

**Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. H. A. Kretzschmar

**Elektrophysiologische Untersuchungen
zur Funktion des Amyloid Precursor Proteins
an der Synapse**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Bauer

aus

München

Jahr

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Herms

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Chr. Haass
Prof. Dr. B. Sutor

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2008

Inhalt

1	Einleitung	6
1.1	Die Alzheimer Erkrankung	6
1.1.1	Symptomatik und Verlauf	7
1.1.2	Neuropathologische Merkmale	7
1.1.3	Genetisch bedingte Alzheimerfälle.....	9
1.2	Das Amyloid-Precursor-Protein	10
1.2.1	Aufbau und Prozessierung.....	10
1.2.2	Funktion	12
1.3	Synaptische Übertragung an hippocampalen CA1-Neuronen	13
1.3.1	Der Hippocampus	13
1.3.2	Aufbau und Funktion der Synapse	14
1.3.3	Synaptische Plastizität	16
1.4	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Zellkultur	19
2.1.1	Mausmodell.....	19
2.1.2	Hippocampale Einzelzellkulturen	19
2.1.3	Autapsen	22
2.2	Elektrophysiologie	24
2.2.1	Patch-clamp-Technik	24
2.2.2	Aufbau des Messplatzes	26
2.2.3	Elektrische Eigenschaften der whole-cell-Konfiguration.....	28

2.2.4	Erzielen der whole-cell-Konfiguration.....	30
2.2.5	Messung von Spontanaktivität	32
2.2.6	Messung AP-induzierter Ströme	33
2.2.7	Messung osmotisch induzierter Ströme	35
2.2.8	Lösungen	35
2.3	Auswertung und Statistik	37
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Synaptische Übertragung bei niedriger extrazellulärer Kalzium - Konzentration	39
3.1.1	AP-evozierte Neurotransmitterfreisetzung	39
3.1.2	Doppelpuls-Stimulation zeigt eine Faszilitation	40
3.2	Synaptische Übertragung bei hoher extrazellulärer Kalzium - Konzentration	44
3.2.1	Spontanaktivität	44
3.2.2	Basale Synaptische Übertragung.....	47
3.2.3	Doppelpuls-Stimulation zeigt eine Depression.....	50
3.2.4	Repetitive Stimulation	52
3.2.5	Readily Releaseable (Vesikel)-Pool (RRP).....	57
3.2.6	Vesikelfreisetzungswahrscheinlichkeit P_{vr}	60
4	Diskussion	62
4.1	Diskussion der Methodik.....	62
4.1.1	Die autaptische Primärzellkultur.....	62
4.1.2	Messungen bei unterschiedlichen extrazellulären Kalzium-Konzentrationen	64
4.2	Diskussion der Ergebnisse	64
4.2.1	Verlust von APP beeinflusst evozierte und spontane exzitatorische synaptische Ströme.....	64

4.2.2	APP beeinflusst die Größe des Readily Releasable Vesikelpools	66
4.2.3	APP moduliert die Größe des RRP durch die Anzahl funktioneller Synapsen	68
4.2.4	APP reguliert die Anzahl funktioneller Synapsen durch sein Spaltprodukt A β	69
4.2.5	Mögliche Beeinflussung der Synapsenformierung durch Einwirkung auf Kationenkanäle	70
4.2.6	Der synaptische Effekt ist wahrscheinlich durch monomeres A β bedingt	71
4.2.7	Mögliche pathologische Prozesse und physiologische Regulationsmechanismen von A β	72
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	76
6.1	Zitierte Veröffentlichungen.....	76
6.2	Eigene Veröffentlichung	84
7	Abbildungsverzeichnis	85
8	Abkürzungsverzeichnis	87
9	Lebenslauf	90

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer Erkrankung

Die Lebenserwartung der Weltbevölkerung vor allem in den Industrienationen wächst kontinuierlich. Die Tatsache, dass alte Menschen einen immer größeren Anteil an unserer Gesellschaft einnehmen, führt zu einer immer größer werdenden Zahl von Patienten mit degenerativen Erkrankungen im Allgemeinen und neurodegenerativen Erkrankungen im Speziellen. Der Morbus Alzheimer stellt mit etwa 75% die weitaus häufigste Form der degenerativen Hirnerkrankungen dar. Etwa 660.000 Menschen leiden in Deutschland an der Alzheimer Krankheit und nur circa 10% sind jünger als 75 Jahre. Die Prävalenz beläuft sich bei der Bevölkerung über 65 Jahre auf 8-10% (Bickel, 2001). Soziodemographische Studien prognostizieren eine deutliche Zunahme der Neuerkrankungen in den nächsten 20 Jahren, wenngleich jetzt schon das Ausmaß einer Volkskrankheit erreicht ist (Möller, 2002). Der Morbus Alzheimer ist, nach Herz- / Kreislauferkrankungen, Krebs und Hirninfarkten mittlerweile die vierthäufigste Todesursache.

Der Münchner Namensgeber Alois Alzheimer war 1907 der Erste, der bei seiner dadurch bekannt gewordenen Patientin Auguste D den Zusammenhang zwischen einer kontinuierlich fortschreitenden dementiellen Symptomatik und spezifischen neuropathologischen Veränderungen erkannte. Die damals beschriebenen Hirnveränderungen, Nervenzellverlust, Plaques und Neurofibrillen sind bis heute die pathologischen Hauptmerkmale des Morbus Alzheimer geblieben. Es dauerte weitere 75 Jahre bis Allsop et al. (1983) das Beta-Amyloid (A β) als Hauptbestandteil der Plaques identifizierte und zusammen mit weiteren Ergebnissen die so genannte Amyloid-Hypothese ausarbeitete (Hardy und Allsop, 1991). In dieser wird die Überproduktion und Aggregation von A β als zentrales Ereignis bei der Entstehung des Morbus Alzheimer angesehen.

1.1.1 Symptomatik und Verlauf

Der Morbus Alzheimer stellt das klassische Beispiel der kortikalen Demenz dar, bei der in der Frühphase v.a. der Hippocampus und der entorhinale Kortex betroffen sind und die sich im Verlauf auf den Neokortex ausbreitet (Braak und Braak, 1991). Dementsprechend sind die Frühsymptome in den allermeisten Fällen mnestiche Störungen v.a. des Kurzzeitgedächtnisses, also der Aufnahme, Speicherung und Wiedergabe neuer Informationen. Der Gedächtnisverlust weitet sich im Verlauf aus, wobei frühe Kindheitseindrücke am längsten erhalten bleiben (Sagar et al., 1988). Im progredienten Verlauf nehmen mit der topographischen Ausdehnung auf den Neokortex auch andere kognitive Defizite zu. So sind vor allem Sprach- und Orientierungsstörungen, Störungen des abstrakten Denkens, der Aufmerksamkeit, sowie des Erkennens von Gesichtern und Gegenständen zu nennen. Daneben sind häufig psychopathologische Symptome, wie Wahnvorstellungen und depressive Episoden zu beobachten, so dass die Altersdepression in der Frühphase der Erkrankung eine wichtige Differentialdiagnose darstellt.

Bezüglich der Prognose ist mit einer progredienten Verschlechterung der kognitiven Funktionen zu rechnen, wobei der zeitliche Verlauf deutlich variiert. Die Lebenserwartung ist v. a. durch Sekundärerkrankungen wie Lungen-, Harnwegs-, oder Dekubitalinfektionen deutlich eingeschränkt und liegt im Mittel bei ca. 6,5 Jahren nach Diagnosestellung (Heyman et al., 1996).

1.1.2 Neuropathologische Merkmale

Neuritische (Senile) Plaques

Die schon von Alois Alzheimer (1911) beschriebenen extrazellulär lokalisierten Proteinablagerungen mit einer sehr variablen Größe von 10 - 120 µm kommen vor allem in der grauen Substanz des limbischen Systems und der Assoziationskortex vor (Dickson, 1997). Sie bestehen überwiegend

aus dem 4-kDa großen Amyloid- β -Peptid, mit einer Länge von 40 ($A\beta_{40}$) und 42 ($A\beta_{42}$) Aminosäuren. Das $A\beta$ geht durch proteolytische Spaltung aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) hervor (Kang et al., 1987; siehe Kapitel 1.2). In Alzheimer-Plaques lässt sich ein hoher Anteil des hydrophoberen und aggregationsfreudigeren $A\beta_{42}$ nachweisen, welches im Zentrum eine fibrilläre Struktur aufweist. Innerhalb der Plaques und in dessen unmittelbarer Umgebung finden sich zahlreiche dystroph veränderte Neuriten und eine reaktive Astrozytose.

Neurofibrillen

Die zweite für die Alzheimer Krankheit charakteristische Veränderung, ist eine intrazelluläre, hauptsächlich perinukleäre Anhäufung von Fibrillenbündeln. Diese kommen vermehrt in typischerweise bei AD betroffenen Hirnregionen, wie dem entorhinalen Kortex, dem Hippocampus und verschiedenen Assoziationskortex vor. Elektronenmikroskopisch lassen sich paarweise helikal umeinander verwundene Filamente nachweisen (paired-helical-filaments oder PHF), deren Hauptbestandteil das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau ist. Als Bestandteil des normalen neuronalen Zytoskeletts ist Tau an der Stabilisierung der Mikrotubuli für den axonalen Transport beteiligt, es liegt aber innerhalb der Neurofibrillenbündel bei AD in einem hyperphosphorilierten, schwer löslichen Zustand vor (Goedert, 1993). Durch die übermäßige Phosphorilierung ist keine Interaktion mit den Mikrotubuli mehr möglich, sodass es aus dem Axon zum Perikaryon rückverlagert wird und zu Neurofibrillen aggregiert. Studien zeigen, dass eventuell eine Dysregulation der cdk-5 (cyclin-dependent kinase 5) für diese Hyperphosphorilierung und die damit verbundenen Fibrillenbildung verantwortlich ist (Patrick et al., 1999). Die Tatsache, dass eine deutliche Korrelation zwischen dem Ausmaß der neurofibrillären Veränderungen und dem Schweregrad der Demenz besteht, unterstreicht deren Bedeutung innerhalb der Alzheimer Pathogenese (Arriagada et al., 1992).

Bei der Frage der Gewichtung bzw. Stellung von Neurofibrillen und Amyloid-Plaques innerhalb der pathophysiologischen Kaskade setzt sich mehr und mehr die Amyloid-Hypothese als zentraler Schritt durch. Es besteht zwar

eine deutlich größere Korrelation zwischen dem Schweregrad der Demenz und dem Ausmaß der Neurofibrillenbildung als der Amyloid-Ablagerung (Arriagada et al., 1992), des Weiteren sind tierexperimentell Tau-Mutationen ausreichend um eine Demenz hervorzurufen. Allerdings sind keine familiären Alzheimer-Fälle bekannt, die auf einer Mutation im Tau-Gen basieren, wohingegen alle bekannten vererbten Alzheimer-Fälle auf Mutationen beruhen, die zu einer Überproduktion von A β führen. Da Mutationen im Gen, das für das Tau-Protein kodiert, zwar zur Formation von Fibrillenbündeln führen, nicht aber zur Bildung von Amyloid-Plaques, während Mutationen in APP-, PS1- oder PS2-Genen jedoch beide Pathologien hervorrufen können, wird angenommen, dass die Amyloid-Aggregation das frühere Ereignis im Krankheitsverlauf ist. Beobachtungen an transgenen Mäusen, die sowohl mutiertes Tau-Protein als auch mutiertes APP überexprimieren, zeigen aber, dass die Amyloid- und Tau-Pathologien trotzdem miteinander in Verbindung stehen. Im Gegensatz zu den Mäusen, die nur die Tau-Mutation besitzen, weisen die Doppelmutanten grundsätzlich mehr Fibrillenbündel auf. Außerdem finden sich bei den Doppelmutanten Fibrillen in Hirnarealen, die bei den reinen Tau-Mutanten nicht betroffen sind (Lewis et al., 2001).

1.1.3 Genetisch bedingte Alzheimerfälle

Über 90% aller Alzheimer-Fälle treten sporadisch auf. Dabei handelt es sich meist um Alzheimer-Demenz vom späten Typ, was einer Erstmanifestation der Erkrankung über 65 Jahre entspricht. Das Risiko an sporadischer AD zu erkranken, erhöht sich v.a. mit zunehmendem Alter, daneben wird aber auch das Allel $\epsilon 4$ des Apolipoprotein E – Gens als genereller Risikofaktor angesehen (Rebeck et al., 1993).

5-10% aller Alzheimer-Erkrankungen sind familiäre Fälle mit einem autosomal dominanten Erbgang. Die ersten Symptome treten in diesen Familien meist schon deutlich früher auf. Zahlreiche Defekte sind mittlerweile als Ursache bekannt, wobei im Wesentlichen drei Gene betroffen sind. Für etwa 1-3% der Erkrankungen sind Defekte des APP-Gens auf Chromosom 21 verantwortlich. Der Rest ist durch Mutationen der Presenilin-1 (PS-1) und

Presenilin-2 (PS-2) Gene auf Chromosom 14 bedingt, wobei Defekte im Presenilin-1 mit 70% der häufigste Grund für ein familiäres Auftreten der Alzheimer-Krankheit sind. In diesen Fällen manifestiert sich die Demenz häufig bereits zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. PS-1/2 kodieren für Proteine die an der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins mitwirken. All diese Mutationen führen zu erhöhter A β Produktion.

1.2 Das Amyloid-Precursor-Protein

1.2.1 Aufbau und Prozessierung

Das Amyloid- β -Peptid der senilen Plaques entsteht durch mehrfache proteolytische Spaltung aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP). Das APP ist ein ubiquitär vorkommendes Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 110-140 kDa, dessen Gen auf Chromosom 21 lokalisiert ist. Es weist eine hohe Variabilität auf, die zum einen durch alternatives Splicen und zum anderen durch posttranslationelle Modifizierungen zustande kommt. Die Isoformen mit 751 und 770 Aminosäuren kommen in nahezu jeder Körperzelle vor, wohingegen das APP mit 695 Aminosäuren relativ neuronenspezifisch ist (Haass et al., 1991). Es besteht aus einem großen extrazellulären Bereich mit drei Domänen, einer Transmembranregion und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne (Kang et al., 1987).

Die Halbwertszeit ist mit 45-60 Minuten relativ kurz (Weidemann et al., 1989), da das APP nach Translokation in das Endoplasmatische Retikulum N- und O-glykosiliert, und dann schnell in verschiedenster Weise proteolytisch gespalten werden kann (siehe Abb. 1). Durch die α -Sekretase wird das Protein innerhalb der A β -Domäne geschnitten, wodurch keine Möglichkeit der Amyloid-Bildung mehr besteht. Es entsteht ein großes, lösliches Fragment, das sog. APP_s- α , und ein 83 Aminosäuren großes carboxyterminales Fragment (CTF) innerhalb der Membran, auch α -stub genannt. Alternativ kann die Proteolyse auch durch die β -Sekretase (BACE)

erfolgen, wodurch eine 16 Aminosäuren kleinere Ektodomäne abgespalten wird (APP_s-β). Das resultierende membranständige CTF hat dadurch eine Länge von 99 Aminosäuren und wird als C99 oder β-stub bezeichnet.

In einem weiteren Schritt werden beide C-terminalen Fragmente, α- bzw. β-stub, von der γ-Sekretase, einem Enzymkomplex mit den Hauptbestandteilen Presenilin, Nicastrin, PEN-2 und APH-1, erneut proteolytisch gespalten. Dieser Proteasekomplex hat die Fähigkeit, das APP-Fragment innerhalb der hydrophoben Plasmamembran anzugreifen (Haass und Steiner, 2002). Dabei entstehen, nach vorheriger Spaltung durch die α-Sekretase das P3-Fragment, bzw. durch die BACE das Aβ, sowie beide Male die APP-intracellular-domain (AICD). Da sich sowohl P3 als auch Aβ unter physiologischen Bedingungen nachweisen lassen ist anzunehmen, dass alle genannten proteolytischen Schritte parallel ablaufen können (Haass et al., 1993). Letztendlich ist noch nicht vollständig geklärt, in welchen Kompartimenten die verschiedenen enzymatischen Schritte ablaufen. Man kann allerdings davon ausgehen, dass ein beträchtlicher Teil der α- und β-Sekretase Aktivität an der Plasmamembran stattfindet, also zu einem späten Zeitpunkt im sekretorischen Weg. Dabei entscheidet möglicherweise die Lokalisation des APP innerhalb einer sog. lipid-raft-Domäne, ob es von der β-Sekretase prozessiert wird und somit den amyloidogenen Weg einschlägt (Ehehalt et al., 2003). Es gibt Hinweise, dass für die darauf folgende Abspaltung des für die Sekretion bestimmten β-Amyloids durch den γ-Sekretase-Komplex die endosomale Internalisierung des APP nötig ist (Perez et al., 1999).

In Neuronen kann das Amyloid Precursor Protein über den schnellen axonalen Transport bis in die Präsynapse transportiert werden (Koo et al., 1990) und kann auch in synaptischen Membranen nachgewiesen werden (Kirazov et al., 2001).

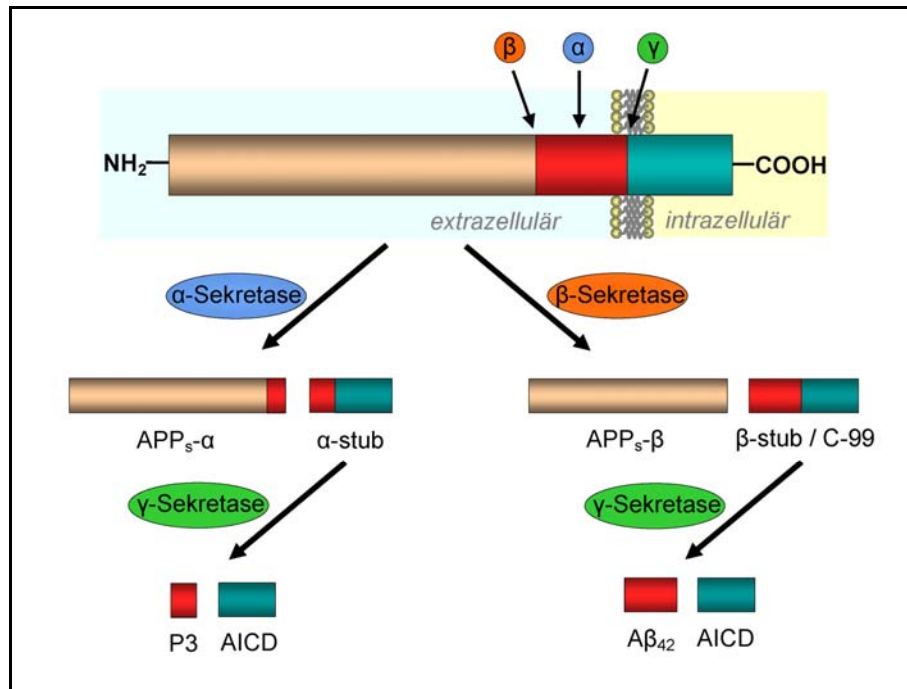


Abbildung 01: APP-Spaltung. Das Amyloid-Precursor-Protein kann durch verschiedene Enzymkomplexe an unterschiedlichen Stellen proteolytisch gespalten werden. Die α -Sekretase schneidet das APP innerhalb der $A\beta$ -Sequenz, womit dessen Bildung unmöglich ist. Es entsteht das lösliche $APP_s-\alpha$ und das sog. α -stub. Von diesem kann durch die γ -Sekretase noch das P3-Segment abgespalten werden. Die β -Sekretase trennt das APP in das $APP_s-\beta$ sowie den, die $A\beta$ -Sequenz enthaltenden β -stub. Das $A\beta$ kann dann aus dem β -stub mit Hilfe der γ -Sekretase herausgespalten werden.

1.2.2 Funktion

Über die physiologische Funktion des in der Evolution sehr gut konservierten Proteins und seiner Derivate gibt es verschiedene Ansätze, allerdings konnten die meisten in vivo noch nicht bestätigt werden. Mäuse mit deletiertem APP Gen, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden (siehe Kap. 2.1.1), sind trotz vollständigem Fehlen dieses Proteins durchaus lebensfähig.

Zahlreiche Studien weisen dem APP unter anderem die Funktion eines G-Protein gekoppelten Rezeptors zu. Nach der Bindung eines Liganden an einer extrazellulären Domäne kann es über die G-Protein-Bindung und

Abspaltung einer Untereinheit zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer second-messenger Systeme kommen. Yamatsuji et al. (1996) konnten zeigen, dass eine APP-Mutation an der Stelle 642, die mit dem Auftreten von familiärem M. Alzheimer assoziiert ist, zu einer Liganden-unabhängigen G-Protein-Aktivierung führt. Dies bewirkt in den Neuronen die Einleitung der Apoptose. Genauso denkbar wären Veränderungen der neuronalen Funktion und daraus resultierende kognitive Störungen durch einen Defekt in einem solchen second-messenger System.

Eine weitere Rolle spielt das Amyloid Precursor Protein bei der Zelladhäsion und Zellbeweglichkeit. Es wurden bereits verschiedene extrazelluläre Domänen beschrieben, die spezifische Liganden wie Heparin, Kollagen oder Laminin binden können. Desweiteren bindet APP auch intrazellulär mit dem Zytoskelett, wodurch sowohl die zelluläre Beweglichkeit als auch der morphologische Umbau z.B. im Rahmen der Informationsspeicherung beeinflusst werden könnte (Sabo et al., 2001).

Die genaue Strukturanalyse des APP ergab das Vorhandensein eines sog. KPI-Motivs in einer Ektodomäne. Dadurch ist das Protein in der Lage, Serin-Proteasen wie Trypsin und Chymotrypsin zu inhibieren, aber auch über die Hemmung des Faktors XIa in die Gerinnungskaskade einzugreifen (Sagar et al., 1988). Da sich die Sequenz nur in den APP Formen mit 751 und 770 Aminosäuren findet, spielt diese Funktion in Neuronen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle.

1.3 Synaptische Übertragung an hippocampalen CA1-Neuronen

1.3.1 Der Hippocampus

Der Hippocampus (Cornu ammonis) wird dem limbischen System zugeordnet und stellt den medialsten Teil des Temporallappens dar. Er spielt eine entscheidende Rolle bei expliziten Lernvorgängen, also der Speicherung von

Sachwissen sowie Informationen über das eigene Leben. Dabei nimmt er vermutlich selber nicht an der längerfristigen Informationsspeicherung teil, sondern ist vielmehr Teil des Kurzzeitgedächtnisses, der dann Inhalte an das Langzeitgedächtnis weitervermittelt. Da die fortschreitende Neurodegeneration im Rahmen des M. Alzheimer den Hippocampus im besonderen Maße betrifft, findet diese Hirnstruktur in der Forschung häufig Verwendung.

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 CA-3 Region. Diese ziehen ihrerseits über die sog. Schaffer-Kollateralen zu den großen CA-1-Pyramidenzellen. Die Fortsätze der CA-1-Zellen ziehen über das Subiculum zurück zum entorhinalen Kortex.

1.3.2 Aufbau und Funktion der Synapse

Bei der Übertragung an einer chemischen Synapse, z.B. einer CA1-Zelle, wird über einen Ca^{2+} vermittelten Prozess in der Präsynapse eine gewisse Menge Neurotransmitter ausgeschüttet, die durch den synaptischen Spalt diffundiert und postsynaptisch Rezeptoren stimuliert.

Eine Depolarisation der neuronalen Zellmembran über einen bestimmten Schwellenwert wird als Reiz bezeichnet. Als Reaktion darauf kommt es vor allem über die Erhöhung der Natriumionen-Leitfähigkeit zu einem schnellen Einstrom positiver Ladung und somit zur Auslösung eines Aktionspotentials (AP). Diese Depolarisation vom negativen Ruhepotential zu positiven Potentialen breitet sich über die ganze Zelle aus. In der präsynaptischen Endigung führt sie zu einer Öffnung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle, deren Dichte in der sog. aktiven Zone der Synapse besonders hoch ist. Da im Ruhezustand zwischen intra- und extrazellulärem Kalzium ein Gradient von ca. 1:10000 besteht, kommt es durch die Öffnung schlagartig zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, und in der

unmittelbaren Folge zur Exozytose von transmittergefüllten Vesikeln, die zum Teil an die Membran gebunden, zum Teil dieser dicht angelagert sind. Dieser sofort zur Fusion mit der Plasmamembran bereitstehende Anteil an Transmittervesikeln wird auch Readily Releasable Pool (RRP) genannt. Der größere Teil der Transmittermenge befindet sich in Vesikeln hinter der Membran und wird als Reserve Pool bezeichnet. Er dient der Wiederauffüllung des RRP, wenn dieser durch den oben beschriebenen Prozess geleert wurde.

Exzitatorischer, d.h. erregender Transmitter in hippocampalen CA1-Neuronen ist Glutamat. Es bindet an der postsynaptischen Membran an zwei verschiedene Rezeptortypen, den non-NMDA oder AMPA-Rezeptor, und den NMDA-Rezeptor. Beides sind ionotrope Rezeptoren, wobei der NMDA-Rezeptor nicht nur für Na^+ und K^+ , sondern auch für Ca^{2+} -Ionen durchlässig ist. Diese können beim NMDA-Rezeptor neben dem depolarisierenden Effekt auch weitergehende second messenger Kaskaden in Gang setzen. Normalerweise ist dieser durch Mg^{2+} -Ionen blockiert und wird erst nach ausreichender Depolarisation durch AMPA-Kanäle funktionstüchtig. Deutlich erhöhte extrazelluläre Mg^{2+} -Konzentrationen unterdrücken die NMDA-Ströme durch die oben beschriebene Blockade auch bei starker Depolarisation (Bekkers und Stevens, 1993). Der durch die Aktivierung dieser beiden Rezeptortypen ausgelöste Kationen-Einstrom wird als Exzitatorisch-Postsynaptischer Strom (EPSC) bezeichnet.

Neben den durch Aktionspotentiale induzierten EPSCs weisen Neurone auch ohne Stimulation eine Grundaktivität auf. Diese entsteht durch die Freisetzung einer konstanten Transmittermenge aus einem spontan mit der präsynaptischen Membran verschmelzenden Vesikels. Die daraus resultierenden postsynaptischen Ströme, die sog. Miniatur-EPSCs (mEPSC), bilden die sog. Spontanaktivität. Diese kleinste, aus einem einzigen Vesikel stammende Menge Botenstoff nennt man ein Transmitterquant. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit eines Quants wird u.a. durch die präsynaptische Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst (Borst und Sakmann, 1996).

Ohne ein AP ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sehr niedrig, sodass nur einzelne Quants freigesetzt werden und in Form von

Spontanaktivität postsynaptisch in Erscheinung treten. Durch ein AP erhöht sich diese in etwa um den Faktor 1000, und es werden zahlreiche Transmittervesikel geleert, die sich postsynaptisch zu einem um ein vielfaches größeren EPSC akkumulieren.

1.3.3 Synaptische Plastizität

Als Plastizität wird die Regulierbarkeit der Synapse bezüglich der Effektivität ihrer synaptischen Übertragung bezeichnet. Man unterscheidet die langfristige von der kurzfristigen Plastizität. Die langandauernde Veränderung der synaptischen Effektivität ist von entscheidender Wichtigkeit für Entwicklung und Lernen. Ein experimentelles Korrelat ist die sog. Langzeitpotenzierung (LTP), bei dessen Funktionsweise die NMDA-Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Da solche Versuche in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden, wird auf eine detaillierte Beschreibung der dabei ablaufenden Vorgänge bewusst verzichtet.

Kurzfristige Plastizität kann sich entweder in einer Verstärkung (Faszilitation) oder in einer Abschwächung (Depression) der synaptischen Übertragung äußern (Zucker und Regehr, 2002). Treffen zwei gleichstarke Aktionspotentiale in einem kurzen Intervall auf die präsynaptische Endigung, so kann es sein, dass der zweite Reiz eine stärkere oder schwächere postsynaptische Reaktion (EPSC) auslöst.

Im Falle der Übertragungsverstärkung hat sich auf der Basis zahlreicher Studien die sog. Rest-Kalzium-Hypothese durchgesetzt. Die, durch das erste AP erhöhte, intrazelluläre Kalzium-Konzentration in der Präsynapse ist bei Eintreffen des zweiten AP immer noch über der normalen Ruhekonzentration. Das restliche und das neu einströmende Ca^{2+} addieren sich, wodurch sich die Freisetzungswahrscheinlichkeit für die Transmittervesikel erhöht. Somit wird beim zweiten Reiz mehr Neurotransmitter ausgeschüttet und die postsynaptischen Ströme sind verstärkt (Katz und Miledi, 1968).

Bei der Abschwächung synaptischer Übertragung wird generell ein anderer Mechanismus diskutiert. Der erste Reiz leert einen Teil des RRP, wodurch dem kurz darauf eintreffenden, zweiten Impuls nicht die adäquate Vesikel-Menge zur Verfügung steht und die Transmitterfreisetzung zwangsläufig geringer ist. Das Resultat ist dann eine geringere postsynaptische Reaktion (Betz, 1970).

Ob eine Zelle nun eine Faszilitation oder eine Depression der synaptischen Übertragung zeigt, hängt zum Teil von der Neuronenpopulation und deren spezifischen Charakteristika, wie der Grösse ihres RRP oder dem Vermögen diesen wieder aufzufüllen, ab. Aber auch das Milieu der Zelle, v.a. die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, ist entscheidend (Murthy et al., 1997). Bei hippocampalen CA1-Neuronen findet sich unter physiologischen Bedingungen meist eine Faszilitation, unter erhöhter $[\text{Ca}^{2+}]_e$ hingegen eine Depression. Durch den stärkeren AP-induzierten Ca^{2+} -Einstrom wird ein grösserer Teil des RRP ausgeschüttet, sodass eine kurz darauf folgende Stimulation nur noch einen kleineren RRP zur Verfügung hat und damit auch nur ein kleineres EPSC generiert. Das intrazelluläre Rest- Ca^{2+} spielt dabei keine Rolle mehr, da letztlich nicht genügend Transmittervesikel zur Verfügung stehen.

1.4 Zielsetzung

Die Alzheimer Erkrankung stellt die häufigste Form der Demenz dar. Sie ist morphologisch unter anderem durch die Ablagerung von β -Amyloid im Gehirn sowie einem vermehrten Zelluntergang und einer Abnahme der Synapsendichte charakterisiert. Diese synaptische Dysfunktion korreliert eng mit der kognitiven Beeinträchtigung der Alzheimer Patienten (Terry et al., 1991). Die grundlegende Rolle des Amyloid Precursor Proteins und dessen proteolytischen Spaltprodukten ist für die Pathogenese des Morbus Alzheimer unbestritten. Zellen mit krankheitsspezifischen Störungen der APP-Kaskade und konsekutiv erhöhten $\text{A}\beta$ -Werten zeigen auch elektrophysiologische Veränderungen wie abgeschwächte synaptische Übertragung oder verringerte Spontanaktivität. Der dafür verantwortliche

Mechanismus ist allerdings noch zu großen Teilen unklar. Genauere Kenntnisse über die physiologische Funktion des Amyloid Precursor Proteins und dessen Spaltprodukten bei der synaptischen Übertragung würde viel zum Verständnis der Pathologie beitragen. Kamenetz et al. (2003) konnten zeigen, dass sowohl A β die synaptische Übertragung moduliert, als auch umgekehrt über die neuronale Aktivität die A β -Sekretion beeinflusst wird. Diese Ergebnisse deuten auf einen physiologischen Regelkreis für synaptische Erregbarkeit hin, in dem die APP-Kaskade involviert ist. Wenn dies stimmt, so sollte auch ein totales Fehlen von APP und somit auch A β einen physiologischen Effekt auf die synaptische Übertragung haben.

Um diese Hypothese zu validieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit elektrophysiologische Messungen an autaptischen CA1-Neuronen hippocampaler Primärzellkulturen durchgeführt. Dabei wurden die Daten der Zellen von APP-knockout Mäusen mit denen von Wildtyp Mäusen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Mausmodell

Zur Erforschung der physiologischen Funktion des Amyloid Precursor Proteins wurde ein Mausmodell gewählt, welches dieses Protein nicht exprimiert. Bei dieser APP-knockout Mauslinie wurde durch cre/lox vermittelte Rekombination ein 200kb großer, die Exons 2 bis 17 umfassender Abschnitt der APP-Gens deletiert. Die Herstellung erfolgte mittels Blastocysteninjektion von ES-Zellen auf C57BL/6 x 129ola Hintergrund (Li et al., 1996).

Homozygote APP-KO Mäuse sind lebensfähig und fertil, jedoch ca. 15-20% leichter als Wildtypmäuse (Magara et al., 1999). Als einzige morphologische Veränderung zeigte sich bei APP-KO Mäusen eine Agenesie des Balkens (Müller et al., 1996). Weiterhin wurde für die Knockout-Mäuse eine, durch intraperitoneale Kainatinjektion induzierte Hypersensitivität gegenüber Krämpfen beschrieben (Steinbach et al., 1998). Die elektrophysiologischen Messungen wurden an Zellen dieser APP-defizienten Maus durchgeführt. Für die Kontrollmessungen wurden C57 BL/6 x 129ola Wildtyp-Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden an der zentralen Tierhaltungseinrichtung des damaligen Instituts für Neuropathologie der Universität München unter Standardbedingungen gehalten.

2.1.2 Hippocampale Einzelzellkulturen

Die Zellkulturen wurden in Anlehnung an die Arbeiten von Rosenmund et al. (1993) und Rosenmund et al. (1995) durchgeführt.

Hirnpräparation

Die Präparation der Mäuse wurde am 1. bis 3. postpartalen Tag durchgeführt. Die Mäuse wurden mittels Formaldehyd narkotisiert und dann dekapitiert. Die weitere Präparation geschah in gekültem HBSS (Invitrogen, Karlsruhe). Die Kalotte wurde eröffnet und das Gehirn in toto entfernt. Nach dem Abtrennen beider Hemisphären von Hirnstamm, Kleinhirn und Thalamus wurden die beiden Hemisphären für die weitere Präparation in eine frische, HBSS gefüllte Petrischale verlagert. Dort wurden die vaskularisierten Meningen entfernt und dann der Hippocampus vom übrigen Cerebrum abgetrennt.

Herstellung der Astrozyten-Mikroinseln

Zur Herstellung der ernährenden Astrozytenschicht wurden die vom Hippocampus getrennten Großhirnhemisphären verwendet. Zur Lösung des Zellverbandes wurden die Hirnteile ca. 5 Minuten lang in 5ml einer 10:1 mit HBSS verdünnten und auf 37° Celsius erwärmten Trypsinlösung mittels einer ausgezogenen Pipette homogenisiert. Nach Zugabe von 5 ml DMEM (Pan, Aidenbach, Deutschland) wurde das Homogenisat zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und die Zellen in Kulturflaschen übertragen. Die Kultivierung erfolgte in einem Medium aus DMEM angereichert mit 4,5 g/l Glucose, 5% FBS (Pan, Aidenbach), 100 I.E./ml Pen/Strep (Invitrogen, Karlsruhe), N2-Supplement (Invitrogen, Karlsruhe), Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe) und Mito⁺ Serum-Extender (BD Bioscience, USA) bei 37° Celsius in einer mit 10% CO₂ angereicherten Atmosphäre. Nach ca. 10 Tagen, wenn sich eine gleichmäßige Astrozytenschicht gebildet hatte, wurden die Gliazellen erneut trypsinisiert und auf die speziellen Glasplättchen (cover-slips) in den Kulturplatten (12 well) übertragen.

Diese cover-slips (Durchmesser 18 mm) wurden zuvor mit 0,15 prozentigem Agar beschichtet und dann mittels eines teflonbeschichteten Stempels eine 3:1:1 Mischung aus Essigsäure, Kollagen und PDL in Form ca. 200 x 200 µm großer Punkte aufgetragen. Diese Behandlung hatte zur Folge, dass die Astrozyten nur auf diesen sog. microdots anwuchsen. Pro coverslip wurden etwa 5000-10000 Zellen aufgebracht. Nach ca. 1 Woche hatten sich die

Astrozyteninseln adäquat ausgebildet, so dass die Hippocampus Neuronen darauf angesiedelt werden konnten (siehe Abb. 2).

Kultivierung der hippocampalen CA-1 Neurone

Zur Herstellung der Neuronen-Kultur wurden die Hippocampi wie oben beschrieben präpariert. Dann folgte die Auflösung des Zellverbands mittels einer auf 37° Celsius erwärmten DMEM Lösung, angereichert mit 0,2 mg/ml Cystein, 100 mM CaCl₂, 50 mM EDTA, sowie 10 U/ml Papain (Roche, Mannheim). Die Andauung wurde nach 60 Minuten durch die Zugabe einer Inaktivierungslösung aus DMEM, 5% FCS, 25 mg Albumin und 25 mg Trypsininhibitor gestoppt. Nach sanfter Triturierung mit einer feuerpolierten Pasteurpipette wurden etwa 500 Hippocampus-Neurone pro coverslip auf die Astrozyten-microdots aufgebracht.

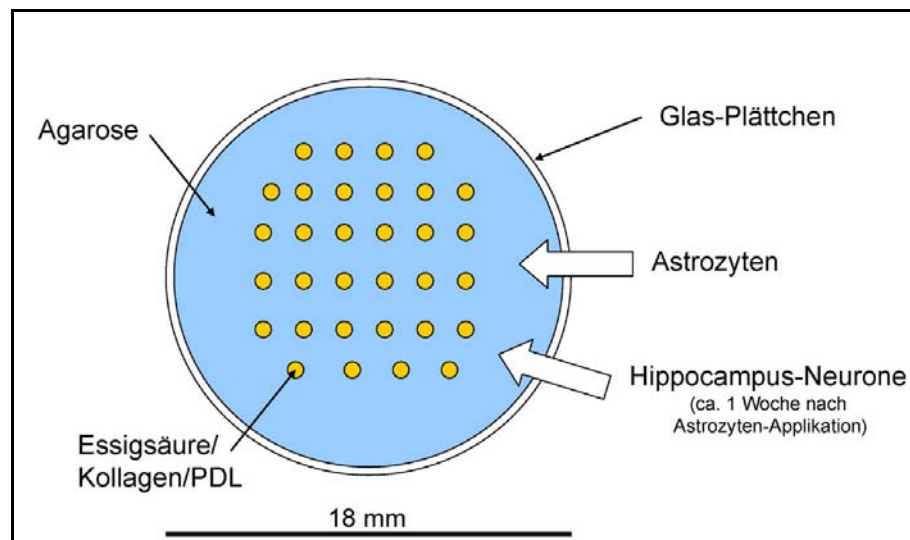


Abbildung 02: Herstellung der autaptischen Neuronenkultur (schematische Darstellung). Ein mit Agarose beschichtetes Glasplättchen (Durchmesser 18 mm) wird mit einem Gemisch aus Essigsäure, Kollagen und PDL bestempelt. Dann wird die Astrozytensuspension appliziert. Nach ca. 1 Woche haben sich die Astrozyten-Microdots soweit ausgebildet, dass die hippocampalen Neuronen darauf angesiedelt werden können.

Als Kulturmedium diente in diesem Stadium Neurobasal A (GIBCO BRL, USA), angereichert durch Vitamin B27-Supplement, Glutamax und Pen/Strep. Die Kultivierung erfolgte bei 37° Celsius in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre. Um eine weitere, exzessive Astrozytenproliferation zu vermeiden, wurde am Tag nach der Neuronenzugabe die antimittotische Substanz 5-fluoro-2-deoxyuridin in einer Konzentration von 8 mM dem Kulturmedium beigegeben.

2.1.3 Autapsen

Ziel dieser aufwendigen Zellkultur war die Herstellung von neuronalen Einzelzellkulturen, die die Eigenschaft besitzen, sog. Autapsen auszubilden. Dabei handelt es sich um Synapsen, die durch die Anlagerung eines Axon an einen Dendriten derselben Zelle entstehen.

Da Gliazellen als Hilfszellen für die Neurone vielfältige Aufgaben erfüllen, halten sich die Nervenzellen in ihrem Wachstum an die Grenzen der Astrozyteninseln. Gelangen die Neuriten an den Rand der microdots, so richtet sich ihr Wachstum wieder mehr zur Mitte. Daher wachsen die Axone einer Zelle innerhalb des eigenen Dendritenbaums und bilden so nach einigen Tagen Synapsen mit sich selbst aus, die Autapsen. Voraussetzung dafür ist allerdings, dass sich auf einem Microdot auch nur ein Hippocampus-Neuron ansiedelt.

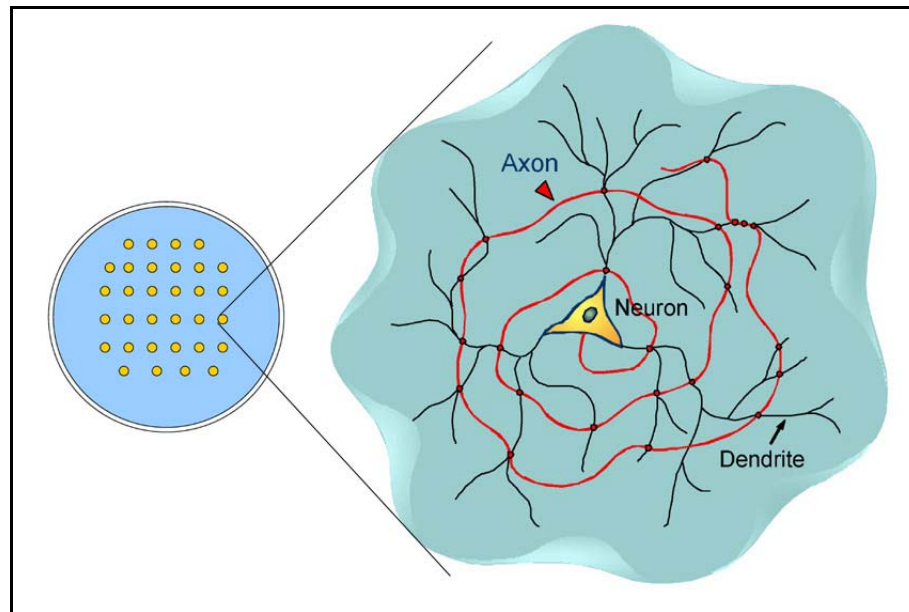


Abbildung 03: Autaptische Einzelzellkultur. Jeder Microdot beherbergt optimalerweise ein Neuron, welches nach einigen Tagen mit sich selbst sog. Autapsen ausbildet.

Autapsen wurden mittlerweile zum Ziel zahlreicher Untersuchungen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl EPSCs die durch ein Aktionspotential evoziert wurden, als auch spontane mEPSCs verglichen mit gewöhnlichen Synapsen nahezu identische elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen (Bekkers und Stevens, 1991).

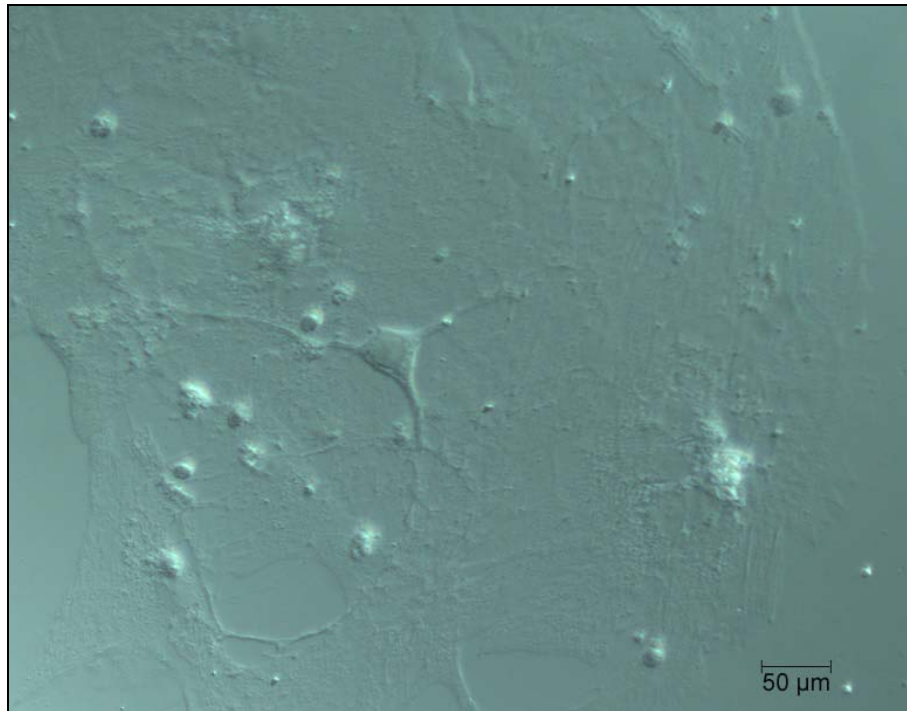


Abbildung 04: *Nativbild eines autaptischen Hippocampus-Neurons. Zu sehen ist die Astrozyteninsel, auf der zentral eine isolierte hippocampale Pyramidenzelle sitzt. Die Zellfortsätze überschreiten nicht die Grenze der Astrozyteninsel, sondern bilden Autapsen aus.*

2.2 Elektrophysiologie

2.2.1 Patch-clamp-Technik

Die von Neher und Sakmann (1976) entwickelte patch-clamp-Technik ermöglicht es, sowohl transmembrane Ströme der gesamten Zellmembran von Neuronen als auch den Strom durch einzelne Ionenkanäle zu messen. Ebenfalls lässt sich dabei das Membranpotential der 'gepatchten' Zelle modulieren. Die patch-clamp-Technik stellt ein spezielles Spannungs-Klemm-Verfahren (engl.: voltage-clamp) dar und funktioniert auf der Basis eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Das heißt, es wird aufgrund von Änderungen des Membranpotentials einer gepatchten Zelle ein

Kompensationsstrom generiert, der der Potentialmodulation entgegenwirkt und somit die Spannung über der Zellmembran während eines Experimentes konstant hält. Dieser Kompensationsstrom repräsentiert den Ionenstrom durch eine Membran und kann mittels des patch-clamp-Aufbaus gemessen werden.

Bei der patch-clamp-Technik wird eine spitzgezogene Glaskapillare (Spitzendurchmesser: 1 - 2 μm) unter mikroskopisch-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 darin befindlichen, chlorierten Silberelektrode die Patchelektrode. Die stabile Membran-Glas-Verbindung mit Dichtungswiderständen im Gigaohm-Bereich (engl.: Gigaohm-seal) bewirkt durch die elektrische Abschirmung des Membranflecks (engl.: patch) von seiner Umgebung, ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Die Stabilität der Verbindung zwischen Elektrode und Membran erlaubt es, mechanische Manipulationen der Membran durchzuführen, ohne den hochohmigen Abdichtwiderstand zu zerstören. So wird bei der whole-cell-Konfiguration (engl. für Ganz-Zell-Anordnung), die bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten angewandt wurde, das Membranstück unterhalb der Pipettenöffnung durch ruckartiges Ansaugen herausgerissen. Dadurch erhält man einen niederohmigen Zugang zum Zellsoma. In dieser Konfiguration tauscht sich das Zytoplasma durch Diffusion schnell mit der Pipettenlösung aus und es ergibt sich aufgrund des im Vergleich viel größeren Pipettenvolumens ein definiertes Ionenverhältnis im Innern der Zelle, das durch die Wahl der Intrazellulärlösung (IZL, siehe Kapitel 2.2.8) bestimmt wird.

Man kann die Ergebnisse solcher Ganzzellmessungen als Summation vieler simultan aktiver Ionenkanäle auffassen. Messbar ist sozusagen das makroskopische Strommuster einer Zelle, ohne dass man den Beitrag einzelner Ionenkanäle aufschlüsseln kann. Dabei muß der seitliche Leckwiderstand erhalten und somit der Leckstrom gering sein, so dass der Ionenstrom durch die gesamte verbleibende Zellmembran messbar wird.

Vom Operationsverstärker (im Vorverstärker integriert) werden Spannungsänderungen über der Membran registriert und durch Initiierung eines Kompensationsstromes über die Patchpipette ausgeglichen. Unter optimalen Bedingungen stellt dieser Kompensationsstrom das Äquivalent des transmembranen Ionenstromes der gesamten Zelle dar.

2.2.2 Aufbau des Messplatzes

Die optische Einheit bestand aus einem Invert-Mikroskop (BX50WI, Olympus, Hamburg), ausgestattet mit einem 60-fach Objektiv (LUMPlanFI, Olympus, Hamburg). Zur Überwachung der Messung wurde das mikroskopische Bild auf einem externen Monitor abgebildet. Das zu untersuchende Präparat wurde in die mit artifizieller Extrazellulärlösung durchspülte Badkammer platziert (Durchflussrate 1,5 - 2 ml/min), die durch zwei Mikromanipulatoreinheiten in horizontaler Ebene justiert werden konnte. Das Objektiv wurde von unten an den Boden der Badkammer herangefahren.

Die patch-clamp-Einheit bestand aus einem motorgesteuerten Mikromanipulator (LN mini / combi, Luigs & Neumann, Ratingen), der über eine Aufnahme für den Vorverstärker verfügte. Der Vorverstärker besaß eine Aufnahme für den Pipettenhalter, in den die Patchpipetten eingesetzt wurden, sowie über einen Erdungseingang für die Badelektrode.

Die Patchpipetten 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. electronic, Göttingen) in zwei Zugschritten gefertigt. Für die Ganzzelleableitungen wurden Elektroden mit einem Öffnungswiderstand von 2 – 4 M Ω verwendet, die vor der Messung mit Intrazellulärlösung befüllt wurden. Die Verbindung mit dem Vorverstärker wurde über das Eintauchen der chlorierten Silberdrahtelektrode des Vorverstärkers in die IZL der Pipette erreicht.

Der Mikromanipulator erlaubte die freie Bewegung und gleichzeitig stabile Haltung des Vorverstärkers mit Pipettenhalter und Pipette in allen drei

Raumachsen und wurde über eine elektronische Fernsteuerung bedient. 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 (G4-Macintosh, USA) angesteuert. Mittels der speziell für patch-clamp-Messungen entwickelten Software (Pulse 8.50, HEKA, Lambrecht) konnte das analog aufgenommene Signal durch den AD-Wandler des EPC 9 digitalisiert dargestellt werden. Mit dieser Software wurden nicht nur die Stromveränderungen der Zelle gemessen und aufgezeichnet, über sie konnte auch die Stimulation des Neurons durch Veränderung des Haltepotentials gesteuert werden.

Der Messplatz war mit einem zweiten Mikromanipulator (Patchman, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) ausgerüstet, der von kontralateral an die zu messende Zelle herangeführt werden konnte. An diesen wurde ein sog. Mikrostepper (Warner Instruments, USA) befestigt, der standardisiert eine Quarzglaskapillare mit einem Innendurchmesser von 430 μm (Polymicrotech, USA) für eine festgelegte Zeit in unmittelbare Nähe der Zelle bringen und dann wieder entfernen konnte. Die Applikationspipette war über ein Schlauchsystem mit einem steuerbaren Ventil (Warner Instruments, USA) verbunden, das genauso wie der Mikrostepper von einem Stimulationsgenerator (TIB-14, Heka) angesteuert wurde. Dieser konnte ebenfalls über die patch-clamp Software Pulse 8.50 (HEKA) automatisch gesteuert und so die Sucrose-Applikation in das Messprotokoll integriert werden.

Der gesamte Messbereich (Mikroskop, Vorverstärker, Mikromanipulator) stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC, Peabody, USA). Dadurch konnten Vibrationen, die ein Verrutschen der Messpipette oder des zu untersuchenden Präparats zur Folge hätten, weitestgehend vermieden werden. Um übermäßiges elektrisches Rauschen während der Messungen zu verhindern, sorgte ein Faraday'scher Käfig für die nötige elektromagnetische Abschirmung.

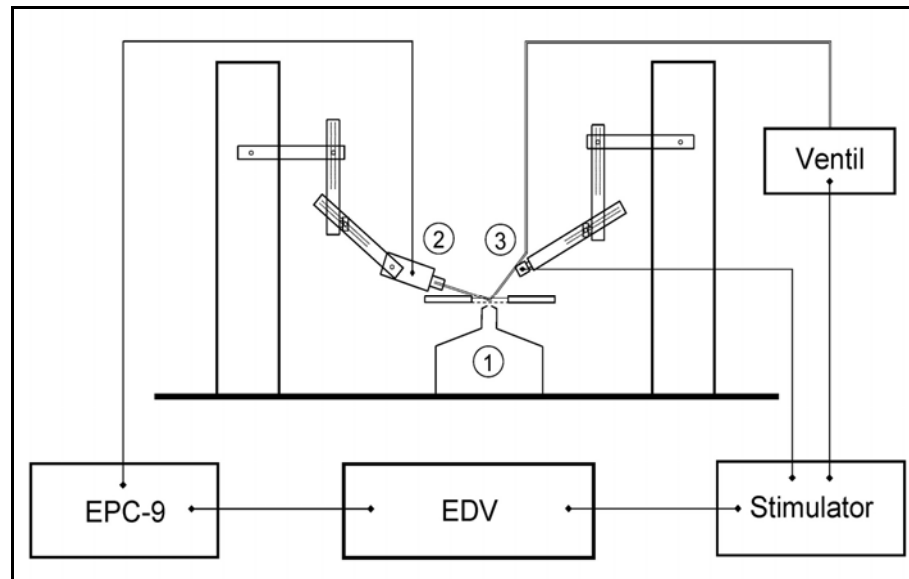


Abbildung 05: Schematischer und vereinfachter Aufbau des Messplatzes. Das Objektiv des Mikroskops wird von unten an die Badkammer gebracht (1). Darin wird die Zelle von EZL umspült. Die mit IZL gefüllte Messpipette ist über den Pipettenhalter fest mit dem Vorverstärker verbunden (2). Dieser ist über ein Kabel mit dem patch-clamp-Verstärker (EPC-9) konnektiert. Der Vorverstärker ist an einen elektronisch steuerbaren Mikromanipulator montiert. Eine zweite Pipette zur extrazellulären Lösungs-Applikation ist an einem mikrostepper angebracht, welcher wiederum an einem Mikromanipulator befestigt ist (3). Beide Mikromanipulatoren sind über Montagesäulen mit dem schwingungsgedämpften Tisch verschraubt. Der Zufluss über die Applikationspipette wird über ein automatisches Ventilsystem geregelt. Mikrostepper und Automatikventil werden über den Stimulationsgenerator angesteuert. Sowohl die Steuerung als auch die Datenvisualisierung und -speicherung werden über ein zentrales EDV-System durchgeführt.

2.2.3 Elektrische Eigenschaften der whole-cell-Konfiguration

Die Zellmembran kann man elektrisch durch ihren Widerstand (R_m) und eine dazu parallel angeordnete Kapazität (C_m) darstellen (siehe Abb. 06). Im whole-cell Modus, bei dem die Pipette mit dem Zellsoma leitend verbunden

ist, liegt zwischen Silberdraht und Soma ein Widerstand (R_s) an. Im Idealfall entspricht dieser dem Pipettenwiderstand. Da sich jedoch nach dem Durchbrechen der Membran Fragmente derselben in Pipettennähe 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 verfügte über Schaltkreise, die diese Erhöhung des Serienwiderstandes kompensieren (C-fast-, C-slow-Kompensation). Während der Messungen kann ein erneutes Verschließen der Membran unter der Patchpipette (engl.: resealing) ebenfalls zu einer Erhöhung des Serienwiderstandes führen. Aufgrund dieser Tatsache musste während der laufenden Messung der Serienwiderstand wiederholt überprüft werden, um im Falle eines resealings die whole-cell-Konfiguration wieder herzustellen oder gegebenenfalls die Messung abubrechen.

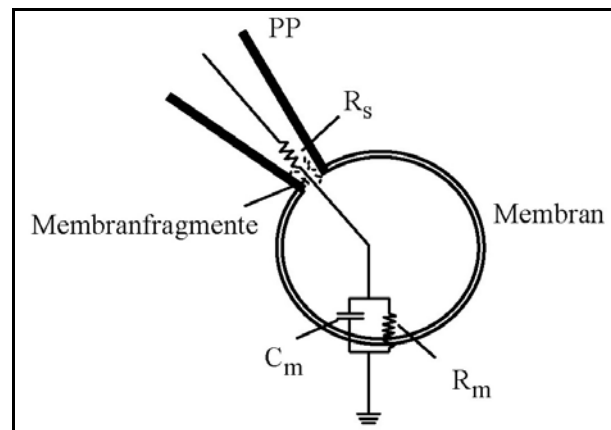


Abbildung 06: Ersatzschaltbild der whole-cell-Konfiguration (nach Numberger und Draguhn, 1996). Nach dem Durchbrechen der Zellmembran erhöht sich der Serienwiderstand durch Membranfragmente. PP: Patchpipette, R_s : Serienwiderstand, C_m : Membrankapazität, R_m : Membranwiderstand.

2.2.4 Erzielen der whole-cell-Konfiguration

Die elektrophysiologischen Messungen wurden zwischen dem 18. und dem 21. Tag nach Herstellung der hippocampalen Primärzellkultur durchgeführt. Ein mit Einzellzellkulturen bewachsener cover-slip wurde aus dem Nährmedium genommen, und in der mit artifizieller Extrazellulärlösung (EZL) gefüllten Badkammer platziert. Die Fixierung am Boden der Kammer erfolgte mit Hilfe einer u-förmigen Platinklammer. Durch Einschalten einer Pumpe wurde gleichzeitig eine geringe Menge EZL der Badkammer zugeführt bzw. abgepumpt, so dass ein kontinuierlicher Austausch stattfand. Nach Funktionskontrolle der verschiedenen Geräte wurde mit Hilfe der Mikrometerschrauben des Objektisches der cover-slip nach einer zur Messung geeigneten Zelle abgesucht. Dabei mussten mehrere Kriterien beachtet werden: Da man Einzellzellkulturen messen wollte, durfte auf der Astrozyteninsel nur genau ein Neuron angewachsen sein. Des Weiteren war das Ziel, CA-1-Neurone zu messen, das heißt die Zelle sollte eindeutig als Pyramidenzelle mit ausreichender Größe zu identifizieren sein. Die

Erfolgsaussicht der Messung konnte durch optische Einschätzung der Vitalität des Neurons beurteilt werden, so dass die Effizienz der Messungen mit zunehmender Erfahrung stieg. Daneben war ebenfalls darauf zu achten, dass die Zelle in der Badkammer so platziert wurde, dass sie später mit beiden Pipetten gut zu erreichen war.

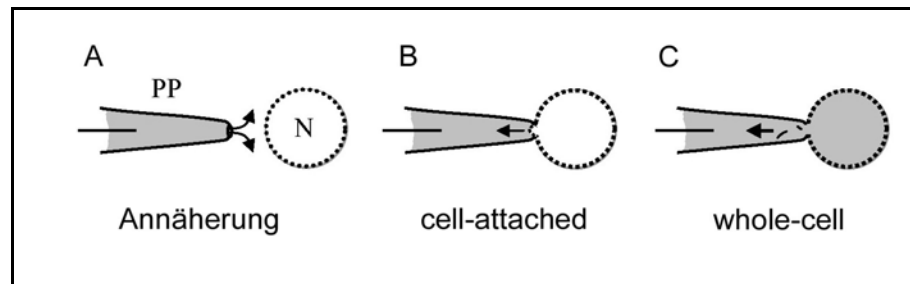


Abbildung 07: Generierung der whole-cell Konfiguration. A: Das Annähern der Pipette an die Zelle muss unter angelegtem Überdruck geschehen, um ein Verschmutzen der Öffnung zu vermeiden. B: Bei nur noch sehr geringer Entfernung zur Zelle wird durch leichten Unterdruck das Gigaseal und somit die cell-attached Konfiguration etabliert. C: Durch kurzen, kräftigen Sog wird die Zellmembran der Pipettenöffnung durchbrochen, und damit die whole-cell Konfiguration hergestellt. Die Pipettenlösung tauscht sich mit dem Zytoplasma aus. PP: Patchpipette; N: Neuron.

Nach Auswahl eines entsprechenden Neurons wurde die Messpipette mit Hilfe der Mikromanipulatoren der Zelle angenähert. Über ein Mundstück, das durch einen Schlauch mit dem Pipettenhalter verbunden war, konnte ein leichter Überdruck in der Pipette erzeugt werden. Dieser minimale Ausstrom von IZL verhinderte zum einen ein vorzeitiges Verstopfen der Öffnung, zum anderen konnte man dadurch bei ausreichender Nähe zum Neuron eine Eindellung der Zelloberfläche erkennen. Durch Wegnahme des Überdrucks und eventuell sanftem Sog konnte in den meisten Fällen die cell-attached Konfiguration hergestellt werden. Dabei stieg der Serienwiderstand in den Gigaohm-Bereich, was als Gigaseal bezeichnet wird. Nach Durchführung der C-fast-Kompensation wurde die Zelle durch Veränderung des Kompensationsstroms auf ein Ruhemembranpotential von -80mV gebracht.

Die Kompensation des Serienwiderstandes wurde auf 60 Prozent eingestellt. Durch ruckartiges Anlegen eines Unterdruckes über das Mundstück an die Pipette wurde dann die Membran innerhalb der Pipettenöffnung durchbrochen. Dabei sollte der Serienwiderstand im Gigaohm-Bereich bleiben. Nach Erlangen der whole-cell-Konfiguration wurde zusätzlich die C-slow-Kompensation aktiviert. Die Stabilität zwischen Zelle und Pipette konnte auch durch die Beobachtung des Leckstroms und der Rauschintensität beurteilt werden. Die Daten wurden bei einer Frequenz von 2 kHz gefiltert, und mit 10 kHz aufgenommen. Sowohl ein initial zu hoher oder auch ein sich während der Messungen verändernder Leckstrom waren Abbruchkriterien.

2.2.5 Messung von Spontanaktivität

Bei stabilen Verhältnissen wurde zunächst für mindestens 2 Minuten Spontanaktivität aufgezeichnet. Die autaptische Isolation der gemessenen Zellen hatte zur Folge, dass jeder spontane Vesikelrelease auch ein mEPSC in der gleichen Zelle auslöste, und durch die whole-cell Konfiguration wurde jeder dieser mEPSCs auch über die Messpipette registriert. Die mit Pulse 8.50 (HEKA) erhobenen Daten konnten später mit Hilfe der Software Axograph 4.1 (Axon Instruments, USA) ausgewertet werden. Dabei wurden die spontanen Ströme mit einem vorprogrammierten Muster, welches einem durchschnittlichen mEPSC entsprach, verglichen. Der Grenzwert für die Registrierung betrug den 3,5 fachen Wert der Standardabweichung von der Grundlinie. Auf diese Weise wurden die einzelnen mEPSCs aus dem Hintergrundrauschen herausgefiltert. Diese konnten dann für jede Zelle bezüglich Amplitude und Ladung vermessen und gemittelt, sowie über die Anzahl und Ausnahmedauer deren Frequenz errechnet werden.

2.2.6 Messung AP-induzierter Ströme

Zur Induktion eines Aktionspotentials wurde das Membranpotential der Zelle, welches in Ruhe bei -80 mV gehalten wurde, für eine Millisekunde auf Null gebracht.

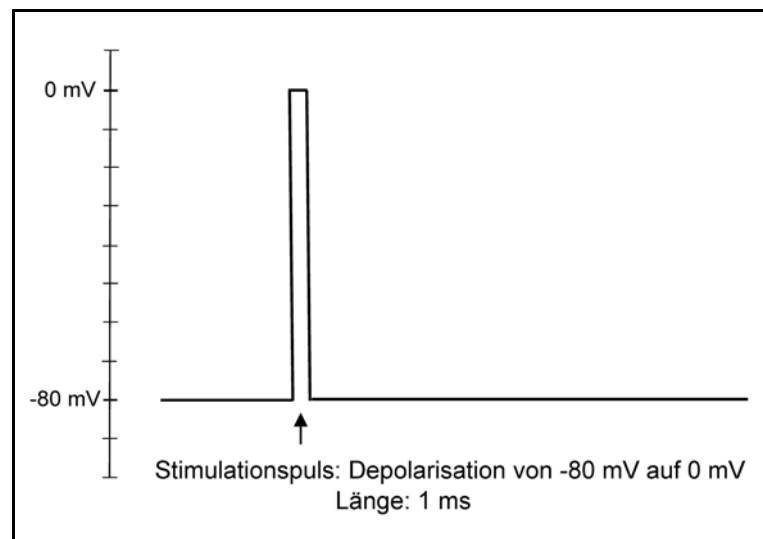


Abbildung 08: Standardisierter Stimulationspuls. Dieser wurde für alle Messungen verwendet, in denen EPSCs durch Aktionspotentiale ausgelöst werden sollten. Das Anheben des Haltepotentials der Zelle von -80 mV auf 0 mV für eine Millisekunde, führt zum Öffnen schneller Natriumkanäle. Durch den resultierenden Einstrom positiver Ladung wird das Aktionspotential generiert.

Das in Abb. 09 dargestellte Beispiel zeigt die aufgezeichnete Kurve nach einfacher Stimulation und Ableitung in der whole-cell Konfiguration. Nach einem durch den Depolarisationsreiz verursachten Artefakt kommt es zum schnellen Einstrom von Natrium-Ionen im Rahmen des ausgelösten Aktionspotentials. Dieser Einstrom positiver Ladung in die Zelle wird definitionsgemäß negativ dargestellt. Der postsynaptische Einwärtsstrom erscheint nur einige Millisekunden nach Beginn des APs und ist durch das Öffnen unspezifischer Kationenkanäle im Rahmen der AMPA-Rezeptor Aktivierung bedingt. Die Gipfel-Amplitude gibt die maximal geflossene

Stromstärke an, die durch ein präsynaptisches AP ausgelöst, postsynaptisch geflossen ist.

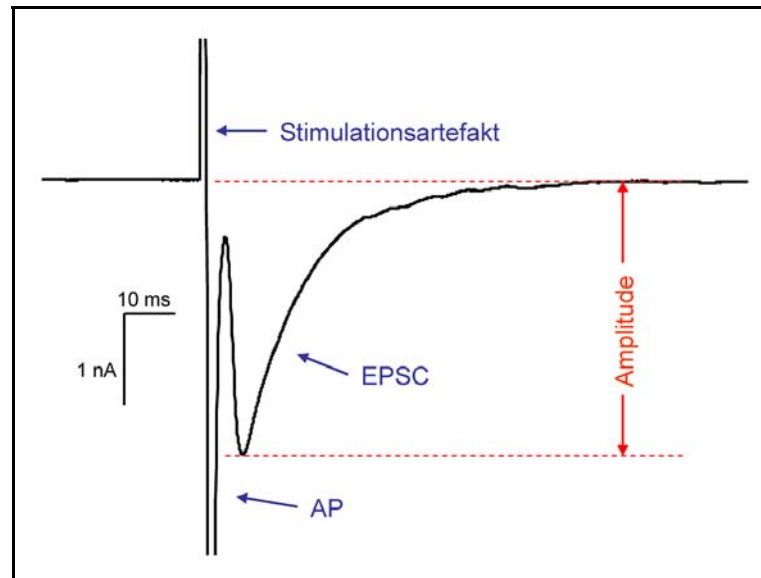


Abbildung 09: AP-induziertes EPSC. Darstellung der gemessenen Ströme während einer einzelnen Stimulation. Das AP ist durch einen schnellen Einstrom positiver Ladung in die Zelle gekennzeichnet. Noch während dessen Rückbildung führt das darauf folgende EPSC durch die Öffnung unspezifischer postsynaptischer Kationenkanäle ebenfalls zu einem negativen Ausschlag. Dieser Ionenstrom ist langsamer und die maximale Stromstärke ist geringer. Die gesamte elektrische Ladung Q des EPSC ist allerdings durch die längere Dauer meist deutlich größer als die des AP. Die Amplitude des EPSC, d.h. dessen maximale Stromstärke, gilt als Maß für die basale synaptische Übertragungsfähigkeit.

Ein großer Teil der Versuche dieser Arbeit beruhen auf AP-evozierten postsynaptischen Strömen, wobei diese entweder nach Einzelreizen oder nach Reizfolgen abgeleitet wurden.

2.2.7 Messung osmotisch induzierter Ströme

Eine andere Möglichkeit, Nervenzellen zu stimulieren, ist, sie einem osmotischen Reiz auszusetzen. Dies führt zu einer vollständigen und Kalzium-unabhängigen Entleerung des Readily-Releaseable Vesikelpools. Als stark osmotisch wirksame Substanz wurde bei den Versuchen dieser Arbeit eine Sucroslösung in einer Konzentration von 500 Millimol pro Liter gewählt. Um die Entleerung des Vesikelpools messbar zu machen, musste dies möglichst schnell geschehen. Dies setzte wiederum voraus, dass die Sucroslösung so nah wie möglich an der Zelle appliziert werden musste, ohne die Zelle durch den Flüssigkeitsstrom zu beschädigen. Ein Abstand von circa 100 Mikrometern zur „gepatchten“ Zelle stellte sich als optimal heraus. Die Applikationspipette war wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben in das System integriert. Die über die Software programmierbare Steuerung von Mikrostepper und Ventilsystem machte es möglich, die Sucroslösung für einen Zeitraum von exakt 4 Sekunden nah an der Zelle zu applizieren und gleichzeitig über die patch-Pipette das resultierende EPSC aufzuzeichnen.

2.2.8 Lösungen

Für die patch-clamp Experimente wurden hauptsächlich zwei verschiedene Lösungen verwendet, deren Zusammensetzung der Arbeit von Fernandez-Chacon et al. (2001) nachempfunden wurden.

Die Badlösung diente als artifizielle Extrazellulärflüssigkeit. Sie zirkulierte durch die Badkammer, in der sich die zu messenden Zellen während der Experimente befanden.

Badlösung / artifizielle Extrazellulärlösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	140
HEPES	10
Glukose	10
CaCl ₂	1 / 4
MgCl ₂	4
KCl	2,4
Bicuculline	15

Die Badlösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,3 gebracht sowie auf eine Osmolarität von circa 300 mOsm eingestellt. Einige Versuche wurden in einem Milieu mit geringer Ca²⁺-Ionen Konzentration (1mM) durchgeführt, die meisten bei 4 mM. Die hohe Mg²⁺-Ionen Konzentration hemmt wirksam NMDA-Rezeptoren, so dass nur AMPA-vermittelte EPSC gemessen wurden (Bekkers und Stevens, 1993). Zur Blockierung inhibitorischer Ströme wurde der Badlösung noch der GABA-Rezeptor-Antagonist Bicuculline zugesetzt.

Die Pipettenlösung stellt die artifizielle Intrazellulärlösung dar und wurde vor jeder Messung mit Hilfe eines Mikroloaders als Spritzenaufsatz in die frisch gezogene Patch-Pipette gefüllt. Nach Herstellung der whole-cell Konfiguration, also nach Durchreißen der Zellmembran unterhalb der Pipettenöffnung, tauschte sich diese mit dem Zellplasma aus. Da das Volumen der Zelle gegenüber dem in der Pipette vernachlässigbar klein ist herrschte nach kurzer Zeit innerhalb der Zelle das definierte Milieu der artifiziellen Intrazellulärlösung.

Pipettenlösung / artifizielle Intrazellulärlösung

Substanz	Konzentration (mM)
NaCl	10
Kalium-Glukonat	125
EGTA	1
MgCl ₂	4,6
ATP-Na ₂	4
Kreatinphosphat	15
Phosphokreatinkinase	20 U/ml

Auch die Pipettenlösung wurde auf einen pH-Wert von 7,3 sowie eine Osmolarität von 300 mOsm eingestellt. Zur Vermeidung von Schwebstoffen jeglicher Art, die die Pipettenöffnung verstopfen könnten, wurde die Lösung ultrafiltriert.

Alle, für die oben genannten Lösungen benötigten Chemikalien wurden von der Firma Sigma (USA) erworben.

2.3 Auswertung und Statistik

Die Software Pulse 8.50 (Heka, Lambrecht) ermöglichte neben dem Aufzeichnen auch das Vermessen der evozierten EPSCs. Diese Daten wurden von der Software in ein Logbuch gespeichert und konnten so über eine speziell programmierte Makrofunktion in das Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL (Microsoft, USA) importiert werden. Die Datenanalyse der Spontanaktivität erfolgte wie bereits in Kapitel 2.2.5 beschrieben mit Hilfe des Mustererkennungsprogramms Axograph 4.1 (Axon Instruments, USA), auch weitere Datenanalysen der osmotisch induzierten Ströme erfolgten mittels dieses Programms. Sowohl die Aufbereitung und graphische Darstellung als auch die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Programms EXCEL durchgeführt. Da alle Messungen über eine Stichprobenanzahl von $n < 40$ verfügten und die Ergebnisse

normalverteilt waren, diente der t-Test für unabhängige Stichproben als statistisches Mittel zur Überprüfung der Signifikanz der Werte (SACHS, 1997). Unterschiede zweier Mittelwerte wurden mit $p < 0,05$ als signifikant eingestuft. Außerdem wurde bei allen Mittelwerten als Fehler der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) bestimmt (SACHS, 1997).

3 Ergebnisse

3.1 Synaptische Übertragung bei niedriger extrazellulärer Kalzium - Konzentration

Zunächst wurden Experimente mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 1mM in der extrazellulären Badlösung durchgeführt. Bei dieser relativ niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_e$, die aber in etwa der physiologischen Konzentration entspricht, ist die Freisetzungswahrscheinlichkeit für Neurotransmitter gering.

3.1.1 AP-evozierte Neurotransmitterfreisetzung

Um die durch ein Aktionspotential ausgelöste Transmitterfreisetzung zu beurteilen, wurden die Amplituden der resultierenden Exzitatorisch Postsynaptischen Ströme (EPSC) gemessen. Zur Stimulation wurden die Zellen für eine Millisekunde von -80mV auf 0mV depolarisiert. Bicuculine in der Badlösung blockte die inhibitorischen Ströme, die hohe Mg^{2+} Konzentration verhinderte wie bereits beschrieben eine NMDA-Rezeptor-Aktivierung. Der am Zellsoma gemessene Strom ist dadurch nahezu vollständig AMPA-Rezeptor vermittelt, und summiert sich aus den an jeder Autapse des Neurons entstehenden EPSCs.

Es wurden die Amplituden von insgesamt 63 Neuronen gemessen, wobei pro Zelle mindestens 3 Werte gemittelt wurden. Hierbei zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen APP-KO ($2270,8 \pm 295,8$ pA) und Wildtyp ($1886,4 \pm 297,9$ pA). Man kann also davon ausgehen, dass unter diesen Bedingungen die basale glutamatvermittelte synaptische Übertragung bei APP-defizienten Neuronen nicht bedeutend verändert ist. Allerdings war eine Tendenz zu größeren Amplituden bei den Zellen der APP-knockout Mäuse zu erkennen.

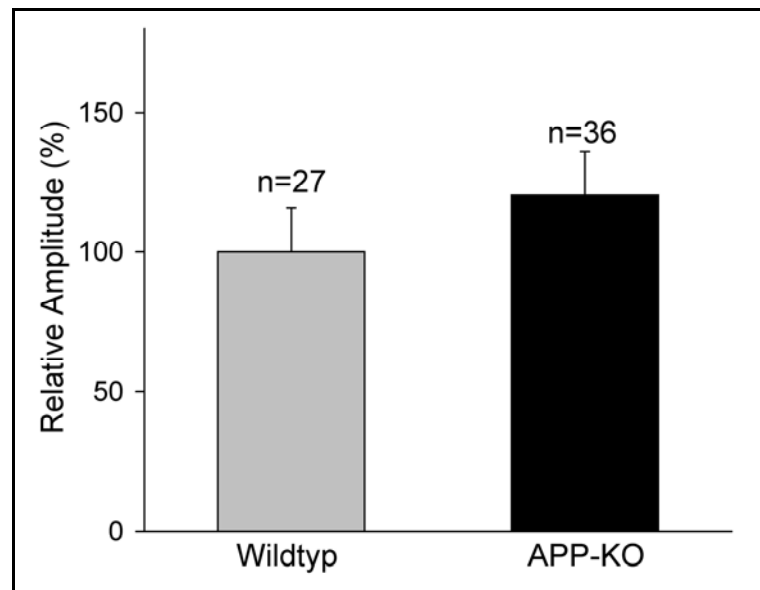


Abbildung 10: Vergleich der basalen synaptischen Übertragung bei 1 mM $[Ca^{2+}]_e$. Das Diagramm zeigt die relative Amplitudendifferenz der AP-evozierten EPSCs zwischen APP-knockout und Wildtyp Zellen. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen ($p > 0,05$). Fehlerbalken = SEM, n = Anzahl der gemessenen Zellen.

3.1.2 Doppelpuls-Stimulation zeigt eine Faszilitation

Ein etabliertes elektrophysiologisches Modell zur Messung der Kurzzeitplastizität ist die Doppelpuls-Stimulation (siehe Kap. 1.3.3). Dafür wurde das autaptische CA-1-Neuron zweimal in kurzen Abständen ebenfalls durch eine 1 ms dauernde Depolarisation stimuliert. Die Amplitudenhöhen der beiden EPSCs wurden ausgemessen und in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Diese Ratio bildet sich aus dem Quotient der Amplitude der zweiten Stimulation zur Ersten (siehe Abb. 12). Ein Verhältnis größer als Eins beschreibt eine Doppelpulsverstärkung, ein Wert kleiner als Eins eine Doppelpulsunterdrückung. Die Ausprägung des jeweiligen Effekts ist vom Stimulationsintervall abhängig. Kürzere Abstände zwischen den Pulsen weisen in aller Regel eine größere Amplitudendifferenz auf als längere Intervalle, weil sich die EPSCs untereinander stärker beeinflussen. Daher wurden die Reizintervalle mit 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 Millisekunden variiert. Pro gemessene Zelle wurden die Amplituden von

mindestens 3 Durchgängen ins Verhältnis zueinander gesetzt und dann gemittelt.

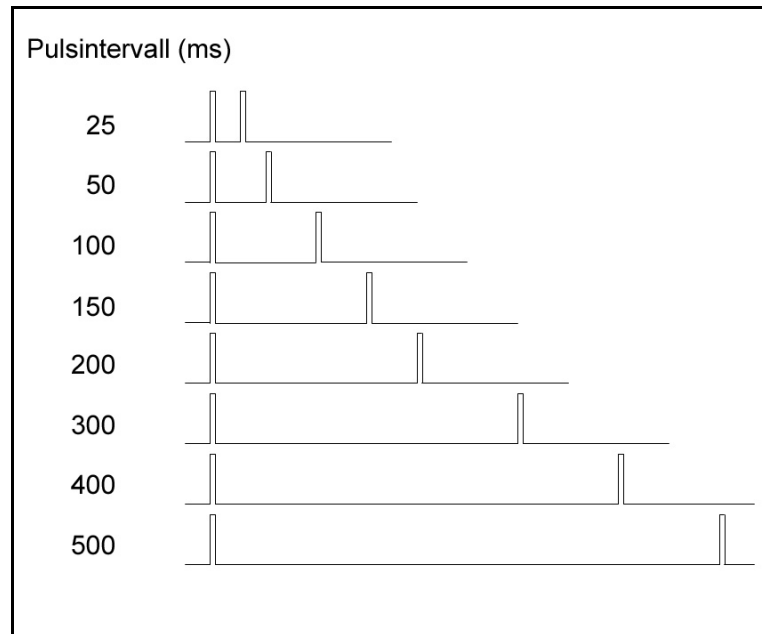


Abbildung 11: Stimulationsprotokoll für die Doppelpuls-Versuche. Jeder Balken steht für einen Stimulationspuls wie oben beschrieben. Die 8 verschiedenen Pulsintervalle liefen hintereinander mit einer Pause von jeweils 2 Sekunden automatisch ab. Das Protokoll wurde pro Zelle mindestens dreimal durchgeführt.

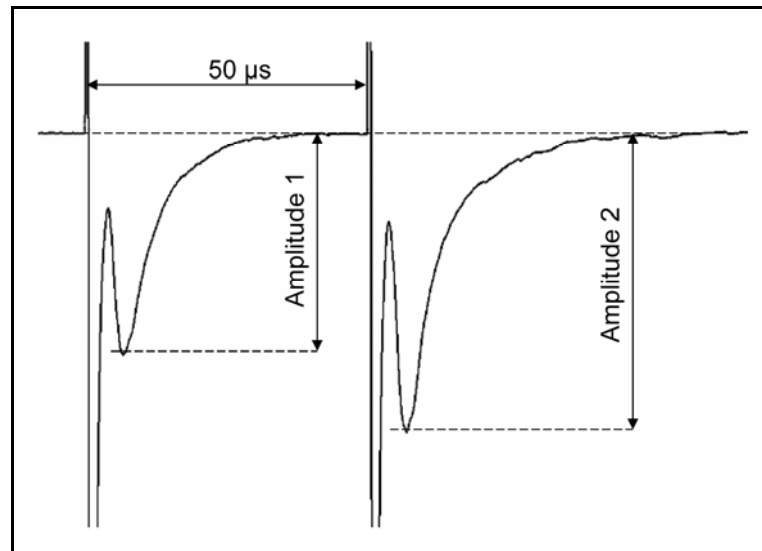


Abbildung 12: Beispiel einer gemessenen Paired-Pulse Facilitation (PPF) bei Doppelpuls-Stimulation. PPF zeigte sich nahezu immer bei niedriger extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. Das Interpulsintervall betrug in diesem Fall $50 \mu\text{s}$. Die Amplitude des zweiten EPSC ist größer als die des ersten. Die Ratio (Amplitude 2 / Amplitude 1) ist größer Eins.

Die Messungen der Doppelpulsstimulation bei 1mM extrazellulärer Ca^{2+} Konzentration ergaben durchgehend eine Verstärkung des zweiten EPSCs im Vergleich zum ersten. Es scheint, dass an den Synapsen hippocampaler Pyramidenzellen in einem Niedrig-Kalzium Milieu, der Ca^{2+} Einstrom durch ein stimuliertes AP nicht die notwendige Größe erreicht, um durch die resultierende Transmitterausschüttung den Readily Releasable Pool (RRP) merklich zu verkleinern. Dadurch sind bei der zweiten Stimulation nicht nur genügend Transmittervesikel vorhanden um die Übertragungsstärke des ersten AP aufrechtzuerhalten, vielmehr sorgt das Rest-Kalzium in der präsynaptischen Endigung für eine verstärkte Transmitterfreisetzung nach der zweiten Stimulation (siehe Kap. 1.3.3). Diese Paired-Pulse Facilitation (PPF) war meist bei einem Intervall von 25ms am ausgeprägtesten und nahm bis zu einem Intervall von 500ms ab (siehe Abb. 13).

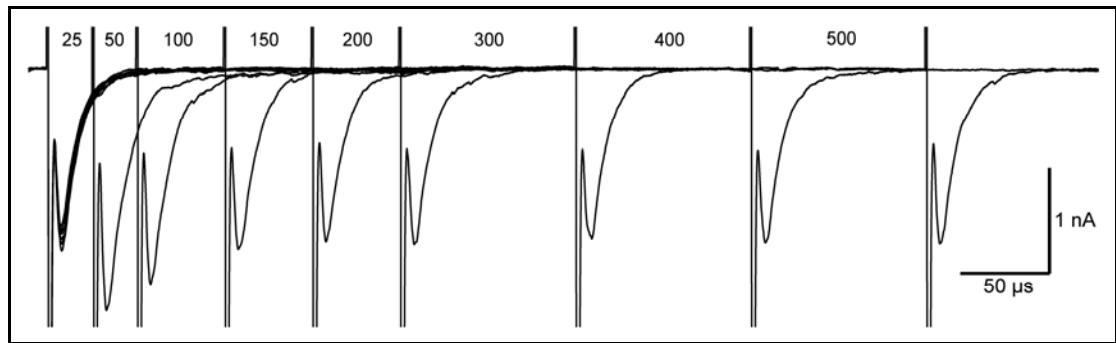


Abbildung 13: Die Doppelpulsverstärkung ist vom Stimulationsintervall abhängig. Dargestellt sind die Ströme, die aus einem Durchgang des Doppelpulsstimulationsprotokolls resultieren. Der Doppelpulsabstand wurde zwischen 25 und 500 ms variiert. Die verschiedenen Intervalle wurden einzeln hintereinander aufgenommen und hier nur zur besseren Anschaulichkeit überlagert dargestellt. Je kürzer der Abstand der Pulse, desto ausgeprägter war die Faszilitation.

Der Vergleich von APP-knockout Neuronen mit denen von Wildtyp-Mäusen erbrachte keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der PPF. Es zeigte sich eine Überlappung der Standardabweichungen in fast allen Bereichen (siehe Abb. 14). Das Fehlen des Amyloid Precursor Proteins und dessen Spaltprodukten in diesen Neuronen wirkte sich also nicht auf das Ausmaß der postsynaptischen Paired-Pulse-Fascilitation aus.

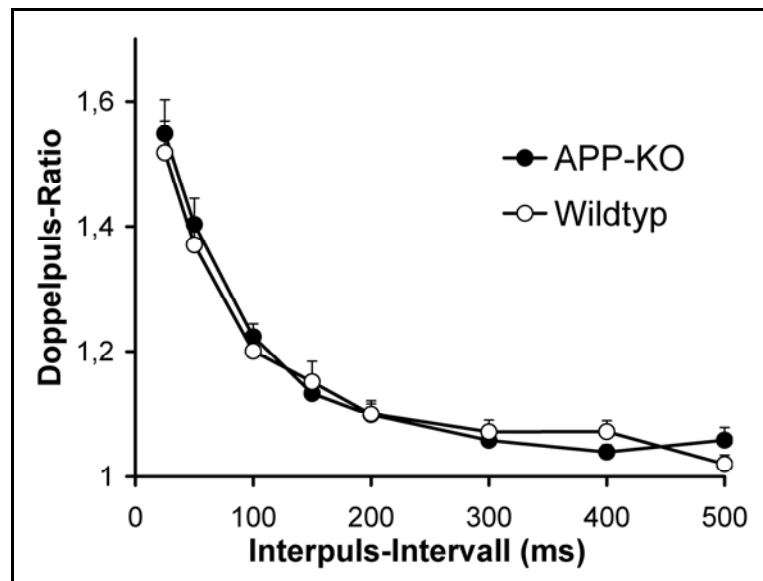


Abbildung 14: Unveränderte Doppelpulsverstärkung bei Neuronen von APP-KO Mäusen. Gezeigt ist das Verhältnis der Amplituden des 2. zum 1. EPSC, als Funktion von 8 verschiedenen Stimulationsintervallen von 25 bis 500 ms. Gemessen wurden 64 Zellen (37 x APP-KO, 27 x Wildtyp). Pro Zelle wurden zwischen 3 und 5 Messungen gemittelt. Fehlerbalken = SEM.

3.2 Synaptische Übertragung bei hoher extrazellulärer Kalzium - Konzentration

3.2.1 Spontanaktivität

Im Rahmen der Messungen mit einer extrazellulären Kalzium-Konzentration von 4 mM wurde zunächst die spontane synaptische Aktivität abgeleitet. Diese beruht auf der sporadischen Freisetzung einzelner synaptischer Vesikel.

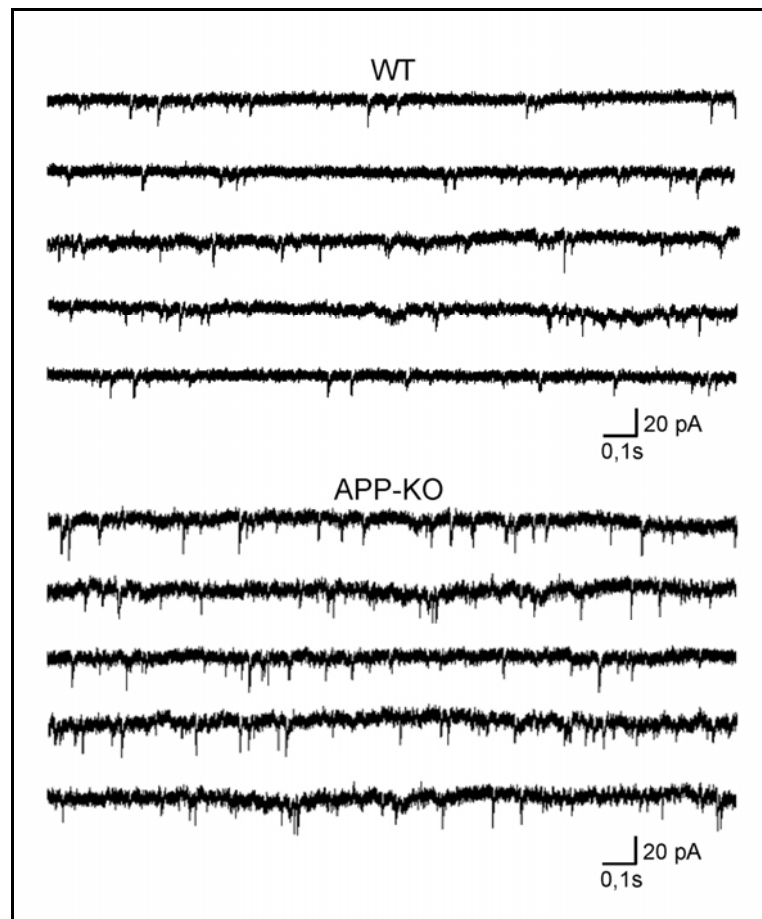


Abbildung 15: Spontanaktivität. Gezeigt sind jeweils 10 Sekunden aufgezeichnete Spontanaktivität. APP-KO Neurone zeigten meist höhere mEPSC Frequenzen.

Über die Auswertungssoftware Axograph wurden Zeiträume von jeweils 30 Sekunden bearbeitet und mEPSCs nach einem, in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Muster herausgefiltert und vermessen. Diesbezüglich wurden im Ganzen die Messungen von 46 Neuronen ausgewertet, wobei 22 vom Typ APP-KO und 24 vom Wildtyp waren.

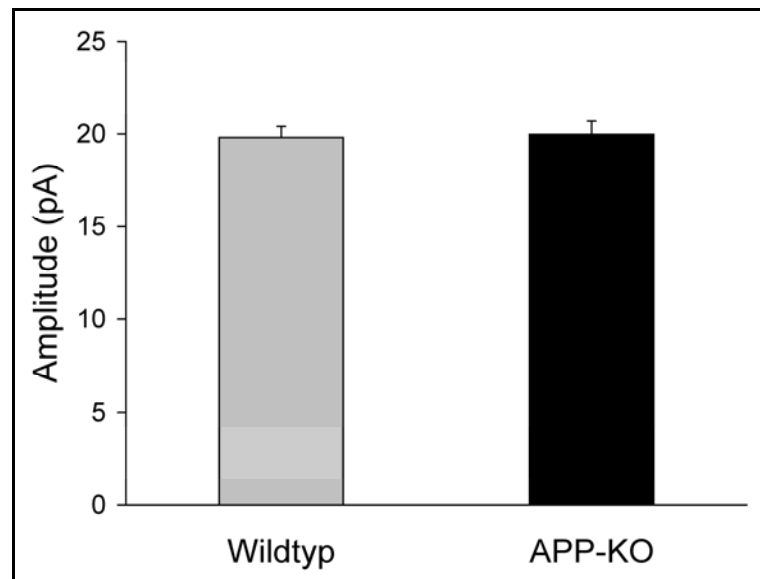


Abbildung 16: Mittlere Amplitude der mEPSCs. Es zeigten sich sehr konstante Werte und kein signifikanter Unterschied zwischen APP-KO und Wildtyp. Fehlerbalken = SEM.

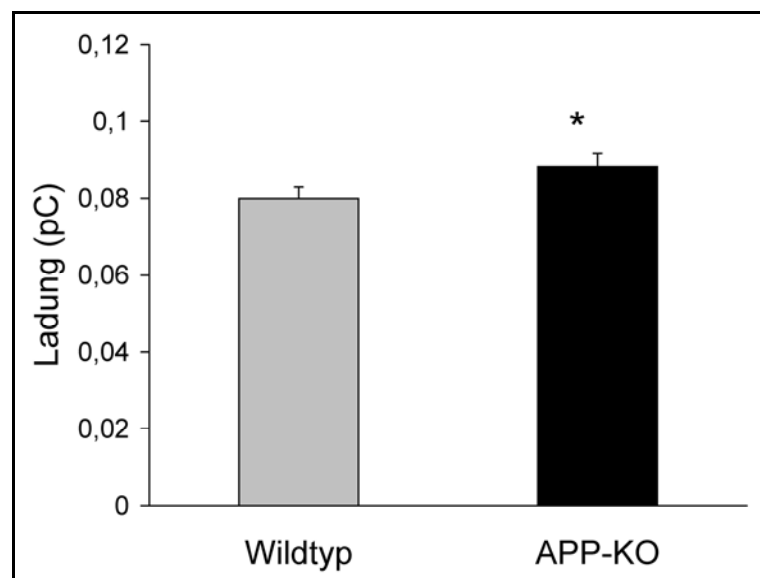


Abbildung 17: Mittlere Ladung der mEPSCs. Es zeigten sich geringgradig, aber signifikant größere Ladungen bei APP-KO Messungen verglichen mit den Wildtypkontrollen. Fehlerbalken = SEM; * = $p < 0,05$.

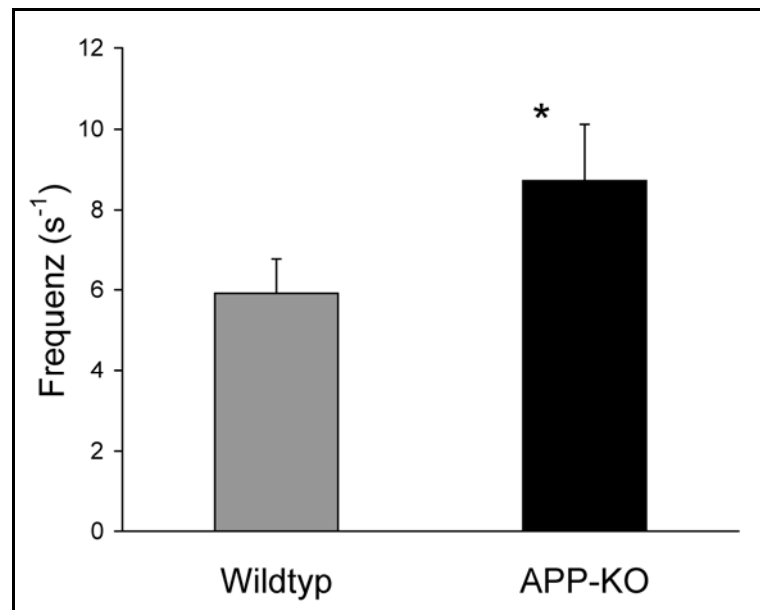


Abbildung 18: Mittlere Frequenz der mEPSCs. Es zeigten sich im Vergleich mit den Wildtypkontrollen bei den APP-KO Zellen signifikant höhere Frequenzen. Fehlerbalken = SEM; * = $p < 0,05$

Für die Amplitude der herausgefilterten mEPSCs ergaben sich im Mittel Werte von $19,98 \pm 0,72$ pA für APP-KO und $19,80 \pm 0,60$ pA für WT, und somit kein signifikanter Unterschied. Die Ladungen Q der einzelnen Transmittervesikel zeigten mit $0,088 \pm 0,003$ pC für APP-KO und $0,080 \pm 0,003$ pC für WT gemittelt für die Knockout-Zellen signifikant geringere Werte. Die gemittelten Frequenzen der einzelnen Zellen bezüglich ihrer Spontanaktivität ergaben einen deutlichen und signifikanten Unterschied, nämlich $8,71 \pm 1,41$ Hz für APP-KO und $5,91 \pm 0,86$ für Wildtyp.

3.2.2 Basale Synaptische Übertragung

Bei hohem extrazellulärem Kalzium zeigten sich unabhängig vom Zelltyp deutlich erhöhte AP-evozierte EPSC-Amplituden im Vergleich zu 1 mM Kalzium. Bei den Neuronen der Wildtyp-Mäuse ergab sich eine Amplitudenvergrößerung um den Faktor 1,9 (1mM Ca^{2+} : 1886,4 pA; 4mM Ca^{2+} : 3591,7 pA), bei denen der APP-Knockout Mäuse sogar um den Faktor 2,5 (1mM Ca^{2+} : 2270,8 pA; 4mM Ca^{2+} : 5642,2 pA; siehe Abb.18).

Der Grund für die Amplitudenvergrößerung ist die bereits beschriebene erhöhte Freisetzungswahrscheinlichkeit des Transmitters Glutamat unter diesen Bedingungen. Die höhere extrazelluläre Kalzium-Konzentration verstärkt den AP-induzierten Einstrom, wodurch auch intrazellulär präsynaptisch mehr Kalzium-Ionen zur Verfügung stehen. Dies führt zu einem vermehrten Vesikelrelease (Zucker und Regehr, 2002).

Diese Amplitudenerhöhung durch die Anhebung der extrazellulären Kalzium-Ionen Konzentration, einmal um den Faktor 1,9 bei WT, aber um den Faktor 2,5 bei APP-null war signifikant unterschiedlich ($p < 0,02$). Die basale synaptische Übertragung der APP-defizienten Neuronen war also gegenüber der Wildtyp-Kontrolle stärker von der extrazellulären Ca^{2+} - Konzentration abhängig.

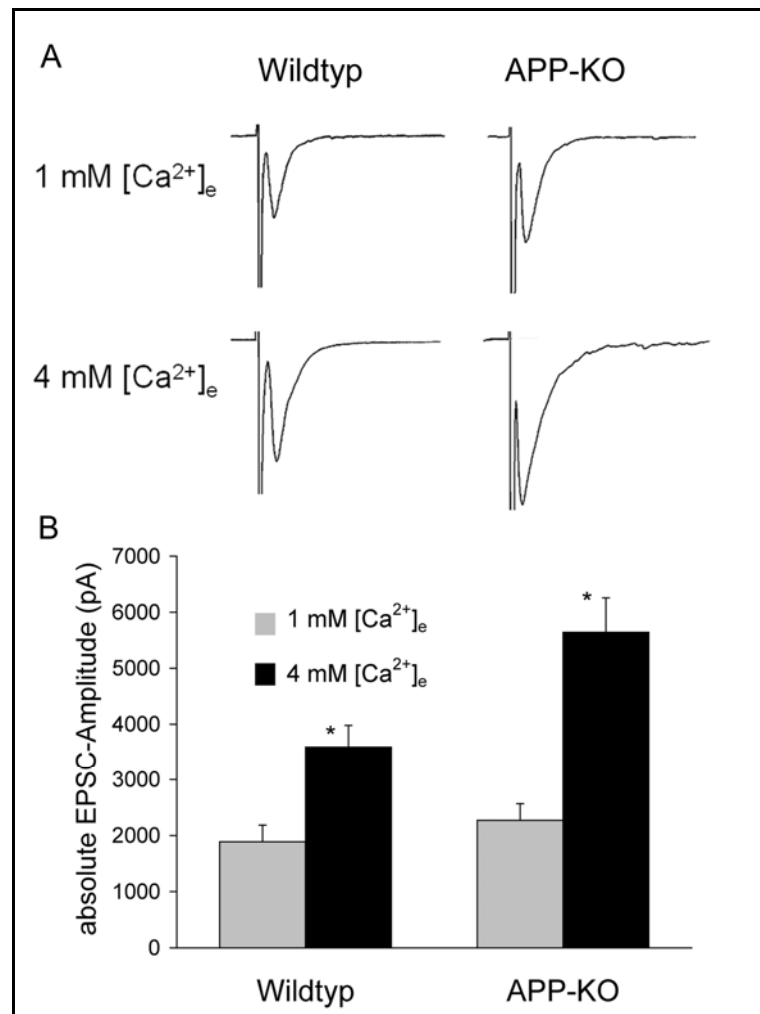


Abbildung 19: Abhängigkeit der basalen synaptischen Übertragung von der extrazellulären Kalzium-Konzentration.

A Dargestellt sind typische Beispiele AP-evozierter EPSCs von APP-KO und Wildtyp Zellen bei 1mM bzw. 4mM extrazellulärer [Ca²⁺]_e. Bei hoher Kalzium-Konzentration zeigten sich stets deutlich größere Amplituden.

B Das Balkendiagramm zeigt die entsprechenden absoluten Mittelwerte der Stromamplituden in Picoampere als Maß der basalen synaptischen Übertragung. Die Amplitudenvergrößerung durch die Erhöhung des extrazellulären Ca²⁺-Konzentration war bei APP-KO Zellen ausgeprägter. (Fehlerbalken = SEM; * = $p < 0,0005$)

Diese Abhängigkeit zeigt sich auch beim direkten Vergleich in Hoch-Ca²⁺ Milieu (siehe Abb. 19). Während man bei 1mM [Ca²⁺]_e noch keinen signifikanten Unterschied feststellen konnte, war bei 4mM [Ca²⁺]_e die EPSC-

Amplitude der APP-KO Zellen um 57,1 % größer als bei den WT Vergleichszellen (APP-KO 5642 ± 615 pA, WT 3592 ± 387 pA). Somit stellte sich unter diesen Bedingungen die AP-evozierte exzitatorische synaptische Übertragung bei APP-Verlust signifikant verstärkt dar.

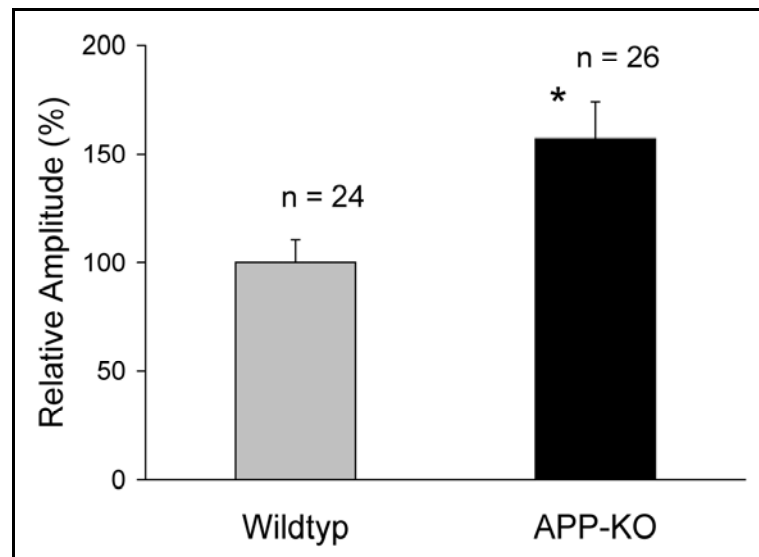


Abbildung 20: Die basale synaptische Übertragung der APP-knockout Neuronen war bei hoher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration signifikant verstärkt. Gezeigt ist die relative Veränderung der EPSC-Amplitude bei APP-knockout gegenüber den Wildtyp Zellen bei einer extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration von 4 mM. Die Vergrößerung betrug 57,1%. (n = Anzahl der gemessenen Zellen; Fehlerbalken = SEM; * $p < 0,005$).

3.2.3 Doppelpuls-Stimulation zeigt eine Depression

Analog zu den Experimenten im Niedrig-Kalzium-Milieu wurde das gleiche Doppelpulsstimulationsprotokoll (siehe Abb.11) auch bei 4mM $[Ca^{2+}]_e$ durchgeführt. Dabei zeigte sich im Mittel eine Unterdrückung des zweiten EPSC im Vergleich zum ersten (Ratio < 1). Des Weiteren fielen wie bei allen Messungen in diesem Milieu die bereits beschriebenen, durchwegs größeren Amplituden auf (siehe Abb. 21). Die PPD ist im Vergleich zur PPF bei 1mM $[Ca^{2+}]_e$ geringer und variabler ausgeprägt. Es zeigte sich trotzdem ein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien. Bei den APP-defizienten

Neuronen konnte in den meisten Fällen nur eine sehr geringe PPD gemessen werden (durchwegs unter 10%) während die Wildtypzellen v.a. in den kürzeren Intervallen (25 – 300 ms) eine Unterdrückung von meist über 10% zeigten.

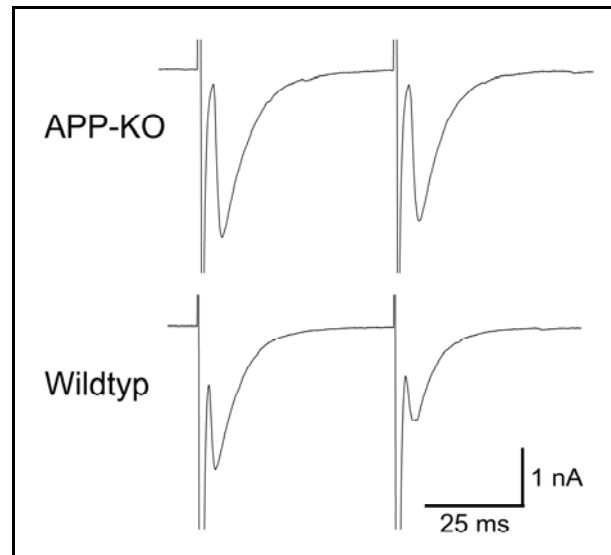


Abbildung 21: Typische Beispiele einer paired-pulse Depression bei einem Interpuls-Intervall von 50 ms. APP-KO zeigt in der Regel im Vergleich zum Wildtyp eine geringere PPD, die absoluten Amplituden waren durchwegs größer. $[Ca^{2+}]_e = 4mM$.

		Doppelpuls-Intervall (ms)							
		25	50	100	150	200	300	400	500
rel. PPD (%)	APP-KO	3,1	2,1	7,3	8,5	7,2	6,1	6,2	6,3
	WT	13,8	12,9	15,1	14,2	14,1	13,0	9,9	9,3

Bei den Wildtyp-Neuronen war in diesem Millieu eine Depression zu erkennen, wie sie auch in ähnlichen Experimenten z.B. von Mennerick und Zorumski (1995) festgestellt wurde. Die APP-defizienten Zellen zeigten im gleichen Versuch eine nur noch sehr geringe PPD. Das Amyloid Precursor Protein und seine Spaltprodukte scheinen den Mechanismus der Paired-Puls-Depression zu beeinflussen.

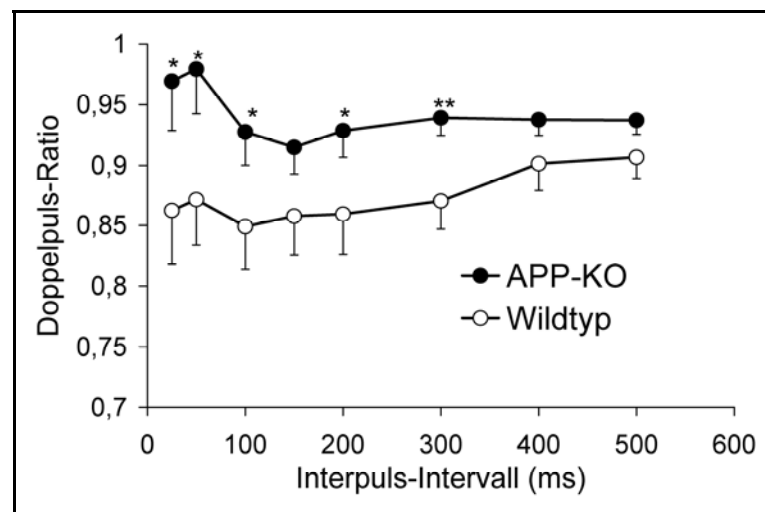


Abbildung 22: Doppelpulsstimulation bei $4\text{mM } [\text{Ca}^{2+}]_e$ zeigte bei fünf von acht Intervallen eine signifikant verringerte Depression des 2. EPSC bei APP-KO. Gemessen wurden 49 Zellen (25 x APP-KO; 24 x WT). Fehlerbalken = SEM; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.2.4 Repetitive Stimulation

Die erhöhte präsynaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit für Transmittervesikel bei hohen extrazellulären Kalziumionen-Konzentrationen hat die bereits beschriebenen Folgen für die resultierenden postsynaptischen Ströme. Zum einen ist die Amplitude AP-evozierter EPSCs vergrößert, zum anderen wird dadurch ein größerer Anteil des Readily Releasable Pool (RRP) exozytiert. Als Folge kann bei einer kurz darauf folgenden identischen Stimulation, unabhängig von der einströmenden Menge an Ca^{2+} , nicht die gleiche Transmittermenge ausgeschüttet werden. Die zweite Amplitude ist unterdrückt.

Um die Größe des RRP weiter zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, die noch zu einer ausgeprägteren Leerung dieses Vesikelpools führen. Dazu wurden die Zellen mehrfach hintereinander stimuliert. Zum einen mit einer sehr hohen Frequenz und geringen Pulszahl als sog. Hochfrequenzstimulation (HFS), zum anderen mit einer niedrigeren Frequenz

und dafür höheren Pulszahl als sog. Prolongierte Repetitive Stimulation (PRS).

Hochfrequenzstimulation (HFS)

Bei der Hochfrequenzstimulation wurde die Zelle fünf mal alle 20 ms, mit der bekannten 1 ms langen Depolarisation von -80 auf 0 mV, stimuliert.

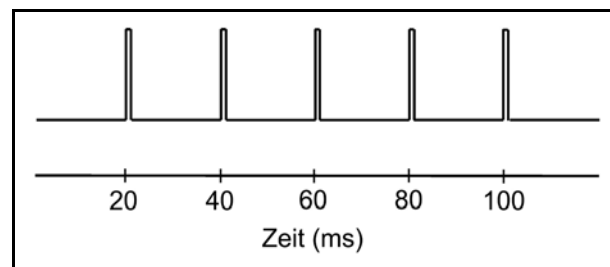


Abbildung 23: Stimulationsprotokoll der Hochfrequenzstimulation (HFS). Eine 1 ms lange Depolarisation wurde fünfmal hintereinander alle 20 ms ausgelöst. Die Frequenz beträgt 50 Hz.

Die Hochfrequenzstimulation wurde bei insgesamt 46 Neuronen gemessen und ausgewertet. Davon waren 22 APP-knockout Zellen und 24 Wildtyp Kontrollen. Die Kontroll-Zellen zeigten durchwegs eine ausgeprägte Depression der EPSCs, die sich nach jeder Stimulation deutlicher darstellt. Hingegen war bei den APP-KO Neuronen in den meisten Zellen nur eine geringe Depression zu erkennen.

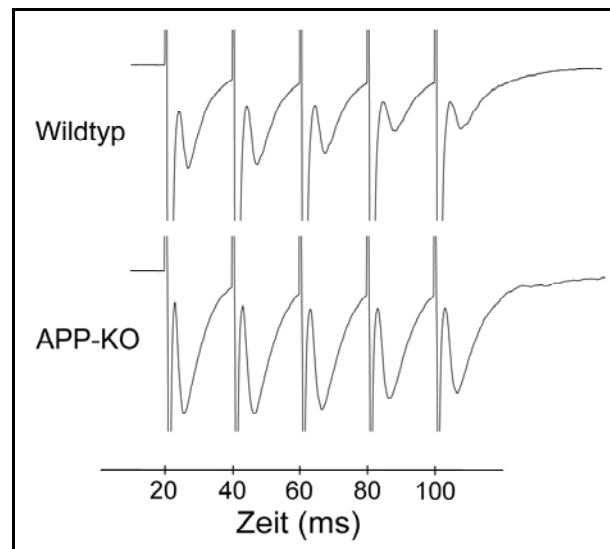


Abbildung 24: Typische Beispiele für die bei einer HFS resultierenden postsynaptischen Ströme. Bei den Wildtyp-Kontrollzellen führte dieses Protokoll meist zu einer zunehmenden Unterdrückung der EPSCs. Dieses Verhalten war bei den APP-knockout Zellen deutlich geringer ausgeprägt.

Desweiteren sind auch bei dieser Versuchsreihe die insgesamt größeren Amplituden bei den APP-KO Neuronen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen erwähnenswert.

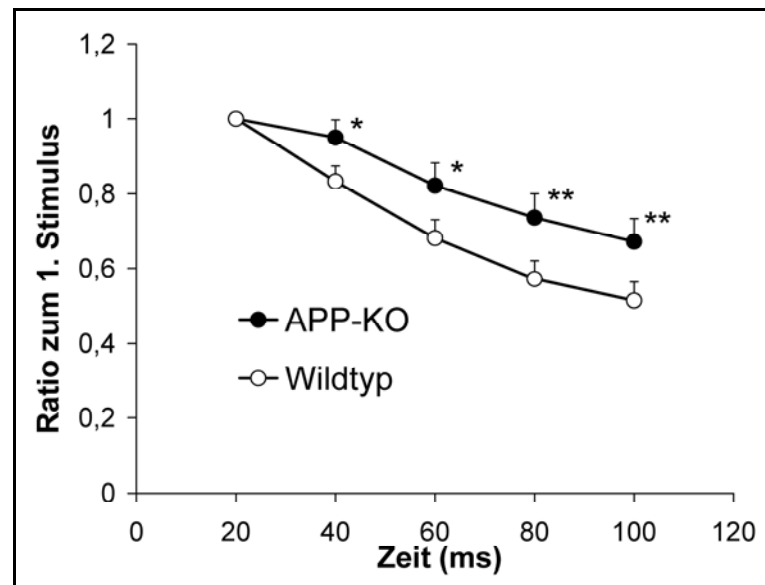


Abbildung 25: Die Hochfrequenzstimulation zeigte im Vergleich zur Kontrolle bei APP-defizienten Neuronen eine signifikant geringere, relative Amplitudenverkleinerung im gesamten Verlauf. Dargestellt ist die EPSC-Amplitude der fünf aufeinander folgenden Pulse als Ratio zur Ersten. Der erste Puls wurde nach 20 Millisekunden ausgelöst, die vier folgenden wiederum jeweils nach 20 Millisekunden. Gemessen wurden 46 Zellen (22 x APP-KO; 24 x Wildtyp). Fehlerbalken = SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,025$.

Im Mittel verringerten sich die EPSC-Amplituden bei den Kontrollen nach dem 2. Puls um 17%, nach dem 3. Puls um 32%, nach dem 4. Puls um 43% und nach dem 5. Puls um 49%. Im Falle der APP-knockout Zellen handelte es sich dabei lediglich um 5%, 18%, 26% und 33% Amplitudenverkleinerung.

Prolongierte Repetitive Stimulation (PRS)

Das Versuchsprotokoll der PRS umfasste 30 Stimulationspulse in drei Sekunden, was einer Frequenz von 10 Hz entspricht. Die Einzelstimulation bestand erneut aus einer 1 ms langen Depolarisation aus dem Ruhepotential von -80 mV auf 0 mV.

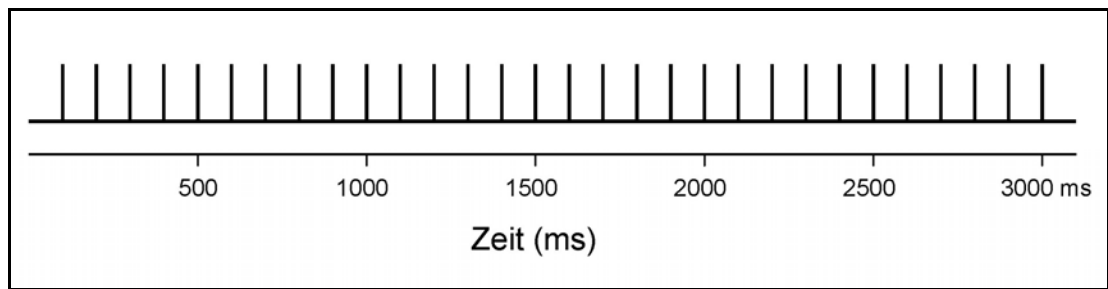


Abbildung 26: *Stimulationsprotokoll der Prolongierten Repetitiven Stimulation (PRS). 1 ms lange Depolarisation wurde 30-mal hintereinander alle 100 ms ausgelöst. Die Frequenz beträgt 10 Hz.*

Auch hierbei verringerten sich die Amplituden der darauffolgenden EPSC bei den APP-defizienten Zellen signifikant geringer als bei den Kontrollen. Bei Mittelung der letzten fünf EPSCs ergab sich bei APP-null eine Amplitude die noch $64,4 \pm 0,07$ Prozent der Ausgangsamplitude entspricht. Die Wildtyp Zellen zeigten dabei nur noch eine Amplitude von $42,5 \pm 0,05$ Prozent.

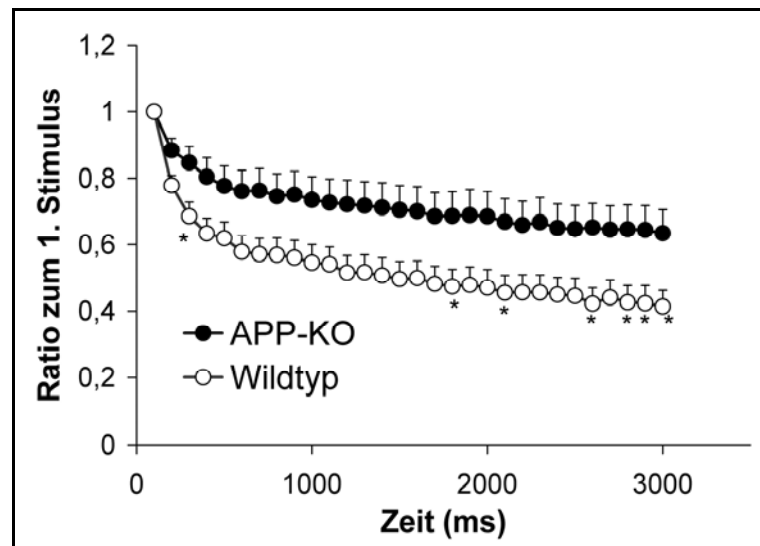


Abbildung 27: Die Prolongierte Repetitive Stimulation zeigten im Vergleich zur Kontrolle bei APP-defizienten Neuronen eine signifikant geringere relative Amplituden-Verkleinerung im gesamten Verlauf. Dargestellt ist die EPSC-Amplitude der 30 aufeinander folgenden Pulse als Ratio zum ersten Puls. Die Neuronen wurden alle 100 ms über einen Zeitraum von 3 Sekunden stimuliert. Gemessen wurden 45 Zellen (20 x APP-KO; 25 x Wildtyp). Fehlerbalken = SEM; * = $p < 0,01$.

3.2.5 Readily Releaseable (Vesikel)-Pool (RRP)

Die vorhergehenden Experimente zeigten, dass sich der Readily Releaseable Pool bei APP-KO Zellen durch wiederholte Stimulationen weniger leicht leeren ließ als bei den Wildtypzellen. Ein größerer Vesikelpool ist hierfür die wahrscheinlichste Ursache. Um dies zu überprüfen, zielten die nächsten Versuche darauf ab, den RRP komplett zu leeren, und damit dessen Größe definitiv zu bestimmen. Um dies zu erreichen, applizierten wir hypertone Sucroslösung mit einer Konzentration von 500 mM für 4 Sekunden von extern in die unmittelbare Nähe der Zelle (siehe Kap. 2.2.7). Diese Prozedur führt zur präsynaptischen, Kalzium-unabhängigen Freisetzung des kompletten RRP, postsynaptisch kommt es zu einem großen, transienten Einwärtsstrom positiver Ionen (Bekkers und Stevens, 1991; Rosenmund und Stevens, 1996).

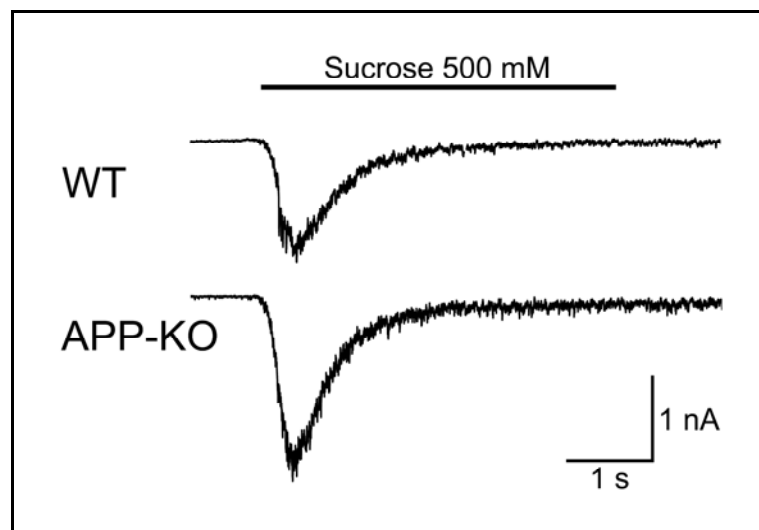


Abbildung 28: Dargestellt sind typische Beispiele, durch Applikation hypertoner Lösung ausgelöster postsynaptischer Ströme von Wildtyp- und APP-KO Zellen. Als hypertone Lösung wurde, dargestellt durch den schwarzen Balken, 500 mM Sucroslösung über einen Zeitraum von 4 Sekunden nahe an der Zelle appliziert. Die Ladung als Produkt aus Strom und Zeit berechnet sich als Fläche über der Kurve.

Zur Beurteilung der Grösse des RRP ist es nötig, zuerst die Ladung des gemessenen Einwärtsstroms zu berechnen. Diese ergibt sich aus der Multiplikation der Stromstärke mit der Zeit, also aus der Fläche über der Kurve. Die Einheit ist Coulomb. Diese Ladung ist proportional zur tatsächlichen Vesikelzahl des RRP. Verglichen wurden die Messungen von 16 APP-KO Zellen mit 22 Wildtyp Kontrollzellen. Es zeigte sich hierbei, dass die APP-knockout Neurone über einen im Mittel mehr als doppelt so großen Vesikelpool verfügten als die Kontrollen. Für die APP-defizienten Neurone berechnete sich eine mittlere Ladung von $1422,8 \pm 242,3$ pC, für die Kontrollzellen lediglich $599,4 \pm 105,1$ pC, was einer Erhöhung um 237 Prozent entspricht. Die Signifikanz p ist dabei kleiner 0,001.

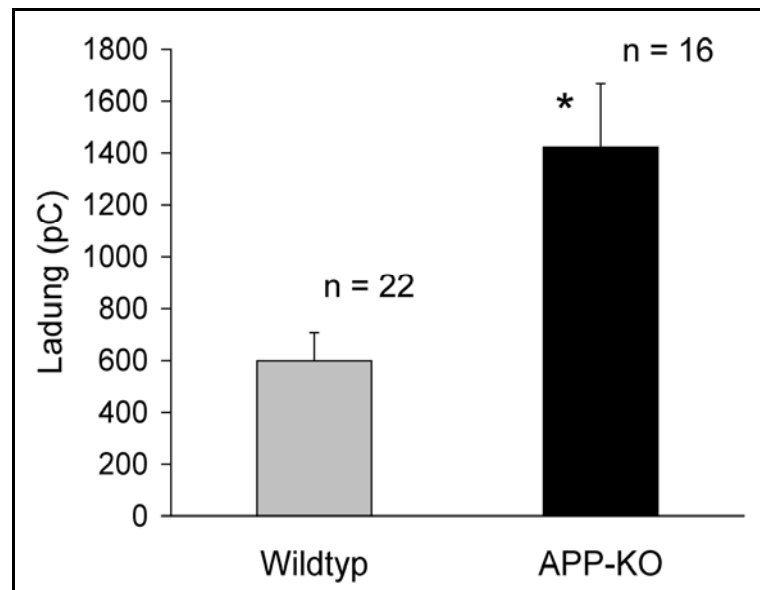


Abbildung 29: Ladung des Sucrose-induzierten Stroms in Coulomb als Maßstab der Größe des RRP. Es zeigte sich bei APP-KO im Vergleich zu Kontrollzellen ein signifikant vergrößerter Vesikelpool. Fehlerbalken = SEM; * = $p < 0,001$; n = Anzahl der gemessenen Zellen.

Zur Berechnung der absoluten Vesikelzahl des Readily Releasable Pool wurde der Quotient aus der Ladung des Sucrose-induzierten Stroms und der mittleren Ladung der mEPSCs derselben Zelle gebildet, da die Ladung eines mEPSCs der Transmittermenge eines einzelnen Transmittervesikels entspricht. Die Vesikelzahl konnte nur bei einer geringen Anzahl an Versuchen gemittelt werden, da aufgrund zeitlich begrenzter Stabilität der Messung nicht bei allen Zellen sowohl die Spontanaktivität als auch die osmotisch induzierte Vesikelfreisetzung gemessen werden konnte.

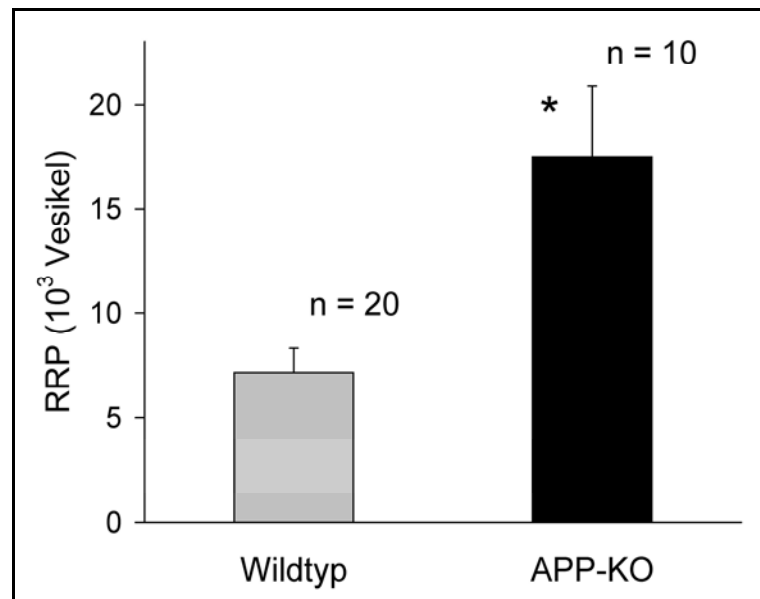


Abbildung 30: Größe des Readily Releasable Vesikelpools. Die Anzahl der durch osmotische Stimulation freigesetzten Transmittervesikel war bei den gemessenen APP-KO Zellen mehr als doppelt so groß. Fehlerbalken = SEM; * = $p < 0,001$.

Die Ladung eines einzelnen mEPSC betrug bei APP-KO im Mittel 0,086 pC, bei den WT-Kontrollen 0,081 pC. Aus den Quotienten der Einzelwerte der auswertbaren Zellen, errechnet sich für den RRP eine mittlere Vesikelzahl pro Zelle von 17495 ± 3390 bei APP-KO, sowie 7171 ± 1157 bei Wildtyp. Dies entspricht einer Poolvergrößerung um 244 Prozent und einer Signifikanz von wiederum kleiner 0,001.

3.2.6 Vesikelfreisetzungswahrscheinlichkeit P_{vr}

Um beurteilen zu können, ob die Effektivität der AP-evozierten Transmitterfreisetzung durch das Fehlen von APP beeinflusst wird, wurde die Vesikelfreisetzungswahrscheinlichkeit P_{vr} bestimmt. Diese kann errechnet werden, indem man die Ladung der AP-evozierten EPSCs einer Zelle durch die Ladung des RRP dividiert. Es wird somit der Anteil des RRP ermittelt, der durch ein Aktionspotential ausgelöst, präsynaptisch an diesem Neuron exozytiert wird. Diese Berechnung wurde ebenfalls nur mit Werten

durchgeführt die von einem Neuron stammten, wodurch die Anzahl der auswertbaren Zellen deutlich sank (APP-KO: n = 10; Wildtyp: n = 11).

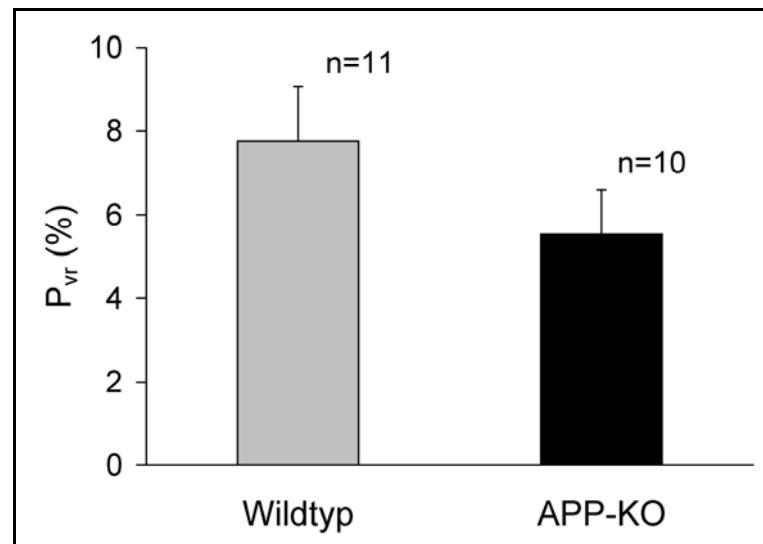


Abbildung 31: Vesikelfreisetzungswahrscheinlichkeit P_{vr} zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen APP-KO und Wildtyp. Dargestellt ist der durch ein AP freigesetzte Anteil des RRP in Prozent.

Hierbei zeigte sich bei Mittelung der Werte dieser 21 Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen APP-KO und Wildtyp. P_{vr} scheint bei APP-KO mit $5,5 \pm 1,1$ Prozent im Vergleich zu den Kontrollmessungen mit $7,8 \pm 1,3$ Prozent tendenziell vermindert zu sein.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Die autaptische Primärzellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden die elektrophysiologischen Versuche zur Untersuchung synaptischer Aktivität an autaptischen Primärzellkulturen durchgeführt. Weitere etablierte Methoden sind die Messung an konventionellen Primärzellkulturen oder an vitalen Hirnschnittpräparaten.

Bei Verwendung hippocampaler Hirnschnitte bleiben die physiologische Hirnarchitektur und somit die natürlichen synaptischen Verbindungen der verschiedenen Neuronenpopulationen untereinander erhalten. Auch kulturspezifische Artefakte können damit weitestgehend vermieden werden. Allerdings weist diese Methode auch Nachteile auf. So ist bei der extrazellulären Stimulation über sog. Feldelektroden, wie sie bei Schnittexperimenten angewendet wird, eine konstante, definierbare Erregung der Zellen nur schlecht zu erzielen. Ein Vergleich der Messungen untereinander ist daher erheblich erschwert. Des Weiteren bewirkt die Stimulation einer Region innerhalb des Schnittes die Aktivierung mehrerer Neurone unterschiedlicher Art, was zu einem polysynaptischen Übertragungsmuster führt. So wird das letztlich gemessene EPSC einer Zelle durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, die Komplexität des Systems steigt.

Die Verwendung konventioneller Primärzellkulturen führt ebenfalls zu einer polysynaptischen Übertragung zwischen den unterschiedlichen, in der Kultur befindlichen Zellen. Die Intention dieser Arbeit war es jedoch, die grundlegenden Auswirkungen des Verlustes des Amyloid Precursor Proteins auf die synaptische Übertragung zu untersuchen. Dafür sollte das, in den Experimenten verwendete neuronale System möglichst einfach sein. Es wurden deshalb autaptische Primärzellkulturen untersucht. Die Pyramidenzelle ist dabei auf der Astrozyteninsel isoliert, das heißt, Einflüsse

anderer Neurone auf die synaptische Übertragung des zu messenden Neurons sind ausgeschlossen. Die Komplexität des Systems wird durch den monosynaptischen Übertragungsweg deutlich geringer und die Einflussnahme unbekannter Parameter eingeschränkt. Darüber hinaus erlaubt diese Methodik eine gleichzeitige Stimulation und Ableitung der synaptischen Aktivität über eine Messelektrode (patch pipette).

Die Nachteile der patch clamp Messung an autaptischen Kulturen sind zum einen die aufwendige Zellkultur und die damit verbundene geringere „Ausbeute“ an Zellen, die die Messkriterien erfüllen und somit für die Untersuchung geeignet sind. Zum anderen ist das Alter der messbaren Zellen bei der Verwendung von Primärzellkulturen begrenzt, da der Anteil intakter Zellen mit der Kulturzeit deutlich abnimmt. In der hier vorgelegten Arbeit waren effiziente Messungen nach der dritten Kulturwoche kaum noch möglich. Die Isolierung und die damit verbundene Einschränkung der Zelle nur mit sich selbst zu interagieren, könnte in der dreiwöchigen Kultivierungsphase außerdem zu funktionellen oder strukturellen Veränderungen der Synapse führen, die in vivo nicht auftreten würden. Allerdings konnte schon in mehreren Studien gezeigt werden, dass sich die synaptischen Ströme der Autapsen von denen der normalen Synapsen kaum unterscheiden. Bekkers und Stevens (1991) fanden keinen Unterschied sowohl in den Kinetiken als auch in den pharmakologischen Eigenschaften exzitatorischer und inhibitorischer synaptischer bzw. autaptischer Übertragung.

In neuerer Zeit zeigen zudem zahlreiche Studien das Vorhandensein von physiologischen Autapsen in verschiedenen Hirnregionen. So konnten Cobb et al. (1997) elektronenmikroskopisch auch im Hippocampus Korbzellen mit einzelnen Autapsen nachweisen. Die Funktion dieser Autapsen könnte dabei in einer neuen Art von Rückkopplungs-Hemmung liegen, die es inhibitorischen Interneuronen ermöglicht, ohne Zwischenschaltung anderer Neuronen hemmend auf sich selbst zu wirken (Bacci et al., 2003; Bekkers, 2003).

4.1.2 Messungen bei unterschiedlichen extrazellulären Kalzium-Konzentrationen

Wie schon in Kapitel 1.3.2 erwähnt, spielen vor allem die präsynaptischen Kalzium-Ionen bei der Freisetzung der Transmittervesikel eine entscheidende Rolle (Borst und Sakmann, 1996). Je höher diese Kalziumkonzentration in der Präsynapse ist, umso höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Vesikel mit der Membran fusioniert und Transmitter in den synaptischen Spalt freigibt.

Die Badlösung der Messkammer enthielt bei einem Teil der Experimente eine Kalzium-Konzentration von 1 mM, was in etwa dem physiologischen Milieu entspricht. Um die erwähnte Kalzium-Abhängigkeit zu reduzieren, erhöhten wir für den Grossteil der Untersuchungen die extrazelluläre Kalziumkonzentration auf 4 mM. Der höhere Ionengradient über der Zellmembran sorgte dabei für einen verstärkten Kalzium-Influx. Die hohe Konzentration an präsynaptischem Kalzium führte dazu, dass diese Ionen keinen limitierenden Faktor bei der synaptischen Übertragung mehr darstellten. Unterschiede zwischen APP-Knockout und Wildtyp waren daher unter den gewählten Bedingungen weniger kalziumabhängig. Dies entspricht der allgemein üblichen Vorgehensweise bei dieser Art von Experimenten. Ähnliche Bedingungen für extrazelluläres Kalzium finden daher häufig Anwendung (Reim et al, 2001; Pyott und Rosenmund, 2002; Mennerick und Zorumski, 1995).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Verlust von APP beeinflusst evozierte und spontane exzitatorische synaptische Ströme

Die Messungen der AP-evozierten Transmitterfreisetzung ergab unter Bedingungen hoher extrazellulärer Kalziumkonzentration signifikant höhere EPSC-Amplituden bei den APP-defizienten Neuronen. Gleichzeitig waren

Werte von 3,5 nA für die Kontroll-Messungen mit denen der Arbeit von Reim et al. (2001) vergleichbar.

Die Doppelpulsstimulation führte zur Ausbildung einer Paired-Puls-Depression (PPD) des zweiten zum ersten EPSC, jedoch war diese Depression bei fehlendem APP signifikant geringer ausgeprägt. Die Ergebnisse der Arbeit von Mennerick und Zorumski (1995) zeigen bei ähnlicher extrazellulärer Kalziumkonzentration (3,5 mM) für autaptische Wildtyp-Zellen ebenfalls eine PPD, allerdings ist diese mit ca. 40 % bei einem Interpulsintervall von 50 ms größer.

Die Ergebnisse repetitiver Stimulationen weisen noch deutlichere Unterschiede auf. Sowohl die Hochfrequenzstimulation (50 Hz, 5 Stimuli) als auch die Prolongierte Repetitive Stimulation (10 Hz, 30 Stimuli) zeigten bei Verlust des APP einen signifikant geringeren Abfall der EPSC-Amplitude im Verlauf der Stimulation. Die Werte der Kontrollmessungen sind auch hier gut mit anderen Studien vergleichbar (Pyott und Rosenmund, 2002; Reim et al., 2001).

Der Vergleich der Spontanaktivität ergab keinen relevanten Unterschied der Amplituden, hingegen waren sowohl die Ladung als auch die Frequenz der aufgezeichneten mEPSCs bei APP-defizienten Zellen signifikant erhöht. In der Arbeit von Reim et al. (2001), die mit nahezu gleicher Methodik durchgeführt wurde, ergab die Auswertung der Spontanaktivität für die Wildtyp-Zellen ähnliche Werte.

Die Resultate der, in niedriger extrazellulärer Kalziumkonzentration (1mM) durchgeführten Experimente wiesen sowohl bei der einfach AP-evozierten, als auch bei der durch Doppelpulsstimulation bedingten Transmitterfreisetzung keine signifikanten Unterschiede auf. Die Versuche von Seabrook et al. (1999) an hippocampalen Schnittpräparaten von 20 – 24 Monate alten APP-knockout Mäusen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Dabei wurde über externe Elektroden an den Schaffer-Kollateralen stimuliert und sog. Feld-Exzitatorisch-Postsynaptische-Potentiale (*field-EPSP*) über der CA1-Region abgeleitet. In einer ähnlichen extrazellulären Kalzium-Konzentration (1,3 mM) konnten ebenfalls keine signifikanten Abweichungen

sowohl der basalen synaptischen Übertragung als auch der Kurzzeitplastizität in Form der Doppelpulsstimulation festgestellt werden. Wie in den von uns erhobenen Daten zeigt sich bei der basalen synaptischen Übertragung eine nicht signifikante Tendenz zu höheren Werten in Neuronen ohne APP. Die absoluten Werte lassen sich dabei auf Grund der Methodik der externen Feldstimulation und der daraus resultierenden Abhängigkeit der Werte von der Stimulationsintensität nicht mit unseren Daten vergleichen. Die Doppelpulsstimulation zeigte ebenfalls eine Verstärkung des zweiten stimulierten EPSCs, die Ratio ist bei vergleichbaren Intervallen insgesamt etwas größer. Beispielsweise liegen die Ratios sowohl von APP-KO als auch Wildtyp bei einem Interpulsintervall von 50 ms bei Seabrook et al. (1999) im Mittel über 1,8, in unserer Studie bei ca. 1,4. So bestätigt unsere Studie diese Befunde mit einer anderen Methodik.

4.2.2 APP beeinflusst die Größe des Readily Releasable Vesikelpools

Der Beeinflussung der synaptischen Übertragung durch das Fehlen des APP können unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Die höhere Amplitude der AP-evozierten EPSCs bei Verlust des APP spricht für eine stärker ausgeprägte exzitatorische synaptische Übertragungsfähigkeit dieser Zellen. Grundsätzlich sind mehrere Gründe dafür denkbar: Entweder könnte die postsynaptische Reaktion bei gleich bleibender Transmitterfreisetzung verstärkt sein, oder die präsynaptischen Freisetzungparameter bzw. die freisetzbare Neurotransmittermenge könnten verändert sein.

Die Untersuchung der Spontanaktivität ergibt Anhaltspunkte über das postsynaptische Antwortverhalten der Zellen. Die Amplituden der mEPSCs, also die postsynaptischen Antworten auf die Freisetzung einzelner Transmittervesikel sind zwischen APP-KO und Wildtyp unverändert. Dies macht eine größere Anzahl oder eine Überfunktion postsynaptischer Rezeptoren als Ursache für die verstärkte Übertragungsfähigkeit der Knockout-Zellen sehr unwahrscheinlich. Hingegen ist die Frequenz der Spontanaktivität bei diesen Zellen signifikant erhöht. Dies spricht dafür, dass präsynaptisch mehr Vesikel zur Verfügung stehen, wodurch die

Wahrscheinlichkeit und somit auch die Frequenz der spontanen Vesikelfreisetzung erhöht sind. Auch eine anderweitig präsynaptisch verursachte grundsätzliche Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit ohne Veränderung der Vesikelzahl bei APP-KO könnte einen solchen Frequenzanstieg verursachen. Dann wäre aber auch eine veränderte synaptische Übertragungsfähigkeit im Niedrigkalzium-Milieu zu erwarten, was nicht der Fall ist.

Zusätzlich weisen die einzelnen mEPSCs auch eine geringgradige, aber signifikant erhöhte Ladung auf. Dies könnte ein Hinweis sein, dass nicht nur die Anzahl der Transmittervesikel erhöht ist, sondern zu einem gewissen Teil auch vergrößerte Vesikel für die genannten Effekt verantwortlich sein könnten. In diesen würde eine größere Neurotransmittermenge dafür sorgen, dass sowohl die Ladung des einzelnen mEPSCs, als auch des gesamten Pools erhöht wäre.

Den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur synaptischen Plastizität (PPD, HFS und PRS) werden in der Literatur verschiedene Mechanismen zugrunde gelegt. Diese elektrophysiologischen Vorgänge werden dabei durchwegs in präsynaptischer Lokalisation beschrieben (Zucker und Regehr, 2002). Es ist daher anzunehmen, dass die durch Verlust des APP-Gens beschriebenen Veränderungen eine präsynaptische Ursache haben.

Ein geringerer Rückgang der EPSC-Amplitude bei Doppelpuls- oder repetitiver Stimulation wie es bei APP-Knockout der Fall ist, spricht primär für einen anteilig am Gesamtpool einer Zelle geringeren Verbrauch von Neurotransmittern. Dafür sind zwei Möglichkeiten denkbar: Zum einen könnte die basale, AP-evozierte Transmitterfreisetzung dieser Zellen verringert sein, wodurch das Neuron pro Stimulation weniger Transmitter verbraucht. Wie die zuvor beschriebenen Experimente zeigen, ist dies allerdings nicht der Fall, vielmehr ist die synaptische Übertragung bei APP-KO verstärkt. Daher erscheint vor allem die zweite Möglichkeit wahrscheinlich, nämlich dass der gesamte Pool freisetzbarer Transmittervesikel, der sog. Readily Releasable Pool (RRP) bei den Zellen, die das Amyloid Precursor Protein nicht exprimieren, vergrößert ist.

Die erhaltenen Daten zur synaptischen Übertragung - sowohl AP-evoziert als auch spontan entstanden - legen die Vermutung nahe, dass die durch Verlust des APP entstandenen Veränderungen durch einen Größenunterschied des RRP zustande kommen. Dies wurde in unserer Arbeit durch die Daten der direkten Messung des Vesikelpools durch osmotische Stimulation bestätigt. Dabei zeigte sich eine Vergrößerung des RRP von über 200 Prozent bei APP-defizienten Neuronen. Die Messwerte für die Wildtyp-Zellen waren dabei gut mit denen anderer Studien vergleichbar (Pyott und Rosenmund, 2002; Reim et al., 2001).

4.2.3 APP moduliert die Größe des RRP durch die Anzahl funktioneller Synapsen

Durch die whole-cell patch-clamp Experimente in dieser Arbeit wurden alle über eine Zelle fließenden Ströme gemessen. Grundsätzlich sind zwei Möglichkeiten denkbar, die Ursache eines vergrößerten Vesikelpools sein können. Entweder ist der RRP jeder einzelnen Synapse vergrößert, oder die Zelle weist eine höhere Gesamtzahl an Synapsen auf. Natürlich ist auch eine Kombination beider Theorien möglich.

Eine morphometrische Studie von Perez et al. (1997) konnte zeigen, dass ein beziehungsweise drei Tage lang kultivierte hippocampale APP-KO Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen sowohl signifikant größere Axone und Dendriten, als auch eine stärkere Verzweigung ihrer Zellfortsätze aufweisen.

Es liegt daher der Schluss nahe, dass eine größere Anzahl an funktionellen Synapsen für die in dieser Arbeit beschriebenen elektrophysiologischen Ergebnisse bei APP-defizienten Neuronen verantwortlich ist. Dies könnte wiederum eine Erklärung für die gesteigerte Glutamatsensitivität und -toxizität bei APP-defizienten Mäusen sein (Steinbach et al., 1998). Weiterhin wäre diese dauerhaft verstärkte Exzitotoxizität auch eine plausible Erklärung für die von Zheng et al. (1995) beobachtete reaktive Gliose bei 14 Wochen alten APP-KO Mäusen.

In der Tat zeigen immunzytologischen Färbungen von Priller et al. (2006) aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Herms, dass an den gleichen autaptischen Hippocampusneuronen sowohl die totale Länge der Zellfortsätze (markiert durch den Dendritenmarker MAP-2), als auch die Anzahl der Synapsen (markiert durch den präsynaptischen Marker Synaptophysin) bei den APP-KO Zellen signifikant erhöht sind. Zusätzliche immunhistologische Färbungen an hippocampalen Hirnschnitten dieser APP-defizienten Tiere ergaben ebenfalls erhöhte Synaptophysin-Intensitäten im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. Diese Resultate bestätigen die Theorie der höheren Synapsenanzahl bei Neuronen mit fehlendem APP als Ursache des vergrößerten Vesikelpools.

4.2.4 APP reguliert die Anzahl funktioneller Synapsen durch sein Spaltprodukt A β

Als nächstes gilt es zu erörtern, welche Mechanismen dazu führen, dass Zellen, denen das APP fehlt, einen vergrößerten Vesikelpool und eine erhöhte Synapsenzahl ausbilden. Ältere Studien an kultivierten Neuronen von PS1 knock-out Mäusen zeigen ebenfalls eine erhöhte Frequenz der Spontanaktivität sowie eine vermehrte Synapsenbildung (Parent et al., 2005). PS1 ist Teil des γ -Sekretase-Komplexes, Zellen denen PS1 fehlt bilden daher weder A β noch AICD. Es ist somit möglich, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten elektrophysiologischen Veränderungen bei APP-KO Neuronen auf einem Mangel an APP als Substrat für die γ -Sekretase beruhen. Die ähnlichen Ergebnisse wären dann durch das gemeinsame Fehlen von A β und AICD zu erklären.

Die für unsere Experimente benutzten Zellen exprimieren zwar kein APP, wohl aber die sehr ähnlichen Proteine Amyloid-Precursor-like-Protein (APLP) 1 und 2 (Zheng et al., 1995). Diese werden ebenfalls von der γ -Sekretase gespalten, durch Fehlen der A β -Domäne führen sie allerdings nur zur Bildung von AICD. Daher sind die APP-KO Zellen nicht frei von AICD, was dessen ursächliche Beteiligung eher unwahrscheinlich macht. Es ist daher

anzunehmen, dass die beschriebenen Effekte am ehesten durch A β vermittelt werden.

Die Funktion des Amyloid Precursor Proteins könnte also darin liegen, die Ausbildung von Synapsen sowie deren Funktion über die Regulation der A β Bildung zu modulieren. Eine ähnliche Hypothese wird auch von Kamenetz et al. (2003) vertreten. Anhand elektrophysiologischer Untersuchungen an hippocampalen Schnittpräparaten, in denen transient APP überexprimiert wurde, konnte gezeigt werden, dass es dabei sowohl zu einer signifikant verringerten AP-evozierten synaptischen Übertragung, als auch zu einer geringeren Frequenz der Spontanaktivität kommt. Wurden diese Schnitte mit einem γ -Sekretase-Inhibitor inkubiert oder zur Überexpression eines mutierten, nicht zu A β spaltbaren APP gebracht, ergaben sich keine signifikanten Veränderungen. Weiterhin wurden verschiedene Konstrukte getestet, unter anderem ein APLP2/APP Chimäre, welches zwar AICD, nicht aber A β überexprimieren. Dabei führte die alleinige AICD-Überexpression zu keiner Unterdrückung der synaptischen Übertragung. Die Entstehung des A β aus der APP-Proteolyse scheint also in der Arbeit von Kamenetz et al. (2003) die entscheidende Rolle zu spielen. Eine vermehrte Bildung von A β führt zu einer Unterdrückung der synaptischen Übertragung, verminderte A β -Bildung, z.B. als Folge einer fehlenden APP Expression, verstärkt die synaptische Übertragung. Der zugrunde liegende Mechanismus könnte die in unserer Arbeit beschriebene Regulierung der Größe des RRP durch die Variation des Neuritenwachstums und der Anzahl funktioneller Synapsen sein.

4.2.5 Mögliche Beeinflussung der Synapsenformierung durch Einwirkung auf Kationenkanäle

Untersuchungen von Ramsden et al. (2002) und Ramsden et al. (2001) weisen auf eine Möglichkeit hin, wie A β das Neuritenwachstum und die Synapsenzahl beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass nicht-aggregiertes A β auf die Funktion von Kalzium- und Kalium-Kanälen in der Zellmembran einwirken kann. Es wäre somit denkbar, dass Veränderungen an diesen Kationen-Kanälen auf das Dendritenwachstum einwirken, zumal auch gezeigt werden

konnte, dass die Beweglichkeit dendritischer Filopodien durch einen depolarisationsinduzierten Kalzium-Influx gesteuert werden kann (Jontes und Smith, 2000). Aber auch die beschriebenen Veränderungen der AMPA Rezeptor- (Almeida et al., 2005; Kamenetz et al., 2003) oder NMDA Rezeptor-Funktion (Snyder et al., 2005) durch A β -Peptide könnten die Synapsen-Formierung besonders während der Entwicklung beeinflussen. So ist bekannt, dass die NMDA-Rezeptoraktivierung Auswirkungen auf die aktivitätsabhängige Regulierung synaptischer Verbindungen hat (Cohen-Cory, 2002). In der erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von Hsieh et al. (2006) konnte gezeigt werden, wie erhöhte A β -Konzentrationen über den Mechanismus der Langzeit-Depression (LTD) zu einer Endozytose von AMPA-Rezeptoren und konsekutiv zu einer verringerten Dichte dendritischer Spines führen.

4.2.6 Der synaptische Effekt ist wahrscheinlich durch monomeres A β bedingt

A β kann in verschiedenen Aggregatsformen als Monomer, Oligomer oder Fibrillen vorliegen, wobei die Oligomerisation als ein früher neurotoxischer Schritt in der Genese des Morbus Alzheimer angesehen wird (Bitan et al., 2001). Welche Rolle diese Oligomerisation bei der Beeinflussung des RRP spielt, lässt sich anhand unserer Arbeit nur schwer einschätzen. Allerdings basieren die Ergebnisse unserer Experimente auf dem Vergleich von APP-KO und Wildtyp Neuronen, die aufgrund der Einzelzellkultur-Technik in einer sehr geringen Dichte gezüchtet werden. Dies führt dazu, dass im Medium nur eine sehr kleine A β Konzentration vorherrscht. Da unter solchen Bedingungen eine Oligomerisation nur in geringem Ausmaß stattfindet, ist davon auszugehen, dass der Effekt auf die synaptische Funktion hauptsächlich von A β -Monomeren und wenn, dann nur in untergeordnetem Maße von Oligomeren oder Fibrillen vermittelt wird.

4.2.7 Mögliche pathologische Prozesse und physiologische Regulationsmechanismen von A β

Die APP-Expression wird bei vielen Arten von neuronalen Schäden hochreguliert (Murakami et al., 1998). Unter solchen Bedingungen könnte die Funktion des A β darin bestehen, über die Modulation des RRP bzw. der Anzahl funktioneller Synapsen, die exzitatorische synaptische Übertragung zu reduzieren. Dies würde die neuronale Erregbarkeit eindämmen und sowohl die Glutamat-Exzitotoxizität als auch den zellulären Energiebedarf verringern. Wiederholte neuronale Schädigungen, z.B. durch Hypoxie oder Trauma, würden dann möglicherweise zu einem chronisch erhöhten A β Spiegel führen. Dies sollte dann entweder eine direkte, physiologische Beeinflussung der synaptischen Übertragung oder die Bildung toxischer A β -Aggregate nach sich ziehen. Weiter könnten dann auch diese toxischen Aggregate oder löslichen Oligomere zu pathologischen Veränderungen der synaptischen Übertragung oder der zellulären Erregbarkeit beitragen. Dafür wären Mechanismen wie die Modulation spannungsaktivierter Kalziumkanäle (Ramsden et al., 2002), verschiedener Arten von Kaliumkanälen (Colom et al., 1998; Ramsden et al., 2001), AMPA-Rezeptoren (Chang et al., 2006), NMDA-Rezeptoren (Snyder et al., 2005), oder die Bildung kalziumpermeabler Membranporen denkbar (Demuro et al., 2005; Hirakura et al., 2000; Kawahara und Kuroda, 2000).

Alternativ dazu wäre auch eine Hypothese denkbar, die bereits von Kamenetz et al. (2003) aufgestellt wurde. Demnach könnte sich in Neuronen im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses die Sensitivität für die A β -induzierte synaptische Depression verringern. Dies wäre z.B. über die Modulation AMPA-Rezeptor vermittelter synaptischer Ströme möglich (Almeida et al., 2005), und würde zu einer bekanntermaßen toxischen, dauerhaft erhöhten neuronalen Aktivität führen.

Aber auch eine physiologische Bedeutung des A β bei der Modulierung der Synapsenbildung und -funktion lässt sich mit den vorgelegten Resultaten in Einklang bringen. Diese Theorie wurde bereits in einigen anderen Studien vorgestellt und findet immer stärkere Unterstützung. In der Arbeit von

Kamenetz et al. (2003) zum Beispiel wurde an hippocampalen Hirnschnitten gezeigt, dass eine APP-Überproduktion sowohl zu einer Unterdrückung evozierter synaptischer Ströme als auch zu einer Reduktion der Frequenz spontaner Ereignisse führt. Bei der Expression von Konstrukten mit mutiertem APP, die kein A β bilden konnten, war dieser Effekt nicht zu beobachten. 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 könnte eine wichtige physiologische Funktion des A β in einem negativen Feedback-Mechanismus liegen. Dabei führt eine hohe neuronale Aktivität durch die vermehrte Bildung von A β zur Depression der synaptischen Übertragung und damit wiederum zur Regulation der neuronalen Aktivität.

Das Konzept einer physiologischen Funktion des A β hätte auch Auswirkungen auf die zukünftige therapeutische Vorgehensweise bei Patienten mit Morbus Alzheimer. Es wird in weiteren Studien zu klären sein, ob Therapieoptionen, welche die A β -Entstehung hemmen sollen, nicht möglicherweise auch negative Auswirkungen auf A β -vermittelte physiologische Regulationsmechanismen haben.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der immer älter werdenden Weltbevölkerung nimmt die medizinische, aber auch die sozioökonomische Bedeutung sogenannter degenerativer Erkrankungen, zu denen auch der Morbus Alzheimer gezählt wird stetig zu. Die Tatsache dass das Amyloid-Precursor-Protein (APP) mit seinen proteolytischen Abbauprodukten wie dem A β in der Pathogenese dieser Erkrankung eine zentrale Rolle spielt ist unbestritten und wurde in zahlreichen Studien gezeigt. Jedoch ist die eigentliche physiologische Funktion dieses Proteins, welches in Neuronen hauptsächlich im Bereich der Synapsen lokalisiert ist, weiterhin noch äußerst unklar. Die zumindest teilweise Klärung dieser grundlegenden Frage ist die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

Hierzu wurden elektrophysiologische Messungen an hippocampalen Neuronen autaptischer Primärzellkulturen durchgeführt. Es zeigt sich, dass hippocampale Neurone von Mäusen die kein APP produzieren (APP-knockout) nicht nur erhöhte Amplituden AP-evozierter EPSCs aufweisen, sondern auch dass die Leerung ihres präsynaptischen Vesikelpools durch repetitive Stimulation verringert ist. Durch Versuche, die den Readily Releaseable Vesikelpool durch osmotische Stimulation vollständig leeren, konnte weiterhin gezeigt werden, dass die absolute Transmittermenge dieses Pools bei den APP-knockout Zellen signifikant erhöht ist. Zusätzlich ergaben Auswertungen spontaner Aktivität dieser Zellen eine gleich bleibende Amplitude und eine signifikant erhöhte Frequenz der sog. miniature EPSCs.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Verlust von APP in hippocampalen Neuronen, zu einer Vergrößerung des präsynaptische Vesikelpools, am ehesten durch eine erhöhte Anzahl funktioneller Synapsen führt. Dies bestätigen auch, über diese Arbeit hinausgehende morphometrische Daten, die einen Anstieg der Synapsendichte in kultivierten Neuronen der APP-knockout Maus zeigen.

In Zusammenschau mit anderen Studien liegen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss nahe, dass APP vermutlich über sein proteolytisches Spaltprodukt A β die synaptische Übertragung moduliert.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Zitierte Veröffentlichungen

Allsop,D., Landon,M., and Kidd,M. (1983). The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain Res.* 259, 348-352.

Almeida,C.G., Tampellini,D., Takahashi,R.H., Greengard,P., Lin,M.T., Snyder,E.M., and Gouras,G.K. (2005). Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol. Dis.* 20, 187-198.

Arriagada,P.V., Growdon,J.H., Hedley-Whyte,E.T., and Hyman,B.T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631-639.

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

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

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

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

- Bickel,H. (2001). [Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]. *Z. Gerontol. Geriatr.* **34**, 108-115.
- Bitan,G., Lomakin,A., and Teplow,D.B. (2001). Amyloid beta-protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 35176-35184.
- Borst,J.G. and Sakmann,B. (1996). Calcium influx and transmitter release in a fast CNS synapse. *Nature* **383**, 431-434.
- Braak,H. and Braak,E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl)* **82**, 239-259.
- Chang,E.H., Savage,M.J., Flood,D.G., Thomas,J.M., Levy,R.B., Mahadomrongkul,V., Shirao,T., Aoki,C., and Huerta,P.T. (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.
- Cobb,S.R., Halasy,K., Vida,I., Nyiri,G., Tamas,G., Buhl,E.H., and 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,L.V., Diaz,M.E., Beers,D.R., Neely,A., Xie,W.J., and Appel,S.H. (1998). Role of potassium channels in amyloid-induced cell death. *J. Neurochem.* **70**, 1925-1934.
- Demuro,A., Mina,E., Kaye,R., Milton,S.C., Parker,I., and Glabe,C.G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J. Biol. Chem.* **280**, 17294-17300.

Dickson,D.W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *56*, 321-339.

Ehehalt,R., Keller,P., Haass,C., Thiele,C., and Simons,K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* *160*, 113-123.

Fernandez-Chacon,R., Konigstorfer,A., Gerber,S.H., Garcia,J., Matos,M.F., Stevens,C.F., Brose,N., Rizo,J., Rosenmund,C., and Sudhof,T.C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* *410*, 41-49.

Goedert,M. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* *16*, 460-465.

Haass,C., Hung,A.Y., Schlossmacher,M.G., Teplow,D.B., and Selkoe,D.J. (1993). beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J. Biol. Chem.* *268*, 3021-3024.

Haass,C., Hung,A.Y., and Selkoe,D.J. (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. and Steiner,H. (2002). Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol.* *12*, 556-562.

Hardy,J. and Allsop,D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* *12*, 383-388.

Heber,S., Herms,J., Gajic,V., Hainfellner,J., Aguzzi,A., Rulicke,T., von Kretschmar,H., von Koch,C., Sisodia,S., Tremml,P., Lipp,H.P., Wolfer,D.P., and 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.

Heyman,A., Peterson,B., Fillenbaum,G., and Pieper,C. (1996). The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part XIV: Demographic and clinical predictors of survival in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 46, 656-660.

Hirakura,Y., Yiu,W.W., Yamamoto,A., and Kagan,B.L. (2000). Amyloid peptide channels: blockade by zinc and inhibition by Congo red (amyloid channel block). *Amyloid*. 7, 194-199.

Hsieh,H., Boehm,J., Sato,C., Iwatsubo,T., Tomita,T., Sisodia,S., and Malinow,R. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52, 831-843.

Jontes,J.D. and Smith,S.J. (2000). Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27, 11-14.

Kamenetz,F., Tomita,T., Hsieh,H., Seabrook,G., Borchelt,D., Iwatsubo,T., Sisodia,S., and Malinow,R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925-937.

Kang,J., Lemaire,H.G., Unterbeck,A., Salbaum,J.M., Masters,C.L., Grzeschik,K.H., Multhaup,G., Beyreuther,K., and Muller-Hill,B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733-736.

Katz,B. and Miledi,R. (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J. Physiol* 195, 481-492.

Kawahara,M. and 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.

Kirazov,E., Kirazov,L., Bigl,V., and Schliebs,R. (2001). Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and

synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**, 287-296.

Koo,E.H., Sisodia,S.S., Archer,D.R., Martin,L.J., Weidemann,A., Beyreuther,K., Fischer,P., Masters,C.L., and Price,D.L. (1990). Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 1561-1565.

Li,Z.W., Stark,G., Gotz,J., Rulicke,T., Gschwind,M., Huber,G., Muller,U., and 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.

Magara,F., Muller,U., Li,Z.W., Lipp,H.P., Weissmann,C., Stagljar,M., and Wolfer,D.P. (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.

Mennerick,S. and Zorumski,C.F. (1995). Paired-pulse modulation of fast excitatory synaptic currents in microcultures of rat hippocampal neurons. *J. Physiol* **488 (Pt 1)**, 85-101.

Murakami,N., Yamaki,T., Iwamoto,Y., Sakakibara,T., Kobori,N., Fushiki,S., and Ueda,S. (1998). Experimental brain injury induces expression of amyloid precursor protein, which may be related to neuronal loss in the hippocampus. *J. Neurotrauma* **15**, 993-1003.

Murthy,V.N., Sejnowski,T.J., and Stevens,C.F. (1997). Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* **18**, 599-612.

Neher,E. and Sakmann,B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799-802.

- Parent,A.T., Barnes,N.Y., Taniguchi,Y., Thinakaran,G., and Sisodia,S.S. (2005). Presenilin attenuates receptor-mediated signaling and synaptic function. *J. Neurosci.* *25*, 1540-1549.
- Patrick,G.N., Zukerberg,L., Nikolic,M., de la,M.S., Dikkes,P., and Tsai,L.H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* *402*, 615-622.
- Perez,R.G., Soriano,S., Hayes,J.D., Ostaszewski,B., Xia,W., Selkoe,D.J., Chen,X., Stokin,G.B., and Koo,E.H. (1999). Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J. Biol. Chem.* *274*, 18851-18856.
- Perez,R.G., Zheng,H., Van der Ploeg,L.H., and Koo,E.H. (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J. Neurosci.* *17*, 9407-9414.
- Priller,C., Bauer,T., Mitteregger,G., Krebs,B., Kretzschmar,H.A., and Herms,J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* *26*, 7212-7221.
- Pyott,S.J. and Rosenmund,C. (2002). The effects of temperature on vesicular supply and release in autaptic cultures of rat and mouse hippocampal neurons. *J. Physiol* *539*, 523-535.
- Ramsden,M., Henderson,Z., and Pearson,H.A. (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,L.D., Webster,N.J., Vaughan,P.F., Henderson,Z., and Pearson,H.A. (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.

- Rebeck,G.W., Reiter,J.S., Strickland,D.K., and Hyman,B.T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11, 575-580.
- Reim,K., Mansour,M., Varoqueaux,F., McMahon,H.T., Sudhof,T.C., Brose,N., and Rosenmund,C. (2001). Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104, 71-81.
- Rosenmund,C., Clements,J.D., and Westbrook,G.L. (1993). Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science* 262, 754-757.
- Rosenmund,C., Feltz,A., and Westbrook,G.L. (1995). Calcium-dependent inactivation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 73, 427-430.
- Rosenmund,C. and Stevens,C.F. (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* 16, 1197-1207.
- Sabo,S.L., Ikin,A.F., Buxbaum,J.D., and Greengard,P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J. Cell Biol.* 153, 1403-1414.
- SACHS,L. (1997). *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Sagar,H.J., Cohen,N.J., Sullivan,E.V., Corkin,S., and Growdon,J.H. (1988). Remote memory function in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Brain* 111 (Pt 1), 185-206.
- Seabrook,G.R., Smith,D.W., Bowery,B.J., Easter,A., Reynolds,T., Fitzjohn,S.M., Morton,R.A., Zheng,H., Dawson,G.R., Sirinathsinghji,D.J., Davies,C.H., Collingridge,G.L., and Hill,R.G. (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* 38, 349-359.

Snyder,E.M., Nong,Y., Almeida,C.G., Paul,S., Moran,T., Choi,E.Y., Nairn,A.C., Salter,M.W., Lombroso,P.J., Gouras,G.K., and Greengard,P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat. Neurosci.* *8*, 1051-1058.

Steinbach,J.P., Muller,U., Leist,M., Li,Z.W., Nicotera,P., and Aguzzi,A. (1998). Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice. *Cell Death. Differ.* *5*, 858-866.

Terry,R.D., Masliah,E., Salmon,D.P., Butters,N., DeTeresa,R., Hill,R., Hansen,L.A., and 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.

Weidemann,A., Konig,G., Bunke,D., Fischer,P., Salbaum,J.M., Masters,C.L., and Beyreuther,K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* *57*, 115-126.

Yamatsuji,T., Matsui,T., Okamoto,T., Komatsuzaki,K., Takeda,S., Fukumoto,H., Iwatsubo,T., Suzuki,N., Asami-Odaka,A., Ireland,S., Kinane,T.B., Giambarella,U., and Nishimoto,I. (1996). G protein-mediated neuronal DNA fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* *272*, 1349-1352.

Zheng,H., Jiang,M., Trumbauer,M.E., Sirinathsinghji,D.J., Hopkins,R., Smith,D.W., Heavens,R.P., Dawson,G.R., Boyce,S., Conner,M.W., and . (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* *81*, 525-531.

Zucker,R.S. and Regehr,W.G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol* *64*, 355-405.

6.2 Eigene Veröffentlichung

Priller,C., Bauer,T., Mitteregger,G., Krebs,B., Kretschmar,H.A., and Herms,J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 26, 7212-7221.

7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 01: APP-Spaltung
- Abbildung 02: Herstellung der autaptischen Neuronenkultur
(*schematische Darstellung*)
- Abbildung 03: Autaptische Einzelzellkultur
- Abbildung 04: Nativbild eines autaptischen Hippocampus-Neurons
- Abbildung 05: Schematischer und vereinfachter Aufbau des Messplatzes
- Abbildung 06: Ersatzschaltbild der whole-cell-Konfiguration
- Abbildung 07: Generierung der whole-cell Konfiguration
- Abbildung 08: Standardisierter Stimulationspuls
- Abbildung 09: AP-induziertes EPSC
- Abbildung 10: Vergleich der basalen synaptischen Übertragung bei 1mM $[Ca^{2+}]_e$
- Abbildung 11: Stimulationsprotokoll für die Doppelpuls-Versuche
- Abbildung 12: Beispiel einer gemessenen Paired-Pulse Facilitation (PPF) bei Doppelpulsstimulation
- Abbildung 13: Die Doppelpulsverstärkung ist vom Stimulationsintervall abhängig.
- Abbildung 14: Unveränderte Doppelpulsverstärkung bei Neuronen von APP-KO Mäusen
- Abbildung 15: Spontanaktivität
- Abbildung 16: Mittlere Amplitude der mEPSCs
- Abbildung 17: Mittlere Ladung der mEPSCs
- Abbildung 18: Mittlere Frequenz der mEPSCs

- Abbildung 19: Abhängigkeit der basalen synaptischen Übertragung von der extrazellulären Kalzium-Ionen Konzentration
- Abbildung 20: Die basale synaptische Übertragung der APP-knockout Neuronen war bei hoher $[Ca^{2+}]_e$ signifikant verstärkt
- Abbildung 21: Typische Beispiele einer paired-pulse Depression bei einem Interpuls-Intervall von 50 ms
- Abbildung 22: Doppelpulsstimulation bei 4mM $[Ca^{2+}]_e$ zeigte eine signifikant verringerte Depression bei APP-null
- Abbildung 23: Stimulationsprotokoll der Hochfrequenzstimulation (HFS)
- Abbildung 24: Typische Beispiele für die bei einer HFS resultierenden postsynaptischen Ströme
- Abbildung 25: Die Hochfrequenzstimulation zeigte bei APP-KO eine signifikant geringere, relative Amplitudenverkleinerung
- Abbildung 26: Stimulationsprotokoll der Prolongierten Repetitiven Stimulation (PRS)
- Abbildung 27: Die PRS zeigte bei APP-KO eine signifikant geringere relative Amplituden-Verkleinerung
- Abbildung 28: Typische Beispiele, durch Applikation hypertoner Lösung ausgelöster postsynaptischer Ströme
- Abbildung 29: Ladung des Sucrose-induzierten Stroms in Coulomb als Maßstab der Größe des RRP
- Abbildung 30: Größe des Readily Releasable Vesikelpools
- Abbildung 31: Vesikelfreisetzungswahrscheinlichkeit P_{vr} zeigte keinen signifikanten Unterschied

8 Abkürzungsverzeichnis

AD	engl.: Alzheimer Disease
AMPA	engl.: <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid</i>
AP	Aktionspotential
APH-1	Anterior Pharynx Defective-1-Homologue
APP	engl.: <i>amyloid precursor protein</i>
APP-KO	Amyloid-Precursor-Protein Knockout Maus
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Aβ	beta-Amyloid
BACE	β-site APPcleaving enzyme (β-Sekretase)
C57 BL6	C57 Black 6 (Wildtyp Maus)
CA	Hippocampus (lat. Cornu Ammonis)
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
[Ca ²⁺] _e	Extrazelluläre Kalzium-Ionen Konzentration
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Kalzium-Ionen Konzentration
CTF	C-terminales Fragment
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom (engl.: <i>current</i>)
EZL	Extrazellularlösung
FBS	Fetal Bovine Serum

GABA	Gamma-Aminobutyric Acid
HBSS	Hanks´ s balanced salt solution
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazinethan-Sulfonsäure
HFS	Hochfrequenzstimulation
IZL	Intrazellularlösung
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KPI	Kunitz-Protease-Inhibitor
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
nA	Nanoampere (10 ⁻⁹ Ampere)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Signifikanz
pA	Picoampere (10 ⁻¹² Ampere)
PDL	Poly-D-Lysin
PEN-2	Presenilin Enhancer-2 Homologue
PHF	Paired helical filament
PRS	Prolongierte Repetitive Stimulation
P _{VR}	Vesikelfreisetzungswahrscheinlichkeit
RRP	Readily Releaseable Pool
SEM	Standard Error of the Mean
WT	Wildtyp

Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Jochen Herms für die ausgezeichnete Betreuung, die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre aber auch die nötige Geduld bis zur Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Für fachliche Hilfe und Unterstützung jeglicher Art sowie die nette Zusammenarbeit bedanke ich mich ganz speziell bei Doris Schechinger, Stefan Korte, Christina Priller und Martin Fuhrmann.

Ganz besonders aber möchte ich mich bei meiner Familie, sowie meiner Freundin Julia für den notwendigen Rückhalt bedanken, auf den ich mich in dieser Zeit immer verlassen konnte.

9 Lebenslauf

Zur Person

Name	Thomas Sebastian Bauer
Geburtsdaten	07. Juni 1978 in München
Familienstand	ledig

Schulbildung

1988 – 1997	Gymnasium Unterhaching Schwerpunktfächer: Chemie, Wirtschaft und Recht
1984 – 1988	Grundschule Unterhaching

Studium

05/1999 – 12/2005	Ludwig-Maximilians-Universität München Studiengang Humanmedizin
11/2005	Staatsexamen 3. Teil
03/2004	Staatsexamen 2. Teil
03/2002	Staatsexamen 1. Teil
03/2001	Ärztliche Vorprüfung
08/1998 – 04/1999	Semmelweis Universität für Medizinische Wissenschaften, Ungarn Studiengang Humanmedizin

Praktisches Jahr

05/2005 – 08/2005	Radiologie am Institut für Klinische Radiologie des Klinikums der Universität München-Innenstadt
01/2005 – 05/2005	Chirurgie in der Chirurgischen Abteilung des Klinikums Traunstein
09/2004 – 01/2005	Innere Medizin in der Gastroenterologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Neuperlach

Praktika und Famulaturen

10/2003	Famulatur in der Abteilung für Neuroradiologie des Klinikums der Universität München-Großhadern
09/2003	Famulatur am Institut für Neuropathologie des Klinikums der Universität München-Großhadern
07/2003	Famulatur am Institut für Klinische Radiologie des Klinikums der Universität München-Innenstadt
02/2003	Famulatur in der Urologischen Praxis Dr. Bauer, München
09/2001	Famulatur in der Abteilung für Kardiologie und Pulmonologie des Städtischen Krankenhauses München-Neuperlach
01/1998 – 06/1998	Praktikum bei der publish-industry Verlag GmbH
10/1997 – 11/1997	Krankenpflegepraktikum in der Abteilung für Neurologie des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching

Berufliche Tätigkeit

05/2006 – 10/2007	Assistenzarzt in der Inneren Abteilung am Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in München
seit 11/2007	Assistenzarzt am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Klinikums Schwabing, München