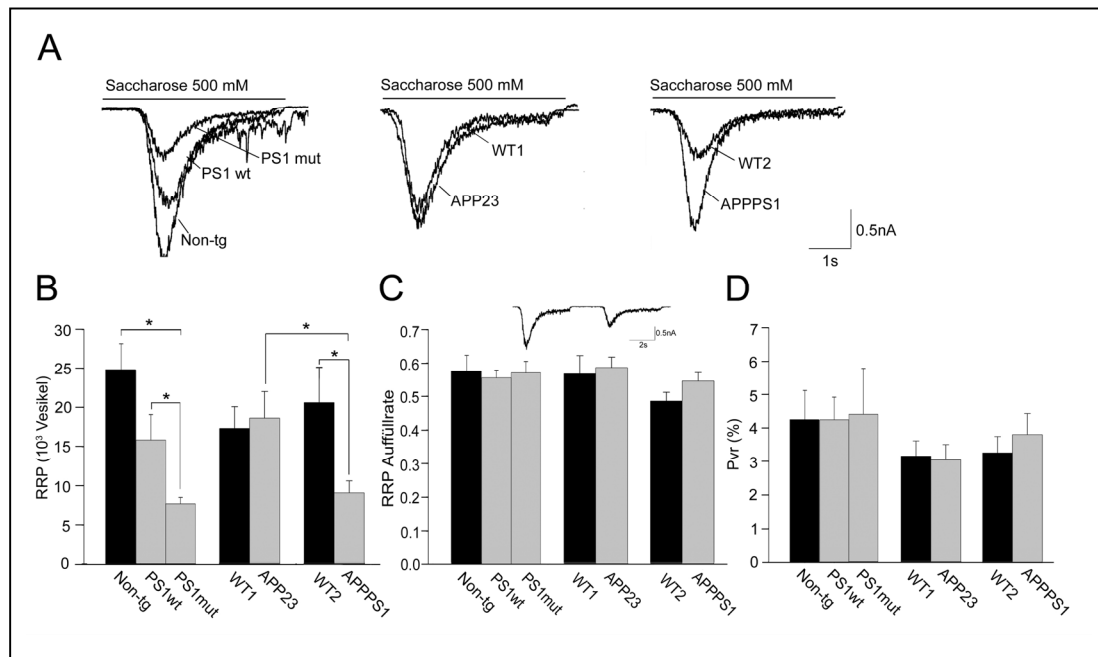


Abb. 25: RRP Größe, Auffüllrate und P_{vr}

A, Beispielhafte Saccharoseantwort der verschiedenen transgenen Linien. Saccharose wurde für 4 s appliziert, was durch den schwarzen Balken angezeigt wird. B, Anzahl Vesikel im RRP von Non-tg (n = 16), PS1wt (n = 13), PS1mut (n = 11) sowie WT1 (n = 20), APP23 (n = 17), WT2 (n = 13) und APPPS1 (n = 15) Neuronen. C, Auffüllrate des RRP von Non-tg (n = 17), PS1wt (n = 15), PS1mut (n = 16) sowie WT1 (n = 20), APP23 (n = 17), WT2 (n = 25) und APPPS1 (n = 25) Neuronen, dargestellt als Verhältnis der zweiten Saccharoseantwort zur ersten Antwort, die 3 s vorher gemessen wurde. Das Insert zeigt eine Beispielmessung. D, Durchschnittliche vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit (P_{vr}) von Non-tg (n = 9), PS1wt (n = 11), PS1mut (n = 8) sowie WT1 (n = 18) und APP23 (n = 13), sowie WT2 (n = 12) und APPPS1 (n = 15) Neuronen. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 8 Mäusen pro Genotyp an 4 unabhängig voneinander präparierten Kulturen: *p < 0,05.

3.2.3 Kurzzeitplastizität

Die Kurzzeitplastizität wurde, wie schon unter 3.1.3 beschrieben, anhand repetitiver Stimulation (Abb. 26A), Hochfrequenzstimulation (Abb. 26C) und Doppelpuls-Stimulation untersucht.

3.2.3.1 Prolongierte repetitive Stimulation und Hochfrequenzstimulation

Sowohl in Non-tg als auch in PS1wt und PS1mut Neuronen nahm die relative EPSC Amplitude (normalisiert auf die Amplitude des ersten EPSCs) kontinuierlich ab (Abb. 26B). Ähnlich verhielt es sich bei der Hochfrequenzstimulation (Abb. 26D). Es wurden keine

Unterschiede zwischen PS1wt, PS1mut und Non-tg Neuronen hinsichtlich prolongierter, repetitiver Stimulation und Hochfrequenzstimulation festgestellt.

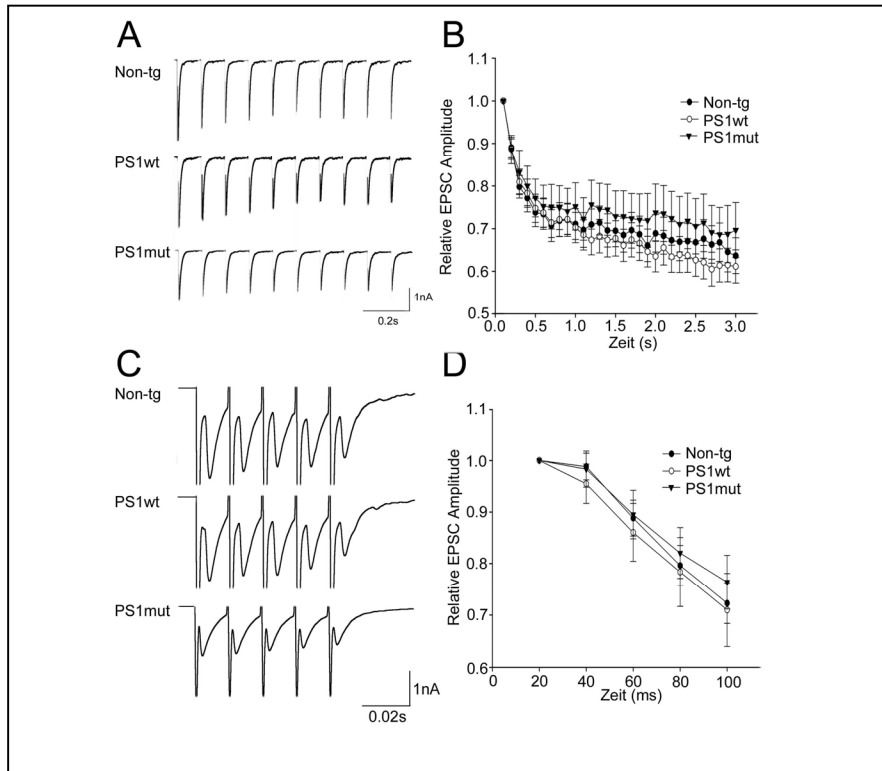


Abb. 26: PRS und HFS

A, Beispielhafte Darstellung der ersten 10 EPSCs einer 10 Hz Stimulation. B, Durchschnittliche EPSC-Amplitude von Non-tg (n = 16), PS1wt (n = 25) und PS1mut (n = 32) während einer 10 Hz Stimulation normalisiert auf die Amplitude des ersten EPSCs. C, Beispielhafte Darstellung der ersten fünf EPSCs einer 50 Hz Stimulation. D, Durchschnittliche EPSC-Amplitude von Non-tg (n = 21), PS1wt (n = 28) und PS1mut (n = 35) während einer 50 Hz Stimulation normalisiert auf die Amplitude des ersten EPSCs. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6-10 Mäusen pro Genotyp an 3-5 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.2.3.2 Doppelpuls-Stimulation

Veränderungen in der synaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit führen sehr häufig zu Änderungen der Kurzzeitplastizität. Dabei führt eine Abfolge von APs zur Verstärkung bei Synapsen mit niedriger und zur *Depression* bei Synapsen mit hoher initialer Freisetzungswahrscheinlichkeit. Die Untersuchung der Kurzzeitplastizität durch Doppelpuls-Stimulation (25-500 ms) und Bildung der Doppelpuls-Ratio (Verhältnis der Amplitude des zweiten EPSC zur Amplitude des ersten EPSC) der entsprechenden Genotypen ergab keine

Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der PPF bei niedrigem $[Ca^{2+}]_e$ (Abb. 27A, B) sowie der PPD bei 4 mM $[Ca^{2+}]_e$ (Abb. 27C, D).

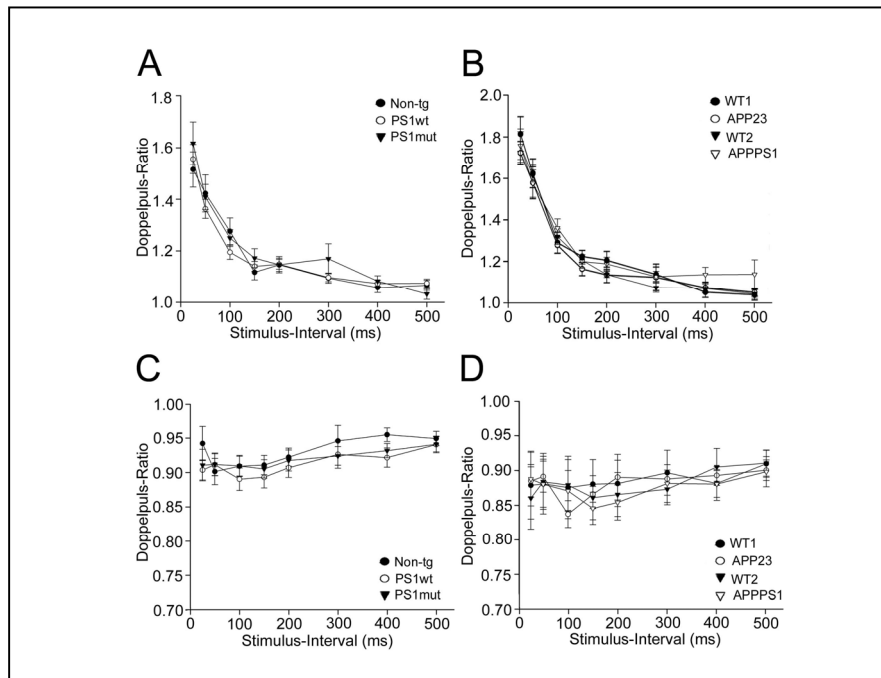


Abb. 27: Doppelpuls-Stimulation

A und B, Paired-pulse facilitation bei 1 mM $[Ca^{2+}]_e$: der Graph beschreibt das Doppelpuls-Ratio (Verhältnis der Amplitude vom zweiten zum ersten EPSC) als Funktion von 8 unterschiedlichen Stimulus-Intervallen bei Non-tg (n = 18), PS1wt (n = 24) und PS1mut (n = 40) Neuronen (A,) sowie WT1, APP23, WT2 und APPPS1 Neuronen (B). C und D, Paired-pulse depression bei 4 mM $[Ca^{2+}]_e$: der Graph beschreibt das Doppelpuls-Ratio (Verhältnis der Amplitude vom zweiten zum ersten EPSC) als Funktion von 8 unterschiedlichen Stimulus-Intervallen bei Non-tg (n = 12), PS1wt (n = 16) und PS1mut (n = 18) Neuronen (C) sowie sowie WT1, APP23, WT2 und APPPS1 Neuronen (D). Die Messungen erfolgten an jeweils 10 Mäusen von 5 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.2.4 Effekt von DAPT auf die stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung

Um herauszufinden, ob die unter 3.2.1 beobachtete Amplitudenreduktion stimulierter EPSCs bei PS1mut Neuronen durch γ -Sekretase Spaltprodukte ($A\beta$, AICD) verursacht wird, wurde der γ -Sekretaseblocker DAPT auf Kulturen von PS1mut Neuronen gegeben. PS1mut Neurone, die mit DAPT behandelt wurden, zeigten signifikant erhöhte Amplituden stimulierter EPSCs verglichen mit unbehandelten PS1mut Neuronen ($1,83 \pm 0,26$ nA bei

PS1mut und $2,65 \pm 0,28$ nA bei DAPT behandelte PS1mut Neurone, $*p < 0,05$; Abb. 28A). Ebenso war die Frequenz spontaner Ereignisse höher bei PS1mut Neuronen die mit γ -Sekretaseblocker behandelt wurden, als bei unbehandelten PS1mut Neuronen ($1,72 \pm 0,49$ s^{-1} bei PS1mut und $4,28 \pm 0,98$ s^{-1} bei mit DAPT behandelten PS1mut Neuronen, $*p < 0,05$; Abb. 28B). Der PS1mut Phänotyp ist also durch Blockade der γ -Sekretase reversibel, was auf einen Effekt von γ -Sekretasespaltprodukten auf die synaptische Übertragung, bzw. die Synapsendichte hinweist.

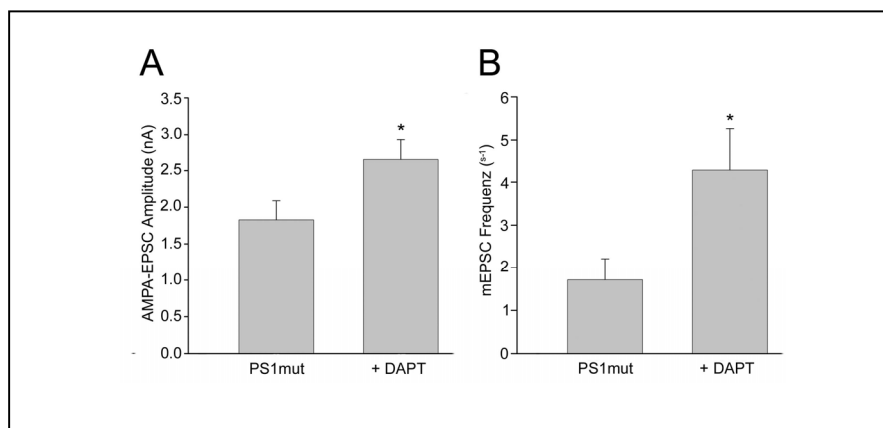


Abb. 28: Zugabe von DAPT zu PS1mut Neuronen

A, AMPA-EPSC-Amplitude von PS1mut Neuronen (n = 27) und von PS1mut Neuronen, die mit DAPT behandelt wurden (n = 25). B, mEPSC-Frequenz von PS1mut Neuronen (n = 22) und von PS1mut Neuronen, die mit DAPT behandelt wurden (n = 22). Die Messungen erfolgten an Neuronen von 6 Mäusen pro Genotyp an 3 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; $*p < 0,05$.

3.2.5 Effekt von $A\beta_{42}$ -Monomeren auf die stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung

Die Tatsache, dass die bei PS1mut beobachtete Amplitudenreduktion durch DAPT blockierbar ist, lässt auf eine Beteiligung von γ -Sekretasespaltprodukten, z.B. $A\beta$, schließen. Um dies genauer zu überprüfen, wurden FvB/N Wildtyp-Neurone mit $A\beta_{42}$ (100 nM) inkubiert und nach 2 Tagen gemessen. Es wurde in diesem Fall eine 10-fach höhere $A\beta_{42}$ -Konzentration als unter 3.1.5 beschrieben benutzt, da schon bei annähernd physiologischer Konzentration von 10 nM $A\beta_{42}$ bereits eine leichte Depression synaptischer AMPA-Ströme erkennbar war. Es sollte nun herausgefunden werden, ob sich dieser Effekt bei einer höheren $A\beta_{42}$ -Konzentration noch verstärken würde. Tatsächlich zeigten Non-tg Neurone, die mit

A β_{42} behandelt wurden eine 40%-ige Reduktion in der AMPA-EPSC Amplitude im Vergleich zu unbehandelten Non-tg Neuronen ($2,69 \pm 0,34$ nA bei Non-tg und $1,61 \pm 0,15$ nA bei A β_{42} -behandelten Non-tg Neuronen, * $p < 0,05$; Abb. 29A). Ebenso war die Frequenz der Spontanaktivität signifikant kleiner in Non-tg Neuronen, die mit A β_{42} behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Non-tg Neuronen ($4,98 \pm 1,4$ s $^{-1}$ bei Non-tg und $1,60 \pm 0,41$ s $^{-1}$ bei A β_{42} -behandelten Non-tg Neuronen, * $p < 0,05$; Abb. 29B).

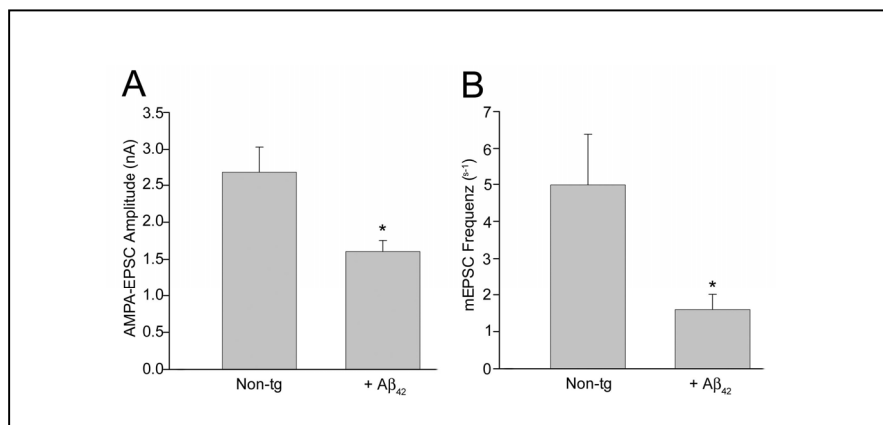


Abb. 29: Inkubation von Non-tg Neuronen mit A β_{42} -Monomeren

A, AMPA-EPSC-Amplitude von Non-tg Neuronen (n = 9) und von Non-tg Neuronen, die mit A β_{42} behandelt wurden (n = 11). B, mEPSC-Frequenz von Non-tg (n = 9) und von Non-tg Neuronen, die mit A β_{42} behandelt wurden (n = 10). Die Messungen erfolgten an Neuronen von 4 Mäusen pro Genotyp 2 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; * $p < 0,05$.

3.2.6 Synapsenanzahl

Da sich die verringerte Amplitude stimulierter EPSCs und der kleinere Saccharosepool bei PS1mut versus Non-tg und PS1wt Neuronen sowie APPPS1 gegenüber WT2 Neuronen bisher weder durch eine verringerte Anzahl postsynaptischer Rezeptoren, noch durch eine verringerte Freisetzungswahrscheinlichkeit erklären ließen, wurde die Synapsenanzahl untersucht. Dafür wurden die Kulturen mit Antikörpern gegen den präsynaptischen Marker Synaptophysin und gegen den dendritischen Marker MAP-2 gefärbt (Abb. 30A) und anschließend die Anzahl der Synapsen pro 10 μ m Dendrit bestimmt. PS1mut Neurone zeigten hierbei signifikant weniger Synaptophysin-positive Punkte pro 10 μ m Dendrit als PS1wt Zellen ($1,20 \pm 0,07$ bei PS1wt und $0,98 \pm 0,05$ bei PS1mut; * $p < 0,05$; Abb. 30B). Auch APPPS1 Neurone wiesen signifikant weniger Synapsen pro 10 μ m Dendrit als WT2 Neurone

auf ($1,37 \pm 0,11$ bei WT2 und $1,04 \pm 0,05$ bei APPS1; $*p < 0,05$; Abb. 30B). Dieser Befund stellt vermutlich die Ursache der verringerten Amplitude stimulierter EPSCs, des kleineren RRP's und der erniedrigten mEPSC-Frequenz in PS1mut und APPS1 Neuronen gegenüber den jeweiligen Kontrollen PS1wt bzw. WT2 dar.

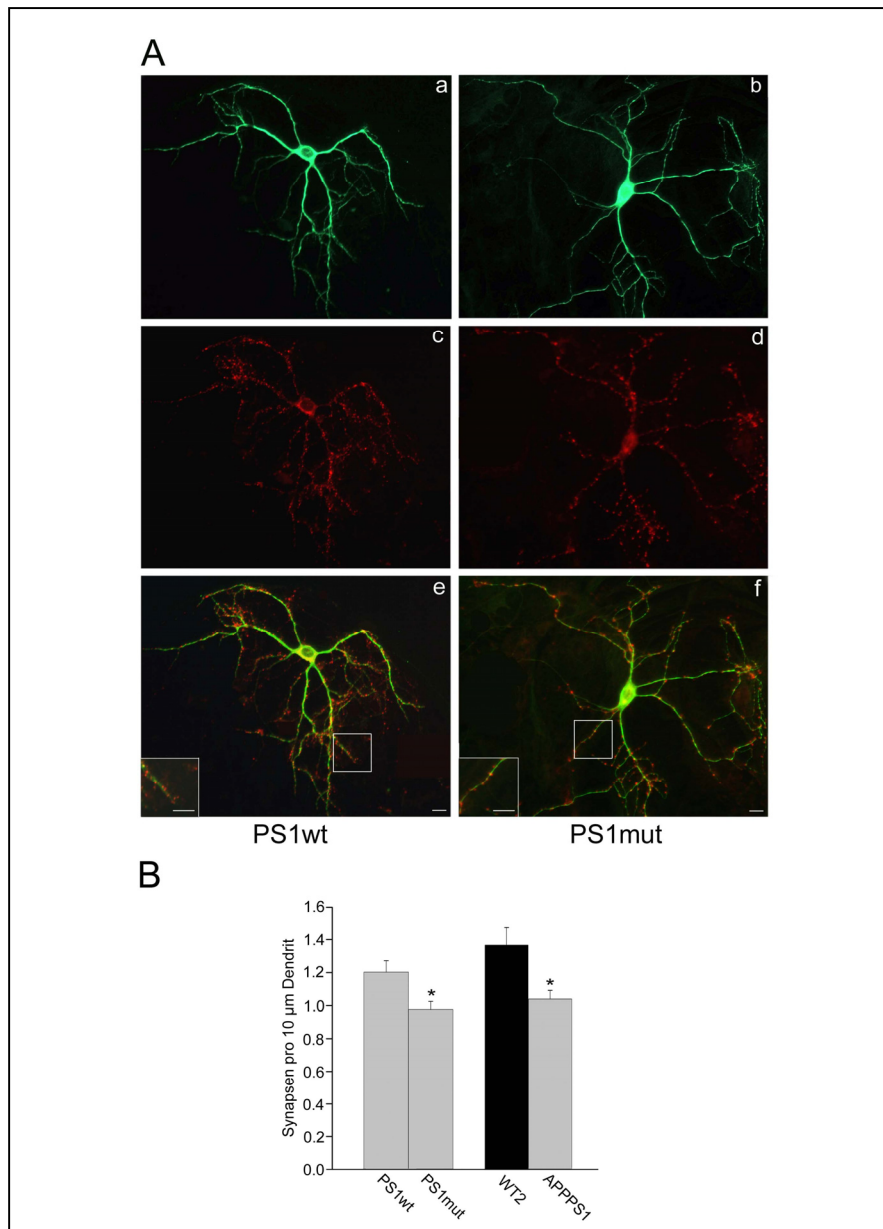


Abb. 30: Darstellung von Dendriten und Synapsen in autaptischen Kulturen

A, Immunfärbung eines autaptischen Neurons. Aa und Ab, Anti-MAP-2 Färbung zur Beurteilung der Größe des Dendritenbaums dargestellt am Beispiel von PS1wt und PS1mut Neuronen. Ac und Ad, Anti-Synaptophysin-Färbung der gleichen Zelle zur Bewertung der Synapsenanzahl. Ae und Af, Kombinierte Aufnahme einer anti-

MAP-2 und anti-Synaptophysin Färbung. Der Balken entspricht 25 μm . B, Anzahl Synapsen pro 10 μm Dendrit bei PS1wt (n = 56) und PS1mut (n = 63), sowie WT2 (n = 39) und APPPS1 (n = 39) Neuronen. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 8 Mäusen pro Genotyp an 4 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; *p < 0,05.

PS1wt Neurone verhalten sich ähnlich wie Non-tg Neurone. Dies macht deutlich, dass die beobachteten Unterschiede zu PS1mut Neuronen nicht auf die Einbringung des menschlichen Gens für PS1, sondern allein durch die Punktmutation im humanen PS1 bedingt sind. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Überexpression von mutiertem APP (APP23) nicht ausreicht, um den elektrophysiologischen Phänotyp zu induzieren. Vielmehr führt die Kombination mit der L199P PS1-Mutation zu den unter 3.2 beschriebenen Ergebnissen.

3.3 Akuteffekt von synthetischem A β ₄₂ auf die synaptische Übertragung

Laut der erstmals von Oda et al. (1994) aufgestellten Oligomer-Hypothese, sind weder A β -Monomere noch unlösliche Fibrillen, sondern lösliche A β -Oligomere (ADDLs) für die Neuronen- bzw. Synapsenschädigung bei der Alzheimer-Erkrankung verantwortlich (Oda et al., 1994; Oda et al., 1995). Untersuchungen von Demuro et al. (2005) zeigten bereits ca. 5 s nach Applikation von A β -Oligomeren einen raschen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Demuro et al., 2005). Die Freisetzung synaptischer Vesikel ist ebenfalls Ca^{2+} -abhängig. Daher sollte sich eine Änderung darin in einer Veränderung stimulierter EPSCs sowie in der Spontanaktivität zeigen. Bei den unter 3.2 erhaltenen Ergebnissen, die auf eine Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch A β schließen lassen, konnte nicht zwischen den einzelnen A β -Spezies unterschieden werden. Deswegen wurde untersucht, ob die externe Akutapplikation von diversen A β ₄₂-Formen (Monomere, Oligomere oder Fibrillen) in einer Konzentration von 1 μM Veränderungen in der Amplitude stimulierter EPSCs, der Spontanaktivität sowie der Kurzzeitplastizität hervorruft.

3.3.1 A β ₄₂-Monomere

A β ₄₂-Monomere unterscheiden sich bezüglich ihres Aggregationsverhaltens und ihrer Neurotoxizität wesentlich von A β ₄₀-Monomeren. Sie gelten als die eigentliche toxische Spezies (Zou et al., 2003).

3.3.1.1 Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung

Hierfür wurde nach Durchführung der Kontrollmessungen eine frisch hergestellte Lösung von A β ₄₂-Monomeren (1 μ M) über eine Pipette vor die zu messende Zelle appliziert. Nach der Zugabe wurden die Folgemessungen innerhalb von 2-5 min durchgeführt (Abb. 31A, C). Beim Vergleich der AMPA-EPSC-Amplituden zeigte sich kein Unterschied zwischen Messungen vor und nach A β ₄₂-Applikation ($1,98 \pm 0,47$ nA bei der Kontrolle und $1,78 \pm 0,45$ nA nach A β ₄₂-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 31B). Ähnlich verhielt es sich mit der Amplitude stimulierter NMDA-Ströme. Auch hier waren keinerlei Veränderungen der Amplitude erkennbar ($2,05 \pm 0,54$ nA bei der Kontrolle und $1,97 \pm 0,41$ nA nach A β ₄₂-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 31D).

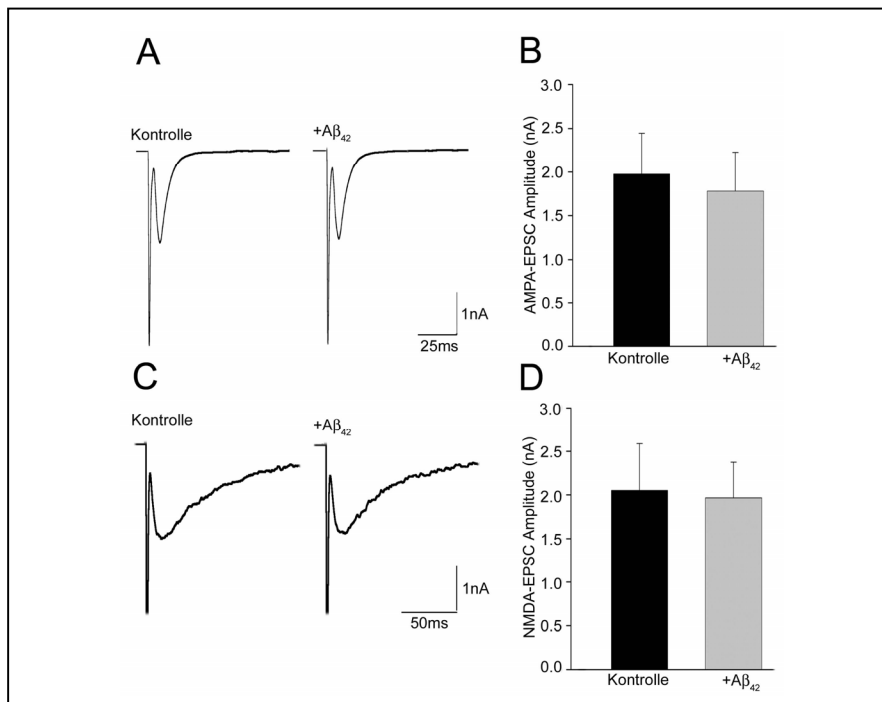


Abb. 31: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung

A, Typischer Verlauf eines AMPA-EPSCs vor und nach Applikation von A β ₄₂. B, AMPA-EPSC-Amplitude in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von A β ₄₂. C, Typischer Verlauf eines NMDA-EPSCs vor und nach Applikation von A β ₄₂. D, NMDA-EPSC-Amplitude in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von A β ₄₂ (n = 9). Die Messungen erfolgten mit 2 unterschiedlichen Monomerpräparationen an Neuronen von 4 Mäusen an 2 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.3.1.2 Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität

Für die Untersuchung der Spontanaktivität wurde diese über 3 min aufgezeichnet und nach 1 min die $A\beta_{42}$ -Monomere ($1 \mu\text{M}$), wie unter 3.3.1.1 beschrieben, appliziert (Abb. 32A). Hierbei konnte weder eine Veränderung in der Frequenz ($2,30 \pm 0,75 \text{ s}^{-1}$ bei der Kontrolle und $2,08 \pm 0,64 \text{ s}^{-1}$ nach $A\beta_{42}$ -Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 32B) noch in der Amplitude ($17,12 \pm 0,78 \text{ pA}$ bei der Kontrolle und $16,56 \pm 0,86 \text{ pA}$ nach $A\beta_{42}$ -Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 32C) der spontanen Ereignisse festgestellt werden. Auch die Doppelpuls-Stimulation mit einem Stimulus-Intervall von 50 (Abb. 32D) und 100 ms zeigte keinerlei Veränderungen nach Monomerapplikation ($0,55 \pm 0,08$ bei 50 ms und $0,61 \pm 0,08$ bei 100 ms Stimulus-Intervall bei der Kontrolle und $0,55 \pm 0,08$ bei 50 ms und $0,58 \pm 0,07$ bei 100 ms Stimulus-Intervall nach $A\beta_{42}$ -Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 32E).

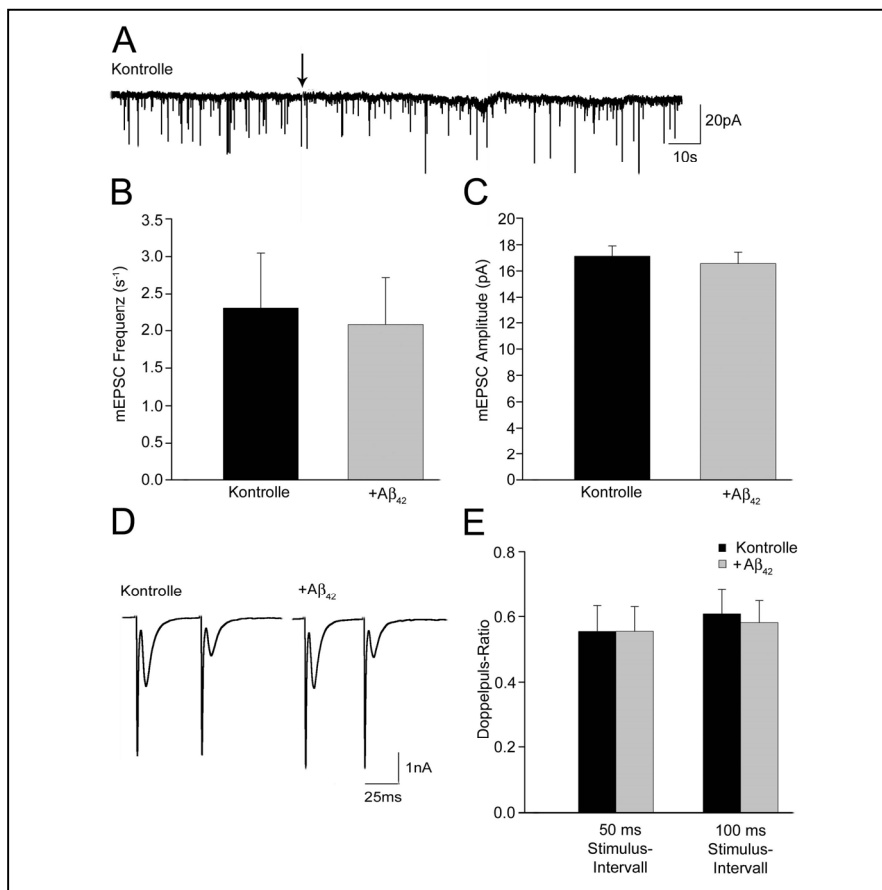


Abb. 32: Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität

A, Typischer Verlauf der Spontanaktivität mit $A\beta_{42}$ -Applikation nach 60 s (schwarzer Pfeil). B, mEPSC-Frequenz in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von $A\beta_{42}$ ($n = 9$). C, mEPSC-Amplitude in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von $A\beta_{42}$ ($n = 9$). D, Beispiel einer Doppelpuls-Stimulation (50 ms Stimulus-

Intervall) vor (Kontrolle) und nach $A\beta_{42}$ -Zugabe. E, Doppelpuls-Stimulation von AMPA-Strömen in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von $A\beta_{42}$ (n =8). Die Messungen erfolgten mit 2 unterschiedlichen Monomerpräparationen an Neuronen von 4 Mäusen an 2 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.3.2 $A\beta_{42}$ -Oligomere

Zunächst wurde die Oligomerisierung der $A\beta_{42}$ - Monomere mittels Western Blot überprüft (siehe 2.6.4). Dabei zeigte sich, dass bei dieser Art der Oligomerherstellung (Klein, 2002; Stine, Jr. et al., 2003) hauptsächlich niedermolekulare $A\beta_{42}$ -Di-, Tri- und Tetramere gebildet werden (Abb. 33).

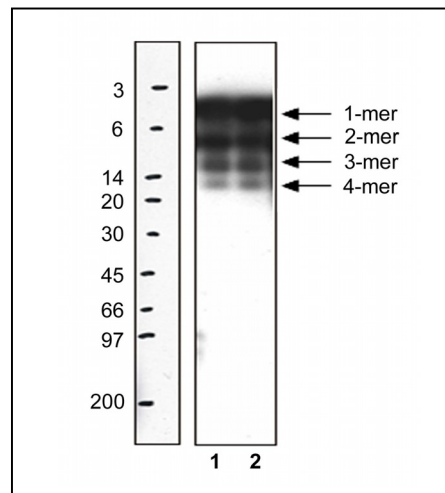


Abb. 33: Detektion von $A\beta_{42}$ -Oligomeren mittels Western Blot

Dargestellt sind die Banden von zwei unterschiedlichen Oligomer-Präparationen (Spur 1 und 2) unter Verwendung des 6E10 anti- $A\beta_{1-17}$ -Antikörpers und Detektion durch Chemilumineszenz.

3.3.2.1 Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung

Die Applikation der ADDLs erfolgte auf die gleiche Weise wie die der Monomere unter Beibehaltung des Messprotokolls (beispielhafter EPSC-Verlauf siehe Abb. 34A, C). Hierbei konnten keine Unterschiede in der Amplitude stimulierter AMPA-EPSCs ($2,69 \pm 0,44$ nA bei der Kontrolle und $2,78 \pm 0,47$ nA nach ADDL-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 34B) und NMDA-Ströme ($2,31 \pm 0,33$ nA bei der Kontrolle und $2,23 \pm 0,38$ nA nach ADDL-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 34D) festgestellt werden.

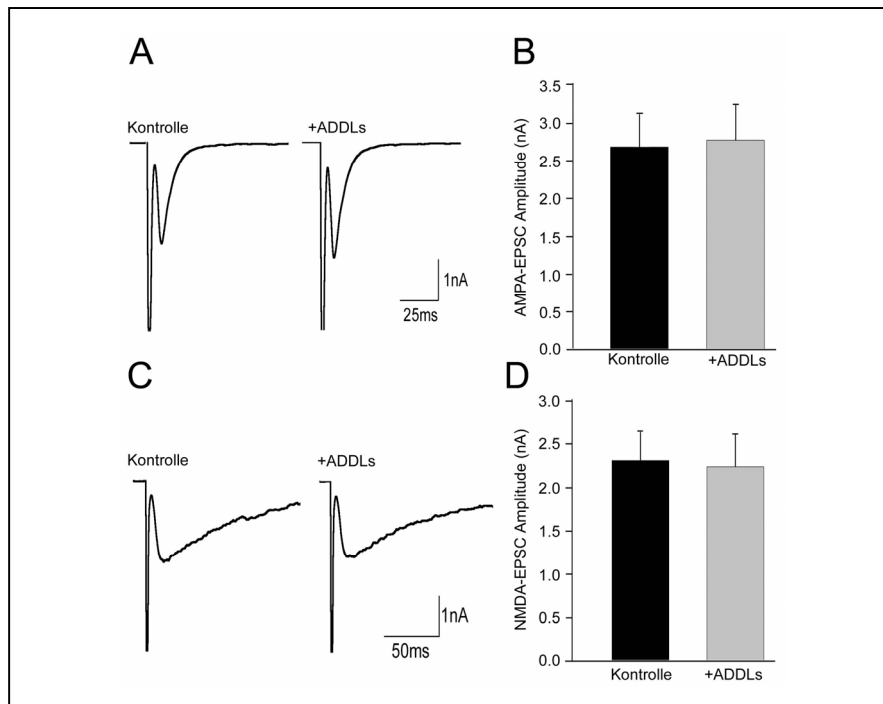


Abb. 34: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung

A, Typischer Verlauf eines AMPA-EPSCs vor und nach Applikation von ADDLs. B, AMPA-EPSC-Amplitude in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von ADDLs ($n = 30$). C, Typischer Verlauf eines NMDA-EPSCs vor und nach Applikation von ADDLs. D, NMDA-EPSC-Amplitude in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von ADDLs ($n = 14$). Die Messungen erfolgten mit 3 unterschiedlichen Oligomerpräparationen an Neuronen von 6 Mäusen an 3 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.3.2.2 Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität

Aus der Untersuchung der Spontanaktivität (siehe Abb. 35A) ergaben sich ebenso keine Unterschiede in der Frequenz ($4,28 \pm 1,18 \text{ s}^{-1}$ bei der Kontrolle und $4,07 \pm 1,14 \text{ s}^{-1}$ nach ADDL-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 35B) und der Amplitude ($18,76 \pm 0,68 \text{ pA}$ bei der Kontrolle und $17,92 \pm 0,59 \text{ pA}$ nach ADDL-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 35C) der spontanen Ereignisse. Ebenso zeigten sich bei der Untersuchung der Kurzzeitplastizität (beispielhafter Verlauf siehe Abb. 35D) keine Veränderungen nach ADDL-Applikation ($0,89 \pm 0,02$ bei 50 ms und $0,85 \pm 0,04$ bei 100 ms Stimulus-Intervall bei der Kontrolle und $0,85 \pm 0,02$ bei 50 ms und $0,83 \pm 0,04$ bei 100 ms Stimulus-Intervall nach ADDL-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 35E).

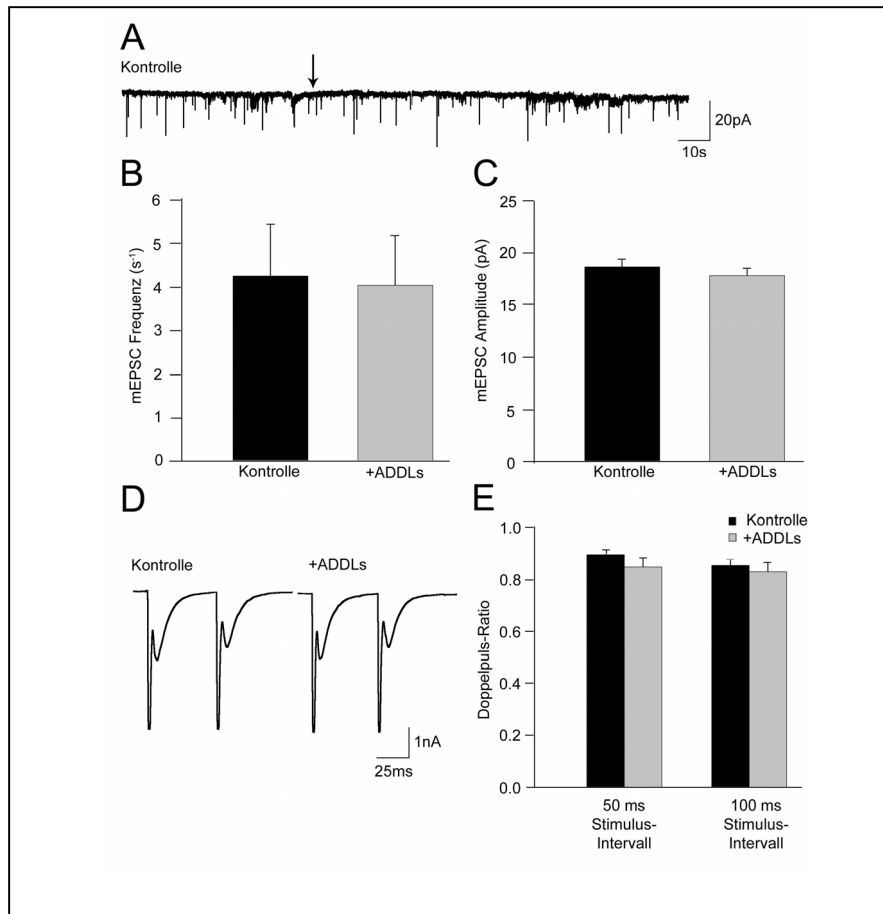


Abb. 35: Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität

A, Typischer Verlauf der Spontanaktivität mit ADDL Applikation nach 60s (schwarzer Pfeil). B, mEPSC-Frequenz in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von ADDLs (n = 27). C, mEPSC Amplitude in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von ADDLs (n = 27). D, Beispiel einer Doppelpuls-Stimulation (50 ms Stimulus-Intervall) in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von ADDLs. E, Doppelpuls-Stimulation von AMPA-Strömen in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von ADDLs (n = 21). Die Messungen erfolgten mit 3 unterschiedlichen Oligomerpräparationen an Neuronen von 6 Mäusen an 3 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.3.3 A β ₄₂-Fibrillen

A β -Fibrillen galten lange Zeit als ursächlich toxische Spezies (Lorenzo and Yankner, 1994; Pike et al., 1991; Pike et al., 1993). Neuere Untersuchungen weisen ihnen jedoch nur noch geringe Bedeutung bei der A β vermittelten Toxizität zu (Demuro et al., 2005).

3.3.3.1 Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung

Die Applikation der A β -Fibrillen (1 μ M) (Abb. 36A) hatte keinen Einfluss auf die AMPA-vermittelte EPSC-Amplitude ($3,55 \pm 0,44$ nA bei der Kontrolle und $3,49 \pm 0,43$ nA nach Fibrillen-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 36B).

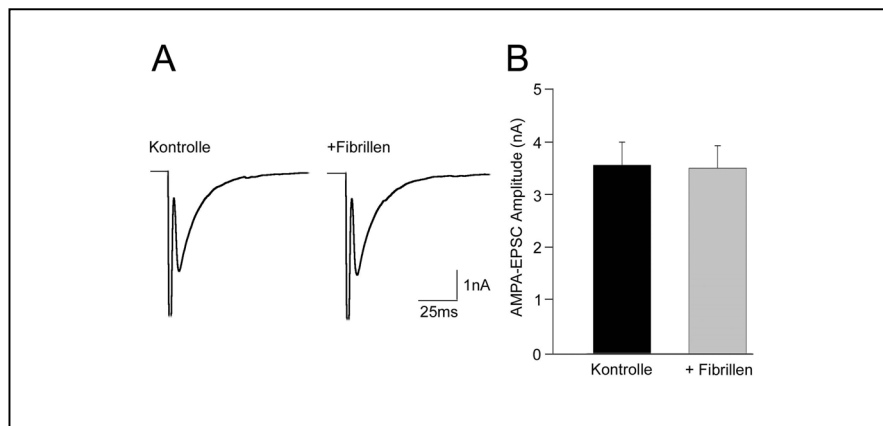


Abb. 36: Stimulierte Neurotransmitterfreisetzung

Typischer Verlauf eines AMPA-EPSCs vor und nach Applikation von Fibrillen. B, AMPA-EPSC-Amplitude in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von Fibrillen ($n = 17$). Die Messungen erfolgten mit 2 unterschiedlichen Fibrillenpräparationen an Neuronen von 4 Mäusen an 2 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

3.3.3.2 Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität

Bei der Analyse der Spontanaktivität (Abb. 37A) konnten weder in der Frequenz ($3,78 \pm 1,13$ s^{-1} bei der Kontrolle und $3,89 \pm 0,84$ s^{-1} nach Fibrillen-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 37B) noch in der Amplitude ($19,15 \pm 0,67$ pA bei der Kontrolle und $18,45 \pm 0,58$ pA nach Fibrillen-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 37C) Unterschiede, vor und nach Fibrillen-Zugabe beobachtet werden. Auch die Doppelpuls-Stimulation (Abb. 37D) zeigte keinerlei Veränderungen nach Fibrillen-Applikation ($0,82 \pm 0,02$ bei 50 ms und $0,75 \pm 0,04$ bei 100 ms Stimulus-Intervall bei der Kontrolle und $0,83 \pm 0,02$ bei 50 ms und $0,79 \pm 0,04$ bei 100 ms Stimulus-Intervall nach Fibrillen-Zugabe, $p > 0,05$; Abb. 37E).

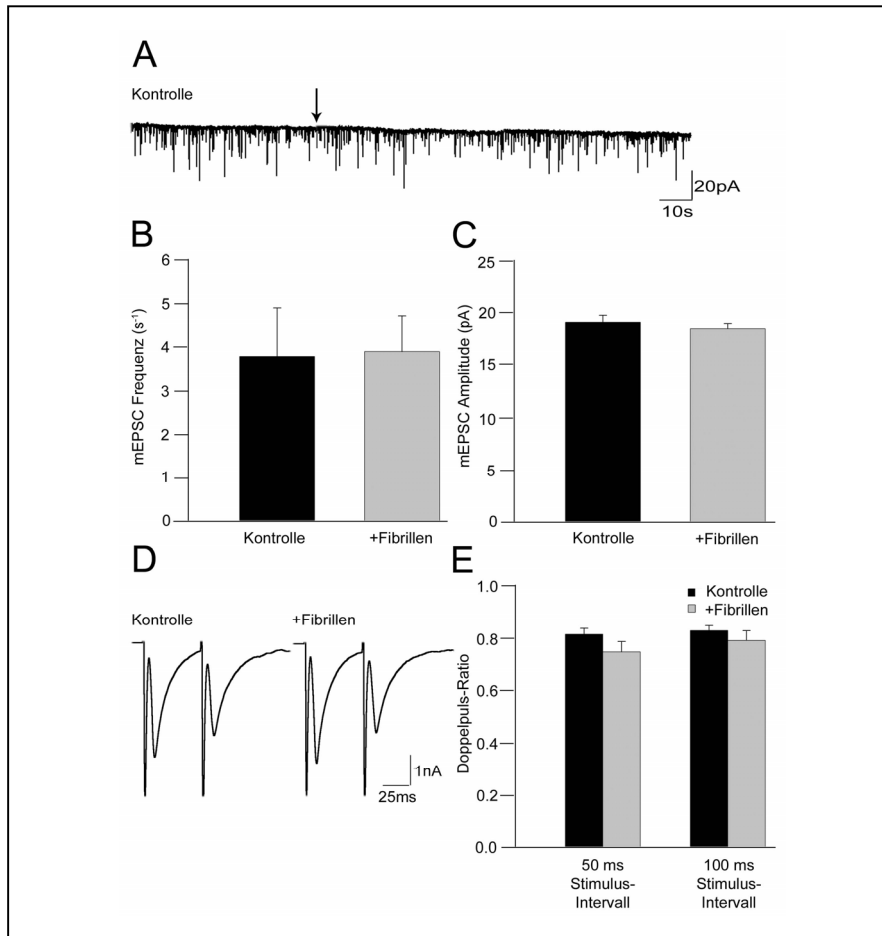


Abb. 37: Spontane Neurotransmitterfreisetzung und Kurzzeitplastizität

A, Typischer Verlauf der Spontanaktivität mit Fibrillen-Applikation nach 60 s (schwarzer Pfeil). B, mEPSC-Frequenz in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von Fibrillen (n = 21). C, mEPSC-Amplitude in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von Fibrillen (n = 21). D, Beispiel einer Doppelpuls-Stimulation (50 Stimulus-Intervall) in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von Fibrillen. E, Doppelpuls-Stimulation von AMPA-Strömen in Neuronen vor (Kontrolle) und nach Zugabe von Fibrillen (n = 21). Die Messungen erfolgten mit 2 unterschiedlichen Fibrillenpräparationen an Neuronen von 4 Mäusen an 2 unabhängig voneinander präparierten Kulturen.

Die Akutapplikation von A β ₄₂ in mono-, oligomerer und fibrillärer Form scheint somit zunächst keinen Einfluss auf die stimulierte und spontane synaptische Übertragung zu besitzen. Mögliche Ursachen dafür sollen in der Diskussion unter 4.3 erörtert werden.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Diskussion gliedert sich in vier Teile. Zunächst sollen die Ergebnisse der Untersuchung der APP-Knockout-Maus im Hinblick einer möglichen physiologischen Funktion von APP-Spaltprodukten an der Synapse diskutiert werden. Anschließend soll anhand der Ergebnisse der Untersuchung von transgenen Tiermodellen des Morbus Alzheimers erörtert werden, ob diese Funktion von APP Spaltprodukten durch Mutationen im APP- bzw. PS1-Gen modifiziert wird. Im dritten Teil dieses Kapitels sollen die Experimente diskutiert werden, deren Ziel die Überprüfung war, wie schnell A β die synaptische Übertragung moduliert und ob der durch A β vermittelte Effekt abhängig von dessen Aggregationszustand ist. Der letzte Teil beschäftigt sich mit der Relevanz der erhobenen Befunde für das Verständnis der Ursachen und der Therapie des Morbus Alzheimer.

4.1 Auswirkungen des Verlustes des Amyloid Precursor Proteins auf die synaptische Übertragung

In den elektrophysiologischen Untersuchungen an kultivierten, autaptischen APP-Knockout-Neuronen konnte eine gesteigerte synaptische Übertragung gezeigt werden. Sowohl die Amplitude stimulierter EPSCs als auch die Frequenz ihrer Spontanaktivität waren erhöht. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen ergab sich ein vergrößerter Pool fusionskompetenter synaptischer Vesikel bei gleich bleibender synaptischer und vesikulärer Freisetzungswahrscheinlichkeit. Die quantitativen immunhistochemischen Untersuchungen kultivierter, autaptischer Neurone und der Hirnschnitte von 3 Wochen alten Tieren deuten darauf hin, dass die oben beschriebenen elektrophysiologischen Beobachtungen sehr wahrscheinlich auf eine Erhöhung der Anzahl funktioneller Synapsen pro Neuron zurückzuführen sind. Ein gesteigertes Neuriten- und Dendritenwachstum und eine dadurch bedingte vermehrte Synapsenbildung könnte auch erklären, warum APP-Knockout-Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit und Toxizität gegenüber dem Neurotransmitter Glutamat aufweisen (Steinbach et al., 1998).

Ältere Tiere (11 Monate) zeigten keine vermehrte Synapsenausbildung. Auch frühere Studien (Heber et al., 2000; Phinney et al., 1999; Seabrook et al., 1999b) haben keine Hinweise einer verstärkten Synapsendichte bei adulten APP-Knockout-Mäusen gezeigt. Ferner haben konventionelle elektrophysiologische Messungen mit scharfen Elektroden am Hirnschnitt

adulter Tiere keine Auffälligkeiten gezeigt, bis auf eine Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung (Dawson et al., 1999; Seabrook et al., 1999a).

Was können die Ursachen dafür sein, dass der Verlust von APP nur die Synapsenanzahl in jungen, jedoch nicht in adulten Tieren beeinflusst? Prinzipiell kommen zwei Mechanismen in Frage: Entweder beschleunigt der Verlust von APP die Synapsenbildung in den ersten Tagen der Entwicklung und normalisiert sich danach, oder es besteht eine generell erhöhte Ausbildung von Synapsen in APP-Knockout Tieren, die durch eine gesteigerte Synapsenelimination in der weiteren Entwicklung kompensiert wird. Die erste Möglichkeit ist zwar nicht auszuschließen, jedoch nicht sehr wahrscheinlich. Die Synapsenbildung in autaptischen Kulturen erreicht normalerweise während der zweiten bis dritten Woche in Kultur ein Plateau (Zhang and Benson, 2001), die Messungen erfolgten jedoch zwischen Tag 18 und 21, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Phase der vermehrten Synapsenbildung im Wesentlichen abgeschlossen ist. Somit ist es wahrscheinlicher, dass es zu einer generell gesteigerten Bildung von Synapsen kommt, diese jedoch im weiteren Verlauf der Entwicklung wieder ausgeglichen wird durch eine verstärkte Eliminierung.

Welche Domäne des APP bzw. der Verlust welcher Domäne kann verantwortlich sein für die erhöhte Synapsendichte bei APP-Knockout Tieren? Eine kürzlich durchgeführte elektrophysiologische Studie an kultivierten Neuronen von PS1-Knockout Mäusen führte zu Ergebnissen, die den unseren sehr ähnlich sind. Auch hier wurde eine erhöhte Frequenz spontaner Ereignisse sowie eine vermehrte Synapsenbildung beobachtet (Parent et al., 2005). PS1 ist ein essentieller Bestandteil des γ -Sekretase-Komplexes und an der Spaltung von APP und der Bildung von A β beteiligt. Denkbar wäre, dass die elektrophysiologischen Befunde an APP-Knockout-Neuronen auf den Verlust von APP-Spaltprodukten, genauer gesagt A β oder der APP-intrazellulären Domäne zurückzuführen sind. In 3.1.4 wurde gezeigt, dass eine Blockade der γ -Sekretase und somit auch der Bildung von APP-Spaltprodukten durch DAPT bei Wildtyp-Neuronen ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung, sowohl der Amplitude stimulierter EPSCs, als auch der Frequenz spontaner Ereignisse führte. Es ist somit möglich, den APP-Knockout Phänotyp durch Gabe von DAPT zu Wildtyp-Zellen zu imitieren. Ob dafür die intrazelluläre Domäne von APP oder intra- bzw. extrazelluläres A β verantwortlich sind, kann nicht definitiv geklärt werden. Eine Beteiligung von AICD an der Ausprägung des APP-Knockout Phänotyps erscheint jedoch als nicht sehr wahrscheinlich, da AICD auch in

APP-Knockout-Neuronen vorhanden ist. Es existieren nämlich zwei weitere Proteine in APP-Knockout-Neuronen, die dem APP sehr ähnlich sind, das Amyloid precursor like protein (APLP) 1 und 2. Diese Proteine werden ebenfalls von der γ -Sekretase gespalten und führen zur AICD-Bildung. Ihnen fehlt jedoch die A β -Domäne (Slunt et al., 1994; Wasco et al., 1992; Wasco et al., 1993). Eine Beteiligung von A β -Peptiden hingegen ist sehr viel wahrscheinlicher. Um dies experimentell zu prüfen, wurden synthetische A β -Monomere in physiologischer Konzentration (10 nm) auf APP-Knockout Kulturen appliziert. Tatsächlich zeigte sich durch extrazellulär appliziertes A β eine Reduktion der Amplitude stimulierter EPSCs und der Frequenz spontaner Ereignisse. Dieser Unterschied war jedoch im Gegensatz zum signifikanten Effekt, den die Applikation von DAPT auf Wildtyp-Kulturen zeigte, nicht signifikant. Dies könnte einerseits daran liegen, dass DAPT den γ -Sekretasekomplex und somit die A β -Bildung komplett inhibiert, so dass A β überhaupt nicht sezerniert werden und somit auch nicht an der Synapse wirksam sein konnte. Andererseits war bei der externen A β -Applikation (10 nM) die an der synaptischen Plasmamembran vorhandene Menge an A β vermutlich zu gering, um signifikante Effekte zu zeigen.

Somit deuten diese Resultate auf eine wichtige physiologische Bedeutung von A β bei der Modulierung der Synapsenbildung und -funktion hin. Diese These findet immer stärkere Unterstützung. Zum Beispiel wurde vor kurzem gezeigt, dass eine APP-Überexpression in hippocampalen Hirnschnitten zu einer Unterdrückung sowohl von AMPA- als auch von NMDA-medierten synaptischen Strömen, sowie zu einer Reduktion der Frequenz spontaner Ereignisse führte. Bei der Expression von Konstrukten mit mutiertem APP, die kein A β bilden konnten, war dieser Effekt nicht zu beobachten (Kamenetz et al., 2003). Weiterhin zeigten Kamenetz et al. dass die Bildung und Sezernierung von A β abhängig von der neuronalen Aktivität ist. Eine hohe neuronale Aktivität bewirkt eine vermehrte β -Sekretasespaltung von APP und die Bildung von β -CTF, welches als Substrat der γ -Sekretase dient und zu einer vermehrten A β -Bildung führt. Die erhöhte A β -Bildung wiederum unterdrückt die synaptische Übertragung, wodurch die neuronale Aktivität reduziert wird. Somit wäre es möglich, dass die physiologische Funktion von A β in einem negativen Feedback-Mechanismus liegt (Kamenetz et al., 2003).

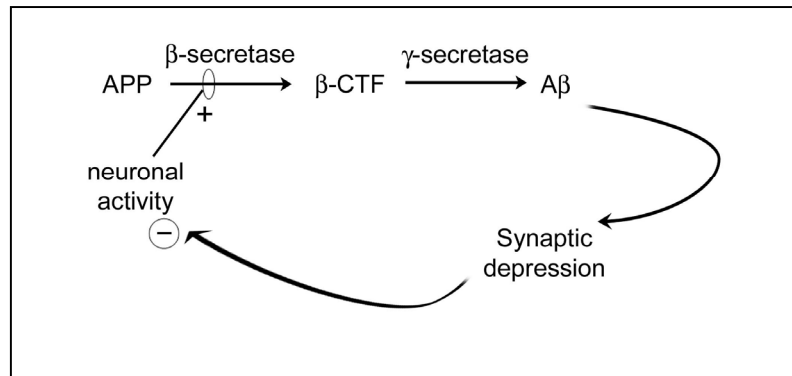


Abb. 38: Möglicher Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und APP-Prozessierung

Die neuronale Aktivität reguliert die β -Sekretasespaltung von APP. Die Bildung von A β führt zur Depression der synaptischen Übertragung, welche über einen negativen Rückkoppelungsmechanismus die neuronale Aktivität reguliert (Kamenetz et al. 2003).

Die Mechanismen, über die A β das Neuriten- bzw. Dendritenwachstum und die Anzahl funktioneller Synapsen moduliert, werden in weiteren Untersuchungen zu klären sein. Ein möglicher Mechanismus könnte in der Modulation von Ionenkanälen der Zellmembran durch A β liegen. So konnten Ramsden et al. einen erhöhten Ca^{2+} und K^{+} -Einstrom in Kortexneurone nach Inkubation mit löslichem A β zeigen (Ramsden et al., 2001; Ramsden et al., 2002). Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase könnten sich somit auf das Neuriten- und Dendritenwachstum sowie die Synapsenbildung auswirken (Fink et al., 2003; Williams et al., 1992). Es wurde außerdem gezeigt, dass z.B. auch die Beweglichkeit von dendritischen Filopodien durch Ca^{2+} Influx moduliert wird (Matus, 2000; Yuste et al., 2000).

4.2. Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch PS1- bzw. APP-Mutationen

Mutationen im PS1 stellen die häufigste Ursache familiär bedingter Alzheimer-Fälle dar und besitzen eine Penetranz von 100%. Sie führen zu einem sehr frühen (40-60 Jahre) Erkrankungsbeginn und sind gekennzeichnet durch eine erhöhte A β ₄₂-Produktion (Hardy, 1997; Murayama et al., 1999).

Die Untersuchung hippocampaler Primärzellkulturen von Mäusen, die humanes PS1 mit der A246E Mutation aufweisen, hat gezeigt, dass die synaptische Übertragung in diesen Neuronen signifikant vermindert ist. Sowohl die Amplitude stimulierter EPSCs als auch die Frequenz spontaner Ereignisse war verringert. Diesen Ergebnissen entsprechend, zeigte sich eine reduzierte Anzahl an Vesikel im RRP, die sich durch die immunhistochemisch nachgewiesene, reduzierte Synapsenanzahl erklären ließ.

Diese Daten sprechen für eine wichtige Rolle von A β bei der synaptischen Übertragung und unterstützen die Ergebnisse aus der Untersuchung der APP-Knockout-Mäuse, bei denen eine erhöhte synaptische Übertragung und eine gesteigerte Synapsenbildung, vermutlich bedingt durch den Verlust von A β , zu beobachten war (3.1). Nicht im Einklang mit diesen Resultaten stehen die Ergebnisse aus der Untersuchung der Mäuse mit der schwedischen Doppelmutation (APP23). Bei diesen Tieren konnten keine Veränderungen der synaptischen Übertragung festgestellt werden. Weder in der Amplitude stimulierter EPSCs noch in der Frequenz und Amplitude spontaner Ereignisse zeigten sich Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Auch die Größe des RRP und die Kurzzeitplastizität waren unverändert. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass allein A β ₄₂ für die unter 3.2 beschriebenen Effekte verantwortlich ist. So ist bekannt, dass es bei der schwedischen APP-Mutation lediglich zu einer Erhöhung der Gesamtkonzentration von A β -Peptiden bei gleich bleibendem Verhältnis von A β ₄₀ zu A β ₄₂ kommt (Storey and Cappai, 1999). Zou et al. zeigten eine neuroprotektive Wirkung von A β ₄₀-Peptiden gegenüber A β ₄₂-induzierter Toxizität (Zou et al., 2003). Es wäre somit möglich, dass bei der APP23-Linie die A β ₄₂-Wirkung durch A β ₄₀ abgeschwächt wird.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen fanden auch Chapman et al. sowie Roder et al. bei der Untersuchung von Hirnschnitt-Präparationen keine Veränderungen der basalen synaptischen Übertragung im Hippocampus von jungen Mäusen mit der schwedischen Doppelmutation (Chapman et al., 1999; Roder et al., 2003).

Die Untersuchung von Mäusen mit der schwedischen APP-Doppelmutation und der L166P PS1-Mutation zeigte wiederum eine deutliche Beeinträchtigung der synaptischen Übertragung. Sowohl die Amplitude stimulierter EPSCs als auch die Frequenz spontaner Ereignisse war signifikant verringert gegenüber Wildtyp-Littermate Kontrollen und ebenso beim Vergleich mit Neuronen der APP23-Linie. Bei APPPS1 Neuronen wies der RRP wesentlich weniger Vesikel auf als bei Wildtyp-Kontrollen bzw. APP23 Neuronen, was wiederum durch die verringerte Synapsenanzahl von APPPS1 Neuronen erklärt werden konnte. APPPS1 Neurone zeigen somit den gleichen Phänotyp wie PS1mut Neurone. Entgegen unseren Erwartungen zeigte sich kein stärkerer Effekt der doppeltransgenen Linie. Dies könnte daran liegen, dass der durch die PS1-Mutation bedingte Effekt auf die synaptische Übertragung bereits maximal war und die zusätzliche APP-Mutation somit keine weitere Auswirkung mehr hatte.

Die unter 3.2 und 3.3 beschriebenen Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von A β bei der Regulation der Synapsendichte hin. Die Tatsache, dass die Inkubation von Wildtyp-Neuronen mit A β_{42} -Monomeren (100 nM) den gleichen Phänotyp zeigte wie Neurone von Mäusen mit der PS1-Mutation, lässt vermuten, dass A β die Synapsenanzahl entweder durch Hemmung der Ausbildung neuer oder durch Abbau bestehender Synapsen moduliert. Es ist jedoch möglich, dass die Mechanismen, die zu einer Synapsenreduktion führen, Zwischenschritte einer verringerten Rezeptorexpression einschließen (Lichtman and Colman, 2000). So bekannt ist, dass die Ausbildung und das Remodelling von Synapsen zumindest teilweise von der Aktivierung exzitatorischer glutamaterger Rezeptoren abhängt (Cohen-Cory, 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass lösliches A β bereits innerhalb einer Stunde die molekulare Zusammensetzung glutamaterger Synapsen verändert (Almeida et al., 2005; Roselli et al., 2005). Somit wäre es möglich, dass die reduzierte Synapsenanzahl bei PS1mut und APPPS1 Neuronen, bei denen A β_{42} über einen Zeitraum von fast drei Wochen akkumulierte, ebenfalls durch lösliches A β bedingt ist.

PS1-Mutationen führen neben einer vermehrten A β_{42} -Bildung auch zu einer reduzierten Produktion der APP-intrazellulären Domäne (Chen et al., 2002; Moehlmann et al., 2002). Somit könnte auch eine geringere AICD Konzentration für den beobachteten PS1-Phänotyp verantwortlich sein. Da jedoch die 48 h Inkubation von Wildtyp-Neuronen mit synthetischen A β_{42} Monomeren (100 nM) die gleichen Effekte erzielte wie die Expression von mutiertem

PS1, wird die Hypothese favorisiert, dass die gesteigerte A β ₄₂-Bildung eine entscheidende Funktion an Synapsen einnimmt. Diese Hypothese wird auch von anderen Arbeitsgruppen durch vielfältige experimentelle Ansätze unterstützt, wie z.B. durch direkte Applikation löslicher A β -Peptide (Snyder et al., 2005), durch Untersuchung transgener Mäuse mit hoher A β ₄₂ Produktion (Chang et al., 2006), oder von APP-transfizierten Neuronen (Kamenetz et al., 2003). Diese Studien legen die Vermutung nahe, dass die Funktion exzitatorischer Synapsen durch lösliches A β moduliert wird. Im Gegensatz zur Arbeit von Chang et al. ergab die Untersuchung autaptischer hippocampaler Neurone mit der PS1 A246E oder L166P Mutation, ebenso wie die Studie von Kamenetz et al. an transfizierten Hirnschnitt-Präparationen, keine Hinweise auf eine direkte Funktionsänderung glutamaterger, postsynaptischer Rezeptoren (Chang et al., 2006; Kamenetz et al., 2003). PS1-Mutationen haben jedoch nicht nur einen Effekt auf die APP-Prozessierung, sie führen z. B. auch zu einer vermehrten Aktivierung der GSK3 β und einem damit verbundenen verminderten anterograden axonalen Transport (Pigino et al., 2001). Die reduzierte Anzahl an Synapsen bei den PS1-Mutationen könnte somit auch das Resultat eines verringerten Transports synaptischer Vesikel sein. Darüber hinaus könnten Mechanismen, bedingt durch Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Speicherung, wie sie für mutiertes PS1 beschrieben wurden (Herms et al., 2003; Leissring et al., 2000), involviert sein.

Des Weiteren kann die Spaltung zahlreicher anderer Substrate der γ -Sekretase wie z.B. Notch, CD44, Low-density lipoprotein receptor-related protein sowie N- und E-Cadherine durch eine PS1 Mutation beeinflusst werden (Vetrivel et al., 2005).

4.3 Effekt der Akutapplikation von A β ₄₂-Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen

Die wahrscheinliche Beteiligung von A β ₄₂ beim beobachteten PS1-Phänotyp wirft die Frage auf, wie schnell dieser Effekt zustande kommt und welche A β ₄₂-Spezies (Mono-, Oligomere oder Fibrillen) dafür verantwortlich ist. Weder bei der Applikation von Monomeren noch bei der Zugabe von Oligomeren oder Fibrillen konnte eine Veränderung der Amplitude stimulierter EPSCs, der Spontanaktivität oder der Kurzzeitplastizität beobachtet werden. Dieser Befund steht im Gegensatz zu zahlreichen Studien, in denen deutliche Veränderungen der synaptischen Übertragung nach A β -Applikation beschrieben wurden. So untersuchten Snyder et al. die Wirkung von A β ₄₂-Monomeren und fanden nach deren Applikation eine

deutliche Reduktion NMDA-vermittelter Ströme (Snyder et al., 2005). Wang et al. konnten zwar keine Veränderungen der Amplitude stimulierter EPSCs nach Applikation von ADDLs zeigen, jedoch war die Kurzzeitplastizität nach ADDL-Zugabe gegenüber Kontrollmessungen verändert (Wang et al., 2002). Eine mögliche Ursache dafür, dass die Akutapplikation der verschiedenen A β ₄₂-Spezies in unseren Untersuchungen keinen Effekt auf die synaptische Übertragung gezeigt hat, könnte sein, dass die Inkubationszeit von 2 min mit den verschiedenen A β -Spezies zu kurz war. Andererseits sind längere Inkubationszeiten mit A β ₄₂-Mono- und Oligomeren bei der verwendeten Konzentration (1 μ M) problematisch, da diese weiter zu Oligomeren bzw. Fibrillen aggregieren können und somit nicht mehr die auslösende Spezies ermittelt werden kann.

Als mögliche Wirkmechanismen von A β -Mono- und Oligomeren kommen Interaktionen mit Membrankomponenten, die zu einer Destabilisierung der Membranstruktur führen (Avdulov et al., 1997; Muller et al., 1995), die Ausbildung Kationen-leitender Poren (Kawahara et al., 2000; Kaye et al., 2004), oder die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren, gekoppelt mit einem Ca²⁺-Influx diskutiert (Blanchard et al., 2004) in Frage. Snyder et al. zeigten, dass A β die Oberflächenexpression und Endozytose von NMDA-Rezeptoren innerhalb weniger Stunden reguliert (Snyder et al., 2005). Daher könnte es sein, dass bei der Untersuchung der PS1 transgenen Tiere das mögliche Zwischenstadium einer verminderten Rezeptorexpression zum Messzeitpunkt bereits in das Stadium einer reduzierten Synapsendichte übergegangen war (Lichtman and Colman, 2000).

4.4 Bezug zur Alzheimer Erkrankung

Am Anfang der Alzheimer-Erkrankung steht die Synapsenschädigung. Diese korreliert weitaus besser mit dem Krankheitsverlauf als die Anzahl an Amyloid-Plaques. Wie es zu dieser Schädigung kommt, ist noch weitestgehend ungeklärt. Die vorliegende Arbeit unterstützt die Hypothese einer bedeutenden Funktion von A β an der Synapse. Bekanntermaßen wird die Expression von APP durch jegliche Art neuronaler Schädigung (Hypoxie, Trauma) hochreguliert (Baiden-Amisshah et al., 1998; Olsson et al., 2004). Somit könnte es die Aufgabe von A β sein, unter solchen Bedingungen die synaptische Übertragung durch Modulation der Anzahl funktioneller Synapsen zu reduzieren. Kommt es jedoch zu einer chronischen Erhöhung der A β -Level, so könnte diese zu einer dauerhaften Depression

der synaptischen Übertragung führen. Außerdem könnten die erhöhten A β -Level zu einer vermehrten Bildung toxischer Oligomere führen, welche durch eine Änderung der Funktion spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle (Price et al., 1998b; Ramsden et al., 2002), bestimmter Typen von K⁺-Kanälen (Colom et al., 1998; Yu et al., 1998), AMPA-Rezeptoren (Chang et al., 2006), NMDA-Rezeptoren (Snyder et al., 2005), den α -7 nikotinischen Rezeptor (Dineley et al., 2001; Wang et al., 2000), oder der Bildung Ca²⁺-permeabler Poren (Arispe et al., 1993; Hirakura et al., 2000; Kawahara and Kuroda, 2000; Kaye et al., 2004; Kourie et al., 2001) die synaptische Übertragung und die zelluläre Erregbarkeit verändern.

Lange Zeit wurde A β lediglich als toxisches Abfallprodukt einer fehlgeleiteten APP-Prozessierung betrachtet. Die Idee einer physiologischen Funktion von A β , auf die unsere Ergebnisse schließen lassen, macht deutlich, dass eine mögliche Therapie der AD, die auf eine vollständige Blockade der A β -Bildung zielt, problematisch sein kann. So basieren ein Großteil künftiger Therapieoptionen, wie z.B. die Sekretaseblocker oder die Immunisierung mit A β -Antikörpern auf einer vollständigen Blockade bzw. Entfernung von A β . Weitaus viel versprechender sind vermutlich Ansätze, die eine Aggregation von A β bzw. schon dessen Konversion in die β -Faltblattstruktur verhindern, oder die Entwicklung A β ₄₂-spezifischer Antikörper, die lediglich das Verhältnis von A β ₄₂ zu A β ₄₀ verschieben, nicht jedoch die A β -Produktion komplett inhibieren.

5. Zusammenfassung

Das Amyloid Precursor Protein (APP) spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung. Seine physiologische Funktion in Neuronen, in denen es sich hauptsächlich in den Synapsen befindet, ist immer noch weitestgehend ungeklärt.

Mit Hilfe autaptischer, hippocampaler Neurone von APP-Knockout-Mäusen, konnte gezeigt werden, dass Knockout-Neurone signifikant erhöhte Amplituden stimulierter AMPA- und NMDA-Rezeptor vermittelter exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSC) aufweisen. Des Weiteren ergab die Analyse spontaner exzitatorischer postsynaptischer Ströme (mEPSC) eine erhöhte Frequenz in APP-Knockout-Neuronen, bei gleich bleibender Amplitude der spontanen synaptischen Ströme. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Verlust des APP-Gens zu einer Erhöhung der Anzahl funktioneller Synapsen führt. Diese Hypothese konnte durch immunhistochemische Untersuchungen weiter bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass APP-Knockout-Neurone tatsächlich mehr Synapsen pro kultivierten Neuron ausbilden als Wildtyp-Neurone. Demzufolge beeinflusst der Verlust des APP-Gens die Synapsenausbildung und dementsprechend auch die synaptische Übertragung in kultivierten hippocampalen Neuronen.

Zusätzlich wurden autaptische Neurone von Mäusen mit Mutationen im APP und/oder Präsenilin1 (PS1), welche bei der vererbaren Form der Alzheimer-Erkrankung auftreten, untersucht. Dabei zeigte sich, dass Mäuse, die entweder humanes PS1 mit der A246E Mutation allein, oder humanes PS1 mit der L166P Mutation zusätzlich zur K670N/M671L Doppelmutation im humanen APP exprimieren, eine verringerte AMPA- und NMDA-EPSC Amplitude gegenüber den jeweiligen Kontrollen aufweisen. Ebenso war der Pool freisetzungsbereiter synaptischer Vesikel bei beiden transgenen Linien gegenüber den Kontrollen verringert. Die Analyse spontaner synaptischer Ströme ergab bei der Linie mit der PS1(A246E) Mutation eine signifikant verringerte Frequenz bei gleich bleibender Amplitude der spontanen Ereignisse. Die immunhistochemische Auswertung zeigte eine Reduktion der Synapsenanzahl pro 10 µm Dendritenlänge, was die elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigte. Die Daten deuten somit an, dass Mutationen im PS1 die synaptische Übertragung durch eine Reduktion funktioneller Synapsen beeinträchtigen. Damit verhalten sich die Ergebnisse aus der Untersuchung von Neuronen mit der PS1-Mutation genau entgegengesetzt

zu den Daten der APP-Knockout-Neurone, was die wichtige Rolle von A β bei der Modulation der Synapsendichte verdeutlicht.

Weiterführende Versuche, die der Identifizierung der verantwortlichen A β -Spezies (Mono-, Oligomere, Fibrillen) dienen, zeigten keine akute Beeinflussung der synaptischen Übertragung. Somit scheint die an PS1mut- und APPPS1-Neuronen beobachtete reduzierte synaptische Übertragung und Synapsenanzahl nicht sofort, sondern erst nach einiger Zeit in Kultur aufzutreten.

Die vorliegende Untersuchung stellt die klassische Ansicht, der zufolge A β nur eine pathologische Funktion besitzt, in Frage. Die angenommene physiologische Funktion von A β könnte Therapieansätze, die auf einer kompletten Blockade der A β -Bildung beruhen, entscheidend beeinflussen.

6. Literaturverzeichnis

6.1 Zitierte Veröffentlichungen

Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol Dis* 20: 187-198.

Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK (1991) Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* 128: 126-128.

Arispe N, Pollard HB, Rojas E (1993) Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10573-10577.

Augustin I, Rosenmund C, Sudhof TC, Brose N (1999) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400: 457-461.

Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Warden CS, Vassiliev AV, Wood WG (1997) Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids. *J Neurochem* 69: 1746-1752.

Bacci A, Huguenard JR, Prince DA (2003) Functional autaptic neurotransmission in fast-spiking interneurons: a novel form of feedback inhibition in the neocortex. *J Neurosci* 23: 859-866.

Baiden-Amisshah K, Joashi U, Blumberg R, Mehmet H, Edwards AD, Cox PM (1998) Expression of amyloid precursor protein (beta-APP) in the neonatal brain following hypoxic ischaemic injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24: 346-352.

Ball MJ (1977) Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol (Berl)* 37: 111-118.

Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PT, Zagorski MG (1992) Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol* 225: 1075-1093.

Baumeister R, Leimer U, Zweckbronner I, Jakubek C, Grunberg J, Haass C (1997) Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate *Caenorhabditis elegans* Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct* 1: 149-159.

Bekkers JM (2003) Synaptic transmission: functional autapses in the cortex. *Curr Biol* 13: R433-R435.

Bekkers JM, Stevens CF (1991) Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7834-7838.

Bekkers JM, Stevens CF (1993) NMDA receptors at excitatory synapses in the hippocampus: test of a theory of magnesium block. *Neurosci Lett* 156: 73-77.

Benninghoff A, Drenckhahn D (2004) *Anatomie*. Urban & Fischer bei Elsevier.

Betz WJ (1970) Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* 206: 629-644.

Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B, Jr., Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 19: 357-360.

Blanchard BJ, Chen A, Rozeboom LM, Stafford KA, Weigele P, Ingram VM (2004) Efficient reversal of Alzheimer's disease fibril formation and elimination of neurotoxicity by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14326-14332.

Blennow K, Bogdanovic N, Alafuzoff I, Ekman R, Davidsson P (1996) Synaptic pathology in Alzheimer's disease: relation to severity of dementia, but not to senile plaques, neurofibrillary tangles, or the ApoE4 allele. *J Neural Transm* 103: 603-618.

Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17: 1005-1013.

Borst JG, Sakmann B (1996) Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature* 383: 431-434.

Bracco L, Gallato R, Grigoletto F, Lippi A, Lepore V, Bino G, Lazzaro MP, Carella F, Piccolo T, Pozzilli C, . (1994) Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study. *Arch Neurol* 51: 1213-1219.

Brunkan AL, Goate AM (2005) Presenilin function and gamma-secretase activity. *J Neurochem* 93: 769-792.

Busciglio J, Lorenzo A, Yankner BA (1992) Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 13: 609-612.

Chang EH, Savage MJ, Flood DG, Thomas JM, Levy RB, Mahadomrongkul V, Shirao T, Aoki C, Huerta PT (2006) AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3410-3415.

Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK (1999) Impaired synaptic

plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2: 271-276.

Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Ruan X, Arawaka S, Fraser P, Westaway D, Mount H, George-Hyslop P (2002) Presenilin 1 mutations activate gamma 42-secretase but reciprocally inhibit epsilon-secretase cleavage of amyloid precursor protein (APP) and S3-cleavage of notch. *J Biol Chem* 277: 36521-36526.

Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 265: 3116-3123.

Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George HP, Selkoe DJ (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3: 67-72.

Cobb SR, Halasy K, Vida I, Nyiri G, Tamas G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience* 79: 629-648.

Cohen-Cory S (2002) The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 298: 770-776.

Colom LV, Diaz ME, Beers DR, Neely A, Xie WJ, Appel SH (1998) Role of potassium channels in amyloid-induced cell death. *J Neurochem* 70: 1925-1934.

Cook DG, Forman MS, Sung JC, Leight S, Kolson DL, Iwatsubo T, Lee VM, Doms RW (1997) Alzheimer's A beta(1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells. *Nat Med* 3: 1021-1023.

Cook DG, Sung JC, Golde TE, Felsenstein KM, Wojczyk BS, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Lee VM, Doms RW (1996) Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9223-9228.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923.

Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, Van der Ploeg LH, Sirinathsinghji DJ (1999) Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90: 1-13.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391: 387-390.

Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG (2005) Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280: 17294-17300.

Dewachter I, van Dorpe J, Smeijers L, Gilis M, Kuiperi C, Laenen I, Caluwaerts N, Moechars D, Checler F, Vanderstichele H, Van Leuven F (2000) Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1. *J Neurosci* 20: 6452-6458.

Diaz-Nido J, Wandosell F, Avila J (2002) Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases. *Peptides* 23: 1323-1332.

Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD (2001) Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 4125-4133.

Dobrunz LE (2002) Release probability is regulated by the size of the readily releasable vesicle pool at excitatory synapses in hippocampus. *Int J Dev Neurosci* 20: 225-236.

Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-Tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383: 710-713.

Edbauer D, Winkler E, Haass C, Steiner H (2002) Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8666-8671.

Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54: 15-36.

Fillit HM, O'Connell AW, Refolo LM (2002) Strategies for drug discovery for cognitive aging and Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 19: 1-3.

Fink CC, Bayer KU, Myers JW, Ferrell JE, Jr., Schulman H, Meyer T (2003) Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII. *Neuron* 39: 283-297.

Galton CJ, Hodges JR (1999) The spectrum of dementia and its treatment. *J R Coll Physicians Lond* 33: 234-239.

Garzon-Rodriguez W, Sepulveda-Becerra M, Milton S, Glabe CG (1997) Soluble amyloid Abeta-(1-40) exists as a stable dimer at low concentrations. *J Biol Chem* 272: 21037-21044.

Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1131-1135.

- Goedert M (1993) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16: 460-465.
- Goedert M, Crowther RA, Spillantini MG (1998) Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* 21: 955-958.
- Goedert M, Jakes R (2005) Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739: 240-250.
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, III, Araoz C (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7611-7615.
- Haass C (1996) Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol* 9: 254-259.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ (1991) Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* 11: 3783-3793.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, . (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359: 322-325.
- Haass C, Selkoe DJ (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75: 1039-1042.
- Haass C, Selkoe DJ (1998) Alzheimer's disease. A technical KO of amyloid-beta peptide. *Nature* 391: 339-340.
- Hardy J (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20: 154-159.
- Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K (1997) Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 3: 1016-1020.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Muller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20: 7951-7963.
- Herms J, Schneider I, Dewachter I, Caluwaerts N, Kretschmar H, Van Leuven F (2003) Capacitive calcium entry is directly attenuated by mutant presenilin-1, independent of the expression of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 278: 2484-2489.

- Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B (2000) Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2: 461-462.
- Hirakura Y, Yiu WW, Yamamoto A, Kagan BL (2000) Amyloid peptide channels: blockade by zinc and inhibition by Congo red (amyloid channel block). *Amyloid* 7: 194-199.
- Hoogendijk WJ, Pool CW, Troost D, van Zwieten E, Swaab DF (1995) Image analyser-assisted morphometry of the locus coeruleus in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 118 (Pt 1): 131-143.
- Hung AY, Selkoe DJ (1994) Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J* 13: 534-542.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393: 702-705.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL (1984) Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225: 1168-1170.
- Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, Ohigashi H, Ohashi R, Takegoshi K, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T (2005) Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng* 99: 437-447.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32: 4693-4697.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37: 925-937.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1991) Principles of neural sciences. Elsevier Science Publishing Co., Inc.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736.
- Katz B, Miledi R (1968) The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 195: 481-492.

Katzman R (1986) Differential diagnosis of dementing illnesses. *Neurol Clin* 4: 329-340.

Kawahara M, Kuroda Y (2000) Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res Bull* 53: 389-397.

Kawahara M, Kuroda Y, Arispe N, Rojas E (2000) Alzheimer's beta-amyloid, human islet amylin, and prion protein fragment evoke intracellular free calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell line. *J Biol Chem* 275: 14077-14083.

Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG (2004) Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem* 279: 46363-46366.

Kelly PH, Bondolfi L, Hunziker D, Schlecht HP, Carver K, Maguire E, Abramowski D, Wiederhold KH, Sturchler-Pierrat C, Jucker M, Bergmann R, Staufenbiel M, Sommer B (2003) Progressive age-related impairment of cognitive behavior in APP23 transgenic mice. *Neurobiol Aging* 24: 365-378.

Kim SH, Lah JJ, Thinakaran G, Levey A, Sisodia SS (2000) Subcellular localization of presenilins: association with a unique membrane pool in cultured cells. *Neurobiol Dis* 7: 99-117.

Kim TW, Pettingell WH, Jung YK, Kovacs DM, Tanzi RE (1997) Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease. *Science* 277: 373-376.

Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6382-6387.

Kimelberg HK, Norenberg MD (1989) Astrocytes. *Sci Am* 260: 66-72, 74, 76.

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41: 345-352.

Kojro E, Fahrenholz F (2005) The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem* 38: 105-127.

Kornhuber J, Weller M (1997) Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol Psychiatry* 41: 135-144.

Kourie JJ, Henry CL, Farrelly P (2001) Diversity of amyloid beta protein fragment [1-40]-formed channels. *Cell Mol Neurobiol* 21: 255-284.

Kraepelin E (1910) *Klinische Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte.* Leipzig: Johann Ambrosius Barth.

Krebs B, Kohlmansperger V, Nolting S, Schmalzbauer R, Kretschmar HA (2006) A method to perform Western blots of microscopic areas of histological sections. *J Histochem Cytochem* 54: 559-565.

LaFerla FM (2002) Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3: 862-872.

Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD (1993) Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat Genet* 5: 22-30.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6448-6453.

Lassmann H (1996) Patterns of synaptic and nerve cell pathology in Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 78: 9-14.

Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP, LaFerla FM (2000) Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol* 149: 793-798.

Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC (1996) The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med* 2: 1146-1150.

Levitan D, Greenwald I (1995) Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377: 351-354.

Li ZW, Stark G, Gotz J, Rulicke T, Gschwind M, Huber G, Muller U, Weissmann C (1996) Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6158-6162.

Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25: 269-278.

Liu X, Erikson C, Brun A (1996) Cortical synaptic changes and gliosis in normal aging, Alzheimer's disease and frontal lobe degeneration. *Dementia* 7: 128-134.

Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whitemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7951-7955.

Lorenzo A, Yankner BA (1994) Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12243-12247.

- Magara F, Muller U, Li ZW, Lipp HP, Weissmann C, Stagljar M, Wolfer DP (1999) Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4656-4661.
- Manabe T, Renner P, Nicoll RA (1992) Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* 355: 50-55.
- Mark RJ, Pang Z, Geddes JW, Uchida K, Mattson MP (1997) Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci* 17: 1046-1054.
- Masliah E, Ellisman M, Carragher B, Mallory M, Young S, Hansen L, DeTeresa R, Terry RD (1992) Three-dimensional analysis of the relationship between synaptic pathology and neuropil threads in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 404-414.
- Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA (1991) Cortical and subcortical patterns of synaptophysinlike immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 138: 235-246.
- Mattson MP (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein modulate dendrite outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. *J Neurobiol* 25: 439-450.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10: 243-254.
- Matus A (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290: 754-758.
- Mennerick S, Zorumski CF (1995) Paired-pulse modulation of fast excitatory synaptic currents in microcultures of rat hippocampal neurons. *J Physiol* 488 (Pt 1): 85-101.
- Moehlmann T, Winkler E, Xia X, Edbauer D, Murrell J, Capell A, Kaether C, Zheng H, Ghetti B, Haass C, Steiner H (2002) Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8025-8030.
- Monji A, Yoshida I, Tashiro K, Hayashi Y, Matsuda K, Tashiro N (2000) Inhibition of A beta fibril formation and A beta-induced cytotoxicity by senile plaque-associated proteins. *Neurosci Lett* 278: 81-84.
- Moore CL, Diehl TS, Selkoe DJ, Wolfe MS (2000) Toward the characterization and identification of gamma-secretases using transition-state analogue inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 920: 197-205.
- Muller U (1999) Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 82: 3-21.

- Muller WE, Koch S, Eckert A, Hartmann H, Scheuer K (1995) beta-Amyloid peptide decreases membrane fluidity. *Brain Res* 674: 133-136.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
- Murayama O, Tomita T, Nihonmatsu N, Murayama M, Sun X, Honda T, Iwatsubo T, Takashima A (1999) Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 265: 61-63.
- Murthy VN, Sejnowski TJ, Stevens CF (1997) Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 18: 599-612.
- Naruse S, Thinakaran G, Luo JJ, Kusiak JW, Tomita T, Iwatsubo T, Qian X, Ginty DD, Price DL, Borchelt DR, Wong PC, Sisodia SS (1998) Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 21: 1213-1221.
- Numberger E, Draguhn A (1996) Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag.
- Oda T, Pasinetti GM, Osterburg HH, Anderson C, Johnson SA, Finch CE (1994) Purification and characterization of brain clusterin. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 1131-1136.
- Oda T, Wals P, Osterburg HH, Johnson SA, Pasinetti GM, Morgan TE, Rozovsky I, Stine WB, Snyder SW, Holzman TF, . (1995) Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress. *Exp Neurol* 136: 22-31.
- Olsson A, Csajbok L, Ost M, Hoglund K, Nylen K, Rosengren L, Nellgard B, Blennow K (2004) Marked increase of beta-amyloid(1-42) and amyloid precursor protein in ventricular cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. *J Neurol* 251: 870-876.
- Pangalos MN, Shioi J, Robakis NK (1995) Expression of the chondroitin sulfate proteoglycans of amyloid precursor (appican) and amyloid precursor-like protein 2. *J Neurochem* 65: 762-769.
- Parent AT, Barnes NY, Taniguchi Y, Thinakaran G, Sisodia SS (2005) Presenilin attenuates receptor-mediated signaling and synaptic function. *J Neurosci* 25: 1540-1549.
- Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca²⁺-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 20: 464-470.
- Phinney AL, Deller T, Stalder M, Calhoun ME, Frotscher M, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M (1999) Cerebral amyloid induces aberrant axonal sprouting and ectopic terminal formation in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 19: 8552-8559.

- Pigino G, Pelsman A, Mori H, Busciglio J (2001) Presenilin-1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth, and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation. *J Neurosci* 21: 834-842.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13: 1676-1687.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1991) In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* 563: 311-314.
- Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, Niinisto L, Halonen P, Kontula K (1995) Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N Engl J Med* 333: 1242-1247.
- Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS (1998a) Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu Rev Genet* 32: 461-493.
- Price SA, Held B, Pearson HA (1998b) Amyloid beta protein increases Ca²⁺ currents in rat cerebellar granule neurones. *Neuroreport* 9: 539-545.
- Ramsden M, Henderson Z, Pearson HA (2002) Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status. *Brain Res* 956: 254-261.
- Ramsden M, Plant LD, Webster NJ, Vaughan PF, Henderson Z, Pearson HA (2001) Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid beta protein (1-40) on K(+) channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones. *J Neurochem* 79: 699-712.
- Ray WJ, Yao M, Mumm J, Schroeter EH, Saftig P, Wolfe M, Selkoe DJ, Kopan R, Goate AM (1999) Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch. *J Biol Chem* 274: 36801-36807.
- Richter G (2003) *Praktische Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Roder S, Danober L, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wiederhold KH, Olpe HR (2003) Electrophysiological studies on the hippocampus and prefrontal cortex assessing the effects of amyloidosis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *Neuroscience* 120: 705-720.
- Rogaeva E (2002) The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2: 1-10.
- Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, Morabito M, Almeida OF (2005) Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci* 25: 11061-11070.

Rosenmund C, Stevens CF (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16: 1197-1207.

Sachs L (1997) *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, . (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43: 1467-1472.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2: 864-870.

Schmidtke K (2005) Demenzen. In: *Neurologie. Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis* pp 662-681. Urban & Fischer bei Elsevier.

Schneggenburger R, Meyer AC, Neher E (1999) Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron* 23: 399-409.

Schneider I, Reverse D, Dewachter I, Ris L, Caluwaerts N, Kuiperi C, Gilis M, Geerts H, Kretzschmar H, Godaux E, Moechars D, van Leuven F, Herms J (2001) Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation. *J Biol Chem* 276: 11539-11544.

Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G (1989) The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* 3: 689-694.

Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T, Fitzjohn SM, Morton RA, Zheng H, Dawson GR, Sirinathsinghji DJ, Davies CH, Collingridge GL, Hill RG (1999a) Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* 38: 349-359.

Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T, Fitzjohn SM, Morton RA, Zheng H, Dawson GR, Sirinathsinghji DJ, Davies CH, Collingridge GL, Hill RG (1999b) Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* 38: 349-359.

Seiffert D, Bradley JD, Rominger CM, Rominger DH, Yang F, Meredith JE, Jr., Wang Q, Roach AH, Thompson LA, Spitz SM, Higaki JN, Prakash SR, Combs AP, Copeland RA,

- Americ SP, Hartig PR, Robertson DW, Cordell B, Stern AM, Olson RE, Zaczek R (2000) Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *J Biol Chem* 275: 34086-34091.
- Selkoe DJ (1993) Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16: 403-409.
- Selkoe DJ (1994a) Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol* 4: 708-716.
- Selkoe DJ (1994b) Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* 10: 373-403.
- Selkoe DJ (1994c) Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci* 17: 489-517.
- Selkoe DJ (1996) Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271: 18295-18298.
- Selkoe DJ (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399: A23-A31.
- Selkoe DJ (2001a) Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis* 3: 75-80.
- Selkoe DJ (2001b) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, . (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359: 325-327.
- Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H, Rogaeva EA, Levesque G, Rogaev EI, Lin C, Liang Y, Ikeda M, Mar L, Brice A, Agid Y, Percy ME, Clerget-Darpoux F, Piacentini S, Marcon G, Nacmias B, Amaducci L, Frebourg T, Lannfelt L, Rommens JM, George-Hyslop PH (1996) Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* 5: 985-988.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B, . (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258: 126-129.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402: 537-540.

- Slunt HH, Thinakaran G, von Koch C, Lo AC, Tanzi RE, Sisodia SS (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* 269: 2637-2644.
- Small DH, Mok SS, Bornstein JC (2001) Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci* 2: 595-598.
- Smith RP, Higuchi DA, Broze GJ, Jr. (1990) Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* 248: 1126-1128.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8: 1051-1058.
- Steinbach JP, Muller U, Leist M, Li ZW, Nicotera P, Aguzzi A (1998) Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice. *Cell Death Differ* 5: 858-866.
- Stine WB, Jr., Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 278: 11612-11622.
- Storey E, Cappai R (1999) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25: 81-97.
- Strittmatter WJ, Roses AD (1995) Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4725-4727.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13287-13292.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264: 1336-1340.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T (2003) The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422: 438-441.
- Tandon A, Fraser P (2002) The presenilins. *Genome Biol* 3: reviews3014.
- Tandon A, Rogueva E, Mullan M, George-Hyslop PH (2000) Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta-amyloid and the presenilins. *Curr Opin Neurol* 13: 377-384.

Terry RD, Masliah E, Hansen LA (1999) The Neuropathology of Alzheimer Disease and the Structural Basis of Its Cognitive Alterations. In: Alzheimer Disease (Terry RD, Katzman R, Bick KL, Sisodia S, eds), pp 187-206. Lippincott Williams & Wilkins.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30: 572-580.

Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17: 181-190.

Thompson RF (2001) *Das Gehirn*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741.

Vetrivel KS, Cheng H, Kim SH, Chen Y, Barnes NY, Parent AT, Sisodia SS, Thinakaran G (2005) Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J Biol Chem* 280: 25892-25900.

Walter J, Capell A, Grunberg J, Pesold B, Schindzielorz A, Prior R, Podlisny MB, Fraser P, Hyslop PS, Selkoe DJ, Haass C (1996) The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol Med* 2: 673-691.

Walter J, Grunberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, Mendla K, George-Hyslop PS, Multhaup G, Selkoe DJ, Haass C (1997) Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5349-5354.

Wang HW, Pasternak JF, Kuo H, Ristic H, Lambert MP, Chromy B, Viola KL, Klein WL, Stine WB, Krafft GA, Trommer BL (2002) Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* 924: 133-140.

Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP (2000) Amyloid peptide A β (1-42) binds selectively and with picomolar affinity to α 7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 75: 1155-1161.

Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10758-10762.

Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE (1993) Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5: 95-100.

Weber K, Osborn M (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244: 4406-4412.

Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57: 115-126.

West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344: 769-772.

Williams EJ, Doherty P, Turner G, Reid RA, Hemperly JJ, Walsh FS (1992) Calcium influx into neurons can solely account for cell contact-dependent neurite outgrowth stimulated by transfected L1. *J Cell Biol* 119: 883-892.

Wisniewski T, Frangione B (1992) Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett* 135: 235-238.

Yamaguchi H, Nakazato Y, Hirai S, Shoji M, Harigaya Y (1989) Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *Am J Pathol* 135: 593-597.

Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990) Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250: 279-282.

Yu SP, Farhangrazi ZS, Ying HS, Yeh CH, Choi DW (1998) Enhancement of outward potassium current may participate in beta-amyloid peptide-induced cortical neuronal death. *Neurobiol Dis* 5: 81-88.

Yuste R, Majewska A, Holthoff K (2000) From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3: 653-659.

Zhang W, Benson DL (2001) Stages of synapse development defined by dependence on F-actin. *J Neurosci* 21: 5169-5181.

Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, van de WM, Clevers H, Saftig P, De Strooper B, He X, Yankner BA (1998) Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 395: 698-702.

Zhang Z, Nadeau P, Song W, Donoviel D, Yuan M, Bernstein A, Yankner BA (2000) Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol* 2: 463-465.

Zou K, Kim D, Kakio A, Byun K, Gong JS, Kim J, Kim M, Sawamura N, Nishimoto S, Matsuzaki K, Lee B, Yanagisawa K, Michikawa M (2003) Amyloid beta-protein (Abeta)1-40 protects neurons from damage induced by Abeta1-42 in culture and in rat brain. *J Neurochem* 87: 609-619.

Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64: 355-405.

6.2 Eigene Veröffentlichungen

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006) Synapse Formation and Function is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *J Neurosci* 26(27):7212-7221.

Priller C, Dewachter I, Vassallo N, Pace C, Kretschmar HA, van Leuven F, Herms J (2006) Mutant Presenilin1 Alters Synaptic Transmission In Cultured Hippocampal Neurons. *Eingereicht bei J Biol Chem*.

Dewachter I*, Priller C*, Filipkowski R*, Neyton J*, Ris L, Borghgraef P, Croes S, Godeaux E, Kaczmarek L, Herms J, van Leuven F (2006) Indirect effects of oligomeric AB1-42 peptides on NMDA-receptor function and impaired NMDA-receptor function and downstream signaling in APP transgenic mice. *Manuskript in Vorbereitung* (* equally contributed).

7. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	<u>Christina</u> Simone Priller geb. Burkhardt
Geburtsdatum:	26.12.1976
Geburtsort:	Augsburg
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1983 – 1987	Grundschule, Ziemetshausen
1987 – 1996	Maria-Ward-Gymnasium, Augsburg

Berufsausbildung

Mai 1997 - Okt. 2001	Studium der Pharmazie an der LMU München
März 1999	1. Staatsexamen
Okt. 2001	2. Staatsexamen
Dez. 2002	3. Staatsexamen

Praktika

Sept.1997	vierwöchige Famulatur in der Heilig-Kreuz-Apotheke, Augsburg
März 1998	vierwöchige Famulatur in der Hubertus-Apotheke, Thannhausen
März – April 2000	Praktikum bei der Firma 4SC in Martinsried
Sept. –Okt. 2000	Praktikum bei der Firma Connex in Martinsried
März – April 2001	Praktikum bei der Firma 4SC in Martinsried
Nov. 2001 - April 2002	Pharmaziepraktikum in der Balde-Apotheke, München
Mai – Okt. 2002	Pharmaziepraktikum am College of Pharmacy in Gainesville, Florida

Berufserfahrung

Jan.– März 2003	Arbeit als Apothekerin in der Balde-Apotheke, München
-----------------	---

seit April 2003

wissenschaftliche Mitarbeiterin am Zentrum für Neuro-
pathologie und Prionforschung der LMU München mit
dem Ziel der Promotion

8. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Jochen Herms für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit, die tatkräftige Unterstützung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit unter den hervorragenden Bedingungen am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung in München durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich ausdrücklich für seine Bereitschaft, diese Promotion extern zu betreuen.

Doris Schechinger danke ich für die Einführung in die Zellkultur sowie die Hilfe bei zahlreichen Genotypisierungen. Bei Bjarne Krebs bedanke ich mich für seine Ratschläge, immer wenn es Probleme mit der Immunfluoreszenz gab.

Bei Ilse Dewachter und Fred van Leuven bedanke ich mich für die Kooperation und die fachlichen Diskussionen.

Für die kritische Durchsicht der Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Martin Fuhrmann, Isabella Richter, Sandra Paluch und ganz besonders Christian und Jette bedanken.

Für die nette Zusammenarbeit und schöne Arbeitsatmosphäre im Labor bedanke ich mich bei Antje Strack, Doris Schechinger, Runa Hamid, Yvonne Kienast, Sandra Paluch, Tobias Bittner und Martin Fuhrmann. Martin, Dir noch ein spezielles Dankeschön für Deine Hilfe bei diversen „technischen“ Problemen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, Hildegard und Werner Burkhardt für Ihre Ermutigungen und fortwährende Unterstützung.

Zum Schluss gilt mein spezieller Dank meinem Mann Christian für seine Geduld und dafür, dass er trotz Auslandsaufenthalt immer für mich da war.