

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung

Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. Armin Giese

Physiologische Funktion und therapeutisches Potential der β -Sekretase 1 in Morbus Alzheimer

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

an der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Severin Filser

geboren in München

München, 2016

Erklärungen

Diese Dissertation wurde unter Leitung von Prof. Dr. Jochen Herms am Lehrstuhl für Translationale Hirnforschung der Ludwig-Maximilians-Universität angefertigt und von Prof. Dr. Barbara Conradt vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt wurde und ich mich nicht anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg unterzogen habe.

Ich bin mit der Einstellung dieser Arbeit in Fachbibliotheken einverstanden.

München, im Januar 2016

Severin Filser

Erstgutachter: Prof. Dr. Barbara Conradt

Zweitgutachter: Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler

Einreichungsdatum: 25. Januar 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2016

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Summary	VI
1. Einleitung	1
1.1 „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“	1
1.1.1 Klinische Symptome und Krankheitsverlauf	2
1.1.2 Neuropathologische Merkmale	3
1.1.3 Amyloide Plaques	4
1.1.4 Tangles	5
1.1.5 Synapsen- und Nervenzellenuntergang	6
1.1.6 Molekularbiologie	6
1.1.7 Proteolytische Prozessierung von APP	7
1.1.8 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	9
1.1.9 Die β -Sekretase BACE1	11
1.1.10 Zellbiologie und physiologische Funktion	12
1.1.11 Therapeutisches Potential	14
1.2 Dendritische Spines	17
1.2.1 Strukturelle Plastizität dendritischer Spines	18
1.3 Intravitalmikroskopie	20
1.3.1 Fluoreszenzmikroskopie – Geschichte und Anwendung	20
1.3.2 <i>In vivo</i> 2-Photonen Mikroskopie	23
2. Ergebnisse	26
2.1 Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisation von BACE1 im murinen Gehirn ...	26
2.2 Analyse prä- und post-synaptischer Endigungen in <i>Bace1</i> ^{-/-} Mäusen	27
2.3 <i>In vivo</i> Evaluierung pharmakologischer BACE1 Inhibitoren	30
2.4 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibitoren auf die Fell-Pigmentierung	31
2.5 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibition auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines	32
2.6 Elektrophysiologische Messungen	37
2.6.1 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibition auf die synaptische Transmission	37
2.6.2 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibition auf die synaptische Potenzierung	40
2.7 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibition auf kognitive Funktionen	43

3.	Diskussion	46
3.1	Synaptische Funktion von BACE1	46
3.2	Differentielle Effekte einer genetischen Ablation und pharmakologischen Inhibition von BACE1	50
3.3	Therapeutisches Potential pharmakologischer BACE1 Inhibitoren	51
3.4	Schlussfolgerung.....	55
4.	Material und Methoden	56
4.1	Maushaltung.....	56
4.2	Transgene Mäuse und deren Genotypisierung	56
4.2.1	DNS Isolierung aus Ohrstanzbiopsien.....	56
4.2.2	Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR	57
4.2.3	Auftrennung des PCR-Produkts mittels Gelelektrophorese.....	57
4.2.4	C57BL/6J	58
4.2.5	B6.129- <i>Bace1</i> ^{tm1Pcw} /J.....	58
4.2.6	B6.Cg-Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J.....	60
4.2.7	<i>Bace1</i> -KO x GFP-M.....	61
4.3	Formulierung und Applikation der Bace1 Inhibitoren.....	62
4.4	Sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	63
4.5	Blutentnahme und Plasmaseparation	64
4.6	Gehirnentnahme und Gewebekomogenisierung.....	64
4.7	Sandwich ELISA Verfahren.....	65
4.8	Immunhistochemie.....	65
4.8.1	Transkardiale Perfusion.....	65
4.8.2	Anfertigung von Gehirn-Schnitten mittels Vibratom	66
4.8.3	Immunhistochemische Färbeprotokolle	67
4.8.4	Färbeprotokoll für die Fluoreszenzmikroskopie.....	67
4.8.5	Färbeprotokoll für die Elektronenmikroskopie	67
4.9	Mikroskopie	70
4.9.1	Elektronenmikroskopie	70
4.9.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	70
4.9.3	Intravitalmikroskopie	71
4.10	Elektrophysiologie	75
4.11	Verhaltensversuche	77

4.12	Bildanalyse und quantitative Auswertung dendritischer Spines.....	78
4.13	Statistische Auswertung	79
4.14	Software.....	79
5.	Abbildungsverzeichnis.....	80
6.	Tabellenverzeichnis.....	81
7.	Literaturverzeichnis.....	81
8.	Lebenslauf und eigene Publikationen	96
8.1	Lebenslauf.....	96
8.2	Publikationen.....	99
9.	Danksagung	101

Zusammenfassung

Morbus Alzheimer ist die weltweit häufigste, altersassoziierte, neurodegenerative Erkrankung und manifestiert sich klinisch in einem progressiven Verlust kognitiver Funktionen und Gedächtnisleistung. Gegenwärtig existieren weder präventive Maßnahmen, noch therapeutische Verfahren, um das Ausbrechen bzw. das Voranschreiten dieser Krankheit zu verhindern. Unter Berücksichtigung des demographischen Wandels stellt Morbus Alzheimer somit heute eine der größten medizinischen, ökonomischen und gesellschaftlichen Herausforderungen dar. Der Amyloid-Kaskaden-Hypothese zufolge besteht die molekulare Krankheitsursache in der pathologischen Akkumulation und Aggregation des A β -Peptids, infolge derer Synapsen und Neurone geschädigt werden und degenerieren. Das A β -Peptid wird hierbei durch die sequentielle, proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins APP produziert. Der erste Schritt dieses sogenannten amyloidogenen Prozessierungswegs wird durch die β -Sekretase BACE1 initiiert. Ein attraktiver Behandlungsansatz zur Reduktion des A β -Spiegels besteht somit in der direkten pharmakologischen Inhibition von BACE1. Um den klinischen Erfolg derartiger Inhibitoren zu gewährleisten, müssen jedoch potentielle Nebenwirkungen zuvor identifiziert werden, die mit der therapeutischen Intervention einhergehen, um Risiken einzuschätzen und minimieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Auswirkungen einer chronischen BACE1 Inhibition auf die Physiologie und das Verhalten adulter Mäuse untersucht. Die hierbei verwendeten BACE1 Inhibitoren reduzierten zwar effektiv die A β -Level im Gehirn, führten jedoch zu einer Beeinträchtigung diverser synaptischer Funktionen. Mittels intravitalmikroskopischer Verfahren konnte während der Inhibitor-Behandlung eine signifikante Abnahme der Bildung neuer dendritischer Spines im somatosensorischen Kortex festgestellt werden; ein Effekt, der nach Absetzen der Inhibitoren langsam wieder abklang. Elektrophysiologische Ableitungen ließen weiterhin auf eine gestörte synaptische Transmission und Plastizität schließen. Diese strukturellen und funktionellen Defizite in der Plastizität von Synapsen spiegelten sich ferner in einer verminderten Lern- und Gedächtnisleistung in BACE1 Inhibitor behandelten Versuchstieren wieder. Die präsentierten Befunde zeigen somit, dass BACE1 eine wichtige physiologische Rolle in der Regulation neuronaler und kognitiver Funktionen erfüllt, die durch eine chronische Inhibition dieser

Protease gestört werden können. Für den potentiellen Einsatz von BACE1 Inhibitoren zur medikamentösen Behandlung von Morbus Alzheimer wird es daher von großer Wichtigkeit sein, eine therapeutische Dosis zu evaluieren, die beides im Gleichgewicht zu halten vermag: Wirksamkeit und klinische Sicherheit.

Summary

Alzheimer's disease is the most common, age-associated, neurodegenerative disorder and is clinically characterized by a progressive loss of cognitive functions and memory. Presently, neither preventive measures nor therapeutic strategies exist to prevent the development or progression of the disease. In consideration of the demographic changes Alzheimer's disease represents one of the biggest medical, economic and social challenges of our time. Based on the amyloid-cascade-hypothesis the molecular cause of the disease is the pathological accumulation and aggregation of the A β -peptide, which is followed by synaptic and neuronal injury and degeneration. The A β -peptide is produced by the sequential, proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein APP. The first step in this so called amyloidogenic processing pathway is initiated by the β -secretase BACE1. Therefore, the direct pharmacological inhibition of BACE1 represents an attractive, therapeutical approach to reduce the A β -levels. To ensure a positive clinical outcome, potential mechanism-based side effects of such inhibitors have to be identified to assess and minimize the risks that might be caused by this therapeutic strategy.

The main goal of this dissertation was to investigate the effects of chronic BACE1 inhibition on the physiology and behavior of adult mice. The applied BACE1 inhibitors effectively reduced A β -levels in the brain but caused the deterioration of various synaptic functions. By intravital microscopy a significant reduction in the formation of new dendritic spines in the somatosensory cortex was discovered during the application of the inhibitors; an effect that recovered slowly after withdrawal of the inhibitors. Furthermore, electrophysiological recordings revealed alterations of synaptic transmission and plasticity. These structural and functional deficits in the plasticity of synapses were also reflected by a diminished performance in learning and memory behavioral tasks. Taken together, these results assign an important physiological role to BACE1 in the regulation of neuronal and cognitive functions, which might be impaired by the chronic inhibition of this protease. Therefore, it will be of great importance to evaluate a therapeutical dose of BACE1 inhibitors for the medication-based treatment of Alzheimer's disease, that balances both: Efficacy and clinical safety.

1. Einleitung

1.1 „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“

Im Jahre 1901 übernahm der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer, seinerzeit Assistenzarzt an der Frankfurter „Städtischen Anstalt für Irre und Epileptische“, eine Patientin, die ungewöhnlich früh an „Altersschwachsinn“ zu leiden schien. So konstatierte Alzheimer, die erst 51-jährige Auguste Deter sei „...zeitlich und örtlich gänzlich desorientiert“ und „...ihre Merkfähigkeit aufs schwerste gestört.“. Des Weiteren litt Auguste Deter unter abrupten Gemütsschwankungen und spontan auftretenden Halluzinationen. Ein Zustand den sie selbst mit den Worten beschrieb: „Ich habe mich sozusagen verloren.“. Diese klinische Symptomatik ließ sich keiner bis dato beschriebenen Krankheit zuordnen und veranlasste Alzheimer das Gehirn der 1906 letztendlich verstorbenen Patientin mittels einer Bielschowsky Silberfärbung zu untersuchen (Abb. 1A). Die Ergebnisse seiner Studie veröffentlichte er 1907 in seinem Aufsatz „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“; heute bekannt als Morbus Alzheimer¹. Durch die Methode der Silberimprägnierung war es Alzheimer gelungen die Bildung proteinöser Ablagerungen im Gehirnpräparat von Auguste Deter nachzuweisen (Abb. 1B). So beschrieb er das Auftreten „miliarer Herdchen“, eines eigenartigen, in die Hirnrinde eingelagerten Stoffes und intrazellulärer Einschlüsse „aufgeknäulter Bündel von Fibrillen“, die heute amyloide Plaques und neurofibrilläre Tangles (engl. für Knäuel) genannt werden. Begleitet wurden diese neuropathologischen Veränderungen durch eine ausgeprägte Nervenzellatrophie, die sich über weite Teile des Gehirns erstreckte. In Anbetracht der steigenden Anzahl ähnlich gearteter Krankheitsfälle prognostizierte Alzheimer ferner, dass die Erforschung der zur Grunde liegenden Ursachen von großer Wichtigkeit sein wird: “Solche eigenartigen Krankheitsprozesse haben sich in den letzten Jahren in größerer Anzahl feststellen lassen. Diese Beobachtung wird uns nahe legen müssen, dass wir uns nicht damit zufrieden geben sollen, irgendeinen klinisch unklaren Krankheitsfall in eine der uns bekannten Krankheitsgruppen unter Aufwendung von allerlei Mühe unterzubringen.“

Mehr als 100 Jahre später stellt Morbus Alzheimer mit zwei Drittel aller Demenzerkrankungen die häufigste neurodegenerative Krankheit und vierthäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Schlaganfall dar. Schätzungsweise 36 Millionen

Menschen weltweit leiden heute an einer Demenz, ein Wert der sich bis zum Jahre 2050 aufgrund des demografischen Wandels durch steigende Lebenserwartung und weniger Nachwuchs sogar verdreifachen dürfte². Die hierdurch entstandenen Kosten für das Gesundheitswesen sind enorm. So beliefen sich die weltweiten Ausgaben 2010 schätzungsweise auf über 600 Milliarden US-Dollar^{3,4}. Trotz dieser alarmierenden Entwicklung existiert bisher keine dauerhaft effektive Medikation, oder präventive Maßnahme für die Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit. Aufgrund der großen ökonomischen und emotionalen Belastung für die Patienten, deren Familien und der Gesellschaft ist es somit heute wichtiger denn je die molekularen Mechanismen der Alzheimer'schen Krankheit zu verstehen, neue Therapien zu entwickeln und ihre Wirksamkeit zu evaluieren.

1.1.1 Klinische Symptome und Krankheitsverlauf

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems, welche sich in einer langsam voranschreitenden Demenz manifestiert. Generell lässt sich der Krankheitsverlauf in drei Stadien unterteilen, die den Schweregrad der Demenz widerspiegeln⁵:

- Das frühe Stadium der Krankheit zeichnet sich besonders durch eine Störung des episodischen Gedächtnisses aus: Der Fähigkeit sich an autobiographische Ereignisse zu erinnern. Entsprechende Defizite lassen sich anhand einer voranschreitenden Degeneration des medialen Temporallappens und einer funktionellen Beeinträchtigung des Hippocampus erklären, einer Gehirnregion die eine zentrale Rolle in der Abspeicherung von Gedächtnisinhalten spielt⁶.
- Im fortgeschrittenem Stadium ist der Patient auf die Unterstützung Dritter angewiesen. Die Gedächtnisleistung nimmt weiter ab mit einer rapiden Verschlechterung des episodischen und semantischen Gedächtnisses, welches das gesamte Faktenwissen eines Menschen umfasst, wie die grundlegende Bedeutung von Wörtern, Begriffen und deren Zusammenhänge in abstrakter Form. Einhergehend ist häufig eine Veränderung der emotionalen Gemütslage und Persönlichkeit des Patienten zu beobachten.

- Im finalen Stadium der Krankheit sind die allgemeinen kognitiven Fähigkeiten des Patienten massiv beeinträchtigt. Der Betroffene verliert die Fähigkeit mit seiner Umwelt zu kommunizieren und ist physisch stark eingeschränkt. Es kann zu einer Versteifung der Muskulatur und Reflexausfällen kommen. Als häufigste Todesursache gilt die Entstehung von Atemwegsinfekten; meist verursacht durch das Verschlucken von Flüssigkeiten und Speisen aufgrund einer Dysphagie.

Die durchschnittliche Lebensdauer nach Diagnosestellung beträgt sieben Jahre, kann allerdings individuell stark variieren². Morbus Alzheimer beginnt jedoch nicht erst mit dem Auftreten der ersten klinischen Symptome. Anhand von Biomarkerstudien an Patienten, die an einer erblichen Form der Krankheit leiden, konnte gezeigt werden, dass sich erste pathologische Veränderungen bereits 25 Jahre vorher nachweisen lassen⁷.

1.1.2 Neuropathologische Merkmale

Makroskopisch lässt sich in Morbus Alzheimer eine zunehmende kortikale Atrophie feststellen, die hauptsächlich den medialen Temporallappen und assoziierte Gehirnregionen betrifft. Ein Prozess, der sich bereits früh im klinischen Krankheitsverlauf mittels MRI (engl. für **M**agnetic **R**esonance **I**maging) anhand einer Ausdehnung der lateralen Ventrikel beobachten lässt (lat.: *ex vacuo hydrocephalus*)⁸. Mikroskopische Verfahren ermöglichen zudem die Identifikation zweier, für die Krankheit stereotypischer Merkmale: Die extrazelluläre Ablagerung amyloider Plaques (Abb. 1C) im Hirnparenchym (griech. für *para* = „neben“ und *enchyma* = „das Eingegossene“) und die Bildung intrazellulärer Tangles (engl. für Knäuel)⁹⁻¹¹ (Abb. 1D). Diese Läsionen gelten als Ursache für die Degeneration synaptischer Kontakte, das Absterben von Nervenzellen¹² und die Entstehung inflammatorischer Prozesse, gekennzeichnet durch die Rekrutierung von Mikroglia und Aktivierung von Astrozyten¹³⁻¹⁵.

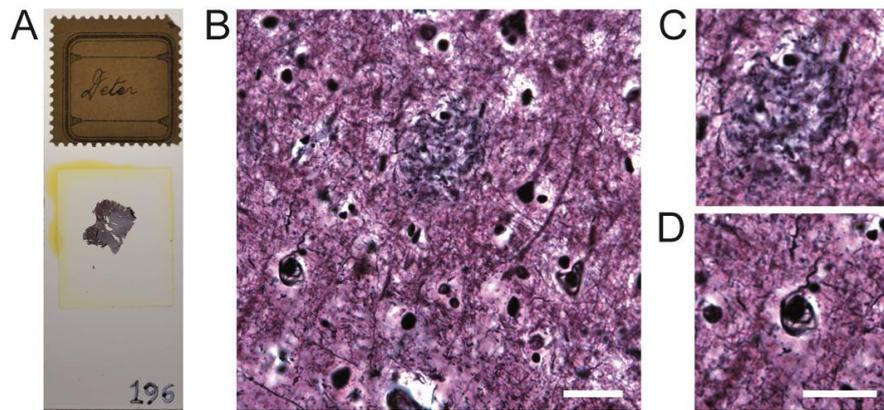


Abbildung 1: Histopathologische Merkmale des ersten, beschriebenen Alzheimer-Patienten Auguste Deter. (A) Histologisches Gehirnpräparat von Auguste Deter, welches mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. h. c. Hans Kretzschmar für die mikroskopischen Aufnahmen unter B-D zur Verfügung gestellt wurde. (B) Übersichtsaufnahme einer Bielschowsky Silberfärbung zur Darstellung der für Morbus Alzheimer charakteristischen, pathologischen Hauptmerkmale: (C) Neuritische Amyloid- β Plaques und (D) Neurofibrilläre Tangles. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils 10 μ m.

1.1.3 Amyloide Plaques

Die Bezeichnung amyloider (lat. *amylum* = „Stärke“) Plaque geht auf den deutschen Pathologen Rudolf Virchow zurück, der diese erstmalig 1854 mittels einer Iod-Färbung detektierte, einer ansonsten klassischen Methode zum Nachweis von Stärke¹⁶. Zwar wurde gezeigt, dass es sich bei amyloiden Ablagerungen um proteinöse Strukturen handelt¹⁷, der Begriff wurde jedoch aus historischen Gründen beibehalten. Amyloide Plaques entstehen durch die Akkumulation und anschließende Aggregation des sezernierten Amyloid- β Peptides ($A\beta$)^{18,19}, welches durch die proteolytische Spaltung des Transmembranproteins APP (engl. für amyloid precursor protein) generiert wird. Plaques zeichnen sich durch eine poröse Struktur²⁰ und annähernd sphärische Form aus, deren Durchmesser bis zu 200 μ m betragen kann²¹. Generell lassen sich zwei Arten von Plaques unterscheiden: Neuritische Plaques weisen einen kompakten Kern aus Amyloidfibrillen mit einer charakteristischen Betafaltblattstruktur auf²², welche durch eine hochgeordnete Quervernetzung des $A\beta$ -Peptides entstehen und radial zur Peripherie ausstrahlen. Typischerweise werden neuritische Plaques von reaktiven Astrozyten, aktivierten Mikroglia und dystrophen Neuriten umgeben^{23,24}. Diffuse Plaques wiederum entstehen durch eine amorphe, gleichmäßige Ablagerung des $A\beta$ -Peptides und verfügen über eine relativ unscharf begrenzte Peripherie²⁴. Im Gegensatz zu neuritischen Plaques wird das Neuropil (griech. für *neuron* = „Nerv“ und *pilema* = „Filz“) durch diffuse Plaques nicht geschädigt. Dieser Plaque-Typ lässt sich relativ

häufig auch in kognitiv unbeeinträchtigten, älteren Menschen beobachten und gilt daher nicht als pathologisches Kriterium für die Diagnose von Morbus Alzheimer²⁵. Die Ausbreitung der A β -Pathologie im Gehirn unterliegt einem räumlich und zeitlich definierten Verlauf. Die sequentielle Reihenfolge mit der die einzelnen Gehirnregionen befallen werden, lässt sich in fünf Phasen unterteilen²⁶: (Phase 1) Isokortex, (Phase 2) enthorinaler Kortex und Hippocampus, (Phase 3) Striatum und Zwischenhirn, (Phase 4) verschiedenen Kerne des Stammhirns, (Phase 5) Kleinhirn. Klinische Studien haben jedoch zeigen können, dass bei Morbus Alzheimer die Schwere oder Dauer der Demenz weder mit der Plaque-Dichte, noch Plaque-Größe korreliert²⁷⁻²⁹.

1.1.4 Tangles

Neurofibrilläre Tangles entstehen durch die Hyperphosphorylierung, Fehlverteilung und anschließende Aggregation des Proteins Tau (= Tubulin bindendes Protein)³⁰ innerhalb einer Nervenzelle³¹. Tau gehört zur Klasse der intrinsisch ungeordneten Proteine³² und weist als solches keine rigide dreidimensionale Struktur auf, sondern ist in der Lage verschiedenste Konformationen anzunehmen. Es ist daher extrem schwierig alle konformativen Umwandlungen von Tau während des Aggregationsprozesses experimentell nachzuvollziehen. Dennoch herrscht ein allgemeiner Konsens darüber, wie die Aggregation von Tau in Morbus Alzheimer initiiert wird. Tau verfügt über Lysin-reiche und daher positiv geladene Bindungs-Domänen, über die es an die negativ geladenen β -Tubulin Untereinheiten von Mikrotubuli binden und letztere somit stabilisieren kann³³⁻³⁷. Aufgrund dieser Eigenschaft spielt Tau eine wichtige Rolle in der Bildung von Zellfortsätzen³⁸, dem Aufbau der Zellpolarität^{9,39} und der Regulierung des axonalen Transports⁴⁰. Unter pathologischen Bedingungen wird das Tau Protein jedoch hyperphosphoryliert^{41,42} und die Bindung zu den Mikrotubuli geschwächt³³. Infolgedessen kommt es zu einer Schädigung des axonalen Transports⁴⁰ und einer Umverteilung von Tau in das somatodendritische Kompartiment^{42,43}. Das im Zytosol (griech. für *kýtos* = „Zelle“ und lat. für *solvere* = „lösen“) angereicherte Tau vollzieht nun eine konformative Veränderung, die zur Ausbildung der sogenannten „Alz50“-Struktur führt (das entsprechende Epitop wird durch den Antikörper Alz50 erkannt) und die Aggregation von Tau begünstigt⁴⁴. Weitere posttranslationale Modifikationen lassen gepaarte, helikale Filamente mit einer gekreuzten β -Faltblattstruktur

entstehen, ähnlich den Amyloidfibrillen⁴⁵. Diese intraneuronalen Aggregate werden als neurofibrilläre Tangles bezeichnet und lassen sich selbst nach dem Absterben der Nervenzelle extrazellulär nachweisen^{43,46}. Hyperphosphorylierte Tau-Aggregate finden sich ferner in dystrophen Neuriten in unmittelbarer Umgebung zu neuritischen Plaques und werden aufgrund ihrer Erscheinung Neuropilfäden genannt⁴⁷. Analog zu der sequentiellen Ablagerung von amyloiden Plaques weist das Voranschreiten der Tau-Pathologie im Gehirn einen zeitlich und örtlich definierten Verlauf auf. Der deutsche Neuropathologe Heiko Braak unterteilte das topographische Verlaufsmuster in sechs Stadien⁴⁸: (Stadium I und II) Trans-enthorinaler und enthorinaler Kortex, (Stadium III und IV) Hippocampus, (Phase V und VI) Isokortex. Da die Tau-Pathologie im Gegensatz zur Amyloid-Pathologie wesentlich stärker mit dem Verlust kognitiver Fähigkeiten korreliert⁴⁹, wurde die Einteilung nach dem Schema von Braak als Standard für die klinische *post mortem* Diagnose von Morbus Alzheimer eingeführt⁴⁸.

1.1.5 Synapsen- und Nervenzellenuntergang

Die Alzheimer'sche Krankheit zeichnet sich durch eine progressive Degeneration von Nervenzellen und synaptischen Endigungen aus, welche sich *post mortem* anhand einer stark ausgeprägten Atrophie des Gehirns feststellen lässt^{50,51}. In besonderem Maße betroffen sind Nervenzellen im Hippocampus, im anatomisch angegliederten enthorinalen Kortex sowie im temporalen, parietalen und frontalen Neokortex⁵²⁻⁵⁴. Einhergehend mit dem Absterben neuronaler Zellen konnte experimentell anhand immunhistochemischer Untersuchungen eine Abnahme des präsynaptischen Markers Synaptophysin festgestellt werden⁵⁵. Ferner wurde, insbesondere in unmittelbarer Nähe zu neuritischen Plaques, ein Verlust dendritischer Spines beobachtet⁵⁶. Zahlreiche Studien konnten belegen, dass Synapsen ein strukturelles Korrelat für Lernen und Gedächtnis darstellen⁵⁷⁻⁵⁹ und tatsächlich korreliert die Abnahme der Synapsendichte stärker mit der Demenzausprägung des Patienten, als alle anderen neuropathologischen Kennzeichen⁶⁰⁻⁶².

1.1.6 Molekularbiologie

Dank methodischer Fortschritte in der Molekularbiologie und Genetik konnte in den letzten zwei Jahrzehnten das Verständnis der pathologischen Mechanismen, die der Alzheimer'schen

Krankheit zugrunde liegen, wesentlich erweitert werden. Auf der Suche nach den molekularen Krankheitsursachen gelang es den Biochemikern George Glenner und Philip Wong 1984 erstmalig das A β -Peptid, den proteinösen Hauptbestandteil amyloider Plaques, aufzureinigen und zu sequenzieren¹⁸. Drei Jahre später wurde das entsprechende Vorläufer-Protein identifiziert aus dem das A β Peptid als Spaltprodukt hervorgeht und sinngemäß APP (engl. für **amyloid precursor protein**) benannt⁶³. Obwohl Morbus Alzheimer größtenteils idiopathisch, also ohne erkennbare Ursache auftritt, so finden sich auch seltene familiäre Fälle, in denen die Krankheit autosomal dominant vererbt wird⁶⁴. Genetische Analysen konnten schließlich zeigen, dass manche Patienten, die an einer familiär vererbaren Form von Morbus Alzheimer leiden, ein mutiertes APP Gen aufwiesen^{65,66}. Heute ist bekannt, dass diverse Punktmutationen in APP die Produktion und Aggregation des A β -Petides begünstigen und somit zur Entstehung amyloider Plaques beitragen^{67,68}. Diese Beobachtungen führten schließlich zur Formulierung der sogenannten „Amyloid Kaskaden Hypothese“, die besagt, dass die übermäßige Produktion bzw. Ablagerung des A β -Peptids im Gehirnparenchym die kausale Ursache einer Kette von Ereignissen darstellt, die letztendlich zur Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit führt⁶⁹.

1.1.7 Proteolytische Prozessierung von APP

Das Amyloid Vorläuferprotein (engl. **amyloid precursor protein**, APP) ist ein ubiquitär exprimiertes Transmembran-Glykoprotein des Typ 1⁶⁶. Im Säugetier bildet APP zusammen mit den homologen Proteinen APLP1 und APLP2 (engl. für **amyloid precursor like protein 1/2**) eine gemeinsame APP-Proteinfamilie; jedoch enthält nur APP, die für die amyloide Plaque Bildung wichtige A β Domäne⁷⁰⁻⁷². Im Menschen ist das korrespondierende APP Gen auf Chromosom 21 lokalisiert, mit drei bekannten Splice Varianten von jeweils 695, 751, oder 770 Aminosäuren Kettenlänge. Während APP751 und APP770 in nahezu allen Gewebearten gebildet werden, findet sich APP695 hauptsächlich in den Synapsen, Dendriten und Axonen von Nervenzellen⁷³⁻⁷⁷. Die Reifung des Proteins erfolgt im sekretorischen Pfad der Zelle, wobei es posttranslational durch Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung modifiziert wird⁷⁸. Anschließend erfolgt eine proteolytische Spaltung des APP Holoproteins, wobei prinzipiell zwei Prozessierungs-Wege unterschieden werden können:

Ein amyloidogener Weg, der zur Generierung des A β -Peptides führt und ein nicht-amyloidogener Weg⁷⁹ (Abb. 2).

Der amyloidogene Prozessierungs-Weg wird durch die Spaltung von APP mittels der Aspartat-Endopeptidase BACE1 (engl. für **β -site APP cleaving enzyme 1**) im Endosom initiiert, da sich das saure Lumen des Endosoms positiv auf die enzymatische Aktivität von BACE1 auswirkt (pH-Optimum bei ~ 5)^{80,81}. Bei der Proteolyse von APP wird hierbei die Ektodomäne (APPs β) in den extrazellulären Raum entlassen, während das carboxy-terminale Fragment (β CTF oder C99) in der Membran verbleibt. Dieses membranständige Fragment wird anschließend durch den γ -Sekretase Komplex, bestehend aus Nicastrin, dem Stabilisationsfaktor APH-1, Präsenilin-Enhancer 2 und den katalytischen Untereinheiten Präsenilin-1 oder Präsenilin-2⁸², innerhalb der Transmembrandomäne gepalten⁸³, wodurch das A β -Peptid und die intrazelluläre Domäne AICD (engl. für **APP intracellular domain**) freigesetzt werden^{78,84}. Die Schnittposition der γ -Sekretase ist hierbei heterogen und so können A β -Peptide mit Längen von 37 bis zu 43 Aminosäuren entstehen, die unterschiedliche, konformationelle Eigenschaften aufweisen⁸⁵. Im Vergleich zu der häufigsten Variante, dem A β_{40} Peptid, neigt A β_{42} zu Konformationsänderungen, die die Aggregation des Peptides begünstigen und zur Ausbildung amyloider Fibrillen führen^{86,87}. Folglich konnte festgestellt werden, dass der Großteil des fibrillären A β in neuritischen Plaques aus A β_{42} besteht⁸⁸.

Im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg wird APP durch die Metalloproteinase ADAM10 (engl. für **a disintegrin and metalloproteinase 10**)⁸⁹ innerhalb der A β -Sequenz gespalten, was zur Sekretion der löslichen extrazellulären APPs α -Ektodomäne führt^{90,91}. Die anschließende Spaltung des membranständigen α CTF (C83) durch die γ -Sekretase resultiert wiederum in der Freisetzung der intrazellulären Domäne (AICD) und des p3 Peptids.

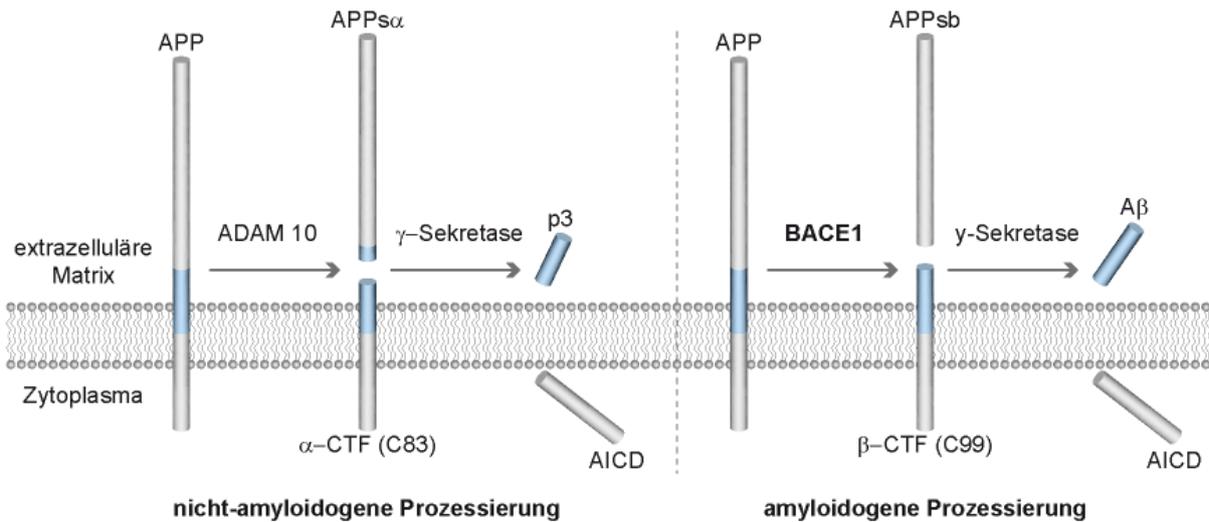


Abbildung 2: Sequentielle Prozessierungswege des Amyloid-Vorläuferproteins APP. Die sequentielle Spaltung von APP erfolgt in zwei Prozessierungswegen. In der amyloidogenen Prozessierung wird die Ektodomäne (APPs β) durch BACE1 proteolytisch abgetrennt und in den extrazellulären Raum entlassen. Durch die anschließende Prozessierung des membranständigen C-terminalen Fragments (β CTF) mittels γ -Sekretase Komplex werden die APP intrazelluläre Domäne (AICD) und das A β -Peptid freigesetzt. Alternativ wird bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung APP innerhalb der A β -Peptid Domäne durch ADAM10 gespalten, wodurch die APPs α -Ektodomäne in den extrazellulären Raum entlassen wird. Die anschließende Spaltung des membranständigen C-terminalen Fragments (α CTF) durch die γ -Sekretase befreit die APP intrazelluläre Domäne und das p3 Peptid. Abbildung modifiziert nach Burgold, 2013⁹².

1.1.8 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurde 1991/1992 von John A. Hardy und Dennis J. Selkoe postuliert und beschreibt eine Sequenz pathologischer Veränderungen, die zur Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit führt^{69,93,94}. Nach dieser Hypothese besteht die unmittelbare Krankheitsursache in der sukzessiven Akkumulation und Aggregation des A β -Peptids aufgrund einer erhöhten A β Freisetzung bzw. aufgrund eines verminderten A β Abbaus. Infolge der Aggregation von A β werden Synapsen geschädigt, Immunreaktionen in Form einer reaktiven Gliose verursacht und lösliches Tau hyperphosphoryliert, was wiederum zur Bildung intrazellulärer Fibrillen führt. Die Kaskade kulminiert letztendlich in einer progressiven synaptischen und neuronalen Degeneration, an deren Ende die Alzheimer'sche Demenz mit ihrer charakteristischen Plaque- und Tangle-Pathologie steht⁹⁵.

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese gründet auf dem Befund, dass das A β -Peptid den proteinösen Hauptbestandteil amyloider Plaques und zerebraler Amyloidangiopathien ausmacht^{18,19}. Die These, dass A β eine zentrale Rolle in der Ätiologie von Morbus Alzheimer

spielt, erhärtete sich weiter durch die Identifizierung des APP-Gens und dessen Lokalisation auf Chromosom 21^{63,96-98}. Aufgrund einer Chromosomenabberation ist das Chromosom 21 und somit das APP-Gen im Down-Syndrom dreifach vorhanden (Trisomie 21). Individuen mit Down-Syndrom weisen eine erhöhte A β -Produktion und amyloide Plaque-Bildung auf und entwickeln in fast allen Fällen bis zum 55 Lebensjahr klinische Symptome einer Demenz vom Alzheimer-Typ^{93,99-101}. Molekulargenetische Studien führten schließlich zur Entdeckung von Punktmutationen im APP-Gen, die mit einer dominant vererbaren Form der Alzheimer'schen Krankheit assoziiert sind^{66,102}. Weitere Mutationen konnten in den katalytischen Untereinheiten PS-1 und PS-2 des γ -Sekretase Komplexes ausgemacht werden¹⁰³. Grundsätzlich verändern diese Mutationen die Prozessierung des APP-Substrats und verstärken somit die Produktion des A β_{42} Peptids¹⁰⁴. Auch das ApoE4 (Apolipoprotein E4), der bisher einzige identifizierte genetische Risikofaktor für Morbus Alzheimer, spielt eine wesentliche Rolle in der Homöostase des A β Levels, da es für die Bindung und den Abtransport des A β -Peptids aus dem Gehirn verantwortlich ist¹⁰⁵. Kürzlich erhielt die Amyloid-Kaskaden-Hypothese zusätzlichen Aufschwung durch die Identifizierung einer APP-Mutation, durch die die Produktion des A β -Peptids vermindert und das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken signifikant verringert wird¹⁰⁶.

Eine wesentliche Grundannahme der Amyloid-Kaskaden-Hypothese besagt, dass die Entstehung der Tau-Pathologie letztendlich verursacht wird durch die Ablagerung amyloider A β -Aggregate. Hinweise hierfür liefern Befunde aus Patienten, die unter einer Frontotemporalen Demenz leiden. Frontotemporale Demenz stellt eine neurodegenerative Erkrankung dar, die durch eine massive Tau-Pathologie gekennzeichnet ist, ohne jedoch amyloide Plaques aufzuweisen^{107,108}. Dies impliziert, dass die pathologische Akkumulation von Tau *per se* neurotoxisch ist, nicht aber die A β -Pathologie induzieren kann^{93,109}. Ein Beleg für die umgekehrte Schlussfolgerung wurde in Tau-überexprimierenden Mausmodellen erbracht, deren Tau-Pathologie sich durch die Koexpression von mutierten, humanen APP wesentlich verstärken ließ¹¹⁰. Weitere Beweise für eine wechselseitige Interaktion zwischen A β und Tau wurden anhand von Experimenten in transgenen Mausmodellen und Zellkultur geliefert. In diesen Studien zeigte sich, dass der genetische Knock-out von Tau A β -induzierte Lerndefizite, Verminderung der LTP (engl. für long-term potentiation) Expression und den Untergang von Neurone kompensiert¹¹¹⁻¹¹³. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Tau-vermittelten synaptotoxischen Wirkung von A β sind weiterhin

Gegenstand intensiver Forschung. So konnte eruiert werden, dass A β über den CAMKK2-AMPK Signalweg (engl. für calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, 5' adenosine monophosphat-activated protein kinase) hyperphosphoryliert und somit zu einer Fehlverteilung von Tau in Richtung des dendritischen Kompartiments führt¹¹⁴. Im dendritischen Spine lokalisiert bewirkt Tau schließlich über die Kinase Fyn eine Hyperphosphorylierung von NMDA-Rezeptoren (**N-Methyl-D-Aspartat**). Die anschließende, übermäßige Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat resultiert letztendlich in Excitotoxizität (lat. für *excitare* = „antreiben“ und griech. für *toxikon* = „Gift“) und der Degeneration von synaptischen Endigungen^{115,116}.

Basierend auf der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurden im Verlauf der vergangenen Jahre zahlreiche potentielle Therapeutika zur Reduktion der A β -Pathologie entwickelt. Therapeutische Strategien zur Behandlung von Morbus Alzheimer umfassten hierbei die aktive bzw. passive Immunisierung gegen A β , oder die Applikation pharmakologischer Substanzen zur Inhibition der A β -Aggregation und Modulation der A β -generierenden Sekretasen. Trotz dieser vielversprechenden Ansätze ist es dennoch bisher nicht gelungen den Krankheitsverlauf effektiv zu verlangsamen. Als Hauptursache für das Scheitern der klinischen Studien wird angeführt, dass die therapeutische Intervention in einem Stadium der Erkrankung erfolgte, bei der die progressive Degeneration des Gehirns bereits dermaßen ausgeprägt war, dass sie nicht mehr gestoppt werden konnte¹¹⁷. Ferner verursachten einige Präparate derart schwere Nebenwirkungen, dass die Behandlung abgebrochen werden musste¹¹⁸⁻¹²¹. Es wird daher für den Erfolg zukünftiger Studien von großer Wichtigkeit sein möglichst früh mit der Therapie zu beginnen¹²²⁻¹²⁴ und die physiologische Funktion der Schlüsselproteine in der Pathogenese von Morbus Alzheimer genauer zu charakterisieren.

1.1.9 Die β -Sekretase BACE1

Der erste und somit limitierende Schritt in der Produktion des toxischen A β Peptids besteht in der proteolytischen Spaltung von APP durch die β -Sekretase BACE1 (**β -site APP cleaving enzyme 1**, auch bekannt als Asp2, oder memapsin 2). BACE1 stellt somit ein primäres und direktes therapeutisches Ziel zur Senkung des cerebralen β -Amyloid-Spiegels in Morbus Alzheimer Patienten dar. Die zentrale Rolle von BACE1 in der Prozessierung von APP wurde erstmals 1999 von fünf unterschiedlichen Forschungsgruppen voneinander unabhängig

aufgedeckt¹²⁵⁻¹²⁹. In diesen Studien wurde zudem eine zweite Aspartat-Endopeptidase identifiziert, deren Aminosäure-Sequenz sich mit BACE1 zu 64% deckt: BACE2 (auch bekannt als Asp1, oder memapsin 1). Beide Endopeptidasen lassen sich zwar in diversen Gewebearten nachweisen, jedoch wird BACE1 hauptsächlich im Gehirn exprimiert^{127,129,130}. Ferner wurde gezeigt, dass BACE1 und nicht BACE2 die *in vivo* relevante β -Sekretase für die Prozessierung von APP darstellt¹³¹. Die katalytische Domäne des BACE1 Enzyms verfügt über zwei charakteristische (DT/SGS/T) Motive, ähnlich der Pepsin Familie der Aspartat Proteasen¹³². Im Gegensatz zu diesen handelt es sich bei BACE1 jedoch um ein Transmembranprotein des Typ I, dessen C-Terminus in das Zytosol ragt, während der N-Terminus samt aktivem Zentrum luminal ausgerichtet ist. Durch besagte Transmembrandomäne wird gewährleistet, dass BACE1 nicht sekretiert wird und sich daher im Trans-Golgi-Netzwerk anreichern kann¹³³.

1.1.10 Zellbiologie und physiologische Funktion

BACE1 lokalisiert in sogenannten Lipidflößen, den Cholesterin-reichen Mikrodomänen der Plasmamembran¹³⁴. Interessanterweise wurde *in vitro* nachgewiesen, dass spezifische Lipide dieser Lipidflöße sich günstig auf die Aktivität des BACE1 Enzyms auswirken¹³⁴. Intrazellulär lässt sich BACE1 in diversen Zellorganellen nachweisen. Aufgrund der pH-Abhängigkeit des Enzyms wird seine maximale katalytische Aktivität jedoch nur im sauren Lumen des Trans-Golgi-Netzwerks und in Endosomen erreicht (pH 4.5 – 6.0)¹³⁵. Entsprechend wird BACE1 zunächst als Pro-Enzym synthetisiert und erst im Trans-Golgi-Netzwerk in die aktive Form konvertiert^{136,137}. Durch weitere post-translationale Modifikationen, wie Phosphorylierung und Palmitoylierung, wird der Transport von BACE1 in das endosomale-lysosomale System bzw. der Einbau in Lipidflöße reguliert^{138,139}. Da im Endosom ein für BACE1 optimales saures Milieu vorherrscht, findet hier auch der Großteil der Prozessierung von APP statt. Experimentelle Studien zeigen, dass BACE1 und APP im Endosom intermolekular interagieren¹³⁵ und dass der Einsatz von Stoffen, die den endosomalen pH-Wert erhöhen, effektiv die A β Produktion inhibiert¹⁴⁰. Neben APP konnten bisher 33 weitere neuronale BACE1 Substrate identifiziert werden und somit ist BACE1 eine der wichtigsten Sheddasen im Nervensystem¹⁴¹. Basierend auf der gegenwärtigen Literatur lassen sich BACE1 Substrate, die eine physiologische Funktion im zentralen Nervensystem erfüllen, in zwei Untergruppen

unterteilen. Die erste Gruppe umfasst Proteine, die eine synaptische Funktion erfüllen, während die zweite Gruppe Proteine enthält, die mit der extrazellulären Matrix von Astrozyten und Oligodendrozyten interagieren und somit das Wachstum von Axonen regulieren¹³².

Da das BACE1 Sekretom eine Vielzahl synaptischer Proteine beinhaltet, weisen *Bace1*^{-/-} Mäuse diverse neurologische Phänotypen auf, wie Lern- und Gedächtnisstörungen, epileptische Anfälle, lokomotorische Hyperaktivität und Schizophrenie-assoziierte Verhaltensänderungen¹⁴²⁻¹⁴⁴. Zumindest zum Teil lassen sich diese komplexen Phänotypen zurückführen auf die BACE1 Substrate *Sez-6* (seizure-related gene 6)¹⁴⁵ und *Nav* β -Untereinheit¹⁴⁶. *Sez-6* ist ein dendritisch lokalisiertes Typ I Membranprotein. *Sez-6* knock-out Mäuse weisen eine reduzierte dendritische Spine Dichte und eine beeinträchtigte Erregbarkeit der pyramidalen Nervenzellen in der kortikalen Schicht V¹⁴⁵ auf. Die epileptischen Anfälle in *Bace1*^{-/-} Mäusen wiederum beruhen wahrscheinlich auf einer reduzierten Prozessierung der *Nav* β -Untereinheit, durch die die Expression und Zelloberflächen-Lokalisation von Natriumkanälen gesteuert wird^{147,148}. Folglich erhöht sich die Dichte an Spannungs-gesteuerten Natriumkanälen in *BACE1*^{-/-} Mäusen und trägt somit zu einer verstärkten neuronalen Erregbarkeit bzw. einer gesteigerten Anfälligkeit für epileptische Anfälle bei.

In der Gruppe der BACE1 Substrate, die in der Regulation des axonalen Wachstums involviert sind, ist insbesondere das neurale Zelladhensionsmolekül *CHL1* (close homolog of **L1**) zu nennen. *CHL1* ist ein Typ I Membranprotein, welches durch *ADAM8* (**A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8**)¹⁴⁹ und *BACE1*¹⁴¹ prozessiert wird und dessen lösliche Ektodomäne mit Neurophilin-1 und Semaphorin 3A interagieren kann, um die axonale Zielfindung zu beeinflussen^{150,151}. Folglich weisen sowohl *CHL1*^{-/-}, als auch *Bace1*^{-/-} Mäuse eine gestörte axonale Verschaltung der hippocampalen Moosfasern innerhalb des infrapyramidalen Bündels auf. Ferner ist die Gesamtlänge des infrapyramidalen Bündels in *Bace1*^{-/-} Tieren um ca. 30% verkürzt¹⁵². Da die Länge des infrapyramidalen Bündels mit der Gedächtnisleistung von Mäusen korreliert¹⁵³, kann hierdurch ein Teil der kognitiven Defizite in *Bace1*^{-/-} Tieren erklärt werden.

Auch im peripheren Nervensystem konnten zahlreiche Funktionen von BACE1 beschrieben werden. So wurde beobachtet, dass eine genetische Ablation von BACE1 zu einer

Hypomyelinisierung von Nervenfasern führt¹⁵⁴. Dieser Effekt ist zurückzuführen auf eine reduzierte proteolytische Prozessierung des BACE1 Substrats NRG1 (**Neuregulin 1**) Isoform Typ III¹⁵⁴, welches eine zentrale Rolle während der frühen postnatalen Myelinisierung spielt¹⁵⁵. Ähnlich zu NRG1 Typ III wird auch NRG1 Typ I von BACE1 prozessiert. Da NRG1 Typ I eine wesentliche Funktion in der Bildung von Muskelspindeln ausübt, führt eine reduzierte Spaltung von NRG1 Typ 1 zu einer verminderten Muskelspindelbildung in *Bace1* knock-out Mäusen¹⁵⁶. Dieser Effekt konnte des Weiteren durch die pharmakologische Inhibition von BACE1 in adulten Wildtyp Mäusen reproduziert werden¹⁵⁶. Die BACE1 vermittelte Prozessierung von NRG1 Typ I ist somit nicht nur nötig für die Formation von Muskelspindeln während der Entwicklung, sondern auch für deren Erhalt im Erwachsenenalter. Es bleibt abzuwarten, ob die Applikation pharmakologischer BACE1 Inhibitoren zu einem ähnlichen Phänotyp bei Menschen führen wird. Ein weitreichendes Verständnis sämtlicher BACE1 Substrate und deren physiologischen Funktion wird daher dazu beitragen, potentielle Nebenwirkungen zu erkennen und zu kontrollieren, die durch den therapeutischen Einsatz von BACE1 Inhibitoren auftreten könnten.

1.1.11 Therapeutisches Potential

Erste Untersuchungen von *Bace1*^{-/-} Tieren stellten weder Entwicklungs-, noch Verhaltensstörungen, oder histologische Veränderungen fest¹⁵⁷. Dies erweckte die Hoffnung, dass eine therapeutische Inhibition von BACE1 frei von unerwünschten Nebenwirkungen sein könnte und somit ein potentielles Zielprotein für die Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit darstellt. In weiterführenden Studien wurde schließlich gezeigt, dass die genetische Ablation von *Bace1* in transgenen, APP überexprimierenden Tieren die Produktion von A β und somit die Entstehung amyloider Plaques bzw. A β -assoziierter Pathologie verhindert^{144,158}. Angesichts dieser vielversprechenden Befunde wurden im Verlauf der Jahre verschiedenste Inhibitoren entwickelt, um das aktive Zentrum von BACE1 zu blockieren. Während erste Peptidmimetika, die der β -Sekretase Spaltstelle von APP nachempfunden sind, effektiv und spezifisch die Aktivität von BACE1 *in vitro* zu inhibieren vermochten, waren sie dennoch zu groß um die Blut-Hirn Schranke zu passieren¹⁵⁹. Erst die Entwicklung niedermolekularer, nicht-peptidischer Inhibitoren löste dieses Problem¹¹⁹. Gegenwärtig befinden sich pharmakologische BACE1 Inhibitoren der Firmen AstraZeneca,

Boehringer Ingelheim, Biogen, Janssen und Merck in klinischen Studien. In diesen gilt es nun wesentliche Fragen zu lösen, die mit dem therapeutischen Einsatz von BACE1 Inhibitoren einhergehen¹³²:

1.) In welchem Maß wird BACE1 inhibiert werden müssen, um einen therapeutischen Effekt zu erreichen?

Die Entdeckung der protektiven APP Punktmutation Ala673Thr legt nahe, dass eine lebenslange Reduktion der A β Produktion um ca. 20% genügen könnte, um die Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit zu verhindern¹⁰⁶. APP transgene Mäuse, die heterozygot für *Bace1* sind, weisen ebenfalls eine um 20% verringerte A β Produktion auf, ohne dabei die Phänotypen zu entwickeln, die bei einem kompletten knock-out des *Bace1* Gens entstehen^{144,160}. Eine moderate Inhibition von BACE1 könnte daher ausreichen, das A β Level adäquat zu senken, ohne die Aktivität von BACE1 derart zu reduzieren, dass schwere Nebenwirkungen auftreten¹³². Weiterhin wurde gezeigt, dass die Konzentration von BACE1 im Gehirn von Alzheimer Patienten im Vergleich zu einem normalen, gesundem Gehirn, um das zweifache erhöht ist¹⁶¹. Sowohl BACE1, als auch APP akkumulieren in dystrophen Neuriten, in unmittelbarer Nähe zu neuritischen Plaques¹⁶². Man vermutet, dass somit die A β Produktion direkt am Plaque erhöht ist und hierdurch eine positive Rückkopplungsschleife entsteht, durch die sich die pathologischen Veränderungen weiterhin verstärken. In diesem Fall stellt eine Normalisierung der BACE1 Aktivität am Plaque mittels BACE1 Inhibition ein potentiell therapeutisches Ziel dar¹³².

2.) In welchem Krankheitsstadium sollten BACE1 Inhibitoren appliziert werden, um eine maximale therapeutische Effektivität zu erzielen?

Die Entdeckung familiär vererbbarer, Alzheimer-assoziiierter Mutationen, die zu einer gesteigerten A β Produktion führen, zeigen, dass A β eine frühe Rolle in der Ätiologie der Alzheimer'schen Krankheit spielt^{65,65}. Weiterhin weisen PET (Positron-Emissions-Tomographie) Studien in Kombination mit dem Amyloid-bindenden, radioaktiven Marker Pittsburgh Compound B, darauf hin, dass die Akkumulation von A β den klinischen Symptomen der Krankheit bis zu 10 Jahre vorausgeht^{7,163}. Angesichts dieser Daten erscheint es sinnvoll A β -reduzierende BACE1 Inhibitoren möglichst früh im Krankheitsverlauf einzusetzen, noch ehe sich eine ausgeprägte, cerebrale Amyloidose entwickelt. Derartige

Untersuchungen wären allerdings sehr zeit- und damit kostenaufwendig und so konzentrieren sich die gegenwärtigen klinischen Studien auf Patienten, die bereits eine leichte bis mittel-schwere Demenz entwickelt haben¹⁶⁴.

3.) Welche Nebenwirkungen könnten mit der Inhibition von BACE1 einhergehen?

Für den Erfolg dieser klinischen Studien wird es allerdings von großer Wichtigkeit sein, potentielle Nebenwirkungen einer pharmakologischen BACE1 Inhibition zu identifizieren. Die Vielzahl der bisher beschriebenen, phänotypischen Veränderungen in *Bace1*^{-/-} Mäusen legt nahe, dass der therapeutische Einsatz von BACE1 Inhibitoren gesundheitliche Risiken bergen könnte. Dennoch ist es bisher unklar, ob eine Inhibition von BACE1 im Menschen zur Entstehung ähnlicher Phänotypen führen wird, wie sie in *Bace1*^{-/-} Tieren beschrieben wurden. So könnte BACE1 während der Entwicklung eine andere Funktion ausüben, als im Erwachsenenalter. Da *Bace1*^{-/-} Mäuse zu keiner Zeit über ein funktionsfähiges BACE1 Enzym verfügen, lassen sich die beschriebenen Defizite in *Bace1*^{-/-} Mäusen teils auf einen Entwicklungs-, oder teils auf einen adulten Phänotyp zurückführen. Zum Beispiel ist Myelinisierung ein Prozess, der bis zum Erreichen des Erwachsenenalters abgeschlossen ist¹⁶⁵ und so handelt es sich bei der charakteristischen Hypomyelinisierung in *Bace1*^{-/-} Tieren um einen Entwicklungsphänotyp. Es ist daher unwahrscheinlich, dass eine therapeutische Inhibition von BACE1 im erwachsenem Menschen zu einer ähnlichen Hypomyelinisierung führen wird, wie sie in *Bace1*^{-/-} Tieren zu beobachten ist. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei der Bildung von Muskelspindeln um einen lebenslangen, kontinuierlichen Prozess, der sowohl in *Bace1*^{-/-} Mäusen, als auch in BACE1 Inhibitor behandelten, adulten Wildtyp Mäusen gestört ist¹⁵⁶. Es handelt sich somit um einen adulten Phänotyp, der potentiell auch durch den therapeutischen Einsatz von BACE1 Inhibitoren in Morbus Alzheimer Patienten auftreten könnte¹³². Ferner besteht die Möglichkeit, dass andere Proteasen das vollständige Fehlen von BACE1 in *Bace1*^{-/-} Tieren zu kompensieren vermögen. Demnach könnte eine akute, pharmakologische Inhibition von BACE1 zu stärkeren, phänotypischen Veränderungen führen, als es basierend auf den Beobachtungen in *Bace1*^{-/-} Tieren zu erwarten wäre.

1.2 Dendritische Spines

1906, im gleichen Jahr als Alois Alzheimer erstmals seine Studienergebnisse „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ öffentlich präsentierte, erhielt der spanische Arzt Santiago Felipe Ramón y Cajal den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin „in Anerkennung seiner Arbeit über die Struktur des Nervensystems“. Seinem Kollegen Alois Alzheimer gleich, bediente sich Ramón Cajal neuester mikroskopischer und histochemischer Verfahren, um den anatomischen Aufbau des Nervensystems möglichst präzise zu charakterisieren und naturgetreue darzustellen. Unter anderem ist es Cajals Arbeiten zu verdanken, dass wir heute das Nervensystem nicht als ein zusammenhängendes Synzytium von Nervenbahnen verstehen, sondern als eine Vernetzung einzelner, diskreter Nervenzellen (Abb. 3). In Verbindung miteinander stehen diese Neurone über präsynaptische Endigungen und postsynaptischen Spines, die Cajal anno 1888 mittels Golgi-Färbung entdeckte und als dornenartige Fortsätze „*espinas*“ bezeichnete¹⁶⁶.

Einzelne Nervenzellen können tausende solcher dendritischen Spines ausbilden und so wird geschätzt, dass allein im menschlichen Neokortex 164×10^{12} synaptischer Verbindungen vorliegen¹⁶⁹. Spines sind Ausstülpungen der dendritischen Zellmembran und stellen das postsynaptische Element exzitatorischer Synapsen dar. Die meisten Spines weisen eine Länge von $0,5 - 2 \mu\text{m}$, ein Volumen von bis zu $0,8 \mu\text{m}^3$ und einen globulären „Kopf“ auf, der über einen dünnen „Hals“ mit dem Dendritenschaft verbunden ist. Basierend auf diesen morphologischen Kriterien lassen sich drei Klassen von Spines unterscheiden^{170,171}: Thin (dünne) Spines weisen einen relativ kleinen Kopf im Verhältnis zur Halslänge auf. Stubby (untersetzte) Spines sind halslos und verfügen über eine annähernd äquivalente Länge wie Breite. Mushroom (pilzförmige) Spines besitzen im Verhältnis zur Halslänge einen relativ großen Kopf. Zudem lassen sich dünne, bis zu $10 \mu\text{m}$ lange Membranfortsätze identifizieren, die als Filopodien (von lat.: *filum* = Faden, *pes* = Fuß) bezeichnet werden. Filopodien verfügen im Gegensatz zu Spines über keine Postsynapse, können jedoch in seltenen Fällen zu Synapsen-bildenden Spines transformieren und stellen somit eine Vorstufe funktioneller Spines dar¹⁷². Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Spine-Kopfes weisen eine elektronendichte Region auf, die mit der postsynaptischen Membran assoziiert ist: die sogenannte postsynaptische Dichte (engl.: **postsynaptic density**; PSD)^{173,174}. Diese setzt sich zusammen aus Rezeptor-, Struktur- und Signal-Proteinen¹⁷⁵. Des Weiteren verfügen

dendritische Spines über ein Aktin-Zytoskelett, welches mit der postsynaptischen Dichte verankert ist und den Spine mit dem Dendriten verbindet¹⁷⁶. Vereinzelt lassen sich im Spine auch Zellorganellen finden, wie Mitochondrien, Polyribosome, oder ein Spine Apparatus, eine spezielle Form des Endoplasmatischen Retikulums¹⁷⁷. Aufgrund des hohen elektrischen Widerstandes des dünnen Spine-Halses stellen Spines ein, vom Dendriten elektrisch isoliertes Kompartiment dar. Hierdurch wird gewährleistet, dass alle eingehenden, synaptischen Potentiale zuvor am Spine prozessiert werden ehe sie am Dendriten integrieren können¹⁷⁸. Die hieraus resultierende Verlangsamung der Ladungsübertragung zum Dendritenschaft verhindert eine Überlagerung der empfangenen Signale und eine übermäßige Erregung der Nervenzelle.

1.2.1 Strukturelle Plastizität dendritischer Spines

Dendritische Spines sind jedoch nicht starr und unveränderlich, sondern weisen ein hohes Maß an struktureller Plastizität auf. Dies betrifft sowohl morphologische Parameter, wie Größe und Form, als auch kinetische Parameter, wie Neubildung und Verlust dendritischer Spines. Grundlage für die dynamische Plastizität dendritischer Spines ist eine Remodellierung des synaptischen Aktin-Zytoskeletts¹⁷⁶. *In vitro* Studien belegen, dass die Applikation von Cytochalasin D die Polymerisation von Aktin blockt und die Fähigkeit von Spines ihre Form zu ändern hemmt¹⁷⁹. Die Polymerization von Aktin wird durch Calcium-abhängige Proteine reguliert und assoziiert mit der Stimulation spannungsgesteuerter NMDA-Rezeptoren und dem nachfolgendem Calciumeinstrom in das synaptische Kompartiment^{180,181}. Interessanterweise korreliert die Größe dendritischer Spines direkt mit dem Einbau synaptischer AMPA-Rezeptoren und dem Ausmaß der PSD. Während „mushroom“ und „stubby“ Spines über eine relativ große PSD verfügen, ist diese in „thin“ Spines weniger stark ausgeprägt. Folglich wurde postuliert, dass größere Spines eine stärkere synaptische Übertragungsleistung aufweisen, als kleine Spines. Der Zusammenhang zwischen synaptischer Aktivität und Änderung der Spine Morphologie wurde in zahlreichen *ex vivo* Studien nachgewiesen. Die Induktion einer synaptischen Langzeit-Potenzierung (engl.: **long-term potentiation**; LTP) mittels hochfrequenter Erregung der Präsynapse führt zu einer signifikanten Zunahme des Spine-Volumens und Neubildung dendritischer Spines. Im Gegensatz hierzu resultiert eine niederfrequente Stimulation in einer synaptischen Langzeit-

Depression (engl.: **long-term depression**; LTD) und Reduktion des Spine-Volumens bis hin zum kompletten Verlust dendritischer Spines^{182–185}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Größe dendritischer Spines positiv mit ihrer Lebensdauer korreliert. Da „mushroom“ und „stubby“ Spines über lange Zeit stabil sind, wird vermutet, dass sie der Langzeitspeicherung von Informationen dienen, während die kurzlebigeren, dynamischen „thin“ Spines mit dem Prozess des Lernens in Zusammenhang gebracht werden^{186,187}. Zusammenfassend wurde aufgrund dieser Beobachtungen postuliert, dass die aktivitätsabhängige Remodellierung dendritischer Spines ein physiologisches Korrelat von Lernen und Gedächtnis darstellt^{188,189}. Überprüft werden konnte diese These erstmals *in vivo* mit dem Aufkommen intravitalmikroskopischer Verfahren und der Generierung transgener Mäuse, deren Nervenzellen sich durch die Expression fluoreszenter Proteine visualisieren lassen^{190,191}. Entsprechend ihrer Lebensdauer konnten in derartigen Studien zwei unterschiedliche Populationen von Spines identifiziert werden: Transiente und persistente Spines. Als transient werden Spines bezeichnet, wenn sie weniger als acht Tage stabil sind. Spines hingegen, die über einen längeren Zeitraum hinaus überleben, bezeichnet man als persistent¹⁹². Analog zu den *ex vivo* Befunden erweisen sich transiente Spines häufig als klein, während große „mushroom“ Spines meist persistent sind¹⁹². Je nach Gehirnregion weisen ca. 70% der kortikalen Spines in der adulten Maus eine Lebensdauer von bis 18 Monaten auf und sind somit der Klasse der persistenten Spines zuzuordnen^{172,191}. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass persistente Spines meist mit einem präsynaptischen Partner in Kontakt stehen und somit eine funktionelle Synapse ausbilden¹⁹³. Die Bildung einer neuen Synapse wird hierbei initiiert durch das Auswachsen eines neuen dendritischen Spines, welcher vorzugsweise eine bereits existierende Präsynapse kontaktiert¹⁹³. In einer Reihe eleganter Studien konnte belegt werden, dass die strukturelle Plastizität dendritischer Spines erfahrungsabhängig moduliert werden kann. Sensorische Manipulation, wie monokulare Deprivation, Läsion der Retina, oder Stutzen von Vibrissen führen zu einer dauerhaften Neuerschaltung neuronaler Verbindungen in den korrespondierenden Gehirnregionen und ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Umsatzrate dendritischer Spines^{190,194–198}. Veränderungen in der Umsatzrate und Morphologie dendritischer Spines lässt sich auch im Kontext des erfolgreichen Erlernens und Erinnerns neuer Aufgaben beobachten¹⁹⁹. So führt das Erlernen motorischer Aufgaben, wie Greif-, oder Balancier-Übungen zur Bildung und Stabilisierung neuer dendritischer Spines im

motorischen Kortex der Maus²⁰⁰. Von maßgeblicher Bedeutung für die Entdeckung und weitergehende Erforschung dieser Phänomene war die Entwicklung moderner mikroskopischer Verfahren wie die Zwei-Photonen Laser Scanning Mikroskopie, welche hochauflösende intravitalmikroskopische Analysen bis zu einer Tiefe von 800 µm ermöglicht.

1.3 Intravitalmikroskopie

Die 2-Photonen Intravitalmikroskopie ist ein bildgebendes Verfahren, welches die Darstellung vielfältiger biologischer Prozesse im lebenden Organismus ermöglicht. Speziell die Erforschung neurobiologischer Fragestellungen profitierte enorm von der Entwicklung und dem Einsatz intravitalmikroskopischer Techniken. So konnte erstmals *in vivo* die strukturelle, aber auch die funktionelle Plastizität ganzer neuronaler Netzwerke studiert und in Verbindung mit Umweltreizen gebracht werden. Die Intravitalmikroskopie verdankt hierbei ihren großen Erfolg einer Reihe innovativer technischer Fortschritte auf den Gebieten der Physik, Genetik und Biochemie, die dieser Technik den Weg ebneten. Im Folgenden soll daher auf die wesentlichen Meilensteine der Entwicklung fluoreszenzoptischer Verfahren eingegangen werden.

1.3.1 Fluoreszenzmikroskopie – Geschichte und Anwendung

Sowohl Ramón Cajals, als auch Alois Alzheimers Entdeckungen auf dem Gebiet der Neurowissenschaft, wurden durch die Entwicklung neuartiger, histochemischer und mikroskopischer Verfahren ermöglicht. Einzelne Strukturen in organischen Geweben, insbesondere Nervenzellen im Gehirn, lassen sich häufig aufgrund eines zu geringen Kontrastes nur schwer visualisieren. Cajal und Alzheimer gelang dies durch Anwendung der Silberfärbung, wodurch neuronale Strukturen vereinzelt angefärbt und somit optisch voneinander abgegrenzt werden können (Abb. 3). Diese Technik erfordert jedoch eine chemische Prozessierung des Präparats und verhindert somit die Studie biologischer Vorgänge im lebenden Nervengewebe. Abermals ist es dem Fortschritt im Bereich optischer Bildgebungsverfahren zu verdanken, dass dieses Problem gelöst werden konnte. Im Jahre 1908 stellte der Optiker August Köhler erstmals der Öffentlichkeit eine neue mikroskopische Methode vor, die er „Lumineszenz Mikroskopie“ nannte²⁰¹. Die Lumineszenz Mikroskopie

(heute bekannt als Fluoreszenzmikroskopie) basiert auf der Beobachtung, dass fluoreszierende Farbstoffe, sogenannte Fluorophore, mit Licht einer bestimmten Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden können. Das Phänomen, dass das Fluoreszenzlicht hierbei gegenüber dem Anregungslicht langwellig verschoben ist, wurde nach seinem Entdecker „Stokes-Verschiebung“ genannt²⁰². Der Effekt der Stokes-Verschiebung lässt sich vereinfacht anhand eines Jabłoński-Diagramms erklären^{203,204}: Unter basalen Bedingungen befinden sich die Elektronen eines Fluorophors in einem energiearmen Grundzustand. Nach Absorption von Photonen einer bestimmten Wellenlänge (Anregungslicht), werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Dieser Zustand ist jedoch energetisch ungünstig und instabil. Nach ca. 1-10 Nanosekunden kehren die Elektronen wieder in ihren Grundzustand zurück, wobei Energie in Form von Photonen (Fluoreszenzlicht) und Wärme (Schwingungsrelaxation) abgegeben wird. Da bei diesem Prozess ein Teil der Energie in Wärme umgewandelt wird, ist das Fluoreszenzlicht energieärmer und somit langwelliger, als das Anregungslicht (Abb. 4A).

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich seitdem als eine unverzichtbare Technik in Forschung und Medizin etabliert. So ermöglichte die Fluoreszenzmikroskopie die direkte Visualisierung einer Reihe organischer Verbindungen im lebenden Gewebe, aufgrund ihrer spezifischen, intrinsischen Fluoreszenz. Der Redox-Zustand einer Zelle lässt sich z.B. anhand der Autofluoreszenz der Coenzyme NADH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) und NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) bestimmen, deren oxidierte Formen NAD⁺ bzw. NADP⁺ eine verminderte Fluoreszenz aufweisen²⁰⁵. Des Weiteren liefert die endogene Fluoreszenz mitochondrialer Flavoproteine Aufschluss über die Aktivität von Nervenzellen, da Flavoproteine unter aerober Oxidation eine grüne Autofluoreszenz aufweisen²⁰⁶. Der Nutzen fluoreszenzoptischer Bildgebungsverfahren für die Erforschung biologischer Prozesse wurde immens gesteigert durch die Entwicklung genetisch kodierter Fluoreszenzfarbstoffe. Im Jahre 1962 gelang es dem Biochemiker Osamu Shimomura und seinen Kollegen das chemilumineszente Protein GFP (engl.: **g**reen **f**luorescent **p**rotein) aus der Qualle *Aequorea victoria* zu isolieren²⁰⁷. 30 Jahre später konnte das GFP-Gen schließlich erfolgreich kloniert und in einem artfremden Organismus exprimiert werden^{208–210}. „Für die Entdeckung und Entwicklung des grün fluoreszierenden Proteins GFP“ erhielten Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien gemeinsam den Nobelpreis für Chemie 2008. GFP wird heutzutage für die Erforschung einer Vielzahl biologischer Fragestellungen eingesetzt. Z. B. lässt sich

durch GFP-Markierung die Lokalisation, Interaktion und Dynamiken diverser Proteine analysieren. Des Weiteren ermöglicht die Expression von GFP unter einem spezifischen Promoter die Visualisierung von Genaktivität und einzelner Zellen samt subzellulärer Kompartimente²¹¹. Für die *in vivo* Analyse neuronaler Strukturen wurden transgene Mäuse generiert, die eGFP (engl.: **e**nhanced **g**reen **f**luorescent **p**rotein), oder eine seiner spektralen Varianten, unter dem pan-neuronalen Promoter Thy-1 exprimieren²¹². Aufgrund der zufälligen Insertion des Transgens in das Genom, wird eGFP jedoch nicht in sämtlichen Nervenzellen, sondern nur in spezifischen, neuronalen Untergruppen gebildet. Anhand der spärlichen eGFP-Expression lassen sich die Neurone optisch deutlich voneinander abgrenzen und mikroskopisch darstellen, ähnlich einer Golgi-Färbung. Konventionelle fluoreszenzmikroskopische Verfahren eignen sich jedoch nur bedingt für die intravitale Mikroskopie von Nervenzellen. Z.B. erzeugt der hohe Lipidanteil axonaler Myelin-Scheiden eine starke Streuung des Anregungs- und Emissionslichts²¹³. Dieser Effekt wird zusätzlich verstärkt, je weiter das Licht durch das Gewebe propagieren muss, bzw. je tiefer die abzubildenden Strukturen im Gehirn liegen. Diesem Problem wurde schließlich 1990 durch Einführung der 2-Photonen Mikroskopie durch Winfried Denk *et al.* entgegengewirkt²¹⁴.

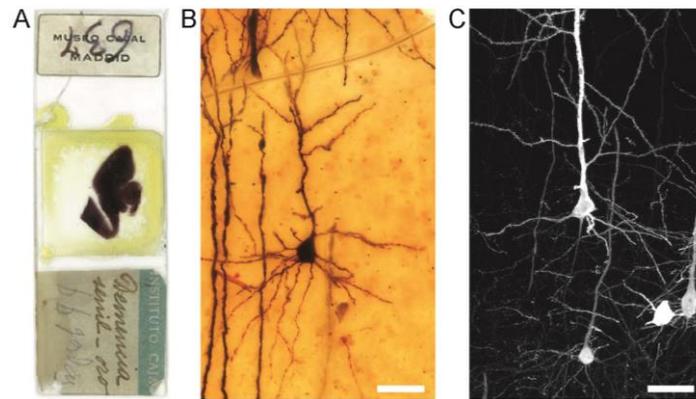


Abbildung 3: Histologische Gehirnpräparate im frühen 20. vs. 21. Jahrhundert. (A-B) Histologische Gehirnpräparate, die von Ramón y Cajal angefertigt wurden^{167,168}. Aufnahmen einer kortikalen Pyramidalzelle im murinen Kortex, visualisiert mittels **(B)** Golgi-Färbung bzw. konventioneller Lichtmikroskopie und **(C)** neuronaler eGFP-Expression bzw. konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Die Maßstäbe repräsentieren jeweils 40 µm.

1.3.2 *In vivo* 2-Photonen Mikroskopie

Der nicht-lineare optische Effekt der 2-Photonen Anregung wurde bereits 1931 von Maria Göppert-Mayer postuliert²¹⁵ und besagt, dass ein Fluorophor durch die quasi-simultane Absorption zweier Photonen angeregt werden kann, wenn die Summe der Photonenenergien gleich der benötigten Anregungsenergie ist (Abb. 4A). Die Anregungswahrscheinlichkeit unter diesen nicht-linearen Absorptionsbedingungen ist extrem niedrig, steigt jedoch proportional zum Quadrat der Lichtintensität. Folglich müssen extrem hohe Photonendichten (mehreren kW/cm²) generiert werden, um ausreichend viele Fluorophore anzuregen, so dass Fluoreszenz messbar ist. Eine derart hohe Photonflussdichte lässt sich durch Anwendung modengekoppelter Ultrakurzpuls-Laser (Laser, engl.: light amplification by stimulated emission of radiation) erreichen. Derartige Laser, z.B. Ti:Sa-Laser (Abb. 4B), sind in der Lage sehr kurze (< 100 Femtosekunden), intensive Laserpulse mit einer Wiederholrate von ca. 80 MHz abzugeben. Da das Licht hierbei nicht kontinuierlich, sondern in Form von extrem kurzen Pulsen emittiert wird, werden Spitzenleistungen von mehreren 100 kW erzielt, während die Durchschnittsleistung niedrig bleibt (> 2.5 W). Hierdurch wird gewährleistet, dass hohe Photonendichten generiert werden können, ohne die Probe unter dem Mikroskop zu schädigen. Intravitalmikroskopische Verfahren mittels 2-Photonen Anregung haben gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wesentliche

Vorteile: Aufgrund des nicht-linearen, optischen Effekts beschränkt sich die 2-Photonen Anregung der Fluorophore auf ein fokal begrenztes Volumen. Hierdurch minimiert sich die unspezifische Anregung der Probe außerhalb der Fokusebene und somit das Photobleichen bzw. Gewebsschäden durch Phototoxizität. Ferner wird langwelliges, nah-infrarotes Anregungslicht verwendet, welches weniger stark vom Nervengewebe gestreut und absorbiert wird, wodurch größere Eindringtiefen von bis zu 800 μm ins Gehirn erzielt werden können^{214,216}.

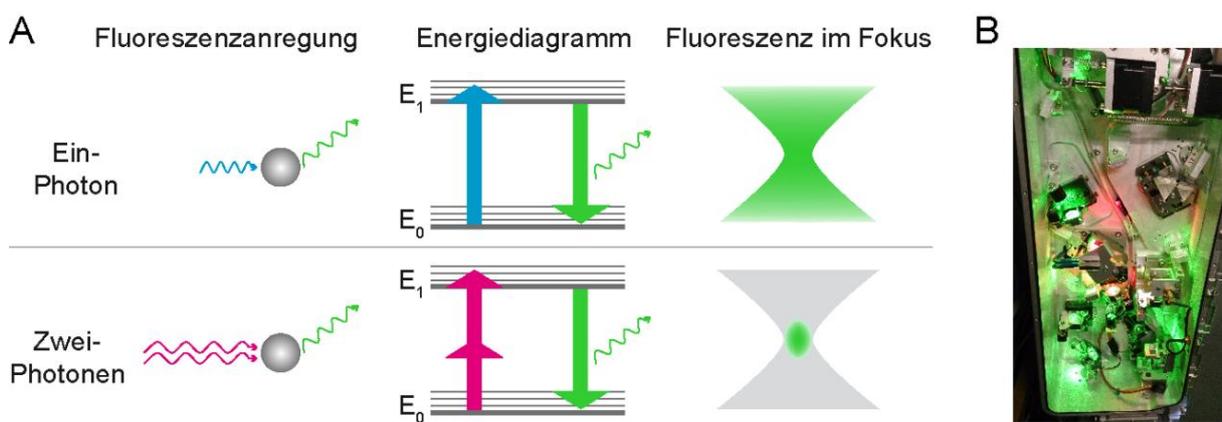


Abbildung 4: Vereinfachtes Jabłoński-Diagramm zur Beschreibung der Ein- bzw. Zwei-Photonen Anregung. (A) Bei der Ein-Photonen Anregung absorbieren Fluoreszenzmoleküle (graue Kugel) Lichtquanten (blau), deren Energie ausreicht um die Elektronen der Fluorophore in einen angeregten Zustand E_1 zu versetzen. Kehren die Elektronen auf das Grundniveau E_0 zurück, werden hierbei Photonen emittiert, die eine geringere Energie aufweisen, als das ursprüngliche Anregungslicht. Die Ein-Photonen Anregung findet im gesamten Lichtkegel eines fokussierten Lichtstrahls statt, wie im Schema dargestellt ist. Bei der Zwei-Photonen Anregung werden zum Überwinden der Energiedifferenz zwischen E_0 und E_1 zwei Lichtquanten (magenta) mit halber Energie im Vergleich zur Ein-Photonen Anregung genutzt. Beide Lichtquanten müssen für diesen Effekt nahezu simultan auf das Fluorophor treffen, was nur bei sehr hohen Photonendichten möglich ist. Um diesen Effekt zu bewirken ist der Einsatz von **(B)** Femtosekunden-Laser nötig, die eine entsprechende Photonendichte erzeugen. Die Anregung ist dabei auf das fokale Volumen beschränkt, da nur im Fokus eine ausreichende Photonendichte existiert. Abbildung modifiziert nach Burgold, 2013⁹².

Zur intravitalmikroskopischen Erfassung neuronaler Strukturen muss die Gehirnoberfläche zunächst optisch zugänglich gemacht werden. Generell finden hierbei zwei verschiedene Methoden Verwendung: Die „thinned skull“²¹⁷ und die „open skull“²¹⁸ Präparation. Beim „thinned skull“ Verfahren wird die Schädeldecke mithilfe eines Bohrers zu einer ca. 20 μm dünnen, transparenten Knochenschicht abgetragen. Die mikroskopierbare Fläche ist mit ca.

0,1 – 0,3 mm² jedoch relativ klein und die Eindringtiefe der 2-Photonen Mikroskopie, aufgrund der optischen Eigenschaften des verbleibenden Knochens, stark eingeschränkt. Des Weiteren erfordert das Rückwachstum des Knochens eine erneute Präparation des Fensters, wenn der Kortex einer repetitiven Mikroskopie über einen langen Zeitraum zugänglich bleiben soll. In den meisten Fällen ist dies nur 3–4 Mal möglich, da der Knochen mit der Zeit an Transparenz verliert. Bei der „open skull“ Methode wird ein zirkuläres Stück Schädeldecke, mit einem Durchmesser von 3-8 mm, vollständig entfernt und durch ein Glasfenster ersetzt (Abb. 5A,B). Derartige Präparationen ermöglichen eine chronische, wiederholte Mikroskopie des Hirnparenchyms (Abb. 5C,D) bis zu einer Tiefe von 800 µm über einen Zeitraum von Wochen bis zu Monaten. Die Trepanation des Schädels ist im Vergleich zum „thinned skull“ Verfahren jedoch weitaus invasiver und induziert in der Regel eine Immunreaktion in Form einer Gliose, die jedoch nach einer Erholungsphase von ca. 3-4 Wochen abklingt²¹⁸.

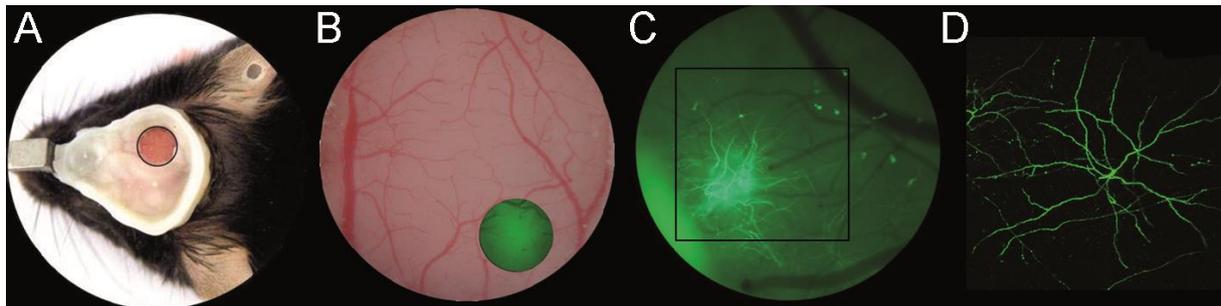


Abbildung 5: Kraniales Fenster. (A) Photographische Abbildung des kranialen Fensters. Nach Trepanation der Schädeldecke wurde die Kraniotomie durch ein kreisrundes Glasplättchen verschlossen und der Schädelknochen mit Dentalzement abgedeckt. Ein zusätzlich angebrachter Titanstift dient zur späteren Fixierung der Maus unter dem 2P-Mikroskop. (B) Stereomikroskopische Aufnahme der Gehirnoberfläche samt Blutgefäße. (C) Weitfeld- und (D) 2-Photonen-mikroskopische Aufnahme der apikalen Dendriten von Pyramidalzellen der kortikalen Schicht V in transgenen Mäusen der Linie GFP-M.

2. Ergebnisse

2.1 Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisation von BACE1 im murinen Gehirn

Aufgrund der zentralen Rolle von BACE1 in der Generierung von Amyloid-beta Peptiden, stellt es ein attraktives, therapeutisches Wirkstoffziel zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit dar. Um die klinische Unbedenklichkeit pharmakologischer BACE1 Inhibitoren zu gewährleisten, bedarf es jedoch einer umfassenden Evaluierung sämtlicher BACE1 Substrate und deren physiologischen Funktion. Ein Verständnis der subzellulären Lokalisation von BACE1 im Gehirn, welches den pharmakologischen Wirkort darstellt, könnte potentiell Aufschluss über die Identität und Funktion dieser Substrate liefern. Zu diesem Zweck wurde BACE1 in murinen Gehirnschnitten der transgenen Linie *Thy1-GFP-M* mittels Immunfluoreszenzfärbung markiert und durch Konfokalmikroskopie analysiert. Die neuronenspezifische Expression von eGFP in transgenen *Thy1-GFP-M* Tieren ermöglicht hierbei eine einfache optische Abgrenzung und Identifikation diverser Gehirnbereiche (Abb. 6A).

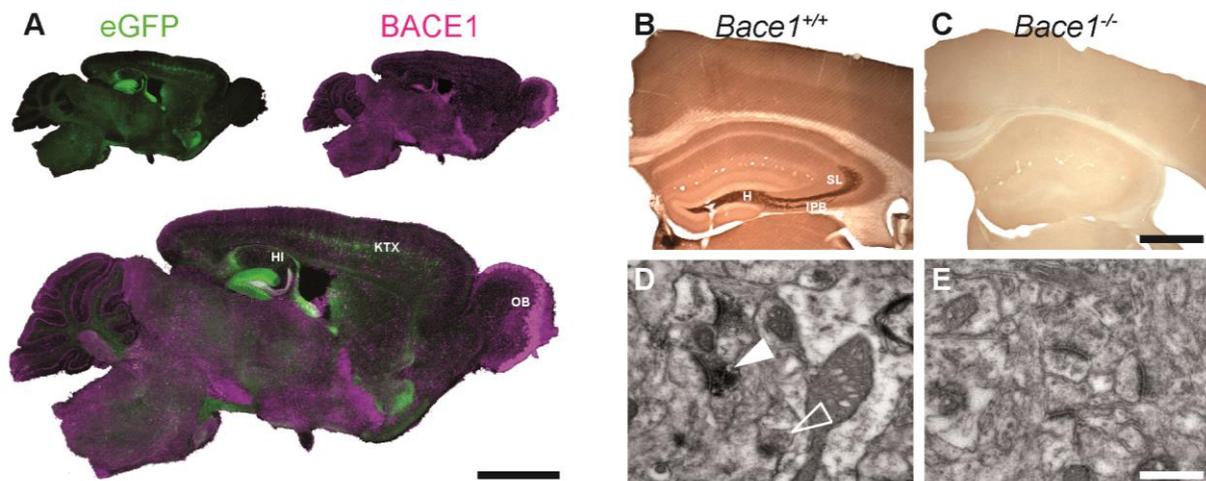


Abbildung 6: BACE1 Lokalisation im murinen Gehirn. (A) Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme eines sagittalen Gehirnschnitts der transgenen Mauslinie *Thy1-GFP-M*, immunogefärbt gegen BACE1 (magenta). eGFP-Expression (grün) lässt sich hauptsächlich in spezifischen Nervenzellpopulationen des Kortex (KTX) und Hippokampus (HI) detektieren. BACE1 wird in sämtlichen Gehirnbereichen exprimiert. Die höchsten BACE1 Expressionslevel lassen sich im olfaktorischen Bulbus (OB) und Hippokampus feststellen. (B-C) Fotografische Aufnahmen von DAB-Immunofärbungen gegen BACE1 in Gehirnschnitten aus (B) *Bace1*^{+/+} und (C) *Bace1*^{-/-} Mäusen. (B) Hohe, hippocampale BACE1 Expressionslevel werden im Hilus (H) des *gyrus dentatus* (SL) feststellbar. (D-E) Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die subzelluläre Lokalisation von BACE1 in (D) *Bace1*^{+/+} und (E) *Bace1*^{-/-} Mäusen. In (D) sind BACE1-positiv gefärbte Strukturen (weiße Pfeile) im Golgi-Apparat (weiße Pfeilspitze) lokalisiert. In (E) ist keine BACE1-Expression sichtbar. Skalenbalken sind in den Panels A, B, C, D und E dargestellt.

dentatus, dem infrapyramidalen Bündel (IPB), dem *stratum lucidum* (SL) und dem Moosfaserweg beobachtet. **(C)** Kein DAB bzw. BACE1 läßt sich in Gehirnschnitten von *Bace1*^{-/-} Mäusen detektieren. **(D, E)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen des somatosensorischen Kortex der entsprechenden BACE1 Färbungen aus **(B)** und **(C)**. **(D)** DAB-Präzipitate lassen sich teilweise in assymetrischen Prä-Synapsen (weißer Pfeil) beobachten, während andere Axon-Terminale keine Färbung aufweisen (weiß umrandeter Pfeil). **(E)** Kein DAB bzw. BACE1 läßt sich in Gehirnschnitten von *Bace1*^{-/-} Mäusen detektieren. Maßstäbe repräsentieren jeweils in A: 2 mm, in B und C: 667 µm, in D und E: 0.55 µm.

Die mikroskopische Analyse ergab, dass BACE1 in allen Regionen des adulten Gehirns zu finden ist, jedoch in Abhängigkeit zur untersuchten Region unterschiedlich stark exprimiert wird (Abb. 6A). Die höchsten BACE1 Expressionslevel ließen sich hierbei in der glomerulären Schicht des olfaktorischen Bulbus und der hippocampalen CA3 Region beobachten. Innerhalb dieser Gehirnareale lokalisierte BACE1 hauptsächlich jeweils in den Axonen olfaktorischer Sinnesnervenzellen und Körnerzellen des Gyrus dentatus (Abb. 6B). Weiterhin wies BACE1 im Axon keine gleichmäßige, sondern eine punktuelle Verteilung auf. Um zu evaluieren, ob die punktuelle Akkumulation von BACE1 einem spezifischen, subzellulären Kompartiment zuzuordnen ist, reichte jedoch die Auflösung des konfokalen Mikroskops nicht aus. Hierzu wurden Gehirnpräparate mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gegen BACE1 immungefärbt und elektronenmikroskopisch untersucht. Die Detektion elektronendichter DAB Präzipitate im Gehirnparenchym ergab, dass DAB bzw. BACE1 ausschließlich in präsynaptischen Kompartimenten lokalisiert (Abb. 6D). Die Spezifität des BACE1 Antikörpers wurde ferner in Gehirnschnitten von *Bace1*^{-/-} Tieren validiert, in denen kein chromogener Farbumschlag beobachtet werden konnte (Abb. 6C,E). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Befunden von Kandalepas et al.²¹⁹, mit dem Unterschied, dass in der vorliegenden Arbeit eine Immuno- DAB, anstelle einer Immuno-Gold Färbung verwendet wurde. Durch die höhere Sensitivität der DAB-Färbung gegenüber dem Immuno-Gold Verfahren, gelang es die präsynaptische Lokalisation von BACE1 auch im Neokortex nachzuweisen, einer Gehirnregion, in der BACE1 nur schwach exprimiert wird.

2.2 Analyse prä- und post-synaptischer Endigungen in *Bace1*^{-/-} Mäusen

Die spezifisch präsynaptische Lokalisation von BACE1 verweist auf eine mögliche, synaptische Funktion. Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen BACE1 Aktivität und synaptischer Konnektivität zu eruieren, wurden die Morphologie und Dichte synaptischer Elemente in adulten, heterozygoten und homozygoten *Bace1* knock-out x *Thy1-GFP-M*^{+/+}

Mäusen ermittelt. Die Analyse beschränkte sich hierbei auf neuronale Strukturen des Hippocampus, da diese Gehirnregion unter physiologischen Bedingungen hohe BACE1 Expressionslevel aufweist (Abb. 6B). Der Konfokalmikroskopie zugänglich waren hauptsächlich prä-synaptische Endigungen des Moosfaserwegs und dendritische Spines der CA1 Pyramidalzellen. Die Größe präsynaptischer Boutons des hippocampalen Moosfaserwegs in der CA3 Region wurde schließlich anhand semi-automatischer, drei-dimensionaler Rekonstruktion der konfokalen Bildstapel in Imaris ermittelt (Abb. 7A). Die Untersuchung ergab, dass der Durchmesser prä-synaptischer Terminale sowohl in *Bace1*^{+/+}, als auch in *Bace1*^{-/-} Tieren einer Gaußschen Normalverteilung folgte. Die Verteilungskurven beider Kohorten waren jedoch gegeneinander leicht verschoben. Diese Tendenz wurde besonders in den Bereichen von 2-5 µm und 11-16 µm Durchmesser evident, in denen die Boutons der *Bace1*^{-/-} Gruppe gegenüber denen der *Bace1*^{+/+} Gruppe, größere Werte erreichten. Diese Bereiche lagen allerdings in den Ausläufern der Verteilung und repräsentierten nur ca. 10% aller detektierten Präsynapsen (Abb. 7B).

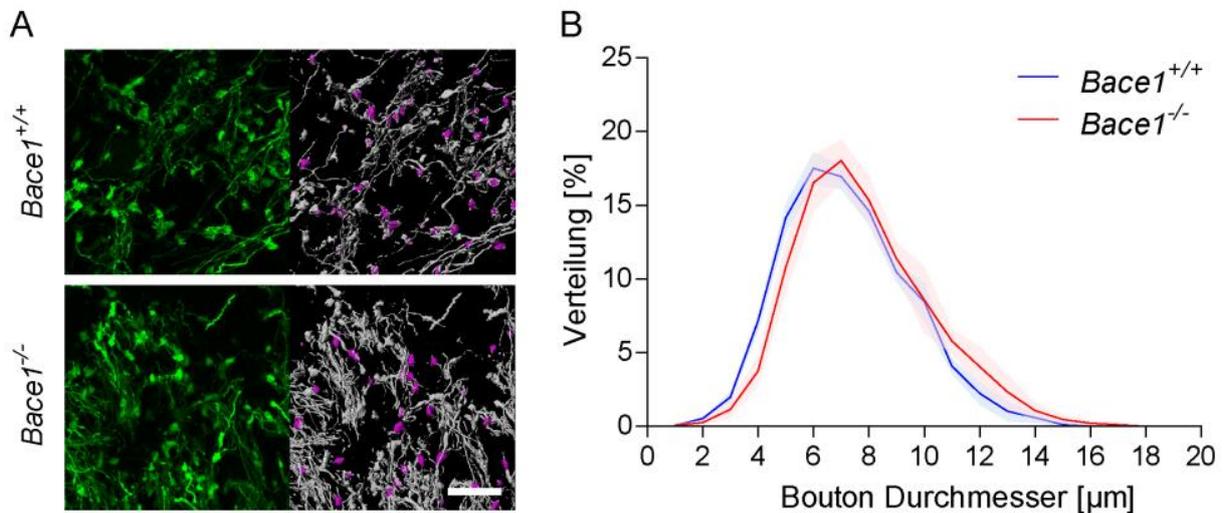


Abbildung 7: Größenverteilung der axonalen Moosfaserterminale in der hippocampalen CA3 Region. (A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen (grün) bzw. entsprechende, drei-dimensionale Rekonstruktionen (magenta) hippocampaler Moosfaserterminale von GFP-M transgenen *Bace1*^{+/+} und *Bace1*^{-/-} Mäusen (Maßstab repräsentiert 15 µm). **(B)** Vergleich des Bouton-Durchmessers zwischen *Bace1*^{+/+} und *Bace1*^{-/-} Kohorten (Fehlerbalken stellen ± SEM dar; n = 5 Tiere pro Gruppe, N ~ 750 Synapsen pro Tier).

Um einen möglichen Effekt der BACE1 Aktivität auf die Dichte post-synaptischer Endigungen zu untersuchen, wurden die Spines apikaler und basaler Dendriten von hippocampalen CA1 Pyramidalzellen (Abb. 8B) quantifiziert und in Abhängigkeit zum *Bace1*-Genotyp zwischen den folgenden Versuchskohorten verglichen: Die Spine-Dichte zwischen *Bace1*^{+/+} Kontrollen, hetero- und homozygoten *Bace1* knock-out Tieren im Alter von zwei Monaten wies keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 8A).

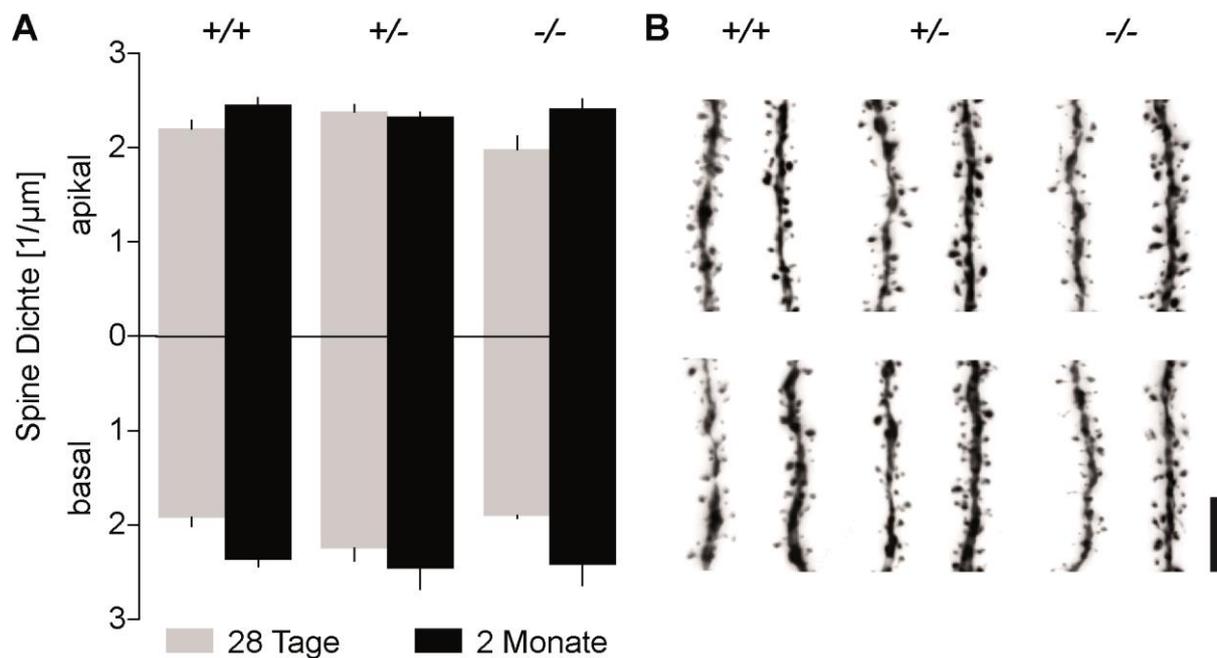


Abbildung 8: Hippokampale, dendritische Spine-Dichten in jungen bzw. adulten *Bace1*^{+/+}, *Bace1*^{+/-} und *Bace1*^{-/-} Mäusen. (A) Quantifizierung und Vergleich der Spine-Dichten apikaler und basaler Dendriten von Pyramidalzellen in der hippocampalen CA1 Region zwischen unterschiedlichen Alterstufen und *Bace1* Genotypen (Fehlerbalken stellen \pm SEM dar; n = 2-6 Tiere pro Gruppe, N = 10 Dendriten). (B) Exemplarische, konfokalmikroskopische Aufnahmen der eGFP-markierten Dendriten aus den jeweiligen Versuchskohorten. Anordnung der Mikrographen entspricht dem Schema aus (A). Maßstab repräsentiert 5 μ m.

Die konfokalmikroskopischen Analysen am histologischen Schnittpräparat gewähren jedoch nur eine Momentaufnahme in den Zustand des Gewebes. Eine Aussage über dynamische Langzeit-Prozesse, wie die strukturelle Plastizität synaptischer Elemente, lässt sich anhand dieser Technik nicht treffen. Ferner handelte es sich bei den inspizierten Gewebeproben um Material aus knock-out Tieren, in denen *Bace1* genetisch ablatiert wurde. Das lebenslange Fehlen von BACE1 könnte entwicklungsbedingt durch andere Proteasen kompensiert und

entsprechende Phänotypen potentiell maskiert werden. Effekte, wie sie durch die therapeutische Inhibition von BACE1 zur Behandlung von Alzheimer-Patienten auftreten könnten, lassen sich anhand eines genetisch modifizierten Mausmodells somit nicht zwangsläufig feststellen. In den folgenden Experimenten wurden daher die physiologischen Auswirkungen pharmakologischer BACE1 Inhibitoren in adulten Tieren untersucht.

2.3 *In vivo* Evaluierung pharmakologischer BACE1 Inhibitoren

In Zusammenarbeit mit der Firma Lundbeck A/S wurde die pharmakologische Effizienz und Verträglichkeit zweier, strukturell unterschiedlicher BACE1 Inhibitoren in adulten C57BL/6J Mäusen *in vivo* evaluiert: SCH1682496 (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals) (Abb. 9A) und LY2811376 (Eli Lilly and Company) (Abb. 9D). Beide Inhibitoren können oral verabreicht werden und passieren die Blut-Hirn-Schranke^{119,220}. Die Effektivität der Substanzen wurde mittels Sandwich-ELISA anhand der Konzentration von A β -Peptiden validiert, den Spaltprodukten des BACE1 vermittelten, amyloidogenen APP-Prozessierungswegs. Unter physiologischen Bedingungen beträgt das Verhältnis von A β 42:A β 40 im murinem Gehirn 1:3²²¹. Die Inhibition von BACE1 konnte somit robuster anhand des A β 40-, als am A β 42-Level detektiert und quantifiziert werden. Sowohl Kurzzeit- (1 Tag, alle 12 h), als auch Langzeit-Behandlung (15 Tage, alle 12 h) mit beiden Inhibitoren führte zu einer dosisabhängigen Reduktion des A β 40 Spiegels im Kortex (Abb. 9B,E) und Plasma (Abb. 9C,F). Die chronische Behandlung der Tiere über 15 Tage mit einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht reduzierte die A β 40 Level in Kortex und Plasma um 60% (SCH1682496) bzw. 75% (LY2811376), ohne offensichtliche Beeinträchtigung des Gesundheitsstatus und Körpergewichts der Mäuse.

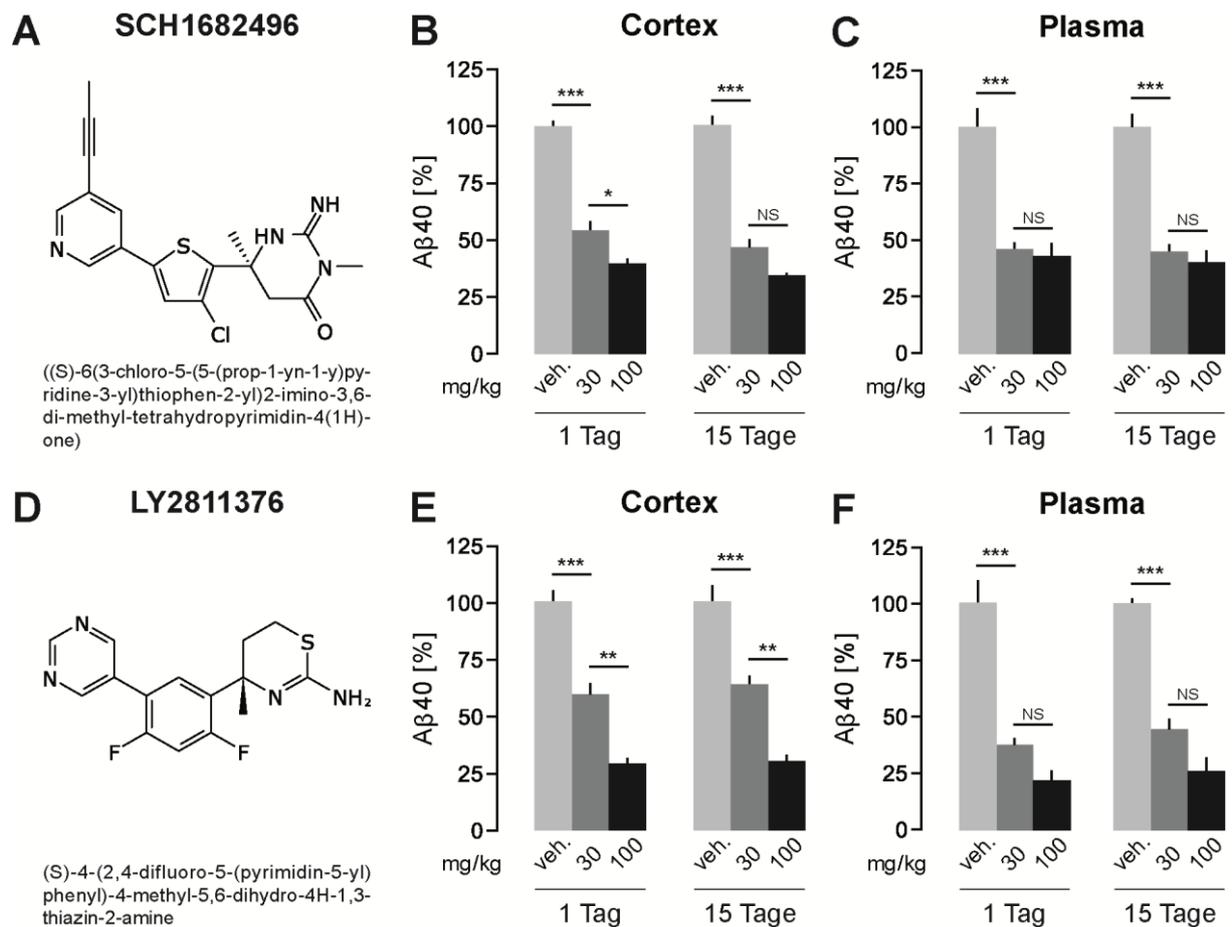


Abbildung 9: Die pharmakologische Inhibition von BACE1 reduziert effektiv die A β -Level. (A, D) Chemische Struktur des Bace1 Inhibitors SCH1682496 (A) und LY2811376 (D). Beide Inhibitoren reduzierten dosisabhängig (30 mg/kg und 100 mg/kg) die A β 40 Level im Cortex (B, E) und Plasma (C, F) der Mäuse jeweils 1 h, oder 12 Tagen (alle 12 Stunden) nach oraler Gabe. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; n = 4-5 Tiere pro Gruppe; einfaktorielle Varianzanalyse. * p < 0.05; ** p < 0.1; *** p < 0.001. NS, nicht signifikant.

2.4 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibitoren auf die Fell-Pigmentierung

Nach ca. 2-wöchiger Applikation pharmakologischer BACE1 Inhibitoren ließ sich ein unerwarteter Effekt auf die Fellpigmentierung von C57BL/6J Mäuse feststellen. Sowohl die Behandlung mit SCH1682496, als auch LY2811376 bewirkte bei einer Dosis von 100 mg/kg (über 16 Tage, alle 12 h) Körpergewicht die Bildung weißer Haare. Dieser Effekt trat auch in *Bace1*^{-/-} Tieren auf, die auf gleiche Weise behandelt wurden (Abb. 10). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen BACE1 und BACE2 existieren gegenwärtig keine nicht-peptidischen, niedermolekularen BACE Inhibitoren, die spezifisch nur eine dieser Proteasen inhibieren können²²². Dieser Phänotyp ist somit nicht der Inhibition von BACE1

zuzuschreiben, sondern resultiert wahrscheinlich aus einer unspezifischen Blockierung der Aktivität von BACE2. Diese Schlussfolgerung stimmt überein mit der Funktion von BACE2 in der Melanogenese und Prozessierung von PMEL (engl.: cell-specific melanocyte protein)²²³. Entsprechend weisen *Bace2*^{-/-} Mäuse Pigmentierungsdefizite auf und entwickeln ein silbriges Fell, im Gegensatz zu ihren dunkel-farbigen *Bace2*^{+/+} Wurfgeschwistern²²³. Welche BACE1-spezifischen Effekte sind folglich durch die Behandlung mit BACE Inhibitoren zu erwarten? Die synaptische Lokalisation von BACE1 im Gehirn lässt vermuten, dass eine Inhibition von BACE1 mit einer Beeinträchtigung synaptischer Funktionen, wie z.B. der strukturellen und funktionellen Plastizität, einhergehen könnte. Dieser These wurde in den folgenden Experimenten nachgegangen.

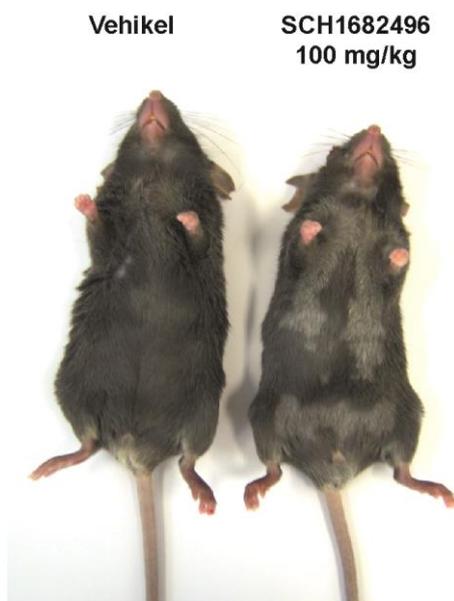


Abbildung 10: Die chronische Behandlung mit hohen Dosen SCH1682496 verursacht Defizite in der Fellpigmentierung. Ein Verlust der Fellpigmentierung trat in C57BL/6J Mäusen nach 16-tägiger Behandlung mit 100 mg/kg SCH1682496 (alle 12 h) auf, ein Effekt der in Vehikel-behandelten Kontrolltieren nicht zu beobachten war.

2.5 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibition auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines

Um potentielle Effekte einer pharmakologischen BACE1 Inhibition auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines zu evaluieren, wurden Mäuse der Linie *Thy1-GFP-M* verwendet²²². Transgene Nachkommen dieser Linie weisen eine starke, zytosolische Expression des grün fluoreszierenden Proteins eGFP in einer spezifischen Subpopulation pyramidalen Neurone der kortikalen Schicht V auf. Die zytosolische Lokalisation von eGFP verleiht den Nervenzellen hierbei eine Golgi-ähnliche Färbung, anhand derer der gesamte

dendritische Baum, inklusive einzelner, dendritischer Spines mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden kann. Um diese Neurone der Intravitalmikroskopie zugänglich zu machen, wurde über dem somatosensorischen Kortex eGFP-positiver Mäuse, im Alter von zwei Monaten, ein chronisches, kraniales Fenster implantiert. Dies ermöglicht die Aufnahme dreidimensionaler, optischer Schnittbilder apikaler dendritischer Segmente samt Spines mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie (Abb. 11A). Eine hochauflösende, intravitale Langzeitmikroskopie über einen Zeitraum von mehreren Wochen ermöglicht somit eine detaillierte Analyse der dendritischen Spine-Kinetik: Durch Verfolgen des Schicksals einzelner dendritischer Spines in aufeinanderfolgenden Aufnahmezeitpunkten, kann die Dichte stabiler, neuer und verlorener Spines quantifiziert werden. Diese Daten liefern schließlich ein messbares Korrelat über die strukturelle Plastizität dendritischer Spines.

4 Wochen nach Implantation des kranialen Fensters, begann die intravitalmikroskopische Aufzeichnung apikaler Dendriten von fluoreszenzmarkierten Pyramidalzellen der Schicht V im somatosensorischen Kortex. Der insgesamt 42-tägige Untersuchungszeitraum untergliederte sich hierbei in drei Phasen: Zunächst wurden anhand von zwei Zeitpunkten die basale Spine-Dichte und -Kinetik bestimmt. Im Anschluss erfolgte eine 16-tägige Behandlungsphase mit den BACE1-Inhibitoren SCH1682496 bzw. LY2811376 und den entsprechenden Vehikeln, als Kontrolle. Die Untersuchung endete schließlich 2 Wochen nach Abschluss der Behandlungsphase.

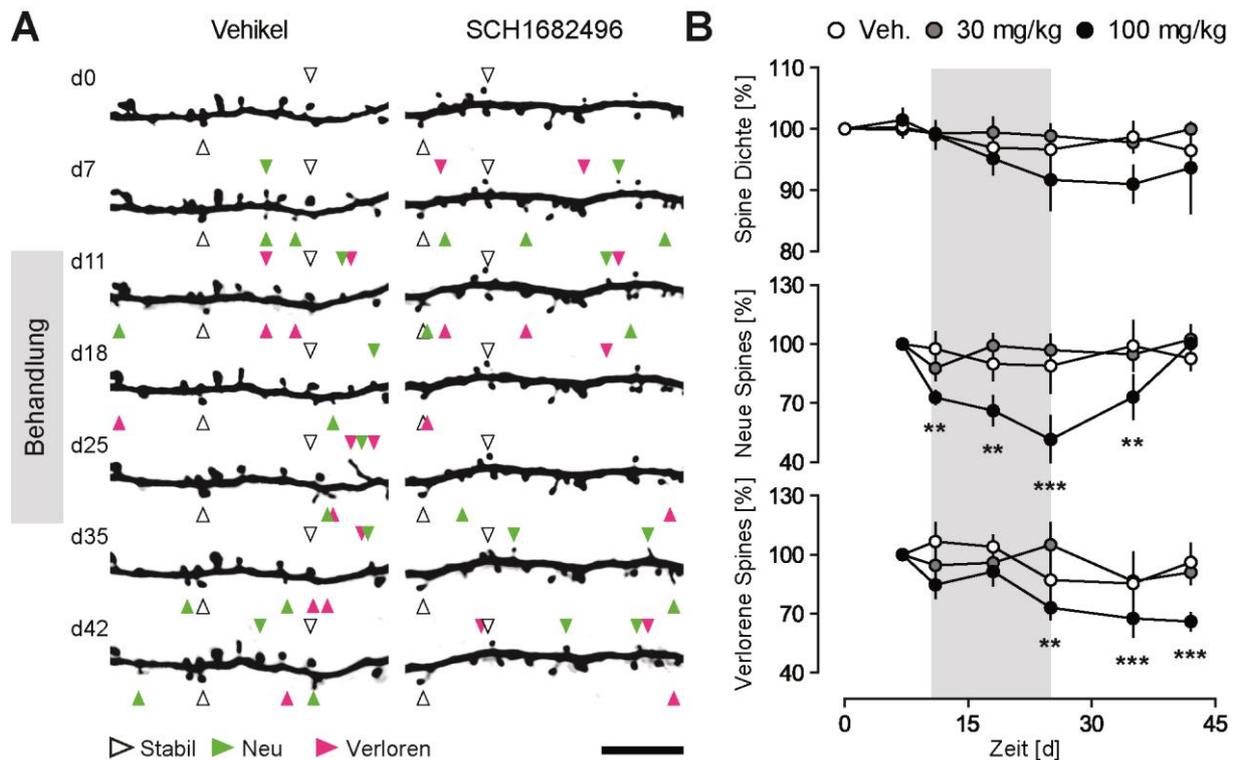


Abbildung 11: BACE1 Inhibitor SCH1682496 beeinträchtigt die strukturelle Dynamik dendritischer Spines *in vivo*. (A) Zwei-Photonen-mikroskopische Aufnahmen eGFP-markierter, apikaler Dendriten von Pyramidalzellen der Schicht V im somatosensorischen Kortex, aufgenommen vor, während und nach der Applikation von Vehikel oder SCH1682496. Die Behandlung erfolgte 10 Tage nach dem ersten Mikroskopiezeitpunkt und wurde 16 Tage lang (alle 12 h) fortgesetzt. Weiße Pfeilspitzen markieren representative Spines, die über den gesamten Mikroskopiezeitraum stabil waren; alle neu gebildeten und verloren gegangenen Spines werden entsprechend durch grüne und magentafarbene Pfeilspitzen gekennzeichnet. (B) Quantifizierung der relativen Spine-Dichte, des Anteils neu gebildeter und verloren gegangener Spines in Vehikel oder SCH1682496 (30 mg/kg, oder 100 mg/kg) behandelten Mäusen. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; $n = 4-5$ Tiere pro Gruppe; $N = 10$ Dendriten; einfaktorische Varianzanalyse. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Maßstab repräsentiert 10 μm .

Eine niedrigdosierte Behandlung mit dem BACE1 Inhibitor SCH1682496 (30 mg/kg, 16 Tage, alle 12 h), oder Vehikel ließ keine Effekte auf die Dichte, oder strukturelle Plastizität dendritischer Spines erkennen (Abb. 11B). Im Gegensatz hierzu führte die chronische Verabreichung einer höheren Inhibitor Dosis von 100 mg/kg (16 Tage, alle 12 h) zu einer graduellen Verminderung der dendritischen Spine-Dichte um bis zu 10%. Ein besonders stark ausgeprägter Effekt ließ sich auf die Bildung neuer Spines feststellen. Bereits einen Tag nach Beginn der BACE1-Inhibition wurde eine signifikante Abnahme in der Fraktion neu gebildeter Spines detektiert. Am letzten Behandlungszeitpunkt betrug diese Reduktion 50%. Sowohl Bildungsrate, als auch Dichte der Spines näherten sich nach Abschluss der Behandlungsphase wieder ihrem ursprünglichen Basiswert an. Analog hierzu führte die pharmakologische

Inhibition von BACE1 zu einer signifikanten Abnahme der Fraktion verloren gegangener Spines. Die Regression verloren gegangener Spines war jedoch weniger stark ausgeprägt, folgte einer langsameren Kinetik und dauerte über die Behandlungsphase hinaus an (Abb. 11B). Da neu entstandene Spines häufig transient sind, spiegelt sich ihr Verlust auch in der Fraktion verloren gegangener Spines wieder. Ein verminderter Spine-Verlust könnte somit eine Konsequenz der reduzierten Spine-Bildung darstellen. Der reduzierte Spine-Verlust könnte ferner auch einen kompensatorischen Mechanismus repräsentieren, um der reduzierten Spine Bildung entgegen zu wirken. Unter basalen Bedingungen befindet sich die Bildung und Eliminierung von dendritischen Spines in einem homöostatischen Gleichgewicht. Aufgrund der pharmakologischen Inhibition von BACE1 verschiebt sich dieses Verhältnis jedoch in Richtung proportional größerer Spine-Verluststraten und verursacht somit den graduellen Abfall in der Spine-Dichte. Ein ähnlicher Phänotyp trat in Mäusen auf, die mit dem BACE1 Inhibitor LY2811376 (100 mg/kg, 16 Tage, alle 12 h) behandelt wurden (Abb. 12). Am letzten Zeitpunkt der 16-tägigen Behandlungsphase waren die Spine-Dichte um 7% und der Anteil neu gebildeter Spines um 30% reduziert. Beide Parameter kehrten nach Absetzen des Inhibitors wieder zurück auf ihren ursprünglichen Basiswert.

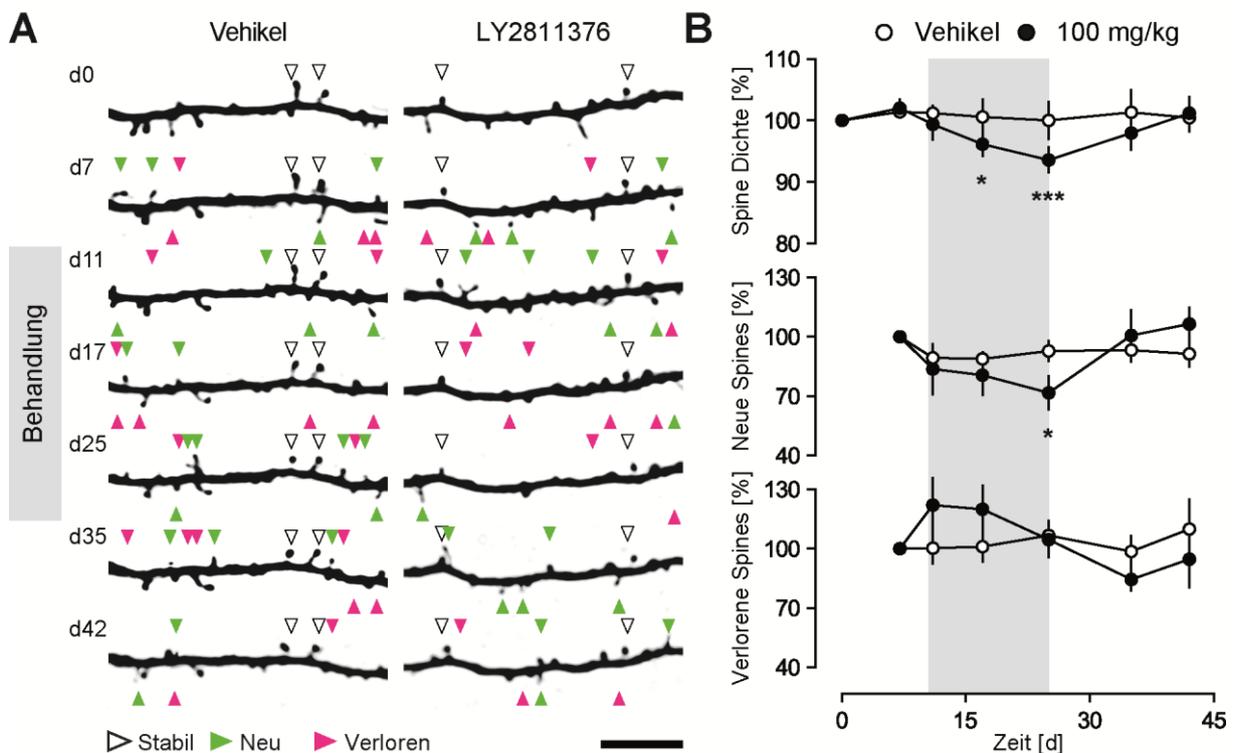


Abbildung 12: BACE1 Inhibitor LY2811376 beeinträchtigt die strukturelle Dynamik dendritischer Spines *in vivo*. (A) Zwei-Photonen-mikroskopische Aufnahmen eGFP-markierter, apikaler Dendriten von

Pyramidalzellen der Schicht V im somatosensorischen Kortex, aufgenommen vor, während und nach der Applikation von Vehikel oder LY2811376. Die Behandlung erfolgte 10 Tage nach dem ersten Mikroskopiezeitpunkt und wurde 16 Tage lang (alle 12 h) fortgesetzt. Weiße Pfeilspitzen markieren repräsentative Spines, die über den gesamten Mikroskopiezeitraum stabil waren; alle neu gebildeten und verloren gegangenen Spines werden entsprechend durch grüne und magentafarbene Pfeilspitzen gekennzeichnet. **(B)** Quantifizierung der relativen Spine-Dichte, des Anteils neu gebildeter und verloren gegangener Spines in Vehikel oder LY2811376 (100 mg/kg) behandelten Mäusen. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; n = 5 Tiere pro Gruppe; N = 10 Dendriten; einfaktorische Varianzanalyse. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Maßstab repräsentiert 10 μ m.

Um auszuschließen, dass die Beeinträchtigung der strukturellen Spine-Plastizität eine BACE1-unspezifische Nebenwirkung der pharmakologischen Inhibitoren darstellt, wurden ähnliche Experimente mit SCH1682496 (100 mg/kg, 16 Tage, alle 12 h) in *Bace1*^{-/-} Mäusen durchgeführt (Abb. 13). Wie erwartet, führte die Behandlung mit SCH1682496 in *Bace1*^{-/-} Tieren zu keiner Veränderung der Spine-Dichte, -Bildung, oder -Eliminierung und bestätigt somit die BACE1-Spezifität der beschriebenen, synaptischen Effekte. Interessanterweise wiesen *Bace1*^{-/-} und *Bace1*^{+/+} Kontrolltiere eine identische Spine-Dichte und -Kinetik auf, eventuell aufgrund kompensatorischer Mechanismen, die in *Bace1*^{-/-} Tieren zum Tragen kommen.

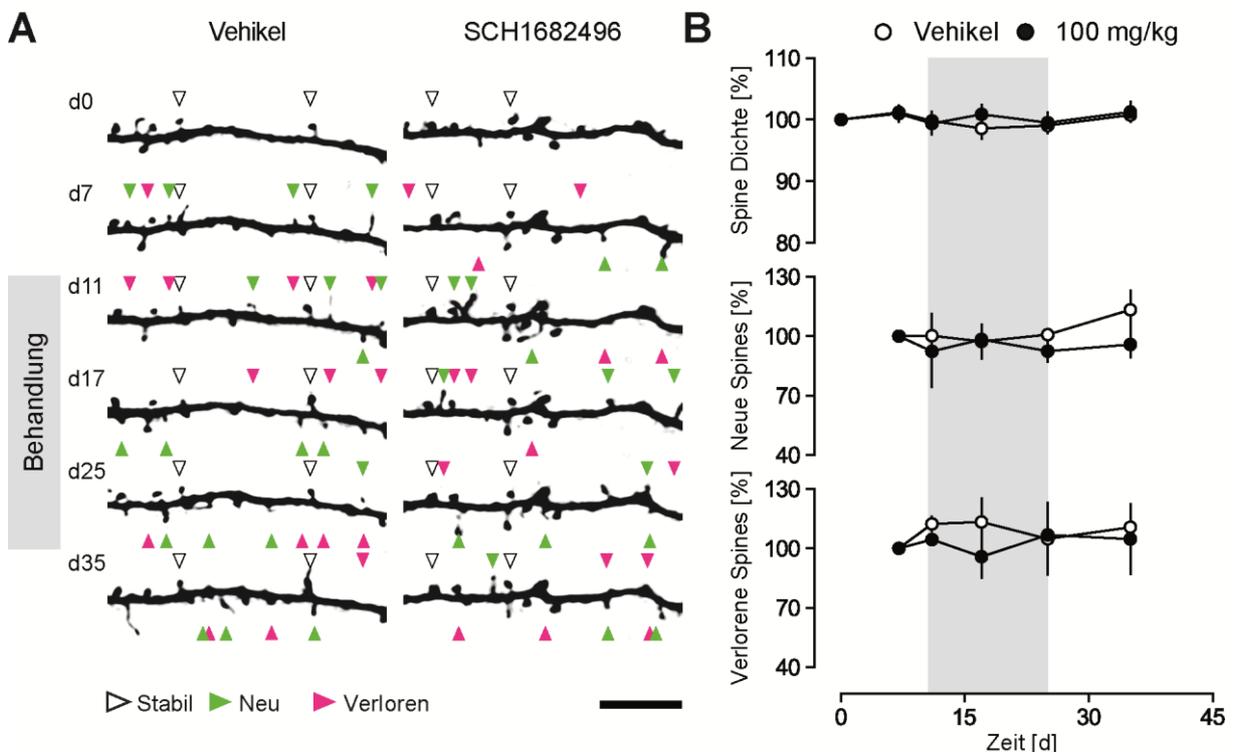


Abbildung 13: BACE1 Inhibitor SCH1682496 verändert nicht die strukturelle Dynamik dendritischer Spines von *Bace1*^{-/-} Mäusen *in vivo*. (A) Zwei-Photonen-mikroskopische Aufnahmen eGFP-markierter,

apikaler Dendriten von Pyramidalzellen der Schicht V im somatosensorischen Kortex, aufgenommen vor, während und nach der Applikation von Vehikel oder SCH1682496. Die Behandlung erfolgte 10 Tage nach dem ersten Mikroskopiezeitpunkt und wurde 16 Tage lang (alle 12 h) fortgesetzt. Weiße Pfeilspitzen markieren representative Spines, die über den gesamten Mikroskopiezeitraum stabil waren; alle neu gebildeten und verloren gegangenen Spines werden entsprechend durch grüne und magentafarbene Pfeilspitzen gekennzeichnet. **(B)** Quantifizierung der relativen Spine-Dichte, des Anteils neu gebildeter und verloren gegangener Spines in Vehikel oder SCH1682496 (100 mg/kg) behandelten Mäusen. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; n = 4-5 Tiere pro Gruppe; N = 10 Dendriten; einfaktorielle Varianzanalyse. Maßstab repräsentiert 10 μ m.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine chronische, pharmakologische Inhibition von BACE1 die strukturelle Plastizität dendritischer Spines im Kortex adulter Mäuse beeinträchtigt.

2.6 Elektrophysiologische Messungen

2.6.1 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibition auf die synaptische Transmission

Konnektivität und Plastizität sind typische Charakteristika neuronaler Netzwerke. Die BACE1 Inhibitor induzierte Abnahme in der dendritischen Spine-Dichte und -Kinetik, sollte sich folglich auch in einer veränderten kortikalen Netzwerkaktivität äußern. Dieser Hypothese wurde experimentell nachgegangen, indem adulte Versuchstiere der Linie GFP-M 16 Tage lang mit den BACE1 Inhibitoren SCH1682496 bzw. LY2811376 behandelt und anschließend ihre Gehirnschnittpräparate elektrophysiologisch untersucht wurden. Diese Experimente wurden von Dr. Saak Ovsepian durchgeführt und mit seiner freundlichen Genehmigung in die Doktorarbeit aufgenommen. Um die elektrophysiologischen Messungen mit den intravitalmikroskopischen Befunden korrelieren zu können, wurden eGFP-positive, pyramidale Neurone der kortikalen Schicht V mittels Gesamtzell-Patch-Clamp (engl.: whole-cell patch clamping) Technik analysiert. Zudem wurde zur Isolation und Detektion Spine-vermittelter exzitatorischer Ereignisse der GABA_A-Rezeptor-Antagonist Picrotoxin appliziert.

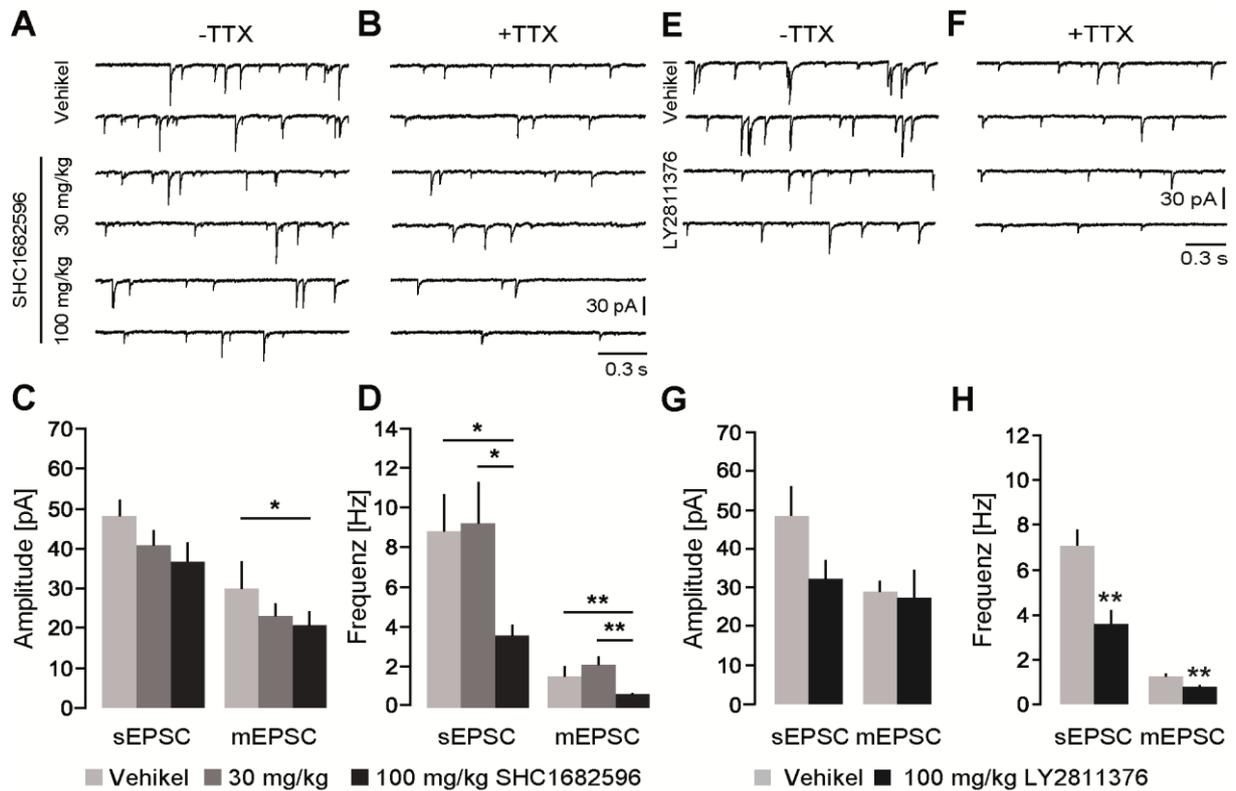


Abbildung 14: Die BACE1 Inhibitoren SCH1682496 und LY2811376 vermindern die exzitatorische synaptische Transmission in kortikalen Pyramidalzellen. Representative Ableitungen spontaner- (A, E) und Miniatur-EPCs (B, F) von Pyramidalzellen des somatosensorischen Kortex aus Mäusen, die über 16 Tage lang (alle 12 h) mit Vehikel, SCH1682496 (30 oder 100 mg/kg) oder LY2811376 (100 mg/kg) behandelt wurden. Die Histogramme geben die Effekte der BACE1 Inhibitoren auf die Amplitude (C, G) und Frequenz (D, H) spontaner- bzw. Miniatur-EPCs im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen wieder. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; $n = 3-4$ Tiere pro Gruppe; $N = 7$ Zellen; einfaktorielles Varianzanalyse. $*p < 0.05$; $***p < 0.001$. sEPSC, engl.: spontaneous excitatory postsynaptic current; mEPSCs, engl.: miniature excitatory postsynaptic current.

Sowohl die chronische Behandlung mit LY2811376, als auch mit SCH1682496 führten bei einer Dosis von 100 mg/kg (16 Tage, alle 12h) zu einer Veränderung der Netzwerkaktivität, in Form einer signifikant reduzierten Frequenz spontaner exzitatorischer postsynaptischer Ströme (engl.: **s**pontaneous **e**xcitatory **p**ostsynaptic current; sEPSC) (Abb. 14D,H). Die sEPSC Amplitude blieb hierbei unverändert (Abb. 14C,G). Des Weiteren wurden postsynaptische Miniaturströme (engl.: **m**iniature **e**xcitatory **p**ostsynaptic current; mEPSC) mittels Applikation des Natriumkanal-Antagonisten Tetrodotoxin von Aktionspotential-induzierten synaptischen Ereignissen isoliert. Hierdurch geben die gemessenen Ströme Aufschluss über einzelne spontane Vesikelfusionen mit der präsynaptischen Membran. Die Verabreichung der BACE1 Inhibitoren LY2811376 bzw. SCH1682496 (jeweils 100 mg/kg, 16 Tage, alle 12 h),

reduzierte robust die mEPSC-Frequenz und –Amplitude (Abb. 14), auch wenn der Effekt von LY2811376 auf die mEPSC–Amplitude die statistische Signifikanz knapp verfehlte. Eine niedriger dosierte (30 mg/kg, 16 Tage, alle 12 h) (Abb. 14) oder akute (100 mg/kg, 1 Tag, alle 12 h) (Abb. 15) Behandlung mit SCH1682496 hingegen ließ keinen signifikanten Effekt auf die Frequenz und Amplitude von sEPSC, oder mEPSC erkennen.

Um zu verifizieren, ob die Abschwächung der synaptischen Transmission explizit auf eine reduzierte BACE1 Aktivität zurückzuführen ist, wurden die Auswirkungen von SCH1682496 (100 mg/kg, 16Tage, alle 12 h) auf sEPSC und mEPSC in Gehirnschnitten von *Bace1*^{-/-} Mäusen untersucht (Abb. 15). Weder die Amplitude, noch die Frequenz von sEPSCs und mEPSCs unterschieden sich zwischen Vehikel-, oder Inhibitor-behandelten *Bace1*^{-/-} Versuchstieren; im Vergleich zu *Bace1*^{+/+} Mäusen war die mEPSCs Frequenz jedoch wesentlich erhöht. Das Fehlen einer SCH1682496 Effektivität auf die synaptische Transmission in *Bace1*^{-/-} Tieren bestätigt, dass BACE1 das primäre pharmakologische Wirkziel darstellt.

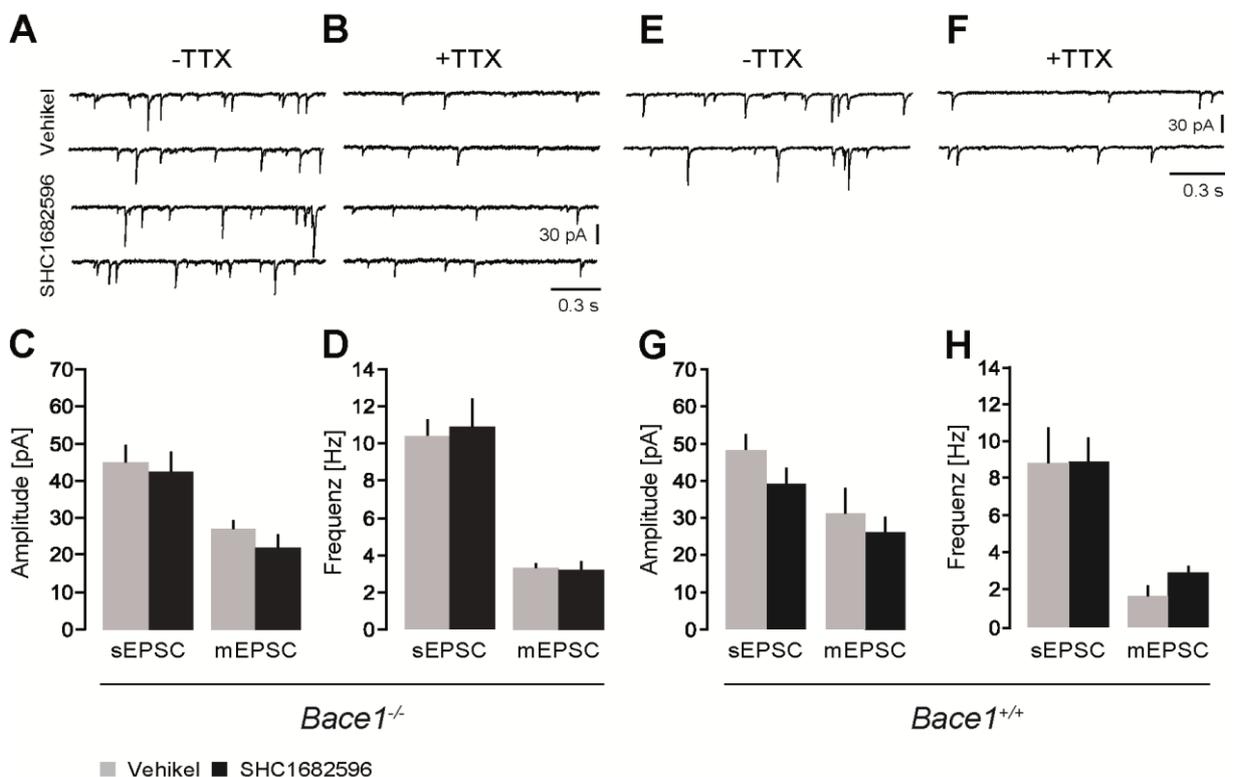


Abbildung 15: Weder eine chronische SCH1682496 Behandlung in *Bace1*^{-/-}, noch eine akute SCH1682496 Applikation in *Bace1*^{+/+} Mäusen verändern die exzitatorische synaptische Transmission in kortikalen Pyramidalzellen. Representative Ableitungen spontaner- (A, E) und Miniatur-EPCs (B, F) von Pyramidalzellen des somatosensorischen Kortex aus *Bace1*^{+/+} Mäusen, die einen Tag lang (E, F), oder aus

Bace1^{-/-} Tieren, die über 16 Tage (**A, B**) (jeweils alle 12 h) mit Vehikel oder SCH1682496 (100 mg/kg) behandelt wurden. Die Histogramme geben die Effekte der BACE1 Inhibitoren auf die Amplitude (**C, G**) und Frequenz (**D, H**) spontaner- bzw. Miniatur-EPSCs im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrollen wieder. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; n = 3-4 Tiere pro Gruppe; N = 7 Zellen; einfaktorielle Varianzanalyse. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. sEPSC, engl.: spontaneous excitatory postsynaptic current; mEPSCs, engl.: miniature excitatory postsynaptic current.

Zusammenfassend weisen diese Daten auf eine reduzierte glutamaterge Neurotransmission hin und stimmen überein mit dem intravitalmikroskopischen Befund, dass eine chronische BACE1 Inhibition zu einer Abnahme der dendritischen Spine-Dichte führt. Ferner bestätigen die Ergebnisse abermals, dass die Auswirkungen einer pharmakologischen BACE1 Inhibition nicht zwangsläufig den Effekten einer genetischen *Bace1* Ablation gleichen.

2.6.2 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibition auf die synaptische Potenzierung

Unter Langzeit-Potenzierung (engl.: long-term potentiation, LTP) versteht man die dauerhafte Verstärkung synaptischer Übertragungsleistung als Folge einer erhöhten neuronalen Erregung. LTP wird somit bedingt durch die Fähigkeit synaptischer Elemente sich plastisch zu verändern und ihre Neurotransmission zu modulieren. Die bisherigen intravitalmikroskopischen und elektrophysiologischen Befunde dieser Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass diese synaptischen Funktionen durch die pharmakologische Inhibition von BACE1 beeinträchtigt sind. Die am besten untersuchte und verstandene LTP-Form findet zwischen den Synapsen der Schaffer-Kollateralen und Pyramidenzellen in der CA1-Region im Hippocampus statt. Um die Wirkung von BACE1 Inhibitoren auf die Aktivitäts-abhängige Plastizität exzitatorischer Synapsen zu untersuchen wurde daher das Stimulus-Antwort-Verhältnis und LTP in der hippocampalen CA1 Region von Vehikel und Inhibitor (100 mg/kg LY2811376 bzw. 30 oder 100 mg/kg SCH1682496, über 16 Tage, alle 12 h) behandelten Mäusen anhand evozierter Feldpotentiale (fEPSP, engl.: field excitatory postsynaptic potential) bestimmt (Abb. 16). In Inhibitor-behandelten Versuchstieren konnte über einen weiten Stimulus-Intensitäts-Bereich ein erheblich abgeschwächtes Antwort-Verhalten in Form einer verminderten fEPSP-Amplitude festgestellt werden (Abb. 16A,C). Um vergleichbare evozierte Feldpotentiale zwischen der Vehikel- und Inhibitor-Gruppe zu generieren, wurde daher die Intensität der Stimuli in der Kontrollgruppe entsprechend reduziert. Hierdurch wurde sichergestellt, dass beide Kohorten eine gleichstarke

postsynaptische Depolarisation erfahren. Nach 15 minütiger Aufzeichnung basaler fEPSPs, erfolgte schließlich eine Tetanisierung der Schaffer-Kollaterale. Wie erwartet, führte die hochfrequente Stimulation in den Gehirnschnitten Vehikel-behandelter Mäuse zu einer ausgeprägten LTP, während die frühe und späte LTP-Phase in den Schnitten Inhibitor-behandelter Tiere eine Dosis-abhängige Reduktion zeigten (Abb. 16B,D).

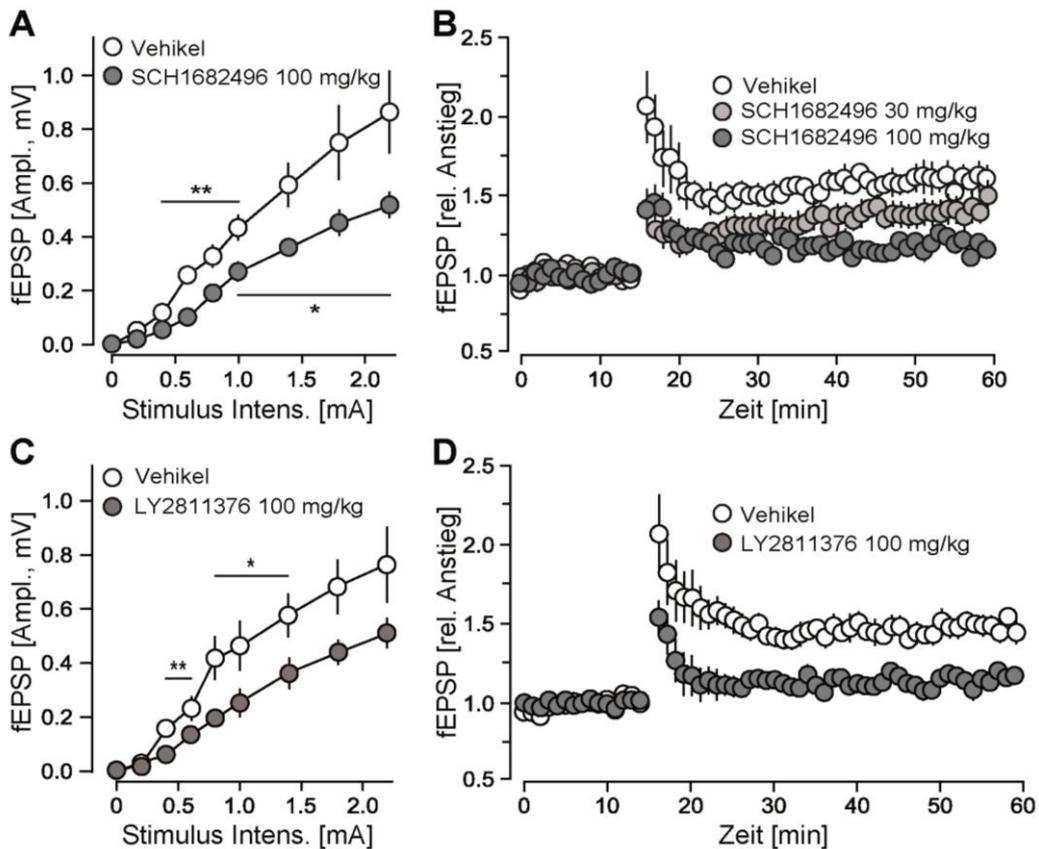


Abbildung 16: Die pharmakologische Inhibition von BACE1 vermindert die Langzeit-Potenzierung in hippocampalen CA1 Neuronen. (A, C) Stimulus-Antwort-Verhalten evozierter Feldpotentiale und (B, D) LTP Messungen in der hippocampalen CA1 Region von Vehikel und BACE1 Inhibitor (30 oder 100 mg/kg SCH1682496 bzw. 100 mg/kg LY2811376, über 16 Tage, alle 12 h) behandelten Mäusen. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; $n = 3-4$ Tiere pro Gruppe; $N = 7$; einfaktorielles Varianzanalyse. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. fEPSP, engl.: field excitatory postsynaptic potential.

Eine signifikante Abschwächung der frühen, aber nicht späten LTP-Phase war auch in hippocampalen Schnitten akut behandelte Tiere (100 mg/kg SCH1682496, 1 Tag, alle 12 h) zu verzeichnen (Abb. 17D). Analog zu den Patch-Clamp Versuchen wurde die BACE1-Spezifität dieser LTP-Effekte mittels chronischer SCH1682496 Gabe (100 mg/kg, 16 Tage, alle

12 h) in *Bace1*^{-/-} Mäusen verifiziert. Die elektrophysiologischen Messungen ergaben, dass *Bace1*^{-/-} Tiere bereits *per se* eine stark verminderte LTP aufweisen, diese jedoch nicht weiter durch die Applikation pharmakologischer BACE1 Inhibitoren reduziert wird (Abb. 17B).

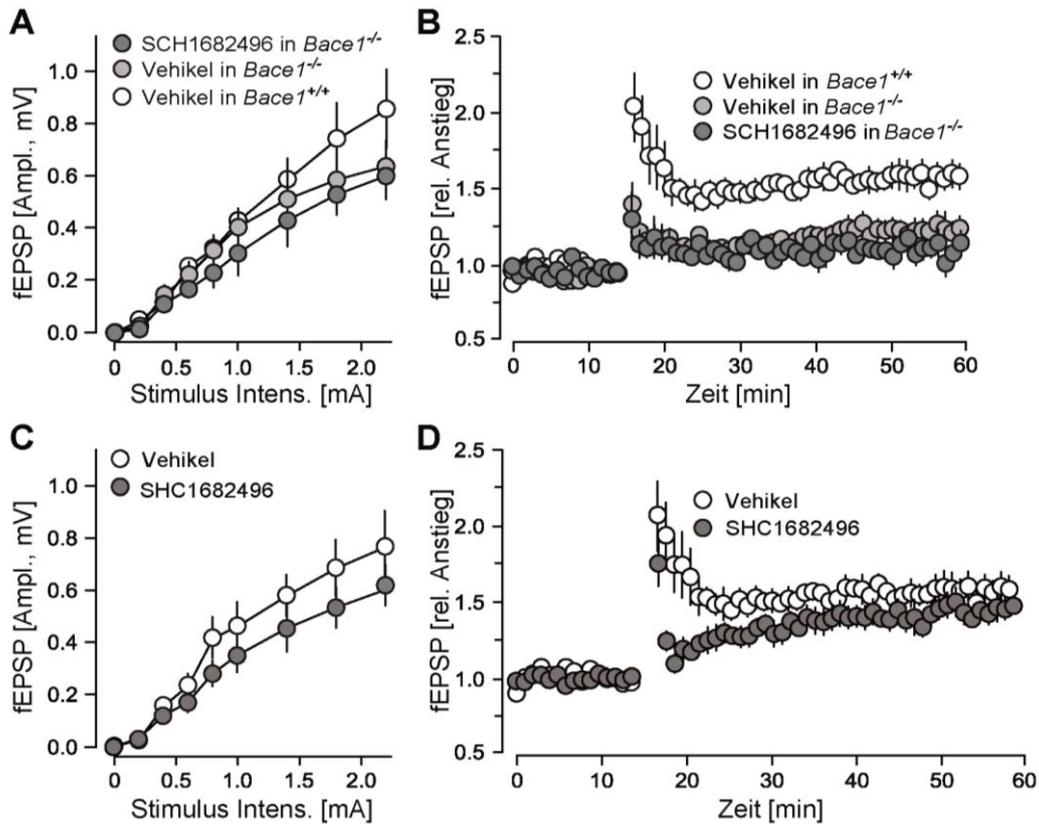


Abbildung 17: Weder eine chronische SCH1682496 Behandlung in *Bace1*^{-/-}, noch eine akute SCH1682496 Applikation in *Bace1*^{+/+} Mäusen verändern die späte LTP Phase in hippocampalen CA1 Neuronen. (A, C) Stimulus-Antwort-Verhalten evozierter Feldpotentiale und (B, D) LTP Messungen in der hippocampalen CA1 Region aus *Bace1*^{+/+} Mäusen, die einen Tag lang (C, D), oder aus *Bace1*^{-/-} Tieren, die über 16 Tage (A, B) (jeweils alle 12 h) mit Vehikel oder SCH1682496 (100 mg/kg) behandelt wurden. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; n = 3-4 Tiere pro Gruppe; N = 7; einfaktorielles Varianzanalyse. fEPSP, engl.: field excitatory postsynaptic potential.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die chronische Inhibition von BACE1 die Stärke exzitatorischer, synaptischer Transmission vermindert und die aktivitätsabhängige synaptische Plastizität hippocampaler CA1 Pyramidal Zellen reduziert.

2.7 Einfluss pharmakologischer BACE1 Inhibition auf kognitive Funktionen

Der Hippocampus ist die zentrale Schaltstelle zur Überführung von Erinnerungen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis. Insbesondere die hippocampale, persistente Potenzierung der Erregungstransmission gilt hierbei als die synaptische Grundlage bzw. das neuronale Korrelat von Lernen und Gedächtnis²²⁴. Aufgrund der Befunde, dass BACE1 Inhibitoren die strukturelle und funktionelle synaptische Plastizität beeinträchtigen, wurde in den nachfolgenden Experimenten der Frage nachgegangen, ob sich die pharmakologische Inhibition von BACE1 nachteilig auf kognitive Funktionen auswirkt, wie z.B. Gedächtnisleistung und emotionaler Status. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6J Mäuse 21 Tage lang alle 12 h mit Vehikel bzw. mit 100 mg/kg SCH1682496 behandelt und anschließend die Reaktionen der Tiere in einer Serie standardisierter Verhaltenstests analysiert²²⁵⁻²²⁷. Generelle motorische Aktivität und das Erkundungsverhalten wurden hierbei quantitativ mittels Offenfeldtest erfasst. Das Grundprinzip des Tests besteht darin, ein Tier in einer unbekanntem Umgebung auszusetzen, aus welcher es nicht entkommen kann. Der hierdurch induzierte Separationsstress führt in der testnaiven Maus zu einem Konflikt zwischen Vermeidungs- und Explorationsverhalten. Die frühe motorische Aktivität kann somit als Parameter angstassoziierten Verhaltens herangezogen werden. Die Messung der gesamten zurückgelegten Distanz im Offenfeldtest während der 15 minütigen Observationsperiode ließ keinen signifikanten Effekt zwischen den Vehikel und Inhibitor-behandelten Kohorten erkennen, obwohl eine leicht reduzierte Lokomotor-Aktivität beobachtet werden konnte (Abb. 18A). Die Zeit, die Mäuse in der inneren und äußeren Zone verbrachten und die Dauer bis zum Betreten der inneren Zone unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant. Eine alternative Methode zur Analyse und Quantifizierung anxiogener Effekte stellt das erhöhte Plus-Labyrinth dar. Der Test beruht auf der natürlichen Furcht der Mäuse vor erhöhten und ungeschützten Flächen sowie auf ihrem spontanen Erkundungsverhalten in einer neuen Umgebung. Das vierarmige Labyrinth besteht aus einer erhöhten Plattform in der Mitte, von der zwei offene gegenüberliegende Arme und zwei geschlossene gegenüberliegende Arme abgehen. Die Anzahl der Besuche der offenen Arme und die dort verbrachte Zeit dienen als Maß der Angst vor offenen Räumen. Sowohl Vehikel-, als auch BACE1 Inhibitor-behandelte Mäuse verweilten hauptsächlich in den geschlossenen Armen ($F_{1,38} = 2835$, $p < 0.0001$). Die Zeit, in der sich die Tiere in den jeweiligen Armen aufhielten, unterschied sich zwischen den Gruppen nicht signifikant (Abb. 18C). Potentielle Effekte einer

BACE1 Inhibition auf das räumliche Arbeitsgedächtnis von Versuchstieren wurden mittels Y-Labyrinth untersucht. Das Y-Labyrinth besteht aus drei Armen, die in einem Winkel von 120° zueinander angeordnet sind. Unter normalen Kontrollbedingungen tendieren Mäuse dazu, eher einen neuen Arm aufzusuchen, als in einen bereits untersuchten Arm zurückzukehren. Anhand des Wechselverhaltens im Y-Labyrinth lässt sich somit die Gedächtnisleistung der Tiere bestimmen. BACE1 Inhibitor-behandelte Mäuse zeigten hierbei eine signifikante Reduktion in der spontanen Alternationsrate beim Aufsuchen der Arme (Abb. 18B). Die leicht beeinträchtigte Lokomotor-Aktivität, wie sie im Offenfeldtest beobachtet wurde, könnte jedoch potentiell zu diesem Effekt beigetragen haben. Diese Vermutung wird unterstützt durch den Befund, dass Inhibitor-behandelte Tiere innerhalb der 10 minütigen Beobachtungsperiode seltener die Arme des Y-Labyrinths betraten, als Vehikel-behandelte Mäuse (15.7 ± 0.8 vs. 19.05 ± 1.27 ; $p = 0.03$). Ein Defizit in der Gedächtnisleistung Inhibitor-behandelter Tiere war ferner in einem Objekterkennungstest evident. Bei diesem Experiment werden dem Tier ein bekanntes und ein unbekanntes Objekt präsentiert. Da Nagetiere eine natürliche Tendenz aufweisen, neue Objekte bevorzugt zu untersuchen, können durch Messung der Explorationsdauer die Wiedererkennungsraten ermittelt und hierdurch Rückschlüsse auf die Leistung des Kurzzeitgedächtnisses gewonnen werden. Die Langzeitbehandlung mit 100 mg/kg SCH1682496 (21 Tage, alle 12 h) verursachte eine signifikante Abnahme der Erkennungsrate, wobei sich die gesamte Explorationsdauer von Objekten zwischen der Vehikel- und Inhibitor-behandelten Gruppe nicht unterschied (Abb. 18D).

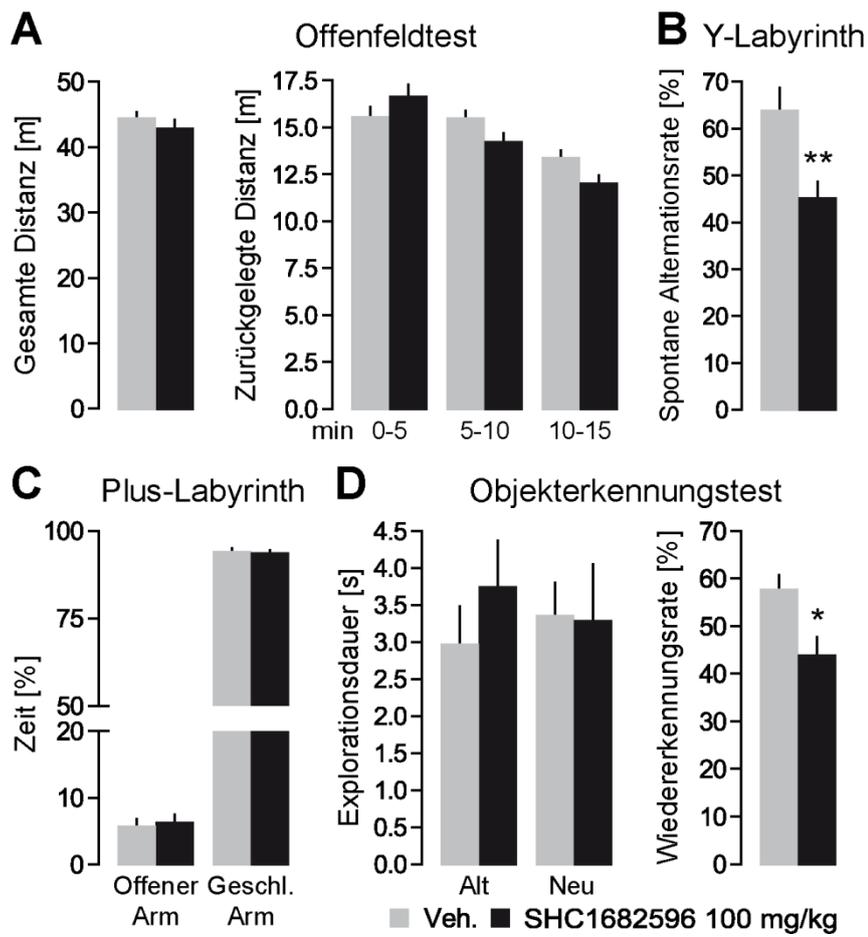


Abbildung 18: Effekte des BACE1 Inhibitors SCH1682496 auf kognitive Funktionen. (A, C) Die pharmakologische Inhibition von BACE1 hat keinen Effekt auf Angst-assoziierte Verhaltensweisen. (A) Gesamte Distanz und Strecke, die innerhalb von 5 minütigen Zeitintervallen im Offenfeldtest zurückgelegt wurde. (C) Relative Zeit, in der sich die Versuchstiere in den geschlossenen und offenen Armen des erhöhten Plus-Labyrinths aufhalten. (B, D) Die pharmakologische Inhibition von BACE1 reduziert die Leistung des Arbeitsgedächtnisses. (B) Spontane Alternationsrate beim Aufsuchen der Arme im Y-Labyrinth. (D) Explorationsdauer und Wiedererkennungsrate im Objekterkennungstest. Die Daten werden als Mittelwerte dargestellt \pm SEM; $n = 20$ Tiere pro Gruppe; zweiseitiger Student t -Test und zweifaktorielle Varianzanalyse. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine langzeitige, pharmakologische Inhibition von BACE1 sich auf synaptische und somit auch kognitive Funktionen, wie Lernen und Gedächtnis, auswirkt.

3. Diskussion

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese postuliert, dass das kausale Ereignis in der Ätiologie von Morbus Alzheimer in der cerebralen Akkumulation und Aggregation des A β -Peptids besteht. Aufgrund der synaptotoxischen Wirkung dieser A β -Aggregate, kommt es zu einem Verlust synaptischer Kontakte und Nervenzellen, der sich schließlich in progressiven kognitiven Defiziten manifestiert^{6,69}. Basierend auf dieser These wurden in den letzten zwei Jahrzehnten zahlreiche therapeutische Strategien entwickelt, um die cerebralen A β -Level zu senken und somit das Voranschreiten der Krankheit zu verlangsamen bzw. zu stoppen. Entsprechende Präparate wurden zwar in klinischen Studien evaluiert, wiesen jedoch eine zu geringe therapeutische Effektivität auf oder verursachten derart schwere Nebenwirkungen, dass die Behandlung frühzeitig abgebrochen werden musste^{121,228}. Für den Erfolg zukünftiger Studien wird es daher von großer Wichtigkeit sein die physiologische Funktion der Schlüsselproteine in der Pathogenese von Morbus Alzheimer eingehender zu charakterisieren, um potentielle Risiken einschätzen zu können, die mit einer therapeutischen Intervention einhergehen. Der limitierende Schritt in der Produktion von A β besteht in der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins APP mittels der β -Sekretase BACE1. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es die Auswirkungen pharmakologischer BACE1 Inhibitoren auf die Physiologie und das Verhalten von Mäusen zu untersuchen, um somit die biologische Funktion dieser Sekretase im adulten Gehirn zu evaluieren und potentielle Nebenwirkungen einer gegen BACE1 gerichteten Therapie identifizieren zu können.

3.1 Synaptische Funktion von BACE1

Die immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, dass BACE1 hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert und im gesamten Gehirn exprimiert wird. Die höchsten Expressionslevel wurden hierbei im Hippocampus und olfaktorischen Bulbus detektiert. Eine gemeinsame Besonderheit dieser Gehirnregionen liegt darin, dass sie den Integrationsort adult-geborener Nervenzellen darstellen, die fortlaufend und lebenslang neu gebildet werden. Insbesondere in den Axonen dieser Neurone (Körnerzellen des hippocampalen Gyrus dentatus und olfaktorische Sinnesnervenzellen) konnte ein sehr hohes BACE1 Expressionslevel festgestellt werden. Im Vergleich zu postmitotischen Nervenzellen

weisen adult-geborene Neurone eine relativ große strukturelle und synaptische Plastizität auf^{229–231}. Die axonale bzw. präsynaptische Anreicherung von BACE1 in diesen Zellen legt somit die Vermutung nahe, dass die Expression von BACE1 positiv mit dem Ausmaß der synaptischen Plastizität korreliert und eine potentielle Funktion in dieser erfüllt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Studien von Willem *et al.*, in denen gezeigt werden konnte, dass die Expression von BACE1 während der frühen postnatalen Entwicklungsphase, in welcher das neuronale Netzwerk noch unreif und sehr plastisch ist, wesentlich höher ist, als im adulten Gehirn¹⁵⁴.

Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen BACE1 Aktivität und synaptischer Konnektivität zu eruieren, wurde zunächst die Morphologie und Dichte synaptischer Elemente von *Bace1*^{-/-} Mäusen analysiert und mit *Bace1*^{+/+} Kontrolltieren verglichen. Die Analyse beschränkte sich hierbei auf neuronale Strukturen im Hippocampus, da diese Gehirnregion unter physiologischen Bedingungen hohe BACE1 Expressionslevel aufweist. In diesen Untersuchungen konnte in *Bace1*^{-/-} Mäusen eine leichte Größenzunahme der CA3 Moosfaser-Boutons beobachtet werden, während die Spine-Dichte apikaler, oder basaler Dendriten der CA1 Pyramidalzellen unverändert blieb. Dieser Befund ist insofern überraschend, da in einer anderen Studie eine signifikant reduzierte Spine-Dichte der hippocampalen Pyramidalzellen in diesen Tieren beschrieben wurde¹⁴². Diese Diskrepanz basiert womöglich auf den unterschiedlichen Methoden, die eingesetzt wurden, um die dendritischen Spines zu analysieren. Savonenko *et al.* verwendeten eine Golgi-Imprägnierung zur Färbung neuronaler Strukturen, während in der vorliegenden Arbeit Nervenzellen mittels neuronaler eGFP Expression in Verbindung mit konfokalmikroskopischen Verfahren visualisiert wurden. Aufgrund der verschiedenen Protokolle, ist es somit denkbar, dass in den jeweiligen Experimenten unterschiedliche Nervenzell-Populationen angefärbt und analysiert wurden. Ferner lassen sich dendritische Spines mittels Konfokalmikroskopie, aufgrund der größeren Tiefenschärfe, besser auflösen und detektieren als mit der, von Savonenko *et al.* verwendeten, konventionellen Lichtmikroskopie.

Die leichte Größenzunahme der Moosfaser-Terminale in *Bace1*^{-/-} Mäusen hingegen ist indikativ für eine veränderte synaptische Übertragungsleistung oder Verschaltung. Generell existieren drei morphologisch distinkte Typen von Moosfaserterminalen: Große, komplexe

Boutons, kleine „en passant“ (französisch für: im Vorbeigehen) Präsynapsen und filamentöse, präsynaptische Endigungen. Elektronenmikroskopische Studien konnten zeigen, dass das Volumen dieser Synapsen hierbei positiv mit der Größe ihres synaptischen Vesikel-Pools korreliert²³². Eine Zunahme im Volumen der Synapsen ließe sich somit potentiell anhand veränderter Vesikelumsatz bzw. Exozytoseraten erklären. Entsprechend wurde in elektrophysiologischen Patch-Clamp Untersuchungen festgestellt, dass die spontane Vesikelausschüttung von hippocampalen Moosfaserterminalen in *Bace1*^{-/-} Mäusen reduziert ist²³³. Des Weiteren innervieren die verschiedenen Synapsentypen unterschiedliche Klassen hippocampaler Nervenzellen: Große Moosfaser-Boutons kontaktieren ausschließlich CA3 Pyramidalzellen, während kleinere en passant und filamentöse Terminale hauptsächlich inhibitorische Interneurone im hippocampalen *Hilus* und *Stratum lucidum* innervieren^{234,235}. Eine Fehlverschaltung der synaptischen Kontakte könnte sich daher auch in einer veränderten Größenverteilung der Synapsen widerspiegeln. Tatsächlich wurden Defizite im Längenwachstum und der Wegfindung von hippocampalen Moosfaseraxonen in *Bace1*^{-/-} Mäusen beschrieben¹⁵².

Aussagen über die strukturelle und aktivitätsabhängige Plastizität dieser Synapsen lassen sich in fixierten Gehirnschnitten anhand morphologischer Kriterien jedoch nur indirekt treffen. Um Einblick in das dynamische Verhalten synaptischer Strukturen in *Bace1*^{-/-} Mäusen zu gewinnen, wurde die Umsatzrate dendritischer Spines in diesen Tieren mittels Intravitalmikroskopie ermittelt. Im somatosensorischen Kortex adulter *Bace1*^{-/-} Tiere konnte weder eine Veränderung in der Dichte, noch in der Dynamik von Spines an den apikalen Dendriten von Pyramidalzellen der kortikalen Schicht V beobachtet werden. Dieser Befund steht in Widerspruch zu den Ergebnissen der Experimente, in denen die Aktivität von BACE1 in *Bace1*^{+/+} Versuchstieren mittels pharmakologischer Inhibition akut blockiert wurde. Eine 16-tägige Behandlung mit den BACE1-Inhibitoren SCH1682496, oder LY2811376 bewirkte hierbei eine signifikante Reduktion in der Bildung und Dichte dendritischer Spines im somatosensorischen Kortex. Auf die möglichen Ursachen dieser Diskrepanz soll im Abschnitt „Differentielle Effekte einer genetischen Ablation und pharmakologischen Inhibition von BACE1“ eingegangen werden. Bemerkenswert ist die Beobachtung eines BACE1-Inhibitor vermittelten Effekts auf die Postsynapsen, obwohl BACE1 hauptsächlich präsynaptisch lokalisiert ist. Zwei potentielle Mechanismen sind für dieses Phänomen denkbar: 1. BACE1 erfüllt eine prä-synaptischen Funktion und die post-synaptischen Defizite stellen daher die

Konsequenz einer prä-synaptischen Dysfunktion dar, oder 2. BACE1-Substrate regulieren direkt die Funktion post-synaptischer Spines. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass beide Mechanismen eine Rolle spielen und BACE1 spezifische prä-, als auch post-synaptische Funktionen zugeschrieben werden können, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll:

1.) Prä-synaptische Funktion von BACE1:

Die Elektrophysiologischen Messungen in kortikalen Pyramidalzellen ergaben, dass die pharmakologische Inhibition von BACE1 zu einer signifikanten Reduktion in der Frequenz spontaner postsynaptischer Miniaturströme führte. Potentielle Erklärungsansätze für dieses Phänomen lassen sich in Berücksichtigung des BACE1 Sekretoms finden. Das BACE1 Substrat CHL1 ist ein prä-synaptisch lokalisiertes Typ I Membranprotein, welches die Exozytose und Clathrin-vermittelte Endozytose von synaptischen Vesikeln reguliert^{236,237}. Entsprechend wurde gezeigt, dass *CHL1*^{-/-} Mäuse eine veränderte synaptische Übertragungsleistung aufweisen²³⁸. Die verminderte Netzwerkaktivität in BACE1 Inhibitor behandelten Tieren ließe sich daher auf prä-synaptische Defizite in der Vesikel-Umsatzrate zurückführen. Ferner ergab die Analyse evozierter Feldpotentiale, dass eine akute pharmakologische Inhibition von BACE1 eine Abschwächung der hippocampalen, frühen LTP-Phase verursachte. Ein Effekt, der ebenfalls in Zusammenhang mit CHL1 stehen könnte, da ähnliche Defizite in der synaptischen Kurzzeitplastizität durch die genetische Ablation von *CHL1* auftreten²³⁸.

2.) Post-synaptische Funktion von BACE1:

Im Gegensatz zu der akuten Hemmung bewirkte die chronische Inhibition von BACE1 eine Dosis-abhängige Abschwächung der späten LTP-Phase. Diese verminderte synaptische Kopplung könnte auf der reduzierten Dichte synaptischer Partner bzw. dendritischer Spines basieren, die in den Inhibitor-behandelten Tieren festgestellt wurde. In elektrophysiologischen Studien wurde gezeigt, dass LTP die Bildung neuer dendritischer Spines induziert^{185,239}. Dauerhafte Defizite in der LTP-Ausprägung und Spinebildung bzw. -Dichte könnten daher in einer kausalen Wechselbeziehung miteinander stehen. Eine reduzierte BACE1-vermittelte Prozessierung von Sez-6 spielt bei der Entstehung dieser postsynaptischen Effekte potentiell eine Rolle. Sez-6 ist ein dendritisch bzw. postsynaptisch lokalisiertes Typ I Membranprotein, dessen Expression durch neuronale Aktivität reguliert

wird¹⁴⁵. Entsprechend führt die Applikation Epilepsie-induzierender Konvulsiva zu einem Anstieg der Sez-6 mRNA-Level im Gehirn (Sez-6, engl. für: **seizure-related gene 6**)²⁴⁰. Sez-6 ist eines der wenigen Substrate, welches nahezu exklusiv durch BACE1 proteolytisch gespalten wird¹⁴¹. Interessanterweise verursacht die genetische Ablation des Sez-6 Gens eine Reduktion in der Spinedichte apikaler Dendriten von Pyramidalzellen der Schicht V, ein Befund der den BACE1-Inhibitor induzierten Effekten gleicht. Weitere Gemeinsamkeiten bestehen in der beeinträchtigten Erregbarkeit pyramidalen Nervenzellen der kortikalen Schicht V¹⁴⁵. Über die molekularen Mechanismen der Sez-6 vermittelten synaptischen Regulation ist jedoch bisher wenig bekannt.

Sowohl die Integrität prä-, als auch post-synaptischer Funktionen ist unabdingbar für die erfolgreiche Prozessierung und Abspeicherung neuer Informationen im Gehirn. Insbesondere synaptische Potenzierung und dendritische Spine-Bildung bzw. -Stabilisierung assoziieren hierbei mit dem Lernerfolg und gelten daher als das physiologische Korrelat von Lernen und Gedächtnis^{200,241-243}. Die Gedächtnisstörung der BACE1-Inhibitor behandelten Tiere steht daher in einem direkten Zusammenhang mit den beschriebenen synaptischen Defiziten.

3.2 Differentielle Effekte einer genetischen Ablation und pharmakologischen Inhibition von BACE1

Die experimentellen Daten der vorgelegten Arbeit zeigen auf, dass der Phänotyp adulter *Bace1*^{-/-} Mäuse nicht zwangsläufig den Effekten einer pharmakologischen BACE1 Inhibition gleicht. Dies wurde z.B. in den Verhaltensstudien festgestellt: Obwohl in *Bace1*^{-/-} Mäusen Angst- und Schizophrenie-assoziierte Verhaltensweisen beschrieben wurden^{142,144}, konnte dieser Effekt mittels pharmakologischer BACE1 Inhibition nicht reproduziert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz besteht darin, dass es sich bei den Schizophrenie-ähnlichen Symptomen in *Bace1*^{-/-} Tieren, um eine entwicklungsbedingte Störung handelt, die folglich durch eine akute Inhibition von BACE1 in einem adulten, bereits reifen Gehirn nicht mehr ausgelöst werden kann. Unterstützt wird diese Hypothese durch klinische Studien, die belegen, dass die multifaktorielle Pathogenese der Schizophrenie teilweise in einer synaptischen Fehlverschaltung gründet, die bereits in der frühen Entwicklungs-Phase beginnt²⁴⁴⁻²⁴⁷. Analog hierzu wurden in 16 Tage alten *Bace1*^{-/-} Mäusen reduzierte hippocampale und kortikale Spinedichten beschrieben, die sich graduell mit zunehmenden

Alter dem Wert von *Bace1*^{+/+} Kontrolltieren angleichen²⁴⁸. Diese Daten und der Befund einer normalen dendritischen Spine-Dichte und -Kinetik in adulten *Bace1*^{-/-} Mäusen plädieren für die Entwicklung kompensatorischer Mechanismen, die den synaptischen Defiziten teilweise entgegenwirken. Interessanterweise versterben ca. 40% aller *Bace1*^{-/-} Jungen innerhalb des ersten Lebensmonats, partiell aufgrund epileptischer Anfälle^{143,249}. Eine Beobachtung, die in Einklang steht mit der abnormen Netzwerkaktivität in Form einer erhöhten sEPSC und mEPSC Frequenz in *Bace1*^{-/-} Mäusen. Auf neurologischer Ebene ist ein epileptischer Anfall die Folge paroxysmaler, synchroner Nervenzell-Depolarisation aufgrund eines Übergewichts von exzitatorischen zu inhibitorischen Impulsen²⁵⁰. Die Anfälligkeit der *Bace1*^{-/-} Mäuse für einen epileptischen Insult könnte daher die Konsequenz einer synaptischen Fehlverschaltung während der frühen postnatalen Entwicklung darstellen. Die Vermutung, dass BACE1 in diesem Prozess eine wesentliche Funktion erfüllt, wird gestützt durch die außerordentlich hohen BACE1 Expressionslevel im Gehirn während des ersten Lebensmonats¹⁵⁴. Adulte *Bace1*^{-/-} Tiere könnten somit eine selektierte Population darstellen, die das Fehlen der BACE1-Aktivität durch alternative Mechanismen teilweise zu kompensieren vermögen. Tatsächlich weisen die überlebenden Mäuse nach Abschluss der kritischen Entwicklungsphase eine relativ normale Lebensdauer auf²⁴⁹. DNS-Microarray Analysen von *Bace1*^{-/-} Gewebeproben demonstrieren allerdings, dass die genetische Ablation von *Bace1* zu keiner Veränderung der globalen, neuronalen Genexpression führt²⁵¹. Potentielle kompensatorische Mechanismen sind somit auf einer funktionalen Ebene zu suchen. In diesem Zusammenhang könnte die zu BACE1 homologe Protease BACE2 eine Rolle spielen. *In vitro* Studien belegen, dass sowohl BACE1-, als auch BACE2-Substrate zumindest partiell durch beide Sekretasen prozessiert werden können²⁵². Es wäre somit möglich, dass der Funktions-Verlust von BACE1 teilweise durch BACE2 ausgeglichen wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass *Bace2*^{-/-} Mäuse zwar überlebensfähig sind, jedoch die genetische Ablation von *Bace2* in *Bace1*^{-/-} Mäusen die hohe neonatale Mortalitätsrate der monogenen *Bace1*^{-/-} Linie zusätzlich steigert²⁴⁹.

3.3 Therapeutisches Potential pharmakologischer BACE1 Inhibitoren

BACE1 initiiert den amyloidogenen APP-Prozessierungsweg und ist somit geschwindigkeitsbestimmend für die Generierung des A β -Peptids. Der Amyloid-Kaskaden-Hypothese zufolge stellt BACE1 somit ein attraktives, therapeutisches Angriffsziel zur

Behandlung bzw. Prävention von Morbus Alzheimer dar. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bereits die genetische Ablation eines einzelnen *Bace1* Allels in transgenen, APP-überexprimierenden Mäusen ausreicht, das Voranschreiten der A β -assoziierten Pathologie signifikant zu verlangsamen, ohne hierbei einen homozygoten *Bace1* knockout Phänotyp zu induzieren^{144,160}. Demnach könnte eine partielle BACE1 Inhibition eine ausreichende therapeutische Effektivität aufweisen, ohne die physiologische Funktion von BACE1 derart zu hemmen, dass schwere Nebenwirkungen auftreten¹³². Wie in der vorgelegten Arbeit jedoch aufgezeigt wurde, sind die Effekte einer genetischen Ablation nicht zwangsläufig mit denen einer pharmakologischen Inhibition von BACE1 vergleichbar. Um das Risiko potentieller Nebenwirkungen zu minimieren, wird eine Inhibitor-Dosis evaluiert werden müssen, die die therapeutische Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Behandlung gleichermaßen gewährleistet. Entsprechend wurden sowohl niedrige, als auch hohe Wirkstoffdosen getestet: Während die chronische Behandlung mit hochkonzentrierten Inhibitoren die Kinetik dendritischer Spines beeinträchtigte, konnte ein ähnliches Defizit bei niedrigerer Dosierung nicht beobachtet werden. Dieser Unterschied in der Dosis-Wirkungs-Beziehung ist insofern bemerkenswert, da die A β 40 ELISA-Messungen ergaben, dass beide Inhibitor-Dosen die A β -Spiegel im Plasma ähnlich effektiv senkten. Das Ausbleiben struktureller, synaptischer Defizite während der Behandlung mit niedrig-dosierten Inhibitoren ist somit nicht stringent die Konsequenz einer schwächeren BACE1 Inhibition, sondern evtl. das Resultat einer kürzeren potenten Wirkung aufgrund einer geringeren Inhibitor-Konzentration im Gehirn^{119,220}.

Zudem werden die erhöhten Protein und enzymatischen Aktivitätslevel von BACE1 in unmittelbarer Nähe zu neuritischen A β -Plaques, in der Titration adäquater Inhibitor-Dosen berücksichtigt werden müssen^{81,161,219} (Abb. 19). In diesem Kontext sind zwei mögliche Szenarien vorstellbar:

- 1.) Die übermäßige Akkumulation von BACE1 erfordert eine starke BACE1 Inhibition, um die A β -Produktion effektiv zu hemmen²⁵³. In diesem Fall, wäre eine chronische BACE1 Inhibitor Applikation verbunden mit den Risiken mechanismusbasierter und unspezifischer Nebenwirkungen.
- 2.) Die Absenkung der aberranten BACE1 Aktivität auf ein physiologisches Level mittels moderater BACE1 Inhibition ist therapeutisch ausreichend wirkungsvoll. Somit wäre die

medikamentöse Behandlung mit BACE1 Inhibitoren zumindest frei von Mechanismusbedingten Nebenwirkungen.

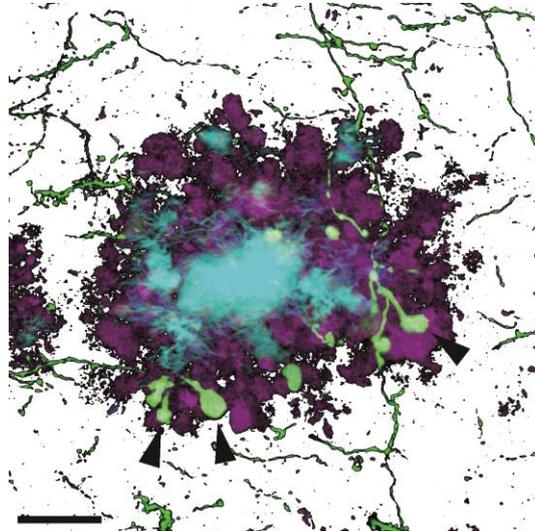


Abbildung 19: BACE1-Level sind in unmittelbarer Nähe zu Aβ-Plaques erhöht. Die konfokalmikroskopische Aufnahme zeigt den kortikalen Gehirnschnitt eines transgenen Alzheimer-Mausmodells. Zur Darstellung der Aβ-Plaques (cyan) wurde der β-Amyloid-bindende Farbstoff Methoxy-X04 appliziert. BACE1 (magenta) wurde mittels Fluorophor-gekoppelter Antikörper immunogefärbt und Neuriten (grün) mittels neuronaler eGFP-Expression markiert. Erhöhte BACE1 Level und neuritische Dystrophien (Pfeilspitzen) lassen sich in der nahen Umgebung von Aβ-Plaques detektieren. Maßstab repräsentiert 25 µm.

Insbesondere aufgrund der Homologie zwischen BACE1 und BACE2 ist jedoch mit einer unselektiven pharmakologischen Hemmung beider Proteasen zu rechnen. Diese Annahme wird bekräftigt durch die phänotypische Ähnlichkeit zwischen der Hypopigmentierung von *Bace2*^{-/-} Mäusen²²³ und den Inhibitor-induzierten Fellpigmentierungsdefekten in behandelten Versuchstieren. Da die Pigmentstörung auch in Inhibitor-behandelten *Bace1*^{-/-} auftrat, ist dieser Effekt somit unabhängig von BACE1 und beruht wahrscheinlich auf einer gestörten Melanogenese aufgrund einer reduzierten PMEL-Prozessierung durch BACE2²²³. Neben PMEL stellt APP selbst ein weiteres BACE2-Substrat dar. Biochemische Studien belegen, dass die Aβ-Domäne von APP durch BACE2 proteolytisch gespalten werden kann und hierdurch ein alternativer, nicht-amyloider APP-Prozessierungsweg beschritten wird²⁵⁴. Eine geringe Inhibitorspezifität würde daher das Risiko bergen den potentiellen therapeutischen Nutzen der Aβ-Level hemmenden Wirkung von BACE2 zu verlieren²⁵⁵.

Obwohl die neurotoxischen Eigenschaften von A β 42 hinlänglich bekannt sind, mehren sich die Hinweise, dass A β -Peptide in geringer, oder physiologischer Konzentration womöglich sogar neuroprotektiv sind: In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass nanomolare A β 42-Level gegen N-Methyl-D-Aspartat-induzierte Exzitotoxizität schützen²⁵⁶. Ferner fördert die hippocampale Injektion exogener A β 42-Peptide in pikomolaren Dosen die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten²⁵⁷. In Entsprechung hierzu beeinträchtigt die Reduktion endogener APP-Expressionslevel mittels RNA-Interferenz die synaptische Langzeitpotenzierung in hippocampalen Schnitten; ein Effekt der durch die Applikation von A β 42 aufgehoben wird²⁵⁸. Diese und ähnliche Befunde verweisen auf die Möglichkeit, dass die Inhibition von BACE1 den A β -Spiegel in Wildtyp Mäusen auf ein derart niedriges Level reduziert, dass seine neuro- und synapto-trophe Funktion verloren geht. Folglich könnte die schädliche Wirkung einer BACE1 Inhibition auf die synaptische Plastizität prinzipiell das Resultat eines A β -Mangels darstellen²⁵⁹. Die pharmakologische Blockierung der amyloidogenen A β -Genese begünstigt zudem die Metabolisierung des APP-Proteins in einem weiteren, divergenten Prozessierungsweg durch die Matrix-Metalloprotease MT5. Hierbei entsteht das sogenannte Carboxy-terminale APP-Fragment CTF- η , dessen neurotoxische Effekte erst kürzlich *in vivo* nachgewiesen werden konnten²⁶⁰.

Die Effektivität pharmakologischer BACE1 Inhibitoren bezüglich ihrer A β -Level senkenden Wirkung wurde bereits in frühen klinischen Studien belegt. Die einmalige Gabe der Inhibitoren LY2811376, oder LY2886721 reduzierte die A β 40/42 Level im Plasma gesunder Probanden um etwa 80%^{119,261}. Bedauerlicherweise musste die Evaluierung beider Substanzen in weiteren klinischen Versuchen aufgrund toxischer, jedoch BACE1-unabhängigen, Nebenwirkungen abgebrochen werden^{119,261}. Der negative Ausgang dieser Studien unterstreicht abermals die Unerlässlichkeit potentielle Nebenwirkungen einer BACE1 gerichteten Therapie frühzeitig zu identifizieren und entsprechend zu berücksichtigen. Ein solches Versäumnis mag teilweise zum Scheitern des vielversprechenden γ -Sekretase Inhibitors Semagacestat in klinischen Studien der Phase III beigetragen haben. So wurde gezeigt, dass die chronische Behandlung mit Semagacestat zu einer Dosis-abhängigen Verschlechterung der kognitiven Leistung von Alzheimer Patienten führte¹²¹. Hinweise für die das Auftreten eines derartigen Effektes lieferten bereits zuvor intravitalmikroskopische Untersuchungen im Mausmodell, die aufzeigen, dass eine mehrtägige Applikation mit dieser Substanz zu einem irreversiblen Verlust dendritischer

Spines führt²⁶². Die Besorgnis, dass ähnlich negative, Mechanismus-basierte Auswirkungen einer BACE1 Inhibition in Alzheimer Patienten auftreten könnten, wird zumindest durch den Befund relativiert, dass die Inhibitor-induzierten Effekte auf die dendritische Spineplastizität reversibel waren.

3.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend demonstrieren die hier vorgestellten Daten, dass BACE1 eine wesentliche, physiologische Rolle in der Regulation synaptischer und kognitiver Funktionen erfüllt, die durch den therapeutischen Einsatz von BACE1 Inhibitoren beeinträchtigt wird.

Sollte BACE1 daher als pharmakologisches Ziel aufgegeben werden? Zu jetzigem Zeitpunkt gewiss nicht! Einerseits könnte die Inhibition von BACE1 den erhöhten A β -Level in Morbus Alzheimer Patienten auf ein physiologischeres Maß senken, so dass die synaptotoxische Wirkung verloren geht und die wünschenswerten Eigenschaften zurückkehren, andererseits könnten die positiven Effekte einer solchen Behandlung insgesamt überwiegen. In Anbetracht der „dualen Natur“ von A β - synaptotoxisch im Übermaß und synaptotroph bei normaler, physiologischer Konzentration – wird eine therapeutische Dosis evaluiert werden müssen, die sowohl Wirksamkeit, als auch klinische Sicherheit zu balancieren vermag. Die Alzheimer'sche Krankheit stellt eine derart große Belastung für die Patienten, ihre Familien und die Gesellschaft dar, dass, sollte sich eine günstige Wirkung auf den Krankheitsverlauf erzielen lassen, die potentiellen Nebenwirkungen pharmakologischer BACE1 Inhibitoren das Risiko wert sind.

4. Material und Methoden

4.1 Maushaltung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedenen Mauslinien verwendet: Kongene, männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J (Charles River, Germany) wurden im Alter von zwei Monaten für die Verhaltensversuche am Max Planck Institut für Psychiatrie verwendet. Transgene, männliche, als auch weibliche Mäuse der Linien B6.129-*Bace1*^{tm1Pcw}/J (Jackson Laboratory, USA), B6.Cg-Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J (Jackson Laboratory, USA) und *Bace1*^{-/-} x GFP-M (erzeugt durch Kreuzung am Zentrum für Neuropathologie) wurden im Alter von 2-3 Monaten für die intravitalmikroskopischen und elektrophysiologischen Untersuchungen am Zentrum für Neuropathologie eingesetzt.

Alle Mäuse wurden in Standard-IVC-Käfigen (individual ventilated cage) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in Gruppen von bis zu sechs Tieren, nach Geschlecht getrennt unter einem 12 stündigen Tag-/Nacht-Rhythmus bei 23 ±2°C gehalten. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu autoklaviertem Futter und Wasser. Im Alter von drei Wochen wurden Jungtiere abgesetzt, mit einer Ohrmarkierung versehen und die hierbei entnommenen Ohrstanzbiopsien für die Genotypisierung verwendet. In einem Tierversuch verwendete Mäuse wurden mindestens einen Tag zuvor getrennt und einzeln im Käfig gehalten. Für den Umgang mit Tieren galt der Grundsatz, möglichst stressfrei mit den Tieren umzugehen und die Belastung auf ein Minimum zu reduzieren. Es wurde entsprechend den Richtlinien des Instituts „Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung“ der LMU München, der Regierung von Oberbayern (Sachgebiet 54 – Tierschutz) und dem Dänischen Nationalen Komitee für Tierversuchsethik gearbeitet. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden im Antrag zu dem Tierversuchsvorhaben Az. 55.2-1-54-2531-188-09 durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt.

4.2 Transgene Mäuse und deren Genotypisierung

4.2.1 DNS Isolierung aus Ohrstanzbiopsien

Für die Genotypisierung transgener Mäuse wurde genomische DNS mittels peqGold Tissue DNA Mini Kit (Peqlab) aus entsprechenden Ohrstanzbiopsien isoliert: Die entnommenen

Gewebeproben wurden über Nacht in einem Schüttel-Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) bei 50°C und 550 U/min in 400 µl Lyse-Puffer T mittels 20 µl Proteinase K und 15 µl RNase A (20 mg/ml) lysiert. Nach Abzentrifugation der unlöslichen Bestandteile für 1 min bei 10.000 U/min (Eppendorf Zentrifuge 5804) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 400 µl DNS-Bindepuffer hinzugegeben. Das Lysat wurde im Anschluss auf PerfectBind DNS Säulen geladen und erneut für 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen der Säulen mit Waschpuffer gefolgt durch jeweils eine Minute Zentrifugation bei 10.000 U/min erfolgte schließlich die Elution der gefällten DNS durch 3 min Inkubation mit 200 µl Elutionspuffer. Die extrahierte DNS wurde für 1 min bei 6000 U/min von der Säule getrennt und bei 4°C gelagert.

4.2.2 Amplifikation von DNS-Fragmenten mittels PCR

Für die Genotypisierung der transgenen Mauslinien wurden die entsprechenden Gensequenzen mittels PCR (**p**olymerase **c**hain **r**eaction) amplifiziert und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Anhand des erhaltenen Bandenmusters ließ sich somit der jeweilige Genotyp bestimmen. In den Abschnitten zu den verschiedenen Mauslinien sind die einzelnen Primer samt PCR-Ansätzen und -Programmen aufgeführt. Die PCRs wurden mit Thermozyklern der Firma Eppendorf (Mastercycler pro) durchgeführt.

4.2.3 Auftrennung des PCR-Produkts mittels Gelelektrophorese

Die PCR Produkte wurden auf Sybr-Gold-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde Agarose (1,5% w/v) in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 0,1 µg/ml Sybr-Gold versetzt. Die Lösung wurde im Anschluss in eine Gelkammer (C.B.S. Scientific) überführt und mit einem Geltaschenkamm bestückt. Nach Erstarren der Agarose wurde der Kamm entfernt und die Kammer mit TAE Puffer befüllt. Die PCR Produkte wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit 6x Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem 1kb-DNS Marker auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der DNS-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 40 mV für 4 h. Das spezifische Bandenmuster der einzelnen Proben wurde durch Illumination auf einem UV-Tisch (3UV Transilluminator, UVP) mit einer Anregungswellenlänge von 258 nm sichtbar gemacht und durch ein Kammerasystem (Canon Powershot G1) dokumentiert. Das Bandenmuster für die verschiedenen Genotypen der

Mauslinien wurde in Abbildung 20 exemplarisch dargestellt. Transgene Tiere der Linie *Thy1-GFP-M* konnten von Wildtyptieren anhand eines 173 bp großen PCR Amplifikats unterschieden werden. Dieses Amplifikat ließ sich nicht im PCR Produkt von Wildtyptieren nachweisen. In der Mauslinie *Bace1-KO* konnten drei Genotypen unterschieden werden: Eine Bande bei 272 bp indizierte Wildtyptiere, die zwei intakte *Bace1*-Allele besaßen. Tiere, die heterozygot für die gerichtete *Bace1* Mutation waren, ließen sich anhand von zwei Banden auf der Höhe von 157 bp und 272 bp identifizieren. War das Tier homozygot für die *Bace1* Mutation, so konnte nur eine Bande auf der Höhe von 157 bp generiert werden (Abb. 20).

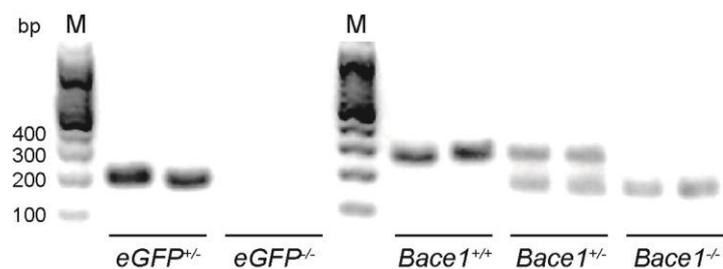


Abbildung 20: Darstellung der DNS-Fragmente zur Genotypisierung der transgenen Mauslinien. Transgene Mäuse der Linie *Thy1-GFP-M* können anhand einer einzelnen Bande auf der Höhe von 173 bp identifiziert und somit von nicht-transgenen Wurfgeschwistern unterschieden werden, die kein PCR Amplifikat aufweisen. In der Mauslinie *Bace1-KO* lassen sich drei verschiedene Genotypen unterscheiden: Eine Bande bei 272 bp indiziert Wildtyptiere, während zwei Banden bei 272 und 157 bp heterozygote *Bace1-KO* Tiere indizieren. Homozygote *Bace1-KO* Mäuse weisen eine einzelne Bande bei 157 bp auf.

4.2.4 C57BL/6J

Unter den kongenen Stämmen ist C57BL/6J die weltweit am häufigsten verwendete und untersuchte Labormaus. 1921 von Dr. CC Little durch Inzucht kreiert, zeichnet sich der Stamm durch seine hohe Fertilität und einen definierten genetischen Hintergrund aus²⁶³.

4.2.5 B6.129-*Bace1*^{tm1Pcw}/J

Zur Generierung der *Bace1*-Knockout Mauslinie wurde ein Zielvektor kreiert, der für ein *Bace1*-Gen kodiert, dessen erstes Exon deletiert wurde und somit nicht mehr transkribiert werden kann. Um das Wildtyp *Bace1* Allel mittels homologer Rekombination zu ersetzen

wurde das Konstrukt durch Elektroporation in embryonale Stammzellen der Mauslinie 129 eingebracht und anschließend in C57BL/6J Blastozysten injiziert. Die hieraus resultierenden chimären Tiere wurden schließlich auf einen reinen C57BL/6J Hintergrund zurückgezüchtet²⁶⁴. Homozygote *B6.129-Bace1^{tm1Pcw}/J* Mäuse sind lebensfähig und fertil, weisen jedoch eine erhöhte Sterblichkeit und verzögertes Wachstum im juvenilen Alter auf²⁴⁹. Des Weiteren wurden diverse neurologische und Verhaltens- Defizite beschrieben, wie die Beeinträchtigung hippocampaler Langzeitdepression, Hypomyelinisierung kortikaler Axone, Gedächtnisstörungen und verringerte Lokomotion^{144,265}.

Tabelle 1: Primer, PCR-Ansatz und Thermozyklen für die Genotypisierung von *B6.129-Bace1^{tm1Pcw}/J*

Bezeichnung	Sequenz (5' ->3')	T _{Hybridisierung} [°C]
<i>Bace1_1</i>	AGG CAG CTT TGT GGA GAT GGT G	62,1
<i>Bace1_2</i>	CGG GAA ATG GAA AGG CTA CTC C	62,1
<i>Bace1_3</i>	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG	59,8

Volumen [µl]	Produkt	Konzentration [µM]
10	HotMasterMix	
0,6	<i>Bace1_1</i> (10 µM)	20
0,6	<i>Bace1_2</i> (10 µM)	20
0,6	<i>Bace1_3</i> (10 µM)	20
2	DNS Probe	
9,6	H ₂ O	

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Wiederholungen
Denaturierung	94	180	1 x
Denaturierung	94	30	35 x
Hybridisierung	52	60	35 x
Elongation	72	60	35 x
Elongation	72	120	1 x
Ende	10		1 x

4.2.6 B6.Cg-Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J

Transgene Mäuse der Linie B6.Cg-Tg (Thy1-GFP)MJrs/J (Synonym: GFP-M) exprimieren das fluoreszierende Protein eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein)²⁶⁶ unter der Kontrolle eines modifizierten *thy1.2* Promoters. Thy-1 ist ein GPI (Glycosylphosphatidylinositol) - verankertes Zelloberflächen-Glykoprotein, das in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen exprimiert wird, wie z.B. im Thymus und im Nervensystem²⁶⁷. Durch Deletion des Exons 3 und dessen flankierenden Introns wurden die für die Expression in nicht-neuronalen Zellen benötigten Sequenzen entfernt, wodurch ein spezifischer pan-neuronaler *thy1.2* Promoter entstand. Das Transgen wurde schließlich in befruchtete Oozyten des Mausstammes C57BL/6J x CBA injiziert und die hieraus resultierenden Nachkommen auf einen reinen C57BL/6J Hintergrund zurückgezüchtet. Mäuse der Linie Thy1-GFP-M zeichnen sich durch eine starke zytosolische eGFP Expression in vereinzelt Nervenzellen, insbesondere der neokortikalen Schicht V und hippocampalen CA1 Region aus²¹². Durch fluoreszenzmikroskopische Verfahren wird somit eine detaillierte Studie der neuronalen Morphologie ermöglicht.

Tabelle 2: Primer, PCR-Ansatz und Thermozyklen für die Genotypisierung von B6.Cg-Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J

Bezeichnung	Sequenz (5' ->3')	T _{Hybridisierung} [°C]	
<i>eGFP_fw</i>	AAG TTC ATC TGC ACC ACC G	56,7	
<i>eGFP_rev</i>	TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG	57,3	
Volumen [µl]	Produkt	Konzentration [µM]	
10	HotMasterMix		
1	<i>eGFP_fw</i> (10 µM)	20	
1	<i>eGFP_rev</i> (10 µM)	20	
2	DNS Probe		
11,2	H ₂ O		
Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Wiederholungen
Denaturierung	94	90	1 x
Denaturierung	94	30	35 x
Hybridisierung	52	60	35 x
Elongation	72	60	35 x
Elongation	72	120	1 x

Ende	10	1 x
------	----	-----

4.2.7 *Bace1*-KO x GFP-M

Transgene Tiere, die sowohl homozygot für das mutierte *Bace1* Allel, als auch heterozygot für das *eGFP* kodierende Transgen sind wurden durch Verpaarung der Linie B6.129-*Bace1*^{tm1Pcw}/J mit B6.Cg-Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J generiert. Die resultierende Linie *Bace1*-KO x GFP-M ermöglicht es aufgrund der neuronalen eGFP Expression, den Einfluss der β -Sekretase BACE1 auf die Morphologie und strukturelle Plastizität spezifischer Nervenzellen mittels fluoreszenzmikroskopischen Verfahren zu untersuchen.

Die Genotypisierung der Linie *Bace1*-KO x GFP-M erfolgte analog dem PCR-Protokoll zu den Linien B6.129-*Bace1*^{tm1Pcw}/J und B6.Cg-Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J.

Tabelle 3: Materialien zur Maus-Genotypisierung

Material	Hersteller
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	Peqlab, Erlangen
5 Prime HotMasterMix 2,5x	VWR, Ismaning
PCR-Primer-Oligonukleotide	Eurofins MWG Operons, Ebersberg
Sybr-Gold	Invitrogen, Karlsruhe
Gel Loading Solution 6x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1 kb DNA-Marker	Peqlab, Erlangen
Agarose	SERVA, Heidelberg
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (100%)	Merck, Darmstadt
NaEDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Safe Lock Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Safe Lock Reaktionsgefäße, 2 ml	VWR, Ismaning
PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg
Pinzette	FST, Heidelberg
Schere	FST, Heidelberg
Skalpelli	VWR, Ismaning
Schüttel-Thermoblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

Zentrifugen 5430R und 5804R	Eppendorf, Hamburg
Thermozykler Mastercycler pro	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle Quickchef 650	Moulinex, Solingen
Gelelektrophorese - Kammer, -Schlitten, -Kämme	Elchrom Scientific, Cham, Schweiz
Spannungsregler PS200HC	Hofer, Holliston, MA, USA
UV-Tisch 3UV-Transilluminator	UVP, Cambridge, UK
Digitalkamera-System Powershot G1	Canon, Krefeld
Thermozykler LightCycler480	Roche, Mannheim

Tabelle 4: Pufferlösung zur Maus-Genotypisierung

Tris-Acetat-EDTA-Puffer

121 g Trizma Base

9,31 g NaEDTA

28,5 ml Essigsäure

mit sterilem Wasser auf 500 ml auffüllen 50x Stammlösung

mit sterilem Wasser 1:50 verdünnen1x
Arbeitslösung

4.3 Formulierung und Applikation der Bace1 Inhibitoren

Die Bace1 Inhibitoren SCH1682496^{220,268} und LY2811376¹¹⁹ wurden freundlicherweise von Lundbeck (Valby, Dänemark) für die elektrophysiologischen und intravitalmikroskopischen Experimente zur Verfügung gestellt. Weitere Mengen an SCH1682496 wurden von Merck Research Labs (Kenilworth NJ) für die Verhaltensstudien bereitgestellt. Die Synthese des Inhibitors SCH1682496 erfolgte gemäß den Patentangaben (WO2007146225 und WO2008103351) von Schering-Plough Pharmaceuticals (North Wales, PA, USA). Der Bace1 Inhibitor LY2811376 wurde nach dem, von Eli Lilly & Co. (Indianapolis, Indiana, USA) publizierten Schema synthetisiert.

Beide Inhibitoren wurden mittels Zugabe von Cyclodextrinen in Lösung gebracht. Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide bestehend aus einer unterschiedlichen Anzahl an α -1-4-verknüpften Glukosemolekülen. Die zyklische Anordnung der Glukose Einheiten führt zur Ausbildung eines trichterförmigen Hohlraumes, der sich durch ein hydrophobes Inneres und einer hydrophilen Außenfläche auszeichnet. Dadurch sind Cyclodextrine in der

Lage die Wasserlöslichkeit apolarer, organischer Substanzen durch Bildung einer Einschlussverbindung zu erhöhen^{269,270}. In der hier vorgelegten Arbeit fanden die Cyclodextrin-Derivate 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD; AppliChem) und Sulfobutyl Ether 7- β -Cyclodextrin (SBE7- β -CD; Captisol) Verwendung. Im Gegensatz zu HP- β -CD verfügt SBE7- β -CD über 6-7 negativ geladene Sulfonat Gruppen, deren elektrostatische Wechselwirkung die Cyclodextrin-Kavität weiter vergrößert und die Bindung zu positiv geladenen Substanzen verstärkt²⁷¹.

Die Bace1 Inhibitoren wurden wie folgt formuliert:

- SCH1682496 (3 mg/ml oder 10 mg/ml) und 220 mM Glucose-Monohydrat (Sigma Aldrich) in 10% (w/v) HP- β -CD bei pH 4,0
- LY2811376 (10 mg/ml) in 30% (w/v) SBE7- β -CD bei pH 4,0

Agglomerate wurden durch 30 minütige Inkubation im Ultraschallbad (Merck) zerlegt und die Lösungen durch Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,35 μ m (MoBiTec) steril filtriert. Je nach Experiment wurde den Versuchstieren Bace1 Inhibitor in Dosen von 30 oder 100 mg/kg Körpergewicht mittels einer Schlundnadel (Fine Science Tools) intragastral alle 12 Stunden bis zu 21 Tagen verabreicht.

4.4 Sandwich ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Die *in vivo* Wirksamkeit der Bace1 Inhibitoren wurde durch Quantifizierung des Bace1 Spaltproduktes Amyloid-beta 40 (A β 40) im Blutplasma und Gehirngewebe mittels Sandwich ELISA ermittelt. Zu diesem Zweck wurde 3 Monate alten, männlichen C57Bl/6J Mäusen alle 12 h Bace1 Inhibitor SCH1682496 oder LY2811376 in Dosen von 30 mg/kg oder 100 mg/kg verabreicht. Nach 1- oder 15-tägiger Behandlung erfolgte jeweils 3 h nach der letzten Inhibitor Applikation die Probenentnahme am narkotisierten Tier. Die Narkose wurde durch eine i.p. (intrapertoneale, lat.: intra=innen, peritoneum=Bauchfell) Ketamin/Xylazin (140 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin in 0,9% NaCl) Injektion eingeleitet.

4.5 Blutentnahme und Plasmaseparation

Die Blutentnahme erfolgte per Herzpunktion. Das narkotisierte Versuchstier wurden hierzu in Rückenlage fixiert, das Abdomen mit 70% Alkohol desinfiziert und der Brustkorb nach Durchtrennung der Rippen eröffnet. Mittels einer 23G-Kanüle bestückten 1 ml Spritze wurde anschließend die rechte Herzkammer punktiert und ca. 500 µl Blut entnommen. Es ist wichtig die Blutabnahme langsam durchzuführen, da ein zu hoher negativer Druck zum Herzkollaps führt, der eine weitere Abnahme nicht zulässt. Um eine Koagulation der Blutprobe zu verhindern wurden diese zügig in ein Heparin-haltiges BD Microtainer Röhrchen (Thermo Fisher Scientific) überführt und anschließend 8-10 mal invertiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2000 g für 3 min durch den das Blut in 3 Phasen aufgetrennt wird: Eine untere Erythrozyten-, eine obere Plasma- und eine weißliche Inter-Phase, der sogenannte Leukozyten-Film. Der Plasmaüberstand wurde nun in Matrix Storage Tubes (Thermo Fisher Scientific) überführt und zur Aufbewahrung bei -80°C gelagert. Bevor die Proben schließlich mittels Sandwich ELISA analysiert werden konnten wurden sie mit Standard-Lösungsmittel (aus dem Sandwich ELISA Kit; Wako Pure Chemical Industries) im Verhältnis 1:4 verdünnt.

4.6 Gehirnentnahme und Gewebhomogenisierung

Nach erfolgter Blutentnahme (siehe Abschnitt „Blutentnahme und Plasmaseparation“) wurde der Kopf der narkotisierten Maus abgetrennt und das Gehirn freipräpariert. Um eine Degradation des Gewebes zu verhindern wurde das Gehirn entnommen, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C asserviert. Bevor die Probe mittels Sandwich ELISA analysiert werden konnte, musste das Gewebematerial zunächst aufgeschlossen werden. Der gefrorene Kortex wurde hierzu im Verhältnis 1:10 (w/v) in einer Lösung bestehend aus 0,2% Diethylamin, 50 mM NaCl (pH 10), Complete Protease Inhibitor (Roche), AEBSF (4- (2-Aminoethyl) benzensulfonylfluorid hydrochlorid; Roche) und 0,5% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich) homogenisiert. Das Homogenat wurden im Anschluss kurz sonifiziert (Bandelin Sonopuls HD2070; Bandelin Electronic), 30 min lang auf Eis inkubiert und für weitere 30 min bei 20.000 g und 4°C abzentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand mit der löslichen Fraktion abgenommen und durch eine 1:10 Verdünnung mit 0,5 M Tris/HCl (Sigma-Aldrich), pH 6.8 neutralisiert. Schließlich wurde die Probe im Verhältnis 1:10 mit 8 M

Urea versetzt und nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis mit Standard-Lösungsmittel (aus dem Sandwich ELISA Kit; Wako Pure Chemical Industries) 1:5 verdünnt.

4.7 Sandwich ELISA Verfahren

Im Sandwich ELISA Verfahren wird die Konzentration eines Antigens anhand eines chromogenen Farbumschlages gemessen. Das nachzuweisende Antigen wird hierbei über einen Erstantikörper an die Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden und über einen HRP-gekoppelten (engl.: **horse raddish peroxidase**) Zweitantikörper detektiert. Der Aufbau des entstandenen Antikörper-Antigen-Antikörper Komplexes ähnelt einem Sandwich, daher auch der Name „Sandwich-ELISA“. Das Reporterenzym HRP bewirkt schließlich den Umsatz des Chromogens TMB (Thermo Fisher Scientific), dessen Reaktionsprodukt mittels Photometer gemessen werden kann. Die Intensität des entstandenen Farbstoffes korreliert hierbei mit der Konzentration des zu bestimmenden Antigens.

Die A β 40 Konzentration in Gehirn- bzw. Plasma-Proben wurde von Lundbeck A/S mittels Sandwich ELISA Kit (Human/Rat A β 40 ELISA Kit; Wako Pure Chemical Industries) gemäß dem Protokoll des Herstellers ermittelt. Im folgendem wurden die wells einer „BNT77 Antikörper“-beschichteten Mikrotiterplatte mit jeweils 100 μ l Probenmaterial beladen und bei 2-10°C über Nacht inkubiert. Die Adsorption des A β 40 Fragments erfolgte hierbei durch Bindung des A β (11-28) Epitops an BNT77. Im Anschluss wurden die wells 5x gewaschen und für 1h mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper BA27 bei 2-10 °C inkubiert. Es folgten 5 weitere Waschschrte und die Zugabe von 100 μ l TMB-Lösung, wodurch die HRP Reaktion bei RT in Gang gesetzt wurde. Nach 30 min wurde diese enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Stop-Lösung unterbrochen und die Extinktion der Proben photometrisch bei 450 nm mittels Microplate Reader (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) bestimmt.

4.8 Immunhistochemie

4.8.1 Transkardiale Perfusion

Die Gewebefixierung mittels transkardialer Perfusion dient der Erhaltung der Probenstruktur, der Härtung des Präparates und der Entfernung von Erythrozyten, deren Autofluoreszenz lichtmikroskopische Untersuchungen beeinträchtigen könnte. Als Fixativ

wurde eine isotonische 4% Formaldehydlösung verwendet. Formaldehyd ist ein additives Fixativ, welches mittels seiner Aldehyd-Gruppe eine kovalente Quervernetzung der Proteine im Gewebe durch Bildung von Methylenbrücken bewirkt. Ein noch stärkeres Fixativ stellt somit Glutaraldehyd dar, da es über zwei Aldehyd-Gruppen verfügt.

Zur transkardialen Perfusion wurden die Versuchstiere mittels einer i.p. Ketamin/Xylazin (140 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin in 0,9% NaCl) Injektion anästhesiert und die Narkosetiefe anhand des Zwischenzehenreflexes beurteilt. Sobald der Zwischenzehenreflex ausfiel, wurden die Mäuse mit exponierter Bauchseite auf einer Halterung fixiert und das Herz durch Eröffnung des Brustkorbes freigelegt. Im Anschluss wurde die linke Herzkammer mittels einer Flügelkanüle punktiert und die absteigende Aorta (lat.: *Aorta descendens*) durchtrennt, um den Ausfluss des Blutes zu gewährleisten. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe wurden nun über 5 min 40 ml Phosphatpuffer (PB; 0,1M; pH 7,4; 4°C) über die Flügelkanüle in den Blutkreislauf eingeleitet. Nachdem das gesamte Blut durch die isotonische PB Lösung ersetzt worden war erfolgte eine 8 minütige Perfusion mit 70 ml Formaldehydlösung (4% Paraformaldehyd in 0,1M PB, pH 7.4). Nach Abschluss der Perfusion wurde der Kopf der Maus abgetrennt, das Gehirn vorsichtig freipräpariert und über Nacht bei 4°C in 4% Formaldehydlösung postfixiert. Die fixierten Gehirne wurden anschließend in PB überführt und bei 4°C asserviert.

4.8.2 Anfertigung von Gehirn-Schnitten mittels Vibratom

Zur Erzeugung 50 µm dicker Gehirn-Schnitte wurde ein VT1000S Vibratom (Leica Microsystems) verwendet. Das fixierte Gehirn wurde hierzu mit einer Rasierklinge zurechtgetrimmt und anschließend mit Sekundenkleber auf der Vibratom-Bühne fixiert. Die Vibratom-Wanne wurde mit 0,1M PB (pH 7,4) gefüllt, so dass das Präparat stets mit Flüssigkeit bedeckt war, während bei niedriger Schnittgeschwindigkeit und hoher Vibrationsamplitude koronale, oder sagittale Schnitte angefertigt wurden. Die Gehirnschnitte wurden schließlich in PBS befüllte 24-well Platten überführt und den folgenden Färbeprotokollen entsprechend prozessiert.

4.8.3 Immunhistochemische Färbeprotokolle

Die subzelluläre Lokalisation und das Expressionsmuster von Bace1 im murinen Gehirn wurden mittels Antikörperfärbung und anschließender Fluoreszenz-, oder Elektronen-Mikroskopie bestimmt.

4.8.4 Färbeprotokoll für die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Herstellung immunfluoreszent gefärbter Präparate wurden die fixierten Gehirnschnitte auf einem Plattformschüttler (Titramax 1000, Heidolph) über Nacht bei RT mittels 0,25% Triton X-100 in PBS (pH 7,4) permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend durch einstündige Inkubation in einer Lösung aus 3% Normalziegenserum (Vector Laboratories, Burlingame) in PBS blockiert. Nach Zugabe des monoklonalen BACE Primärantikörper D10E5 (Cell Signalling) im Verhältnis 1:200 folgte eine eintägige Inkubation bei 4°C. Ungebundener Antikörper wurde anschließend in drei Waschsritten mit PB entfernt. Die Detektion des D10E5 Antikörpers erfolgte durch zweistündige Inkubation mit Alexa 647-gekoppelten Sekundärantikörper (1:200; Invitrogen) in Dunkelheit, um ein Ausbleichen des Alexa-Fluorophors zu vermeiden. Die Präparate wurden nun lichtgeschützt drei weitere Male mit PBS für jeweils 15 min gewaschen, auf Objektträger aufgezogen und mit Vectashield „Mounting Medium“ (Vector Laboratories) eingedeckelt. Um die Präparate vor Austrocknung zu schützen wurden die Objektträger mit Nagellack versiegelt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

4.8.5 Färbeprotokoll für die Elektronenmikroskopie

Die immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten für die Elektronenmikroskopie verlief analog zum „Färbeprotokoll für die Fluoreszenzmikroskopie“, mit dem Unterschied, dass der Permeabilisierungsschritt übersprungen und ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet (1:200; Vector Laboratories) wurde. Die Detektion des Sekundärantikörpers erfolgte mit Hilfe eines VECTASTAIN ABC Immunoperoxidase Kits (Vector Laboratories) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Hierbei wurde ein Avidin-HRP Komplex (engl.: **horse raddish peroxidase**) an das Biotin-Antikörper Konjugat gebunden und durch die HRP vermittelte Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB; Sigma Aldrich)

sichtbar gemacht (Substratlösung: 0,05% DAB, 0,01% Wasserstoffperoxid). Die Gehirnschnitte wurden im Anschluss für 1 h in einem Fixativ aus 2,5% Glutaraldehyd (SERVA) und 2% Formaldehyd (Carl Roth) in 0,1M Cacodylatpuffer (Sigma-Aldrich) postfixiert und mittels 1% Osmiumtetroxid (Paesel + Lorei) in 0,1 M Cacodylatpuffer für 1 h osmiert. Daraufhin erfolgte die Einbettung der Präparate unter Verwendung einer mit Vakuumkammer und Kühlplattform ausgestatteten Mikrowelle (Ted Pella):

Tabelle 5: Einbettungsprotokoll

Vorgang	Dauer	Lösung
Waschen	5 x 2 min	0,1 M Cacodylatpuffer
<i>Bace1_2</i>	2 x 2 min	deionisiertes Wasser
<i>Bace1_3</i>	2 x 2 min	50% EtOH
Dehydrieren	Mikrowellen-Behandlung bei 250 W:	
	40 s	1% (w/v) Uranylacetat in 50% EtOH
	40 s	1% (w/v) Uranylacetat in 70% EtOH
	40 s	1% (w/v) Uranylacetat in 90% EtOH
	40 s	1% (w/v) Uranylacetat in 100% EtOH
	40 s	100% EtOH
	40 s	1:1 EtOH/Aceton
	40 s	1:2 EtOH/Aceton
	3 x 40 s	100% Aceton
Flacheinbettung	Mikrowellen-Behandlung bei 350 W im Vakuum:	
	3 min	1:1 Aceton/Araldit
	3 min	1:4 Aceton/Araldit
	4 x 3 min	Araldit
	48 h bei 60°C	Araldit

Die in Kunstharz eingebetteten Schnitte wurden anschließend unter einem Lichtmikroskop (BX50, Olympus) mittels einer Kamera (ColorView Illu, Olympus) fotografiert. Nach Färbung der Präparate mit 1% Toluidinblau (Sigma-Aldrich) in 1% Borax (Natriumtetraborat; Sigma-

Aldrich) wurden die Blöcke vom Objektträger geschnitten und der gewünschte Gewebeausschnitt zu einer trapezförmigen Pyramide getrimmt, wobei die zuvor erzeugten Fotos bei der Orientierung halfen. Mit einem Ultracut UCT Ultramikrotom (Leica Microsystems) wurden nun Semidünnschnitte (ca. 2 µm Schnittdicke) angefertigt und interessante Regionen zur weiteren Prozessierung lichtmikroskopisch ausgewählt. Schließlich wurden Ultradünnschnitte (ca. 50 – 70 nm Schnittdicke) erzeugt, auf Formvar-beschichtete Nickel-Polygonnetze (Agar Scientific) aufgezogen und mittels Bleicitrat (Sigma-Aldrich) und Uranylacetat (Sigma-Aldrich) kontrastiert.

Tabelle 6: Materialien zur Immunhistochemie

Material	Hersteller, Sitz
Aceton (Propanon)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Araldit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BACE-Antikörper (Klon D10E5)	Cell Signalling, Cambridge
Bleicitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borax (Natriumtetraborat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol absolut	VWR, Ismaning
Formvar-beschichtete Nickel-Polygonnetze	Agar Scientific, Essex
Glutaraldehyd (25 % in Wasser für Elektronenmikroskopie, hoch rein)	SERVA, Heidelberg
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Normalziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame
Osmiumtetroxid	Paesel + Lorei, Duisburg
Pelco BioWave Pro	Ted Pella, Redding
Sekundärantikörper, Alexa Fluor 647-Konjugat	Invitrogen, Karlsruhe
Titramax 1000 Plattformschüttler	Heidolph, Schwabach
Toluidinblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Uranylacetat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
VECTASTAIN ABC Immunoperoxidase Kit	Vector Laboratories, Burlingame

Vectashield „Mounting Medium“	Vector Laboratories, Burlingame
Wasser, destilliert	Merck Millipore, Darmstadt

Tabelle 7: Pufferlösungen zur Immunhistochemie

0,1 M Phosphatpuffer (PB)

1 l destilliertes Wasser
14,95 g Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat
2,49 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat
pH 7,4

0,02 M Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

200 ml 0,1M PB
800 ml destilliertes Wasser
8 g NaCl
pH 7,4

0,1 M Cacodylatpuffer

1 l destilliertes Wasser
21,4 g Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat
pH 7,4

4.9 Mikroskopie

4.9.1 Elektronenmikroskopie

Die Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Ultradünnschnitte erfolgten mit einem Jeol JEM-1011 Transmissionselektronenmikroskop (JEOL Inc., MA) mittels eingekoppelter, 11 Megapixel Gatan Orius CCD Digital Kamera.

4.9.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Aufnahmen der immunhistochemisch prozessierten Gehirnschnitte wurden an einem inversen konfokalen LSM 780 Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss) durchgeführt. Alexa647 und eGFP wurden gleichzeitig mit einem HeNe-Laser (633nm) und einem Argon-Laser (488nm) über einen Strahlenteiler MBS 488/561/633 angeregt. Um eine Übersaturierung der Bildpixel

zu vermeiden, wurde darauf geachtet die Laserintensität beider Kanäle entsprechend anzupassen. Die Detektion des Emissionslichtes erfolgte durch NDD-Detektoren nach Aufteilung durch einen Spektralfarbteiler. Zur Erstellung großflächiger Übersichtsaufnahmen wurde die Lochblende des Mikroskops vollständig eröffnet und ein Plan-Neofluar 10x/0,3 Luftobjektiv (Zeiss) verwendet.

4.9.3 Intravitalmikroskopie

Implantation des kranialen Fensters

Um das Risiko einer postoperativen Wundinfektion zu minimieren wurde das Operationsbesteck zunächst mithilfe eines Tischsterilisators (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) thermisch desinfiziert. Der operative Eingriff erfolgte unter Zuhilfenahme eines SZ51 Stereomikroskopes (Olympus, Hamburg, Deutschland) und einer KL 1500 LED Kaltlichtschwanenhalslampe (Schott, Mainz, Deutschland). Durch eine i.p. Ketamin/Xylazin (140 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin in 0,9% NaCl) Injektion wurde das Versuchstier anästhesiert und die Narkosetiefe anhand des Zwischenzehenreflexes überprüft. Nach Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe wurde eine i.p. Dosis des Entzündungshemmers Dexamethason (6 mg/kg in 0,9% NaCl) appliziert, um die Entstehung einer Hirnschwellung während der Trepanation der Schädeldecke zu verhindern. Zur Vermeidung postoperativer Schmerzen und Entzündungen wurden des weiteren s.c. (subkutan, lat.: sub = unter, cutis = Haut) das Analgetikum Rimadyl (7,5 mg/kg in 0,9% NaCl) bzw. das Antibiotikum Cefotaxim (250 mg/kg in 0,9% NaCl) verabreicht. Im Anschluss wurde die Maus auf ein selbstregulierendes Heizkissen (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) platziert um die Körpertemperatur während der Operation bei konstanten 37°C aufrecht zu erhalten. Der Kopf des Tieres wurde mittels einer MA-6N Halterung (Narishige, Tokyo, Japan) fixiert und die Augen durch Auftragen von Bepanthen-Salbe (Hoffmann-La Roche, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung geschützt. Das Schädelfell wurde mit einer 70% Ethanol-Lösung desinfiziert und der Skalp im Anschluss großflächig mit einer Schere entfernt, ohne dabei den Schläfenmuskel zu verletzen. Lose Haare am Wundrand wurden mit sterilen Wattestäbchen beseitigt und die restliche Knochenhaut mit einem Skalpell sorgfältig entfernt. Um das Austreten von Blut zu verhindern und die Haftung des Dentalzementes zu verstärken wurde eine dünne Schicht Cyano-Veneer Flüssigkleber (Hager und Werken,

Duisburg, Deutschland) auf den Wundrand und den freigelegten Schädelknochen appliziert. Der Bereich des rechten Scheitelbeins, in dem die kraniale Fensterimplantation erfolgen soll, wurde hierbei ausgespart. Anschließend erfolgte eine kreisförmige Trepanation der Schädeldecke von 4 mm Durchmesser mithilfe eines C1-Master Dentalbohrers (Schick Dental, Schemmerhofen, Deutschland) über dem somatosensorischen Kortex (stereotaktische Koordinaten relativ zu Bregma: 2 mm kaudal und 2,5 mm lateral). Es wurde hierbei stets darauf geachtet, die Schädeldecke nur auszudünnen und nicht zu durchstoßen. Knochenpartikel wurden über eine elektrische Vakuumpumpe entfernt. Auf die Kraniotomie wurde schließlich ein Tropfen steriles PBS gesetzt und der Knochen vorsichtig mit einer gebogenen Pinzette abgehoben. Das PBS verhindert hierbei, dass der Kortex während der Eröffnung der Schädeldecke trocken liegt. Kleinere, durch die Kraniotomie verursachte Blutungen wurden durch Spülen mit PBS und Applikation von hämostatisch wirkendem Gelfoam (Pfizer, New York, USA) gestillt. Im Anschluss wurde ein kreisrundes Deckglas von 4 mm Durchmesser (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) passgenau in die Kraniotomie eingelassen und überschüssiges PBS mittels sterilen Sugi Saugtupfern (Kettenbach, Eschenburg, Deutschland) entfernt. Der Spalt zwischen Glas- und Knochen-Rand wurde anschließend mit Histoacryl Gewebekleber (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) versiegelt und die gesamte freigelegte Schädeldecke mit Cyano-Veneer Dentalzement (Hager Werken, Duisburg, Deutschland) bedeckt. Um den Kopf des Tieres später unter dem Mikroskop positionieren zu können, wurde im letzten Schritt der Operation ein aus Titan gefertigter Stift auf die Schädeldecke aufgebracht und durch Dentalzement fixiert. Bis zum Zeitpunkt des Erwachens wurde das Tier auf einem Heizkissen gebettet und anschließend in seinen Käfig überführt.

Tabelle 8: Materialien zur Fensterimplantation

Material	Hersteller, Sitz
Ketamin 10 %	WDT, Garbsen
Xylazin	Bayer HealthCare, Leverkusen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rimadyl (Wirkstoff Carprofen)	Pfizer, Berlin
Cefotaxim	Pharmore, Ibbenbüren
Isofluran (Forene)	Abbott, Wiesbaden

Inhalations-Narkosegerät Trajan808	Dräger Medical, Lübeck
Gasmaske für Mäuse	Eigenbau
Heizkissen für Mäuse	FST, Heidelberg
Mauskopfhalterung mit Ohrstiften zur Operation	Eigenbau
Bepanthen	Bayer HealthCare, Leverkusen
Stereomikroskop SZ51	Olympus, Hamburg
Kaltlichtquelle KL 1500 LED mit Schwanenhals-Lichtleiter	Schott, Mainz
Tischsterilisator FST 250 Hot Bead Sterilizer	FST, Heidelberg
Bohrer C1 Master	Schick Dentalgeräte, Schemmerhofen
Bohrkopf	Gebrüder Brasseler, Lemgo
Vakuum-Absaugvorrichtung	Eigenbau
Spritzen 1ml	VWR, Ismaning
Kanülen 27G/20G	VWR, Ismaning
PBS (pH 7,4)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol (70%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Operationsbesteck (Schere & Pinzetten)	FST, Heidelberg
Skalpell	Swann-Morton, Sheffield, UK
Wattestäbchen, steril	Paul Böttger, Bodenmais
hämostatischer Schaumstoff Gelfoam	Pfizer, Berlin
Saugtupfer Sugj, steril	Kettenbach, Eschenburg
Deckgläser (4 mm Durchmesser)	Gerhard Menzel, Braunschweig
Dentalkleber Cyano-Veneer Starter Kit	Hager & Werken, Duisburg
Titan-Stift	Eigenbau

***In vivo* Zwei-Photonen Mikroskopie**

Intravitalmikroskopische Untersuchungen erfolgten 3-4 Wochen nach Implantation des kranialen Fensters. Eine derart lange Erholungsphase stellt sicher, dass zum Zeitpunkt der Mikroskopie keine reaktive Gliose mehr vorliegt; eine unspezifische, neuropathologische Veränderung von Gliazellen, die durch die Kraniotomie verursacht werden kann. Zur Durchführung der Mikroskopie wurde die Maus mittels eines Gasgemisches aus 1% Isofluran (Abbot) in 95% O₂ und 5% CO₂ anästhesiert (Isofluranverdampfer: Trajan 808, Dräger) und die Augen des Tieres zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen-Salbe (Bayer) bedeckt. Schließlich wurde das Tiere mittels, des am Schädel aufgebracht Titan-Stiftes in einer

speziell-angefertigten Halterung fixiert und das Fenster mit einem Skalpell vorsichtig gereinigt. Anschließend wurde die Halterung samt Maus unter dem Mikroskop positioniert. Um die Körpertemperatur des Tieres bei konstanten 37°C aufrecht zu erhalten wurde während der maximal einstündigen Mikroskopie ein Heizkissen (Fine Science Tolls) verwendet. Der Mikroskopie-Aufbau setzte sich zusammen aus einem LSM 7 MP Laserscanning-Mikroskop (Zeiss) in Verbindung mit einem Axio Examiner Z1 Stativ samt integrierten, in X,Y,Z-verstellbaren, motorisiertem Tisch, einem W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC Immersions-Objektiv (Zeiss) und eingekoppelten Ti:Sa-Laser MaTai DeepSee eHP (Newport Spectra-Physics). Die 2-Photonen Anregung von eGFP erfolgte bei einer Wellenlänge von 920 nm. Das emittierte Fluoreszenz-Signal wurde hierbei durch einen Hauptfarbteiler (dichroitischer Spiegel Kurzpass 690, Zeiss) und im Detektionsstrahlengang durch einen Sperrfilter (Kurzpassfilter 690, Zeiss) vom Anregungslicht getrennt. Die Detektion erfolgte über einen direkt nachgeschalteten Galliumarsenidphosphid (GaAsP) Detektor (Zeiss).

Im Epifluoreszenz-Modus des Mikroskopes sind die Blutgefäße auf der Gehirnoberfläche deutlich erkennbar und deren charakteristisches Muster lässt sich somit zum Wiederauffinden der Position in nachfolgenden Mikroskopie-Sitzungen nutzen. Zu diesem Zweck wurde mit einer Powershot A95 Digitalkamera (Canon) über einen Kamerazugang am Mikroskopstativ Fotos der Blutgefäßstruktur aufgenommen. Im Anschluss wurden von den ausgewählten Positionen dreidimensionale Übersichtsaufnahmen in der Größe von 425 x 425 x 350 µm mit 0,41 x 0,41 x 0,3 µm XYZ-Auflösung angefertigt. Diese Übersichtsaufnahmen erfassten alle Pyramidalzellen der kortikalen Schicht II/III, so dass der Ursprung der apikalen Dendriten von Schicht II/III und Schicht V durch Nachverfolgen bis zum Zellkörper unterschieden werden konnte. Innerhalb dieser Aufnahmen wurden nun einzelne, möglichst parallel zur Gehirnoberfläche verlaufende Dendriten von Nervenzellen der Schicht V lokalisiert, um schließlich hochauflösende Bilder ihrer dendritischen Spines anzufertigen (0,16 x 0,16 x 1 µm in XYZ bei Zoom 6). Durch Abgleich der Blutgefäßmuster und Repositionierung der Übersichtsaufnahmen, konnten somit einzelne dendritische Spines über einen Zeitraum von mehreren Wochen wiederaufgefunden und mikroskopiert werden. Hierbei wurde stets darauf geachtet, die Laserleistung entsprechend anzupassen, um ein möglichst konstantes Fluoreszenzsignal zwischen den einzelnen Mikroskopie-Sitzungen zu

gewährleisten. Eine Laserleistung von 50 mW wurde dabei nie überschritten, um Phototoxizität zu verhindern.

4.10 Elektrophysiologie

Für die elektrophysiologischen Versuche wurden transgene Mäuse der Linie GFP-M im Alter von 12 Wochen verwendet. Die Tiere wurden entweder akut, oder chronisch über 16 Tage alle 12 h mit Vehikel bzw. Bace1 Inhibitor behandelt. 2-3 h nach Gabe der letzten Dosis wurden die Tiere mit Isofluran (1% in 95% O₂, 5% CO₂) narkotisiert und enthauptet. Die Gehirne wurden zügig entfernt und für 5-6 min inkubiert in einer eiskalten, begasten (95% O₂, 5% CO₂) Lösung (pH 7,4) bestehend aus: 75 mM Sucrose, 85 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 25 mM Glukose. Anschließend wurden mittels VT1200S Vibratom (Leica) 350 µm dicke, koronale Schnitte auf Höhe des somatosensorischen Kortex angefertigt und in eine Wärmekammer (35°C) überführt, die mit folgender Lösung befüllt wurde: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 0.5 CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 25 mM Glukose, pH 7,4. Nach 30 min wurden die Schnitte in künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, engl. für artificial cerebrospinal fluid) transferiert: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 25 mM Glukose. Elektrophysiologische Ableitungen von Pyramidalzellen der kortikalen Schicht V wurden unter kontinuierlicher Perfusion mit aCSF (begast mit 95% O₂, 5% CO₂) bei RT in einer Messkammer vorgenommen, welche zuvor auf dem Objektisch eines aufrechten BX51 Mikroskops (Olympus) fixiert wurde. Patch-Pipetten wurden aus Borosilikatglas (HEKA Electronics) mit Hilfe eines P87 Mikropipettenpullers (Sutter Instrument) gezogen und mit Intrazellulärlösung befüllt: 140 mM CsCH₃O₃S, 10 mM KCl, 5 mM NaCl, 2 mM MgATP, 0.01 mM EGTA, 10 mM HEPES; 280-290 mOsm, pH 7.3. Alle Ableitungen wurden bei einem Haltepotential von -65 mV durchgeführt, unter Korrektur des Diffusionspotentials von +8 mV. Nur eGFP exprimierende pyramidale Nervenzellen der kortikalen Schicht V des somatosensorischen Kortex, wurden in die Studie einbezogen. GABAA/Glyzin Rezeptor Blocker Picrotoxin (200 µM in DMSO) versetzte Badlösung wurde genutzt, um spontane exzitatorische postsynaptische Ströme (sEPSC) zu isolieren. Durch Zugabe von Tetrodotoxin (TTX, 0.5-1.0 µM) wurde weiterhin Aktionspotential-abhängige Netzwerkaktivität blockiert, um die Analyse von mini-EPSCs (mEPSC) zu ermöglichen. Zur Aufnahme evozierter exzitatorischer postsynaptischer Feldpotentiale (fEPSP, engl für field excitatory postsynaptic

potential) im Hippocampus wurden koronale Schnitte (Schnittdicke 400 μm) nach dem oben beschriebenen Protokoll angefertigt. Eine bipolare Stimulationselektrode wurde innerhalb des *stratum radiatum* der CA2-CA3 Region platziert um die Schaffer-Kollaterale mit 0,2 ms Pulsen bei 0,033 Hz (A-360, WPI) zu stimulieren. Die evozierten Feldpotentiale wurden im *stratum radiatum* der CA1 Region aufgenommen. Strompulse zunehmender Stärke (jeweils + 0,2 mA) wurden genutzt um das Stimulus-Antwort Verhalten zu analysieren. Langzeit-Potenzierung (LTP) wurde induziert durch Tetanisierung der Schaffer-Kollaterale mit 10 Impulsfolgen von jeweils 10 Pulsen bei 100 Hz und einem Intervall von 2 s zwischen den einzelnen Impulsfolgen. sEPSC und mEPSC wurden mittels Synaptosoft Software (Synaptosoft, Co.) bzw. der relative Anstieg und die Spitzenamplitude der evozierten fEPSPs mittels FitMaster (HEKA Electronics) ausgewertet.

Tabelle 9: Materialien zur Elektrophysiologie

Material	Hersteller, Sitz
Borosilikatglas	HEKA Electronics, Lambrecht
BX51 Mikroskop	Olympus, Hamburg
Caesium Methansulfonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calciumchlorid	Carl-Roth, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FitMaster	HEKA Electronics
Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	Applichem, Darmstadt
Inhalations-Narkosegerät Trajan808	Dräger Medical, Lübeck
Isofluran	Abbot, Wiesbaden
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Carl-Roth, Karlsruhe
Mg.ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl-Roth, Karlsruhe
P87 Mikropipettenpuller	Sutter Instrument, Novato

Picrotoxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sulfobutyl Ether 7- β -Cyclodextrin	Captisol, La Jolla
Tetrodotoxin	BioTrend, Köln
VT1200S Vibratom	Leica, Wetzlar

4.11 Verhaltensversuche

Alle Verhaltensstudien wurden von Dr. rer. nat. Merce Masana durchgeführt und mit ihrer freundlichen Genehmigung in die Arbeit aufgenommen.

Den Versuchstieren wurden alle 12 h über 21 Tage 100 mg/kg des Bace1 Inhibitors SCH1682496 intragastral über eine Schlundiersonde verabreicht. Die Verhaltensversuche fanden zwischen 9⁰⁰ und 14⁰⁰ Uhr an den Behandlungs-Tagen 14 – 21 statt, jeweils 1 h nach Verabreichung des Inhibitors. Die Tiere wurden zuvor eine Woche lang an den Versuchs-Raum gewöhnt und während der verhaltensorientierten Aufgaben mittels einer Kamera kontinuierlich überwacht (Anymaze 4.20, Stoelting). Die Verhaltensversuche fanden in der folgenden Reihenfolge statt: (I) Offenfeldtest, (II) Y-Labyrinth, (III) Objekterkennungstest, (IV) erhöhtes Plus-Labyrinth. Für den Offenfeldtest wurden umwandete Räume aus grauem Polyvinylchlorid verwendet, die während des Tests beleuchtet wurden (20 lux im Zentrum). Allgemeine lokomotorische Aktivität (zurückgelegte Distanz) wurde für 15 min verfolgt und in 5 min Segmente unterteilt, wobei die Latenzzeit bis zum Eintritt in die innere Zone und die Zeit, die die Tiere in der inneren (20 x 20 cm) bzw. äußeren Zone verbrachten, gemessen wurde. Zur Beurteilung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses wurde das spontane Wechselverhalten im Y-Labyrinth analysiert. Das Y-Labyrinth bestand aus drei gleichmäßig beleuchteten Armen (30 x 10 x 15 cm, 10 lux) aus grauem Polyvinylchlorid, die in einem Winkel von 120° zueinander angeordnet und mit visuellen Orientierungsmarken versehen waren. Nachdem das Versuchstier in das Zentrum des Y-Labyrinths platziert wurde, durfte es die Umgebung 10 min lang ungehindert untersuchen. Zwischen den Versuchen wurde das Gangsystem des Labyrinths gereinigt, um auszuschließen, dass sich die Tiere anhand von Duftmarken orientieren. Eine Alternation galt als abgeschlossen, sobald alle drei Arme in einer konsekutiven Reihenfolge von der Maus aufgesucht wurden. Der Prozentsatz der spontanen Alternationen berechnet sich hierbei durch die Anzahl aller Alternationen durch

die Anzahl aller Armbesuche minus 2. Eine mögliche Beeinträchtigung des Kurzzeit-Gedächtnisses durch pharmakologische Bace1 Inhibition wurde mittels Objekterkennungstest ermittelt. Einen Tag vor Versuchs-Beginn wurden die Tiere hierzu zweimal für 10 min an eine leere Versuchsbox gewöhnt. Die Versuchsbox bestand aus einem Standard Typ 3 Käfig (45 x 25 x 15 cm, 10 lux), dessen Boden mit Sägespänen bedeckt und dessen Wände mit schwarzen Karton ausgekleidet waren. Für den Objekterkennungstest wurden zwei Objekte aus Lego-Steinen derart konstruiert, dass sie sich zwar in Größe ähnelten, aber in Form und Farbe unterschieden. Während des Lernversuches wurde den Mäusen gestattet zwei identische Kopien des ersten Objekts für 10 min zu untersuchen. Der Wiederholungsversuch begann 30 min nach Abschluss des Lernversuchs. Zwischen den einzelnen Versuchen wurden die Tiere in Ihre Mauerkäfige zurückgebracht und alle Objekte gesäubert, um Duftstoffe als mögliche Orientierungsmarker zu entfernen. Während des 5-minütigen Wiederholungsversuchs wurde den Mäusen nun eine Kopie des bekannten Objekts zusammen mit einem neuen Objekt präsentiert. Berührte die Maus das zu untersuchende Objekt direkt mit der Schnauze oder den Vorderpfoten, so wurde dies als Explorationsverhalten gewertet. Zur Bestimmung des Erkennungsindex wurde der prozentuale Unterschied des Explorationsverhaltens gegenüber dem alten und neuen Objekt berechnet. Als erhöhtes Plus-Labyrinth wurde eine beleuchtete (40 lux), 50 cm über dem Boden liegende Vorrichtung verwendet. Die Apparatur bestand dabei aus einer plusförmigen Plattform mit zwei gegenüberliegenden, offenen (30 x 5 x 0.5 cm) und zwei gegenüberliegenden, geschlossenen (30 x 5 x 15 cm) Armen. Während des 6-minütigen Versuchs wurde die Zeit gemessen, in der das Tier sich in den offenen und geschlossenen Armen aufhielt.

4.12 Bildanalyse und quantitative Auswertung dendritischer Spines

Vor der Auswertung wurden alle Daten hinsichtlich ihrer entsprechenden Behandlungskohorte verblindet. Zur Analyse der Dichte und strukturellen Plastizität dendritischer Spines wurde die ZEN 2009 Light Edition Software (Zeiss) verwendet. Je nach Bedarf wurden Helligkeit und Kontrast der Rohdaten angepasst, bevor Spines manuell markiert und ausgezählt wurden. Da die Z-Auflösung auf 1 µm limitiert war, wurden primär lateral von den Dendriten ausgehende Fortsätze erfasst. Durch chronologischen Vergleich der einzelnen Aufnahmezeitpunkte wurden stabile, neu entstandene und verlorene Spines

unterschieden. Dabei wurden Spines als identisch bzw. stabil definiert, wenn ihre Position sich zwischen zwei Aufnahmezeitpunkten nicht mehr als 1 μm entlang des Dendriten veränderte. Zur Ermittlung der Spine-Dichte (Spines/ μm) wurde die Länge des analysierten Dendriten gemessen.

Zur Morphologieanalyse präsynaptischer Boutons wurden konfokale Bildstapel vom hippocampalen Moosfaser-Weg, mit einer Auflösung von 0.1 x 0.1 μm in Imaris geladen. Die präsynaptischen Elemente mussten anschließend halbautomatisch identifiziert und die Oberfläche ausgehend von den Bilddaten drei-dimensional rekonstruiert. Im Anschluss wurden die gerenderten Objekte mittels einem, in MATLAB implementierten Algorithmus ausgelesen. Die Analyse lieferte im Anschluss Daten zum Volumen allen Synapsen, die in Prism 5 übertragen und ausgewertet wurden.

4.13 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Messdaten wurde in Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA) erfasst und mittels Prism Software 5.04 (Graphpad, San Diego, Kalifornien) statistisch ausgewertet. Unter Annahme einer Normalverteilung der Daten wurden Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen mittels ungepaarten, zweiseitigem Student *t*-Test geprüft. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen so wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, engl.: **analysis of variance**) mit anschließendem Bonferroni post hoc Test durchgeführt. Soweit nicht anders deklariert, werden die Ergebnisse als Mittelwert der Versuchsgruppen \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM, engl.: **standard error of mean**) angegeben. Die ermittelten p-Werte geben an mit welcher Wahrscheinlichkeit (engl.: **probability**) sich zwei Ereignisse nicht signifikant unterscheiden. Als statistisch signifikant definiert wurde hierbei ein p-Wert von $<0,05$. Die graphische Darstellung und das Arrangement der Daten erfolgte in Illustrator CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

4.14 Software

Tabelle 10: Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems
AutoQuant X2	Media Cybernetics

FitMaster	HEKA Electronics
Imaris 7.5.1	Bitplane Imaris
LSM Image Browser 4.2.0	Zeiss
MATLAB	MathWorks
Microsoft Excel 2010	Microsoft
Microsoft Word 2010	Microsoft
PatchMaster für EPC10	HEKA Electronics
GraphPad PRISM 5	Graphpad Software
Synptosoft	Synptosoft
Zen 2009	Zeiss

5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histopathologische Merkmale des ersten, beschriebenen Alzheimer-Patienten Auguste Deter.....	4
Abbildung 2: Sequentielle Prozessierungswege des Amyloid-Vorläuferproteins APP.....	9
Abbildung 3: Histologische Gehirnpräparate im frühen 20. vs. 21. Jahrhundert.	23
Abbildung 4: Vereinfachtes Jabłoński-Diagramm zur Beschreibung der Ein- bzw. Zwei-Photonen Anregung.....	24
Abbildung 5: Kranielles Fenster.....	25
Abbildung 6: BACE1 Lokalisation im murinen Gehirn.	26
Abbildung 7: Größenverteilung der axonalen Moosfaserterminale in der hippokampalen CA3 Region.	28
Abbildung 8: Hippokampale, dendritische Spine-Dichten in jungen bzw. adulten <i>Bace1^{+/+}</i> , <i>Bace1^{+/-}</i> und <i>Bace1^{-/-}</i> Mäusen.....	29
Abbildung 9: Die pharmakologische Inhibition von BACE1 reduziert effektiv die A β -Level.	31
Abbildung 10: Die chronische Behandlung mit hohen Dosen SCH1682496 verursacht Defizite in der Fellpigmentierung.	32
Abbildung 11: BACE1 Inhibitor SCH1682496 beeinträchtigt die strukturelle Dynamik dendritischer Spines <i>in vivo</i>	34
Abbildung 12: BACE1 Inhibitor LY2811376 beeinträchtigt die strukturelle Dynamik dendritischer Spines <i>in vivo</i>	35
Abbildung 13: BACE1 Inhibitor SCH1682496 verändert nicht die strukturelle Dynamik dendritischer Spines von <i>Bace1^{-/-}</i> Mäusen <i>in vivo</i>	36

Abbildung 14: Die BACE1 Inhibitoren SCH1682496 und LY2811376 vermindern die exzitatorische synaptische Transmission in kortikalen Pyramidalzellen. 38

Abbildung 15: Weder eine chronische SCH1682496 Behandlung in *Bace1*^{-/-}, noch eine akute SCH1682496 Applikation in *Bace1*^{+/+} Mäusen verändern die exzitatorische synaptische Transmission in kortikalen Pyramidalzellen. 39

Abbildung 16: Die pharmakologische Inhibition von BACE1 vermindert die Langzeit-Potenzierung in hippocampalen CA1 Neuronen. 41

Abbildung 17: Weder eine chronische SCH1682496 Behandlung in *Bace1*^{-/-}, noch eine akute SCH1682496 Applikation in *Bace1*^{+/+} Mäusen verändern die späte LTP Phase in hippocampalen CA1 Neuronen..... 42

Abbildung 18: Effekte des BACE1 Inhibitors SCH1682496 auf kognitive Funktionen. 45

Abbildung 19: BACE1-Level sind in unmittelbarer Nähe zu Aβ-Plaques erhöht. 53

Abbildung 20: Darstellung der DNS-Fragmente zur Genotypisierung der transgenen Mauslinien. 58

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer, PCR-Ansatz und Thermozyklen für die Genotypisierung von B6.129-*Bace1*^{tm1Pcw}/J 59

Tabelle 2: Primer, PCR-Ansatz und Thermozyklen für die Genotypisierung der B6.Cg-Tg (Thy1-EGFP)MJrs/J 60

Tabelle 3: Materialien zur Maus-Genotypisierung..... 61

Tabelle 4: Pufferlösung zur Maus-Genotypisierung..... 62

Tabelle 5: Einbettungsprotokoll 68

Tabelle 6: Materialien zur Immunhistochemie 69

Tabelle 7: Pufferlösungen zur Immunhistochemie 70

Tabelle 8: Materialien zur Fensterimplantation..... 72

Tabelle 9: Materialien zur Elektrophysiologie..... 76

Tabelle 10: Software..... 79

7. Literaturverzeichnis

1. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Zeitschr Psychiatr* 146–148 (1907).
2. Sütterlin, S., Hoßmann, I. & Klingholz, R. *Demenz-Report*. (Techn. Ber. Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2011).

3. Batsch, N. L. & Marks, M. S. *World Alzheimer Report 2012*. (Techn. Ber., 2012).
4. Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S. S. & Ransohoff, R. M. *World Alzheimer Report 2011*. (Tech. Ber.).
5. Weintraub, S., Wicklund, A. H. & Salmon, D. P. The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006171 (2012).
6. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **298**, 789–791 (2002).
7. Bateman, R. J. *et al.* Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **367**, 795–804 (2012).
8. Dickerson, B. C. *et al.* Alzheimer-signature MRI biomarker predicts AD dementia in cognitively normal adults. *Neurology* **76**, 1395–1402 (2011).
9. Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**, 425–427 (1998).
10. Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. 'Fatal attractions' of proteins. A comprehensive hypothetical mechanism underlying Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **924**, 62–67 (2000).
11. Terry, R. D. Neuropathological changes in Alzheimer disease. *Prog. Brain Res.* **101**, 383–390 (1994).
12. Iqbal, K. & Grundke-Iqbal, I. Neurofibrillary pathology leads to synaptic loss and not the other way around in Alzheimer disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* **4**, 235–238 (2002).
13. Beach, T. G., Walker, R. & McGeer, E. G. Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia* **2**, 420–436 (1989).
14. Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S. & Selkoe, D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J. Neuroimmunol.* **24**, 173–182 (1989).
15. Rogers, J., Lubner-Narod, J., Styren, S. D. & Civin, W. H. Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **9**, 339–349 (1988).
16. Virchow, R. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* **6**, 135–138 (1854).
17. Friedreich, P. D. N. & Kekulé, P. D. A. Zur Amyloidfrage. *Arch. Für Pathol. Anat. Physiol. Für Klin. Med.* **16**, 50–65 (1859).
18. Glenner, G. G. & Wong, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 885–890 (1984).
19. Masters, C. L. *et al.* Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4245–4249 (1985).
20. Cruz, L. *et al.* Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 7612–7616 (1997).
21. Cummings, J. L., Vinters, H. V., Cole, G. M. & Khachaturian, Z. S. Alzheimer's disease: etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology* **51**, S2–17; discussion S65–67 (1998).
22. Rak, M., Del Bigio, M. R., Mai, S., Westaway, D. & Gough, K. Dense-core and diffuse Abeta plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy. *Biopolymers* **87**, 207–217 (2007).
23. Dickson, D. W. The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 321–339 (1997).

24. Thal, D. R. & Braak, H. [Post-mortem diagnosis of Alzheimer's disease]. *Pathol.* **26**, 201–213 (2005).
25. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**, 741–766 (2001).
26. Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M. & Braak, H. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**, 1791–1800 (2002).
27. Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. & Hyman, B. T. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631–631 (1992).
28. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP & et al. NEocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* **52**, 81–88 (1995).
29. Giannakopoulos, P. *et al.* Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* **60**, 1495–1500 (2003).
30. Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. & Kirschner, M. W. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 1858–1862 (1975).
31. Wischik, C. M. *et al.* Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4506–4510 (1988).
32. Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A. & Mandelkow, E. Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J. Biol. Chem.* **269**, 24290–24297 (1994).
33. Mandelkow, E. M. *et al.* Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiol. Aging* **16**, 355–362; discussion 362–363 (1995).
34. Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1887–1902 (1995).
35. Kar, S., Fan, J., Smith, M. J., Goedert, M. & Amos, L. A. Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J.* **22**, 70–77 (2003).
36. Drubin, D. G. & Kirschner, M. W. Tau protein function in living cells. *J. Cell Biol.* **103**, 2739–2746 (1986).
37. Cleveland, D. W., Hwo, S.-Y. & Kirschner, M. W. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.* **116**, 227–247 (1977).
38. Esmali-Azad, B., McCarty, J. H. & Feinstein, S. C. Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 4)**, 869–879 (1994).
39. Litman, P., Barg, J., Rindzoonski, L. & Ginzburg, I. Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* **10**, 627–638 (1993).
40. Ebner, A. *et al.* Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* **143**, 777–794 (1998).
41. Köpke, E. *et al.* Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **268**, 24374–24384 (1993).
42. Bancher, C. *et al.* Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **477**, 90–99 (1989).

43. Braak, F., Braak, H. & Mandelkow, E.-M. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **87**, 554–567 (1994).
44. Carmel, G., Mager, E. M., Binder, L. I. & Kuret, J. The Structural Basis of Monoclonal Antibody Alz50's Selectivity for Alzheimer's Disease Pathology. *J. Biol. Chem.* **271**, 32789–32795 (1996).
45. Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R. & Hoesen, G. W. V. The Topographical and Neuroanatomical Distribution of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques in the Cerebral Cortex of Patients with Alzheimer's Disease. *Cereb. Cortex* **1**, 103–116 (1991).
46. Su, J. H., Cummings, B. J. & Cotman, C. W. Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **625**, 228–237 (1993).
47. Holtzman, D. M., Morris, J. C. & Goate, A. M. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci. Transl. Med.* **3**, 77sr1 (2011).
48. Braak, H. & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **82**, 239–259 (1991).
49. Nelson, P. T. *et al.* Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **71**, 362–381 (2012).
50. Huang, Y. & Mucke, L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* **148**, 1204–1222 (2012).
51. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006189 (2011).
52. Hof, P. R., Cox, K. & Morrison, J. H. Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J. Comp. Neurol.* **301**, 44–54 (1990).
53. Whitehouse, P. J. *et al.* Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**, 1237–1239 (1982).
54. Gómez-Isla, T. *et al.* Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **16**, 4491–4500 (1996).
55. Terry, R. D. *et al.* Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **30**, 572–580 (1991).
56. Grutzendler, J., Helmin, K., Tsai, J. & Gan, W.-B. Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1097**, 30–39 (2007).
57. Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L. & Svoboda, K. Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 313–353 (2002).
58. Yuste, R. & Bonhoeffer, T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1071–1089 (2001).
59. Yuste, R. Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron* **71**, 772–781 (2011).
60. DeKosky, S. T. & Scheff, S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* **27**, 457–464 (1990).
61. Scheff, S. W., DeKosky, S. T. & Price, D. A. Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **11**, 29–37 (1990).
62. Masliah, E. *et al.* Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **174**, 67–72 (1994).
63. Kang, J. *et al.* The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733–736 (1987).

64. Campion, D. *et al.* Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 664–670 (1999).
65. Chartier-Harlin, M. C. *et al.* Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* **353**, 844–846 (1991).
66. Goate, A. *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704–706 (1991).
67. Nilsberth, C. *et al.* The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **4**, 887–893 (2001).
68. Scheuner, D. *et al.* Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2**, 864–870 (1996).
69. Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184–185 (1992).
70. Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K. & Masters, C. L. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem. Int.* **36**, 175–184 (2000).
71. Wasco, W. *et al.* Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10758–10762 (1992).
72. Wasco, W. *et al.* Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat. Genet.* **5**, 95–100 (1993).
73. Rohan de Silva, H. A. *et al.* Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **47**, 147–156 (1997).
74. Kirazov, E., Kirazov, L., Bigl, V. & Schliebs, R. 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. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* **19**, 287–296 (2001).
75. Koo, E. H. *et al.* Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1561–1565 (1990).
76. Schubert, W. *et al.* Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* **563**, 184–194 (1991).
77. Shigematsu, K., McGeer, P. L. & McGeer, E. G. Localization of amyloid precursor protein in selective postsynaptic densities of rat cortical neurons. *Brain Res.* **592**, 353–357 (1992).
78. Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006270 (2012).
79. Haass, C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* **23**, 483–488 (2004).
80. Yamashiro, D. J. & Maxfield, F. R. Acidification of endocytic compartments and the intracellular pathways of ligands and receptors. *J. Cell. Biochem.* **26**, 231–246 (1984).
81. Fukumoto, H., Cheung, B. S., Hyman, B. T. & Irizarry, M. C. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **59**, 1381–1389 (2002).
82. De Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **38**, 9–12 (2003).
83. Shoji, M. *et al.* Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126–129 (1992).

84. Haass, C. & Selkoe, D. J. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* **75**, 1039–1042 (1993).
85. Sgourakis, N. G., Yan, Y., McCallum, S., Wang, C. & Garcia, A. E. The Alzheimer's peptides A β 40 and 42 adopt distinct conformations in water: A combined MD / NMR study. *J. Mol. Biol.* **368**, 1448–1457 (2007).
86. Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T. Seeding 'one-dimensional crystallization' of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055–1058 (1993).
87. Jarrett, J. T., Berger, E. P. & Lansbury, P. T. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry (Mosc.)* **32**, 4693–4697 (1993).
88. Mann, D. M. *et al.* Predominant deposition of amyloid-beta 42(43) in plaques in cases of Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage associated with mutations in the amyloid precursor protein gene. *Am. J. Pathol.* **148**, 1257–1266 (1996).
89. Kuhn, P.-H. *et al.* ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* **29**, 3020–3032 (2010).
90. Esch, F. S. *et al.* Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* **248**, 1122–1124 (1990).
91. Sisodia, S. S., Koo, E. H., Beyreuther, K., Unterbeck, A. & Price, D. L. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* **248**, 492–495 (1990).
92. Burgold, S. Charakterisierung der in vivo Wachstumskinetik amyloider Plaques und der synaptischen Pathologie mit Evaluierung eines immuntherapeutischen Ansatzes in einem Alzheimer-Mausmodell. (LMU München, 2013). at <<https://edoc.ub.uni-muenchen.de/16261/>>
93. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353–356 (2002).
94. Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487–498 (1991).
95. Haass, C. & Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112 (2007).
96. Goldgaber, D., Lerman, M. I., McBride, O. W., Saffiotti, U. & Gajdusek, D. C. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* **235**, 877–880 (1987).
97. Robakis, N. K., Ramakrishna, N., Wolfe, G. & Wisniewski, H. M. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 4190–4194 (1987).
98. Tanzi, R. E. *et al.* Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* **235**, 880–884 (1987).
99. Olson, M. I. & Shaw, C. M. Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain J. Neurol.* **92**, 147–156 (1969).
100. Lai, F. & Williams, R. S. A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. *Arch. Neurol.* **46**, 849–853 (1989).
101. Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M. & Wen, G. Y. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* **17**, 278–282 (1985).
102. Mullan, M. *et al.* A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat. Genet.* **1**, 345–347 (1992).

103. O'Brien, R. J. & Wong, P. C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 185–204 (2011).
104. Shen, J. & Kelleher, R. J. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 403–409 (2007).
105. Kim, J., Basak, J. M. & Holtzman, D. M. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* **63**, 287–303 (2009).
106. Jonsson, T. *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96–99 (2012).
107. Poorkaj, P. *et al.* Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* **43**, 815–825 (1998).
108. Spillantini, M. G., Bird, T. D. & Ghetti, B. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **8**, 387–402 (1998).
109. Goedert, M., Ghetti, B. & Spillantini, M. G. Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006254 (2012).
110. Lewis, J. *et al.* Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **293**, 1487–1491 (2001).
111. Nussbaum, J. M. *et al.* Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . *Nature* **485**, 651–655 (2012).
112. Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. & Ferreira, A. Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6364–6369 (2002).
113. Roberson, E. D. *et al.* Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **316**, 750–754 (2007).
114. Mairet-Coello, G. *et al.* The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A β oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* **78**, 94–108 (2013).
115. Ittner, L. M. & Götz, J. Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 65–72 (2011).
116. Ittner, L. M. *et al.* Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **142**, 387–397 (2010).
117. Selkoe, D. J. Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nat. Med.* **17**, 1060–1065 (2011).
118. Bittner, T. *et al.* β -Secretase Inhibition Reduces Spine Density In Vivo via an Amyloid Precursor Protein-Dependent Pathway. *J. Neurosci.* **29**, 10405–10409 (2009).
119. May, P. C. *et al.* Robust central reduction of amyloid- β in humans with an orally available, non-peptidic β -secretase inhibitor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 16507–16516 (2011).
120. Holmes, C. *et al.* Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* **372**, 216–223 (2008).
121. Doody, R. S. *et al.* A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **369**, 341–350 (2013).
122. Callaway, E. Alzheimer's drugs take a new tack. *Nature* **489**, 13–14 (2012).
123. Garber, K. Genentech's Alzheimer's antibody trial to study disease prevention. *Nat. Biotechnol.* **30**, 731–732 (2012).
124. Mullard, A. Sting of Alzheimer's failures offset by upcoming prevention trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 657–660 (2012).
125. Hussain, I. *et al.* Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 419–427 (1999).

126. Sinha, S. *et al.* Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537–540 (1999).
127. Vassar, R. *et al.* β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science* **286**, 735–741 (1999).
128. Yan, R. *et al.* Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533–537 (1999).
129. Lin, X. *et al.* Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 1456–1460 (2000).
130. Bennett, B. D. *et al.* Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem.* **275**, 20647–20651 (2000).
131. Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R. & Wong, P. C. The β -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *J. Neurosci.* **29**, 12787–12794 (2009).
132. Vassar, R. *et al.* Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects. *J. Neurochem.* **130**, 4–28 (2014).
133. Yan, R., Han, P., Miao, H., Greengard, P. & Xu, H. The transmembrane domain of the Alzheimer's beta-secretase (BACE1) determines its late Golgi localization and access to beta - amyloid precursor protein (APP) substrate. *J. Biol. Chem.* **276**, 36788–36796 (2001).
134. Kalvodova, L. *et al.* Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J. Biol. Chem.* **280**, 36815–36823 (2005).
135. Kinoshita, A. *et al.* Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J. Cell Sci.* **116**, 3339–3346 (2003).
136. Bennett, B. D. *et al.* A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J. Biol. Chem.* **275**, 37712–37717 (2000).
137. Benjannet, S. *et al.* Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* **276**, 10879–10887 (2001).
138. Vetrivel, K. S. *et al.* Alzheimer disease A β production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **284**, 3793–3803 (2009).
139. Pastorino, L., Ikin, A. F., Nairn, A. C., Pursnani, A. & Buxbaum, J. D. The carboxyl-terminus of BACE contains a sorting signal that regulates BACE trafficking but not the formation of total A β . *Mol. Cell. Neurosci.* **19**, 175–185 (2002).
140. Mitterreiter, S. *et al.* Bepiridil and amiodarone simultaneously target the Alzheimer's disease beta- and gamma-secretase via distinct mechanisms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 8974–8983 (2010).
141. Kuhn, P.-H. *et al.* Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J.* **31**, 3157–3168 (2012).
142. Savonenko, A. V. *et al.* Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5585–5590 (2008).
143. Hitt, B. D., Jaramillo, T. C., Chetkovich, D. M. & Vassar, R. BACE1 $^{-/-}$ mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Mol. Neurodegener.* **5**, 31 (2010).

144. Laird, F. M. *et al.* BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 11693–11709 (2005).
145. Gunnarsen, J. M. *et al.* Sez-6 Proteins Affect Dendritic Arborization Patterns and Excitability of Cortical Pyramidal Neurons. *Neuron* **56**, 621–639 (2007).
146. Kim, D. Y., Gersbacher, M. T., Inquimbert, P. & Kovacs, D. M. Reduced sodium channel Na(v)1.1 levels in BACE1-null mice. *J. Biol. Chem.* **286**, 8106–8116 (2011).
147. Hu, X. *et al.* BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 8819–8829 (2010).
148. Kim, D. Y. *et al.* BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat. Cell Biol.* **9**, 755–764 (2007).
149. Naus, S. *et al.* Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* **279**, 16083–16090 (2004).
150. Montag-Sallaz, M., Schachner, M. & Montag, D. Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation, and altered behavior in mice deficient for the close homolog of L1. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7967–7981 (2002).
151. Heyden, A., Angenstein, F., Sallaz, M., Seidenbecher, C. & Montag, D. Abnormal axonal guidance and brain anatomy in mouse mutants for the cell recognition molecules close homolog of L1 and NgCAM-related cell adhesion molecule. *Neuroscience* **155**, 221–233 (2008).
152. Hitt, B. *et al.* β -Site Amyloid Precursor Protein (APP)-cleaving Enzyme 1 (BACE1)-deficient Mice Exhibit a Close Homolog of L1 (CHL1) Loss-of-function Phenotype Involving Axon Guidance Defects. *J. Biol. Chem.* **287**, 38408–38425 (2012).
153. Crusio, W. E. & Schwegler, H. Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav. Brain Funct. BBF* **1**, 3 (2005).
154. Willem, M. *et al.* Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* **314**, 664–666 (2006).
155. Birchmeier, C. & Nave, K.-A. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia* **56**, 1491–1497 (2008).
156. Cheret, C. *et al.* Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. *EMBO J.* **32**, 2015–2028 (2013).
157. Luo, Y. *et al.* Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.* **4**, 231–232 (2001).
158. Ohno, M. *et al.* BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron* **41**, 27–33 (2004).
159. Hong, L. *et al.* Crystal structure of memapsin 2 (beta-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. *Biochemistry (Mosc.)* **41**, 10963–10967 (2002).
160. McConlogue, L. *et al.* Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* **282**, 26326–26334 (2007).
161. Yang, L.-B. *et al.* Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med.* **9**, 3–4 (2003).
162. Zhang, X.-M. *et al.* Beta-secretase-1 elevation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease is associated with synaptic/axonal pathology and amyloidogenesis: implications for neuritic plaque development. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 2271–2283 (2009).

163. Yau, W.-Y. W. *et al.* Longitudinal assessment of neuroimaging and clinical markers in autosomal dominant Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* **14**, 804–813 (2015).
164. Tarawneh, R. & Holtzman, D. M. The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006148 (2012).
165. Salzer, J. L. Axonal regulation of Schwann cell ensheathment and myelination. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* **17 Suppl 3**, 14–19 (2012).
166. Cajal, S. Ramón. Estructura de los centros nerviosos de las aves. **1**, 1–10 (1888).
167. Garcia-Lopez, P., Garcia-Marin, V. & Freire, M. The histological slides and drawings of cajal. *Front. Neuroanat.* **4**, 9 (2010).
168. García-López, P., García-Marín, V. & Freire, M. Three-dimensional reconstruction and quantitative study of a pyramidal cell of a Cajal histological preparation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 11249–11252 (2006).
169. Tang, Y., Nyengaard, J. R., De Groot, D. M. & Gundersen, H. J. Total regional and global number of synapses in the human brain neocortex. *Synap. N. Y. N* **41**, 258–273 (2001).
170. Harris, K. M., Jensen, F. E. & Tsao, B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **12**, 2685–2705 (1992).
171. Peters, A. & Kaiserman-Abramof, I. R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* **127**, 321–355 (1970).
172. Zuo, Y., Lin, A., Chang, P. & Gan, W.-B. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron* **46**, 181–189 (2005).
173. Harris, K. M. & Weinberg, R. J. Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
174. Harris, K. M. & Kater, S. B. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 341–371 (1994).
175. Sheng, M., Sabatini, B. L. & Südhof, T. C. Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
176. Hotulainen, P. & Hoogenraad, C. C. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* **189**, 619–629 (2010).
177. Hering, H. & Sheng, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 880–888 (2001).
178. Yuste, R. Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* **36**, 429–449 (2013).
179. Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D. & Matus, A. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* **20**, 847–854 (1998).
180. Engert, F. & Bonhoeffer, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**, 66–70 (1999).
181. Oertner, T. G. & Matus, A. Calcium regulation of actin dynamics in dendritic spines. *Cell Calcium* **37**, 477–482 (2005).
182. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R. & Kasai, H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* **429**, 761–766 (2004).
183. Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A. & Hayashi, Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* **7**, 1104–1112 (2004).

184. Zhou, Q., Homma, K. J. & Poo, M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* **44**, 749–757 (2004).
185. Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B. & Bonhoeffer, T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* **44**, 759–767 (2004).
186. Bourne, J. & Harris, K. M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 381–386 (2007).
187. Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N. & Nakahara, H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* **26**, 360–368 (2003).
188. Hebb, D. The organization of behavior: a neuropsychological theory. (1949).
189. Ho, V. M., Lee, J.-A. & Martin, K. C. The cell biology of synaptic plasticity. *Science* **334**, 623–628 (2011).
190. Trachtenberg, J. T. *et al.* Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* **420**, 788–794 (2002).
191. Grutzendler, J., Kasthuri, N. & Gan, W.-B. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* **420**, 812–816 (2002).
192. Holtmaat, A. J. G. D. *et al.* Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* **45**, 279–291 (2005).
193. Knott, G. W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E. & Svoboda, K. Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat. Neurosci.* **9**, 1117–1124 (2006).
194. Hofer, S. B., Mrsic-Flogel, T. D., Bonhoeffer, T. & Hübener, M. Experience leaves a lasting structural trace in cortical circuits. *Nature* **457**, 313–317 (2009).
195. Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G. W., Welker, E. & Svoboda, K. Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* **441**, 979–983 (2006).
196. Keck, T. *et al.* Massive restructuring of neuronal circuits during functional reorganization of adult visual cortex. *Nat. Neurosci.* **11**, 1162–1167 (2008).
197. Wilbrecht, L., Holtmaat, A., Wright, N., Fox, K. & Svoboda, K. Structural plasticity underlies experience-dependent functional plasticity of cortical circuits. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 4927–4932 (2010).
198. Zuo, Y., Yang, G., Kwon, E. & Gan, W.-B. Long-term sensory deprivation prevents dendritic spine loss in primary somatosensory cortex. *Nature* **436**, 261–265 (2005).
199. Fu, M. & Zuo, Y. Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends Neurosci.* **34**, 177–187 (2011).
200. Xu, T. *et al.* Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* **462**, 915–919 (2009).
201. Köhler, A. Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. **21**, 129–165; 273–304 (1904).
202. Stokes, G. G. On the Change of Refrangibility of Light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **142**, 463–562 (1852).
203. Jablonski, A. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Z. Phys.* **94**, 38–44 (1935).
204. Jablonski, A. Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes. **131**, 839–840 (1933).
205. Chance, B., Cohen, P., Jobsis, F. & Schoener, B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* **137**, 499–508 (1962).
206. Shibuki, K. *et al.* Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J. Physiol.* **549**, 919–927 (2003).

207. Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223–239 (1962).
208. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–233 (1992).
209. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805 (1994).
210. Inouye, S. & Tsuji, F. I. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* **341**, 277–280 (1994).
211. Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* **90**, 1103–1163 (2010).
212. Feng, G. *et al.* Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **28**, 41–51 (2000).
213. Jacques, S. L. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys. Med. Biol.* **58**, R37–61 (2013).
214. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73–76 (1990).
215. Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* **401**, 273–294 (1931).
216. Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Methods* **2**, 932–940 (2005).
217. Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J. & Gan, W.-B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat. Protoc.* **5**, 201–208 (2010).
218. Holtmaat, A. *et al.* Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nat. Protoc.* **4**, 1128–1144 (2009).
219. Kandalepas, P. C. *et al.* The Alzheimer's β -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **126**, 329–352 (2013).
220. Scott, J. D. *et al.* Novel Iminopyrimidinone beta-Secretase (BACE1) Inhibitors - P1 Thiophenes. in (2011).
221. Fitzjohn, S. M. *et al.* A study of long-term potentiation in transgenic mice over-expressing mutant forms of both amyloid precursor protein and presenilin-1. *Mol. Brain* **3**, 21 (2010).
222. Neumann, U. *et al.* A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile and robust reduction of amyloid- β and neuroinflammation in APP transgenic mice. *Mol. Neurodegener.* **10**, 44 (2015).
223. Rochin, L. *et al.* BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 10658–10663 (2013).
224. Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. & Bear, M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* **313**, 1093–1097 (2006).
225. Masana, M. *et al.* The stress-inducible actin-interacting protein DRR1 shapes social behavior. *Psychoneuroendocrinology* **48**, 98–110 (2014).
226. Wang, X.-D. *et al.* Nectin-3 links CRHR1 signaling to stress-induced memory deficits and spine loss. *Nat. Neurosci.* **16**, 706–713 (2013).

227. Knapman, A. *et al.* Increased stress reactivity is associated with cognitive deficits and decreased hippocampal brain-derived neurotrophic factor in a mouse model of affective disorders. *J. Psychiatr. Res.* **44**, 566–575 (2010).
228. Orgogozo, J.-M. *et al.* Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* **61**, 46–54 (2003).
229. Lemaire, V. *et al.* Long-Lasting Plasticity of Hippocampal Adult-Born Neurons. *J. Neurosci.* **32**, 3101–3108 (2012).
230. Mizrahi, A. Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* **10**, 444–452 (2007).
231. Neuner, J. *et al.* Pathological α -synuclein impairs adult-born granule cell development and functional integration in the olfactory bulb. *Nat. Commun.* **5**, 3915 (2014).
232. Rollenhagen, A. & Lübke, J. H. R. The Mossy Fiber Bouton: the ‘Common’ or the ‘Unique’ Synapse? *Front. Synaptic Neurosci.* **2**, (2010).
233. Wang, H., Megill, A., Wong, P. C., Kirkwood, A. & Lee, H.-K. Postsynaptic target specific synaptic dysfunctions in the CA3 area of BACE1 knockout mice. *PLoS One* **9**, e92279 (2014).
234. Chicurel, M. E. & Harris, K. M. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **325**, 169–182 (1992).
235. Acsády, L., Kamondi, A., Sík, A., Freund, T. & Buzsáki, G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **18**, 3386–3403 (1998).
236. Leshchyn'ska, I. *et al.* The adhesion molecule CHL1 regulates uncoating of clathrin-coated synaptic vesicles. *Neuron* **52**, 1011–1025 (2006).
237. Andreyeva, A. *et al.* CHL1 is a selective organizer of the presynaptic machinery chaperoning the SNARE complex. *PLoS One* **5**, e12018 (2010).
238. Nikonenko, A. G. *et al.* Enhanced perisomatic inhibition and impaired long-term potentiation in the CA1 region of juvenile CHL1-deficient mice. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 1839–1852 (2006).
239. Nägerl, U. V., Köstinger, G., Anderson, J. C., Martin, K. A. C. & Bonhoeffer, T. Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 8149–8156 (2007).
240. Shimizu-Nishikawa, K., Kajiwara, K., Kimura, M., Katsuki, M. & Sugaya, E. Cloning and expression of SEZ-6, a brain-specific and seizure-related cDNA. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **28**, 201–210 (1995).
241. Hayashi-Takagi, A. *et al.* Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature* **525**, 333–338 (2015).
242. Yang, G., Pan, F. & Gan, W.-B. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* **462**, 920–924 (2009).
243. Mayford, M., Siegelbaum, S. A. & Kandel, E. R. Synapses and Memory Storage. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a005751 (2012).
244. Murray, R. M. & Lewis, S. W. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J Clin Res Ed* **295**, 681–682 (1987).
245. van Os, J. & Kapur, S. Schizophrenia. *The Lancet* **374**, 635–645 (2009).
246. Lyon, M., Barr, C. E., Cannon, T. D., Mednick, S. A. & Shore, D. Fetal neural development and schizophrenia. *Schizophr. Bull.* **15**, 149–161 (1989).

247. Brennand, K. J. *et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* **473**, 221–225 (2011).
248. Jung, C. Der Einfluss eines Enriched Environments und von Schlüsselproteinen der Alzheimerschen Erkrankung auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines - eine in vivo Analyse mithilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie. (LMU München, 2012). at <<https://edoc.ub.uni-muenchen.de/15246/>>
249. Dominguez, D. Phenotypic and Biochemical Analyses of BACE1- and BACE2-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 30797–30806 (2005).
250. Huguenard, J. R. & McCormick, D. A. Thalamic synchrony and dynamic regulation of global forebrain oscillations. *Trends Neurosci.* **30**, 350–356 (2007).
251. Luo, Y. *et al.* BACE1 (beta-secretase) knockout mice do not acquire compensatory gene expression changes or develop neural lesions over time. *Neurobiol. Dis.* **14**, 81–88 (2003).
252. Stützer, I. *et al.* Systematic proteomic analysis identifies β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 10536–10547 (2013).
253. Sadleir, K. R., Eimer, W. A., Cole, S. L. & Vassar, R. A β reduction in BACE1 heterozygous null 5XFAD mice is associated with transgenic APP level. *Mol. Neurodegener.* **10**, 1 (2015).
254. Sun, X., He, G. & Song, W. BACE2, as a novel APP theta-secretase, is not responsible for the pathogenesis of Alzheimer's disease in Down syndrome. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1369–1376 (2006).
255. Abdul-Hay, S. O., Sahara, T., McBride, M., Kang, D. & Leissring, M. A. Identification of BACE2 as an avid β -amyloid-degrading protease. *Mol. Neurodegener.* **7**, 46 (2012).
256. Giuffrida, M. L. *et al.* Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 10582–10587 (2009).
257. Garcia-Osta, A. & Alberini, C. M. Amyloid beta mediates memory formation. *Learn. Mem.* **16**, 267–272 (2009).
258. Puzzo, D. *et al.* Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann. Neurol.* **69**, 819–830 (2011).
259. Killick, R., Hardy, J. & Simons, J. P. Reducing β -amyloid by inhibition of BACE1: how low should you go? *Biol. Psychiatry* **77**, 683–684 (2015).
260. Willem, M. *et al.* η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **526**, 443–447 (2015).
261. May, P. C. *et al.* The Potent BACE1 Inhibitor LY2886721 Elicits Robust Central A β Pharmacodynamic Responses in Mice, Dogs, and Humans. *J. Neurosci.* **35**, 1199–1210 (2015).
262. Bittner, T. *et al.* Gamma-secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 10405–10409 (2009).
263. Mouse Genome Sequencing Consortium *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520–562 (2002).
264. Cai, H. *et al.* BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 233–234 (2001).
265. Hu, X. *et al.* Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat. Neurosci.* **9**, 1520–1525 (2006).
266. Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38 (1996).

267. Gordon, J. W. *et al.* Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. *Cell* **50**, 445–452 (1987).
268. Stamford, A. W. *et al.* Discovery of an Orally Available, Brain Penetrant BACE1 Inhibitor that Affords Robust CNS A β Reduction. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**, 897–902 (2012).
269. Davis, M. E. & Brewster, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 1023–1035 (2004).
270. Stella, V. J. & He, Q. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* **36**, 30–42 (2008).
271. Okimoto, K., Rajewski, R. A., Uekama, K., Jona, J. A. & Stella, V. J. The interaction of charged and uncharged drugs with neutral (HP-beta-CD) and anionically charged (SBE7-beta-CD) beta-cyclodextrins. *Pharm. Res.* **13**, 256–264 (1996).

8. Lebenslauf und eigene Publikationen

8.1 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Fassung entfernt.

8.2 Publikationen

1. **Filser S**, Ovsepien S, Masana M, Blazquez-Llorca L, Brandt Elvang A, Volbracht C, Müller MB, Jung CKE, Herms J, Pharmacological Inhibition of BACE1 Impairs Synaptic Plasticity and Cognitive Functions, *Biol. Psychiatry* (2015).
2. Zou C, Montagna E, Shi Y, Peters F, Blazquez-Llorca L, Shi S, **Filser S**, Dorostkar M, Herms J, Intraneuronal APP and extracellular A β independently cause dendritic spine pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.* (2015).
3. Dorostkar MM, Burgold S, **Filser S**, Barghorn S, Schmidt B, Anumala UR, Hillen H, Klein C, Herms J, Immunotherapy alleviates amyloid-associated synaptic pathology in an Alzheimer's disease mouse model, *Brain* (2014).
4. Ochs SM, Dorostkar MM, Aramuni G, Schön C, **Filser S**, Pöschl J, Kremer A, Van Leuven F, Ovsepien SV, Herms J, Loss of neuronal GSK3 β reduces dendritic spine stability and attenuates excitatory synaptic transmission via β -catenin, *Mol. Psychiatry* (2014).
5. Neuner J, Ovsepien SV, Dorostkar MM, **Filser S**, Gupta A, Michalakis S, Biel M, Herms J, Pathological α -synuclein impairs adult-born granule cell development and functional integration in the olfactory bulb, *Nat. Commun.* (2014).
6. Burgold S, **Filser S**, Dorostkar MM, Schmidt B, Herms J, In vivo imaging reveals sigmoidal growth kinetic of β -amyloid plaques, *Acta Neuropathol. Commun.* (2014).
7. Neuner J, **Filser S**, Michalakis S, Biel M, Herms J, A30P α -Synuclein interferes with the stable integration of adult-born neurons into the olfactory network, *Sci. Rep.* (2014).
8. Schön C, Hoffmann NA, Ochs SM, Burgold S, **Filser S**, Steinbach S, Seeliger WM, Arzberger T, Goedert M, Kretzschmar HA, Schmidt B, Herms J, Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice, *PloS One* (2012).
9. Merk D, Jasmin J, Merk N, Ahlfeld J, Schmid S, **Filser S**, Harrison L, Weißhaar M, Erkek S, Shakarami M, Neumann J, Marra M, Li Y, Mungall A, Moore R, Ma Y, Jones S, Plenker D, Morrissy S, Lutz B, Ertl-Wagner B, Rossi A, Sendtner M, Pfister S, Taylor M, Kool M, Schüller U, CBP has opposing functions during cerebellar development and is a targetable tumor suppressor at late stages of medulloblastoma initiation (in Revision bei Cancer Cell)

10. Ahlfeld J, **Filser S**, Schmidt F, Wefers A, Herms J, Schüller U, Neurogenesis from Sox2-expressing cells in the adult cerebellar cortex (Manuskript in Vorbereitung).
11. Masana M, Dine J, **Filser S**, Blazquez-Llorca L, Kretzschmar A, Schmidt MV, Bock J, Herms J, Eder M, Rein T, Müller MB, Cognitive performance and synaptic function are dependent on the resilience-promoting protein DRR1 (Manuskript in Vorbereitung).
12. Kaichuan Z, Xianyuan X, Dorostkar M, **Filser S**, Crux S, Rammes G, Neumann U, Gunnarsen J, Lichtenthaler S, Haass C, Herms J, BACE1 Inhibition Impairs Synaptic Plasticity via Seizure Related Gene 6 Protein (Manuskript in Vorbereitung)

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jochen Herms für die Unterstützung dieses Projekts, seine vertrauensvolle Betreuung inklusive kritischer Diskussionen und stete wissenschaftliche und persönliche Förderung.

Vielen Dank möchte ich auch Frau Prof. Dr. Barbara Conradt aussprechen für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Bereitschaft die externe Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie zu vertreten. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Anja Horn-Bochtler für die Zeit und Mühe bei der Erstellung des Zweitgutachtens.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit hatte ich die Möglichkeit mit vielen Wissenschaftlern zusammenzuarbeiten, Gedanken auszutauschen und zu lernen. Hierbei möchte ich die Kollaboration mit der Firma Lunbdbeck, Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals und AG Müller hervorheben und mich entsprechend bei Dr. Christiane Volbracht, Dr. Anders Brandt Elvang, Dr. Matthew Kennedy, Dr. Marianne Müller und Dr. Mercè Masana für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Für ein sehr gutes Arbeitsklima möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Kollegen aus dem ZNP und der AG Herms danken. Ein spezieller Dank geht an Dr. Steffen Burgold, Dr. Petar Marinkovic und Dr. Julia Ahlfeld für ihren Rat und die vielen Diskussionen. Ein großes Dankeschön an Dr. Saak Ovsepijan und Dr. Lidia Blazquez für die methodische und sachkenntliche Hilfeleistung, Sonja Steinbach und Johanna Neuner für die experimentelle Mitarbeit an zahlreichen Projekten, Julia Vlcek, Patrizia Bonert und allen Kollegen aus dem Tierstall für euren Einsatz und eure Hilfe. Besonders hervorheben möchte ich Finn Peters, Christian Schön, Nadine Hoffmann, Ann-Katrin Krauß und Simon Ochs, die mir während meiner Doktorarbeit sehr gute Freunde und Kollegen waren.

An meine Eltern und meine Schwester richtet sich ein besonders großes und liebes Dankeschön. Euch möchte ich diese Arbeit widmen.