

Aus dem Physiologischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Markus Bleich)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

EINFLUSS DES  *$\beta$ -site-APP-cleaving  
enzyme 1 (BACE1)* AUF DEN  
SPANNUNGSABHÄNGIGEN  
NATRIUMKANAL  $\text{Na}_v1.2$

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
KAROLINE SCHMIDT-NEUENFELDT  
aus Bückeburg

Kiel 2009

1.Berichterstatter:	Prof. Dr. med. C. Alzheimer
2.Berichterstatter:	Prof. Dr. Saftig
Tag der mündlichen Prüfung:	18. Juni 2009
Zum Druck genehmigt:	Kiel, 18. Juni 2009

gez.: Prof. Dr. Stick  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## Vorbemerkung

Teilergebnisse dieser Dissertation sind bereits wie folgt veröffentlicht worden:

Posterpräsentation "*Cleavage of  $\beta$ 2 subunit by BACE1 alters sodium channel gating*" von Neuenfeldt, K., Rittger, A., Huth, T., Schwake, M., Nukina, N., de Strooper, B., Saftig, P., Alzheimer, C. auf dem Jahreskongress 2006 der *Deutschen Physiologischen Gesellschaft* in München

Poster "*Effects of BACE1 on Sodium Channel Gating*" von Neuenfeldt, K., Rittger, A., Huth, T., Schwake, M., Nukina, N., de Strooper, B., Saftig, P., Alzheimer, C. auf dem Jahreskongress 2007 der *Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft* in Göttingen

Poster "*Effects of BACE1 on Nav1.2a sodium channel activation*" von Neuenfeldt, K., Rittger, A., Huth, T., Schwake, M., Reiss, K., Saftig, P., Alzheimer, C. auf dem Jahreskongress 2007 der *Society for Neuroscience* in San Diego/Kalifornien

Paper "*Non-proteolytic effect of beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) on sodium channel function*" von Huth, T., Schmidt-Neuenfeldt, K., Rittger, A., Saftig, P., Reiss, K., Alzheimer, C. in *Neurobiology of Disease* (im Druck, Referenz: YNBD1772), 2008.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einführung</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Grundlagen des Natriumkanals .....	1
1.1.1.	Elektrophysiologie des spannungsabhängigen Natriumkanals .....	1
1.1.2.	Struktur und Funktion.....	3
1.2.	Grundlagen zu Morbus Alzheimer .....	7
1.2.1.	Allgemeines .....	7
1.2.2.	Pathomechanismen bei Morbus Alzheimer.....	8
1.2.3.	Das Amyloid-Vorläuferprotein und seine physiologische Funktion .....	11
1.2.4.	Bedeutung und Funktion von BACE1 .....	12
1.3.	Fragestellung der vorliegenden Dissertation.....	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1.	Molekularbiologie.....	15
2.1.1.	Zellkultur .....	15
2.1.2.	Vektoren und Bakterien .....	17
2.1.3.	Bakterienklonierung und Plasmidgewinnung .....	18
2.1.4.	Nachweismethoden.....	19
2.1.5.	Polymerase-Kettenreaktion und <i>TOPO-Cloning</i> .....	20
2.1.6.	Transfektion.....	21
2.1.7.	Immunfluoreszenz-Darstellung .....	23
2.2.	Elektrophysiologie .....	24
2.2.1.	<i>patch-clamp</i> -Technik.....	24
2.2.2.	<i>patch-clamp</i> -Aufbau .....	26
2.2.3.	Pipetten und ihre Herstellung .....	27
2.2.4.	Messlösungen .....	27
2.2.5.	Versuchsdurchführung.....	28
2.2.6.	Messprotokolle .....	30
2.3.	Darstellung der Problemfelder .....	31
2.4.	Aufzeichnungs-, Auswertungs- und Darstellungsverfahren.....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1.	Einflüsse der $\beta$ -Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 4$ auf das Öffnungsverhalten des Natriumkanals Na <sub>v</sub> 1.2a .....	34
3.2.	Proteolytische Wirkung von BACE1 .....	36
3.3.	Endogener Einfluss der N- bzw. C-terminalen Fragmente der $\beta$ -Untereinheiten .....	38
3.4.	Nicht-proteolytischer Einfluss von BACE1 .....	39
3.5.	Kontrollversuche .....	43
3.6.	Immunfluoreszenz-Darstellung .....	44
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>46</b>
4.1.	$\beta$ -Untereinheiten als Substrate von BACE1 .....	46
4.2.	Modulation des Na <sub>v</sub> 1.2 durch $\beta$ -Untereinheiten und Proteolyse durch BACE1 .....	46

4.3. BACE1 zeigt nicht-proteolytische Effekte.....	47
4.4. Bestätigung der BACE1-Wirkung im Neuroblastom-Zellsystem.....	48
4.5. Klinische Konsequenz der Ergebnisse .....	49
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>51</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>59</b>
Anhang: Chemikalien .....	59
Anhang: Enzyme, Kits, DNS.....	59
Anhang: Verbrauchsmaterialien .....	60
Anhang: Geräte.....	60
Anhang: Plasmide und Konstrukte.....	61
Anhang: Primer für $\beta 2$ und $\beta 4$ .....	61
Anhang: Natriumkanal- und EGFP-Vektor.....	62
Anhang: Gensequenz von $Na_v1.2a$ .....	63
Anhang: Gensequenz von $\beta 2$ und $\beta 4$ .....	64
Anhang: Gensequenz von pCDMA8 .....	65
Anhang: Gensequenz von pCDM3.1.....	66
Anhang: Gensequenz von BACE1 zur Herstellung der inaktiven Mutante D289N .....	68
Anhang: Western-Blot-Experimente und Ko-Immunopräzipitation .....	69
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>70</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>72</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>73</b>

# 1. Einführung

## 1.1. Grundlagen des Natriumkanals

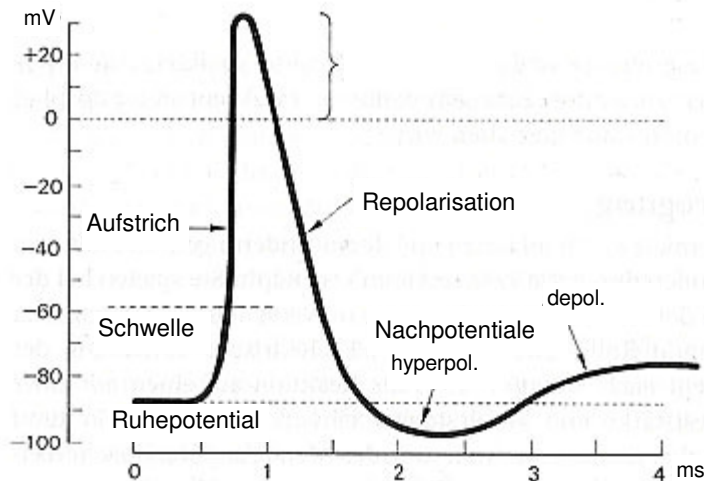
### 1.1.1. Elektrophysiologie des spannungsabhängigen Natriumkanals

Spannungsabhängige Natriumkanäle dienen dem Informationsaustausch auf elektrischem Wege von erregbaren Zellen, was für das Nervensystem, die Herz- und Skelettmuskulatur eine wichtige Rolle spielt. Die hierfür erforderlichen Signale werden über schlagartige Änderungen der Membranspannung (Aktionspotentiale) vermittelt und mittels der spannungsabhängigen Öffnung von Natrium- und Kaliumkanälen generiert. Unter physiologischen Bedingungen besteht im Intrazellulärraum einer elektrisch erregbaren Zelle eine hohe Kalium- und eine niedrige Natriumionen-Konzentration. Gegensätzlich dazu verhalten sich die extrazellulären Konzentrationen. Diese Ionengradienten werden von einer  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (Alberts et al., 1990) aufrechterhalten. Im Ruhezustand ist die Leitfähigkeit der Zellmembran für Kaliumionen wesentlich größer als für  $\text{Na}^+$ -Ionen, so dass das Membranpotential hauptsächlich von dem Kaliumgradienten bestimmt wird und nahe bei dem  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotential  $E_K$  von ca.  $-90/-100\text{mV}$  liegt (Dudel, 2000). Für die schnelle Aufstrichphase des Aktionspotentials sind die spannungsgesteuerten Natriumkanäle verantwortlich, wobei das Membranpotential kurzfristig in Richtung des  $\text{Na}^+$ -Gleichgewichtspotentials, das bei ca.  $+60\text{mV}$  liegt, verschoben wird (s. Abb. 1. 1). Anschließend nimmt die  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit rasch wieder ab, währenddessen die Leitfähigkeit für Kalium zeitversetzt zunimmt, was dazu führt, dass sich das Membranpotential dem  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotential annähert.

Für die Ausbreitung von Aktionspotentialen gilt: Je größer das Axon, desto geringer der axiale elektrische Widerstand und umso leichter die Stromausbreitung. Die Refraktärität (s.u.) bestimmt dabei die Richtung der Ausbreitung der Potentiale.

### Das Aktionspotential nach Hodgkin und Huxley

Durch Blockade der Natrium-Kanäle mit Tetrodotoxin (TTX), bzw. der Kalium-Kanäle durch Tetraethylammonium (TEA), können, nach Abzug des Leckstroms, und unter Berücksichtigung der kapazitiven Ströme der Natrium- und der Kaliumstrom ( $I_{\text{Na}}$  und  $I_{\text{K}}$ ) isoliert werden. Aus diesen Strömen können dann nach dem Ohm'schen Gesetz ( $I_{\text{Ion}} = g_{\text{Ion}} (E_{\text{Membran}} - E_{\text{Ion}})$ ) und der Nernst-Gleichung ( $E_{\text{Ion}} = (RT/zF) \times \ln ([\text{Ion}]_{\text{au\ss}er} / [\text{Ion}]_{\text{innen}})$ ) die Leitfähigkeiten berechnet werden. ( $I_{\text{Ion}}$  ist der durch eine Ionensorte getragene Strom über eine Zellmembran;  $g_{\text{Ion}}$  die Leitfähigkeit der Membran für diese Ionen,  $E_{\text{Ion}}$  entspricht dem Nernst-Potential der Ionen, und  $E_{\text{Membran}}$  oder auch kurz  $E_m$  der elektrischen Potentialdifferenz über der Membran. Der Ausdruck ( $E_{\text{Membran}} - E_{\text{Ion}}$ ) beschreibt die elektromotorische Triebkraft für das betreffende Ion.  $z$  ist dabei die Ladung des Ions (+1 für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ; +2 für  $\text{Ca}^{2+}$ ; -1 für  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ),  $R$  die allgemeine Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $F$  die Faradaykonstante.)



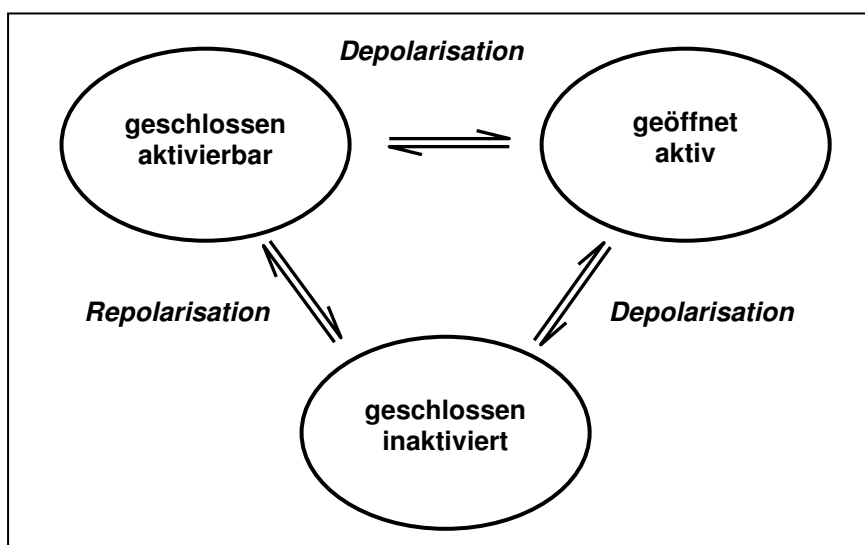
**Abb. 1. 1** Zeitlicher Ablauf eines Aktionspotentials. Das Aktionspotential dauert am Nerv etwa 1ms, am Muskel ca. 10ms und am Herzmuskel mehr als 200ms.

(nach Silbernagl, 2007)

Der Ablauf des Aktionspotentials (s. Abb. 1. 1) ist von Hodgkin und Huxley (1939) wie folgt charakterisiert worden:

- Depolarisation der Membran.
- Öffnen der Natriumkanäle führt zum Natriumeinstrom.
- Die Entladung des Membrankondensators führt zu einem weiteren Natriumeinstrom.
- Die weitere Depolarisation durch die sich lawinenartig verstärkende Wirkung der Natriumionen (immer mehr Kanäle öffnen sich, immer mehr Natrium strömt ein) führt zur schnellen Inaktivierung der Natriumkanäle.
- Verzögerte Öffnung der Kaliumkanäle.
- Der Kaliumeinstrom re- bzw. hyperpolarisiert die Membran.

Die Natriumkanäle können nach dieser Darstellung vereinfacht betrachtet in drei Konformationen vorliegen (s. Abb. 1. 2): geschlossen, offen und inaktiviert.



**Abb. 1. 2** Die drei Grundzustände des spannungsgesteuerten Natriumkanals.

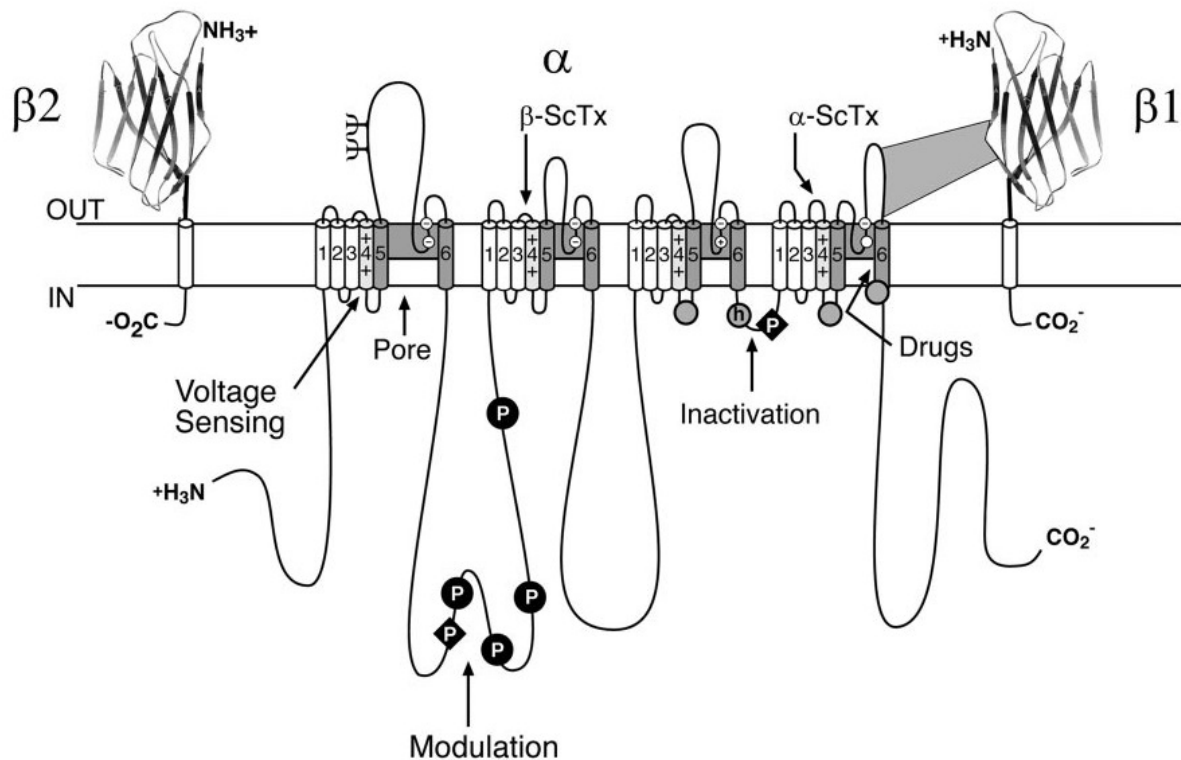
### 1.1.2. Struktur und Funktion

#### Aufbau

Der Natriumkanal besteht aus einer ca. 260kDa großen  $\alpha$ -Untereinheit und mehreren assoziierten  $\beta$ -Untereinheiten, deren Anzahl je nach Kanalsubtyp schwankt (Catterall et al., 2005). Die  $\alpha$ -Untereinheit allein vermittelt die entscheidenden Charakteristika wie Natriumselektivität und Spannungssensitivität (Catterall 2000). Die Assoziation mit  $\beta$ -Untereinheiten wirkt modulierend auf die Kinetik des Aktivierungs- und Inaktivierungsverhaltens und die Spannungssensitivität der  $\alpha$ -Untereinheit (Isom 2001) und bestimmt die Quantität der Kanalexpression (s. Abschnitt 1.1.2,  $\beta$ -Untereinheiten).

Die  $\alpha$ -Untereinheit ist aus vier sich ähnelnden Domänen zusammengesetzt, die wiederum jeweils aus sechs die Membran durchziehenden Segmenten (S1-S6) bestehen. Das Segment 4 ist überwiegend positiv geladen und vermittelt mithilfe von Ladungsverschiebungen die Aktivierung des Kanals. Zwischen den Segmenten 5 und 6 befinden sich schleifenbildende Aminosäureketten, die existenzielle Bedeutung für die Porenbildung des Kanals besitzen und daher auch *P-loops* genannt werden oder, wegen ihrer Konformation, auch *hairpin*. Dieser *P-loop* reguliert die Ionenselektivität des Natriumkanals.

Bei der Proteinbiosynthese des Natriumkanals wird die  $\alpha$ -Untereinheit in einem Stück in der Zelle produziert und anschließend in die Membran geschleust. Die einzelnen Domänen sind über intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden (s. Abb. 1. 3).



**Abb. 1. 3** Sekundärstruktur des spannungsgesteuerten Natriumkanals (Catterall et al., 2005). Die Zylinder markieren die  $\alpha$ -helikalen Segmente S1-S6. Die durchgezogenen Linien symbolisieren Polypeptidketten. Die Länge dieser Linien korreliert mit der Anzahl von Aminosäuren.



Die extrazellulären  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten, die hier beispielhaft eingezeichnet sind, weisen eine ähnliche Struktur wie Immunglobuline auf.

$\Psi$ : Aminosäuren für die extrazelluläre Glykosylierung

Kreise und Rauten: Aminosäuren für intrazelluläre Phosphorylierung

Zylinder 5 und 6: Aminosäuren, die die Kanalpore formen

Weißer Kreis: äußerer (EEDD) und innerer (DEKA) Ring von Aminosäuren des Selektivitätsfilters und der Tetrodotoxin-Bindungsstelle

Zylinder 4: Spannungssensor

h im Kreis: Inaktivierungssegment (IFM) in der intrazellulären Schleife zwischen Domäne 3 und 4

Kreise ohne Beschriftung: Aminosäuren, die als Rezeptor für das IFM dienen

ScTX: Bindungsstelle für Skorpionsgifte

Nach der Nomenklatur, die von Catterall et al. (2005) vorgeschlagen wurde, werden Natriumkanäle als z.B.  $rNa_v1.2a$  bezeichnet. Das r steht in diesem Beispiel für Ratte, v für *voltage* (Spannung), was den regulatorischen Mechanismus beschreibt. Bei obigem Beispiel bezeichnet 1 die Kanalfamilie 1, wobei zum jetzigen Zeitpunkt lediglich eine Kanalfamilie bekannt ist. Die 2 steht für Kanalsubtyp 2; inzwischen sind neun Subtypen des spannungsabhängigen Natriumkanals bei Säugetieren identifiziert. Das außerdem angehängte a bezeichnet die Prozessierungsvariante (*splice variant*) a, wobei auch hier zu berücksichtigen ist, dass andere Varianten zwar vermutet werden, aber noch nicht identifiziert werden konnten (Catterall et al., 2005).

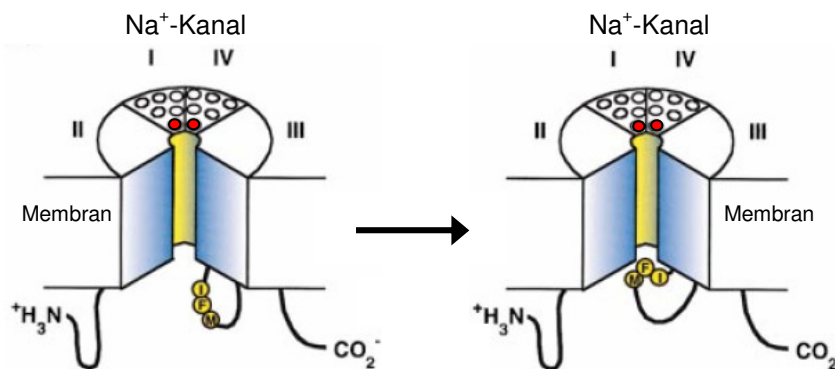
Die am häufigsten vorkommenden Subtypen des Natriumkanals im adulten Gehirn sind  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$  und  $Na_v1.6$ . Der Subtyp  $Na_v1.6$  wird an den Ranvier'schen Schnürringen und den initialen Axonsegmenten sowie im Soma und Dendriten vieler Neurone exprimiert (Trimmer und Rhodes, 2004).  $Na_v1.2$  weist eine besonders hohe Expression in unmyelinisierten Fasern auf. Immunhistochemische Daten legen nahe, dass die primäre Lokalisation von  $Na_v1.1$  in neuronalen Somata ist (Westenbroek et al., 1989, 1992; Gong et al., 1999). Außerdem scheint  $Na_v1.1$  bevorzugt von GABAergen Neuronen exprimiert zu werden (Yu et al., 2006; Ogiwara et al., 2007).

Die hohe Spezifität für  $Na^+$ -Ionen wird durch einen Selektivitätsfilter ermöglicht, der an der Kanalpore entdeckt worden ist (Hille, 1984). Zur Entdeckung der Pore und des Selektivitätsfilters führten die als Negativformen benutzten Porenblocker Tetrodotoxin und Saxitoxin, von denen die Struktur bekannt war. Da alle bisher untersuchten Natriumkanäle hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit ähnliche Eigenschaften aufweisen, wird angenommen, dass auch die jeweiligen Selektivitätsfilter ähnlich sind (Catterall et al., 2005).

Die spannungsabhängige Aktivierung der Ionenkanäle wird durch Auswärtsbewegungen positiv geladener Aminosäuren im elektrischen Feld bedingt (Hodgkin und Huxley, 1952; Armstrong, 1981). Dabei bewegen sich ca. 12 positiv geladene Gruppen der S4- $\alpha$ -Helices durch das elektrische Feld der Membran (Hirschberg et al., 1995; Catterall, 2000). Wie diese Bewegung vonstatten geht, steht gegenwärtig noch zur Diskussion und konnte noch nicht eindeutig geklärt werden (Blaustein und Miller, 2004). Es ist sowohl die Hypothese einer umfangreichen Extrazellulärschwenkung der Domäne aufgestellt worden, als auch die einer weitaus subtileren konformativen Verschiebung (Jiang et al., 2003; Starace und Bezanilla, 2004).

## Inaktivierung

Die schnelle Inaktivierung besitzt eine Zeitkonstante von lediglich Millisekunden und spielt eine entscheidende Rolle bei der Repolarisation des Aktionspotentials (Ulbricht, 2005). Das schnelle Schließen der Kanalpore erfolgt nach dem so genannten *hinged-lid*-Mechanismus (Kellenberger et al., 1997a). Abbildung 1. 4 zeigt diesen Mechanismus, wobei die intrazelluläre Schleife zwischen Domäne 3 und 4 die Funktion eines Scharniers übernimmt (Vassilev et al., 1988, 1989; Stühmer et al., 1989) und die Aminosäuren Isoleucin1488, Phenylalanin (F)1489 und Methionin1490 dieser Schleife als Deckel fungieren (West et al., 1992; Eaholtz et al., 1994; Kellenberger et al., 1997b). Dieser Deckel stellt das oben erwähnte IFM-Motiv dar, das den Kanal von intrazellular verschließt und damit inaktiviert.



**Abb. 1. 4** Modell des Natriumkanals mit seinen 4 Domänen.

Der Kanal ist zwischen Domäne II und III aufgeklappt dargestellt. Die Kreise symbolisieren die jeweils 6  $\alpha$ -Helices; je eine Helix (rot) pro Domäne reagiert über Ladungsverschiebungen auf Änderungen der Membranspannung. Die Peptidkette zwischen Domäne III und IV mit der Aminosäurefolge IFM verschließt den Kanal nach Depolarisation an der Innenseite.

(nach Catterall, 2000)

Das C-terminale Ende des Na<sup>+</sup>-Kanal-Proteins stabilisiert den geschlossenen *hinged-lid*-Mechanismus, so dass sich der Kanal während der Refraktärzeit nicht öffnen kann (Motoike et al., 2004).

## $\beta$ -Untereinheiten

Von der Lokalisation des Natriumkanals ist abhängig, welche der fünf identifizierten  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta$ 1,  $\beta$ 1A,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 4) mit dem  $\alpha$ -Kanalprotein assoziiert sind. So werden z.B. im adulten ZNS sämtliche bekannten  $\beta$ -Untereinheiten exprimiert, wohingegen in adulter Skelettmuskulatur lediglich die  $\beta$ 1-Untereinheit nachgewiesen worden ist (Catterall et al., 2005). Dabei sind die Natriumkanäle des adulten Gehirns entweder nicht-kovalent mit  $\beta$ 1 oder  $\beta$ 3 assoziiert, oder liegen in gebundener Form mittels Disulfid-Bindungen mit  $\beta$ 2- oder  $\beta$ 4-Untereinheiten vor.

Die  $\beta$ -Untereinheiten beeinflussen die Kinetik und Spannungsabhängigkeit des Natriumkanal-Öffnungsverhaltens sowie das Ausmaß der Kanalexpression an der Zelloberfläche.

Auch die Modulation der Kanallokalisation sowie Zell-Zell-Interaktionen werden den  $\beta$ -Untereinheiten zugeschrieben, wobei letzteres mit der partiellen morphologischen Ähnlichkeit der  $\beta$ -Untereinheiten mit Immunglobulinmolekülen begründet wird (Catterall et al., 2005). Es ist beschrieben worden, dass die Natriumkanäle über die  $\beta$ -Untereinheiten mit anderen zellulären Strukturen verbunden und auf diese Weise in dazugehörige Zellbereiche integriert werden (Isom, 2001). Bereits 1985 ist gezeigt worden, dass die Expression der  $\beta 2$ -Untereinheit in Primärkulturen embryonaler Neurone für die Translokation neu synthetisierter Natriumkanäle aus intrazellulären Speichern in die Plasmamembran benötigt wird (Schmidt et al., 1985; Schmidt et Catterall, 1986). In Experimenten mit *Xenopus*-Oozyten konnte gezeigt werden, dass  $\beta 2$  in Abwesenheit der  $\alpha$ -Untereinheit eine deutliche Expansion der Oozyten-Membranoberfläche hervorrief. Aus der alleinigen Expression von  $\beta 2$  resultierten hochsignifikante Veränderungen in der Membrankapazität der Oozyten durch Beschleunigung der Fusion intrazellulärer Vesikel mit der Mikrovillus-Membran (Isom et al., 1995).

Für die  $\beta 4$ -Untereinheit konnte nachgewiesen werden, dass eine Expression von  $\beta 4$  in Neuroblastom-Zellen zu einer gesteigerten Ausbildung von Filopodien-ähnlichen Zellausstülpungen führt, die vermutlich im Rahmen der Synaptogenese von Bedeutung sind (Yuste und Bonhoeffer, 2004; Miyazaki et al., 2007).

Im Oozyten-Expressionssystem zeigte sich, dass bei Koexpression von  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Untereinheiten sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung des Kanal-Öffnungsverhaltens beschleunigt sind, wobei die Inaktivierung im stärkeren Maße betroffen ist (Isom et al., 1992, 1995). Der immunglobulinähnliche Anteil der  $\beta$ -Untereinheit interagiert mit dem Extrazelluläranteil der S6-Helix aus Domäne IV (s. Abb. 1. 3, Makita et al., 1996; Qu et al., 1999) und beeinflusst auf diese Weise das Öffnungsverhalten des Kanals.

Mutationen in den Genen, die die  $\alpha$ -Untereinheit der Natriumkanäle kodieren, werden mit paroxysmalen Erkrankungen wie z.B. Epilepsie, dem Long-QT-Syndrom oder der Hyperkaliämischen Periodischen Paralyse (HYPP) in Verbindung gebracht (Isom, 2001). Störungen in der Inaktivierung, gesteigerte Aktivierbarkeit und/oder verzögerte Repolarisation führen zu einer pathologischen Hyperexzitabilität.

Die oben erwähnten Experimente zur Untersuchung der Eigenschaften der  $\beta$ -Untereinheiten auf intakte Natriumkanäle zeigten, dass die Koexpression von  $\beta$ -Untereinheiten Verschiebungen in der Aktivierung in hyperpolarisierender Richtung hervorruft (Isom, 2001), was die Erregbarkeitsschwelle der Neurone senken würde. Ferner beobachtete Verkürzungen der Inaktivierungszeit und der Erholungsphase (Refraktärzeit) (Isom, De Jongh et al., 1994) führen ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivierbarkeit elektrisch erregbarer Zellen. Dies macht deutlich, welche Rolle die  $\beta$ -Untereinheiten in der Pathogenese diverser Erkrankungen spielen aber auch als mögliche therapeutische Angriffspunkte einnehmen können.

## Neuromodulation

Natriumkanäle können funktionell über Phosphorylierungen von Aminosäuren beeinflusst werden. Diese Modulation kann auf verschiedene Weisen geschehen: über Aktivierung von muscarinergen Acetylcholinrezeptoren (Cantrell et al., 1996; Mittmann et Alzheimer, 1998), über Dopamin an *D1*-Rezeptoren (Dopamin-Rezeptoren; Maurice et al., 2004, Maurice et al., 2001; Cantrell et al., 1997) oder über Koexpression von G-Proteinen ( $G_{\beta\gamma}$ , Ma et al., 1997; Mantegazza et al., 2005). Diese Modulationen spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Erregbarkeit von Nervenzellen. Dieser Zusammenhang wird in Kapitel 1.2.2. (*Pathomechanismen bei Morbus Alzheimer*) weiter erörtert.

## 1.2. Grundlagen zu Morbus Alzheimer

### 1.2.1. Allgemeines

Auf dem Kongress der südwestdeutschen Irrenärzte in Tübingen beschrieb der Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer 1906 die Erkrankung, die später nach ihm Morbus Alzheimer genannt wurde (Alzheimer, 1907). Seit 1901 hatte er die 51-jährige Auguste Deter bis zu ihrem Tode im Jahr 1906 begleitet, die sich wegen zunehmender Vergesslichkeit und Desorientierung sowie Wahnvorstellungen in seine Behandlung begeben hatte. Wegen des relativ jungen Alters der Patientin bezeichnete er die Erkrankung als präsenile Demenz. Zur Unterscheidung der präsenilen Demenz, dem „originalen“ Morbus Alzheimer, von der Demenz älterer Patienten, bei der dieselben histologischen Auffälligkeiten vorliegen, wurde die Erkrankung älterer Patienten auch als Senile Demenz vom Alzheimer-Typ bezeichnet (Hochberg & Rottenberg, 1977; Graeber et al., 1997). Beiden Erkrankungsformen sind die oben aufgeführten Symptome gemeinsam, die sich bis zur umfassenden Agnosie, fehlenden Orientierung auf allen Ebenen und somit zur vollständigen Pflegebedürftigkeit einschließlich Bewegungsstörungen und Inkontinenz steigern können. Todesursache ist bei derart geschwächten Patienten meist eine Lungenentzündung oder kardiovaskuläre Probleme. Viele Betroffene verhalten sich zudem emotional auffällig, unbegründete Wut- und Gewaltausbrüche sind keine Seltenheit.

Morbus Alzheimer ist weltweit die häufigste Form von Demenz. Das immer häufigere Auftreten der Alzheimer Erkrankung hängt mit der kontinuierlich zunehmenden Lebenserwartung zusammen, mit der auch das Risiko für erste Symptome ansteigt. Unter den 65jährigen sind etwa 2% von der Erkrankung betroffen, bei den 75jährigen zeigen ca. 6% Krankheitssymptome, bei den 85jährigen sind dies dagegen bereits etwa 20%. Über dem 85. Lebensjahr ist eine Abnahme der Erkrankten zu verzeichnen, was im Wesentlichen darauf zurückzuführen ist, dass nur wenige der Betroffenen dieses Lebensalter erreichen (Schäfer, 2007).

Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung und der altersabhängigen Zunahme von Alzheimer-Erkrankten ist in den nächsten Jahrzehnten mit einem dramatischen Anstieg der Patientenzahlen zu rechnen (Alzheimer Forschung Initiative e.V., Düsseldorf, Deutschland).

### 1.2.2. Pathomechanismen bei Morbus Alzheimer

Im Hirn von verstorbenen Alzheimer-Patienten beobachtet man typischerweise sogenannte Amyloid-Plaques (s. Abb. 1. 5), die bis zu einem Fünftel der Gehirnmasse ausmachen können. Die Plaques werden außerhalb der Nervenzellen abgelagert. Der plaque-induzierte Zelluntergang ist somit erst sekundäre Folge der Amyloid-Ablagerung, primär steht eine Überleitungsstörung in den Synapsen im Vordergrund. So konnte in Neuronen gezeigt werden, dass durch A $\beta$ -Oligomere die synaptische Übertragung signifikant beeinträchtigt wird (Kamenetz, 2003). Da allerdings eine hohe neuronale Aktivität eine Zunahme der A $\beta$ -Konzentration verursacht, ist die These aufgestellt worden, A $\beta$ -Oligomere nähmen zur Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit eine Funktion im Sinne einer negativen Rückkopplung ein (Venkitaramani et al., 2007; Kamenetz et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen, die die synaptische Übertragung beeinträchtigen, durch A $\beta$ -induzierte Endozytose von Glutamat-Rezeptoren verursacht werden (Hsieh et al., 2006).

Die Amyloid-Ablagerungen verursachen darüber hinaus eine starke Entzündungsreaktion, wie anhand von Untersuchungen an Ratten gezeigt werden konnte (Giovannini et al., 2002). Den Ratten wurde in den Nucleus basalis magnocellularis aggregiertes A $\beta_{42}$  injiziert, was mit einer deutlichen Aktivierung von Mikroglia-Zellen, Astrozyten und der Cyclooxygenase-2 einherging, sowie Konzentrationsanstiege von Interleukin-1 $\beta$  und Peroxyd-Radikalen verursachte (Giovannini et al., 2002; McDonald et al., 1997). Diese Entzündungsreaktion führte zu Einschränkungen im cholinergen System, die sowohl durch eine Reduktion der Zahl cholinergischer Neurone im Sinne eines Zelluntergangs zu erklären sind, als auch durch Funktionsminderungen der noch bestehenden Neurone, die nur eingeschränkt Acetylcholin freisetzen (Giovannini et al., 2002).

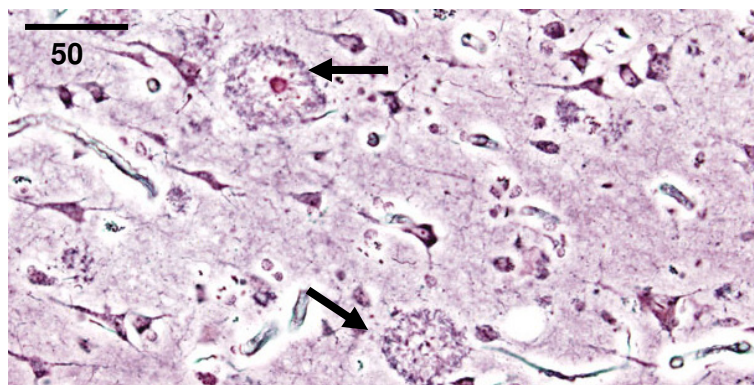
In Experimenten an Ratten, deren Nucleus basalis magnocellularis durch Injektion von Ibotensäure, einer nicht proteinogenen Aminosäure, geschädigt worden war, konnte eine signifikante Konzentrationsabnahme an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren beobachtet werden (Ogawa et al., 2006), wohingegen der Glukose-Stoffwechsel sich nach anfänglicher Störung wieder erholte und die Konzentration an muscarinergen Rezeptoren gänzlich unbeeinträchtigt war. Störungen im cholinergen System, die bereits im Frühstadium des Morbus Alzheimer vorhanden sind und mit Frühsymptomen wie zunehmendem Nachlassen des Kurzzeitgedächtnisses einhergehen, könnten vielleicht zukünftig durch Quantitätsmessungen der Acetylcholinrezeptoren im Rahmen von Positronenemissionstomographien frühzeitig erkannt werden (Ogawa et al., 2006).

Als weiterer Pathomechanismus kommt es zur Bildung von vaskulären Plaques aus Amyloid (sogenannte kongophile Angiopathie wegen der Darstellbarkeit in der Kongorot-Färbung), die über eine zunehmende Okklusion der kleinen Hirngefäße einen chronischen Sauerstoffmangel induzieren, der die Demenz-Symptomatik begünstigt (Wagner & Munoz, 1999).

Außerdem sind Ablagerungen in Form von Neurofibrillen aus tau-Protein (sogenannte *tau-tangles*) und Lewy-Körperchen beobachtet worden, auf die hier allerdings nicht weiter eingegangen werden soll.

Im Rahmen der medikamentösen Therapie werden unter anderem Esterase-Hemmstoffe eingesetzt mit dem Ziel, den Abbau von Acetylcholin zu verlangsamen und somit die synaptisch wirksame Konzentration zu erhöhen. Die Studienlage bezüglich der Wirksamkeit von Medikamenten wie NMDA-Rezeptor-Antagonisten, nichtsteroidalen Entzündungshemmern oder Ginkgo-Extrakten ist widersprüchlich (DeKosky et al., 2006; Sastre et al., 2006; Birks et al., 2007). Die besondere Problematik des Morbus Alzheimer liegt also neben der oben beschriebenen Vielzahl von nebeneinander auftretenden Pathomechanismen (s. auch Abschnitt 4.8 *Biologische Bedeutung der  $\beta$ -Spaltung durch BACE1*) auch in der momentan noch mangelhaften Therapierbarkeit. Denn sowohl die Acetylcholinesterase-Hemmstoffe als auch die NMDA-Rezeptor-Antagonisten und andere Präparate können das Voranschreiten der Erkrankung letztendlich nicht verhindern.

Die oben genannten Plaques werden aus Amyloid- $\beta$ -Peptid ( $A\beta$ -Peptid), einem Typ-I-Transmembranprotein (s.o.), gebildet. Dieses Peptid aggregiert mit weiteren anfallenden  $A\beta$ -Peptiden, bis schließlich ein unlöslicher Komplex vorliegt, der als Plaque abgelagert wird. Aggregierende Peptide sind ein Charakteristikum neurodegenerativer Erkrankungen. Obwohl je nach Krankheit unterschiedliche spezifische Peptide im Vordergrund stehen, haben diese Proteine eine Gemeinsamkeit: Es erfolgt eine Umstrukturierung ihres physiologischen dreidimensionalen Aufbaus, die zu einer besonders starken Aggregation führt. Liegt eine gewisse Menge an aggregierten Proteinen vor, wird das Absterben der neuronalen Zellen vorangetrieben. Im Falle von Morbus Alzheimer wird durch die Plaque-Vorstufen, kleine Amyloidoligomere, die so genannte Amyloidkaskade eingeleitet. Im Rahmen dieser Kaskade werden auch die oben erwähnten *tangles* gebildet, durch die wiederum zytotoxische Verbindungen freigesetzt werden, aufgrund derer die Neurone zugrunde gehen.

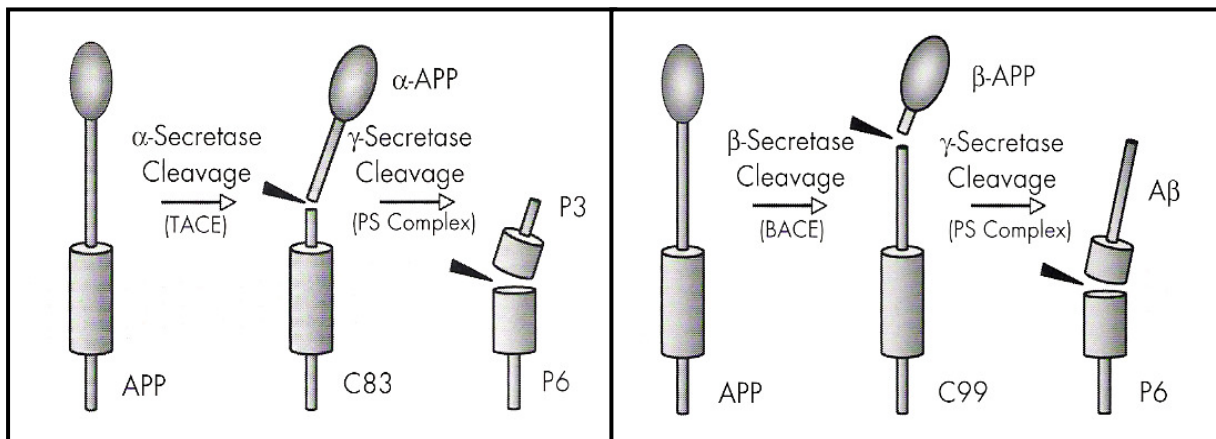


**Abb. 1. 5** Histologisches Präparat von Gehirnschnitten zur Darstellung von Amyloid-Plaques. Deutlich sind die Plaqueformationen (Pfeile) um die Nervenzellen herum erkennbar (Silberimprägnation nach Bielschowsky)

Das Amyloid- $\beta$ -Peptid wird aus einem großem Vorläufermolekül, dem *amyloid-precursor-protein* (APP), herausgeschnitten. Die dabei beteiligten Enzyme werden Sekretasen genannt (Esler und Wolfe, 2001). Es werden drei verschiedene Sekretasen, die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase (Abb. 1. 6) unterschieden. Proteasen wie ADAM10, ADAM17 (*a disintegrin and metalloproteinase domain*

10/17) und TACE (*Tumor-necrosis-factor- $\alpha$  converting enzyme*) übernehmen die Funktion der  $\alpha$ -Sekretase, die der  $\beta$ -Sekretase wird durch BACE1 (*beta-site-APP-cleaving enzyme 1*) oder das verwandte BACE2 erfüllt. Die  $\gamma$ -Sekretase besteht aus einem Komplex mehrerer Proteine wie Präsenilin 1 und 2, PEN-2 (*presenilin enhancer 2*), APH-1 (*anterior pharynx-defective 1*) und Nicastrin. Inwieweit weitere Proteine involviert sind, ist bis dato nicht eindeutig geklärt (Kaether, Haass und Steiner, 2006).

Beim nicht-amyloidogenen Entstehungsweg spaltet die  $\alpha$ -Sekretase die Amyloiddomäne gefolgt von der  $\gamma$ -Sekretase, die den restlichen Proteinkomplex spaltet (s. Abb. 1. 6). Die so entstehenden Produkte werden anschließend abgebaut. Vor allem in Nervenzellen steht die  $\alpha$ -Sekretase in Konkurrenz mit der  $\beta$ -Sekretase. Zur Amyloid-Entstehung kommt es durch die kombinierte Aktion von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase (s. Abb. 1. 6), während die Spaltung durch die  $\alpha$ -Sekretase nicht erfolgt. Das Amyloid wird anschließend aus der Nervenzelle ausgeschieden (Esler und Wolfe, 2001) und aggregiert.



**Abb. 1. 6** Schematik der enzymatischen Spaltung von APP und Plaque-Bildung

*Links:* Nicht-amyloidogene Spaltung; das Amyloid-Precursor-Protein (APP) wird von der  $\alpha$ -Sekretase in dem Bereich geschnitten, in dem das Amyloid- $\beta$ -Protein ( $A\beta$ ) enthalten ist. Somit wird die Bildung von  $A\beta$  verhindert.

*Rechts:* Amyloidogene Spaltung; APP wird zuerst durch die  $\beta$ -Sekretase, anschließend durch die  $\gamma$ -Sekretase gespalten. Es kommt zur Freisetzung von  $A\beta$ .

nach Esler und Wolfe (2001)

Diese Amyloid-Bildung an sich ist noch nicht pathologisch, sondern ein normaler, physiologischer Vorgang. Zur symptomatischen Erkrankung an Morbus Alzheimer ist eine gewisse Menge an Amyloid nötig sowie eine gewisse Zeit der Akkumulation. Zur Einschätzung der zeitlichen Dimensionen sei darauf hingewiesen, dass es zur Bildung einer Plaque mit dem Durchmesser von 0,3mm etwa 30 Jahre braucht. Wird im Laufe der Zeit die entsprechende Menge an  $A\beta$  erreicht bzw. überschritten, akkumulieren die Amyloide, aggregieren und bilden die oben beschriebenen Plaques. Auch schwankt die Anzahl der Aminosäuren, die in dem Amyloid- $\beta$ -Peptid enthalten sind. Am häufigsten wird das Peptid bestehend aus 40 Aminosäuren ( $A\beta_{40}$ ) gebildet, ein geringerer Anteil besteht aus 42 Aminosäuren ( $A\beta_{42}$ ). Dieses  $A\beta_{42}$  hat allerdings die ausgeprägte Tendenz, stabile Aggregate zu bilden.

Es gibt verschiedene genetische Komponenten bei der Verursachung der Alzheimer-Erkrankung. Bei knapp 10% der Betroffenen lässt sich eine familiäre Häufung nachweisen, die auf Mutationen des Präsenilin-1-Gens auf Chromosom 14, des Präsenilin-2-Gens auf Chromosom 1 oder des APP-Gens auf Chromosom 21 zurückzuführen sind. Bei Menschen mit dem Down-Syndrom ist durch das dreifache Vorhandensein des Chromosoms 21, auf dem das APP-Gen liegt, das Risiko für eine Alzheimer-Erkrankung ebenfalls erhöht (Wagner und Munoz, 1999). Mutationen dieser Gene führen zu einer veränderten Funktion der Sekretasen mit vermehrter Bildung von A $\beta$ <sub>42</sub>, das, wie oben ausgeführt, besonders dauerhaft aggregiert.

Die oben beschriebenen Pathomechanismen werden momentan als parallel existierend angesehen. Es ist zurzeit unklar, ob und welcher Vorgang den eigentlichen Auslöser der Erkrankung darstellt. Die verschiedenen Mechanismen führen letztendlich alle zum Zelluntergang. Dieser Untergang der Neurone zeigt sich nicht nur in den oben aufgeführten Symptomen, sondern auch in einer dramatischen Hirnatrophie, die mittels Magnetresonanztomographie (MRT) darstellbar ist.

### 1.2.3. Das Amyloid-Vorläuferprotein und seine physiologische Funktion

APP ist ein glykosyliertes Typ-I-Transmembranprotein, das eine große N-terminale Ektodomäne, eine kurze C-terminale zytoplasmatische Domäne und eine Transmembrandomäne aufweist (Selkoe, 2001). APP wird ubiquitär in fast allen Zellen und Gewebearten gebildet. Dabei werden drei Isoformen unterschieden, die in unterschiedlichen Geweben auftreten und durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen (Selkoe, 2001). Die kürzeste Form APP<sub>695</sub> wird nahezu ausschließlich in Neuronen exprimiert, während APP<sub>751</sub> die am häufigsten vorzufindende Isoform in nicht-neuronalen Zellen ist (Wertkin *et al.*, 1993). Alle APP-Isoformen weisen eine Kupfer-, Eisen- sowie eine Zink-Bindungsstelle in der Ektodomäne auf (Bush *et al.*, 1993; Hesse *et al.*, 1994; Maynard *et al.*, 2002). Für die Bindung von Zink wurde nachgewiesen, dass sie die Aggregation von A $\beta$  *in vitro* und *in vivo* beeinflusst (Bush *et al.*, 1994). Die A $\beta$ -Region tritt in allen drei Isoformen auf und wird N-Terminal durch die Schnittstelle der  $\beta$ -Sekretase und C-Terminal durch die Schnittstellen der  $\gamma$ -Sekretase begrenzt. Die zytoplasmatische Domäne ist hoch konserviert und interagiert mit den meisten der identifizierten Bindungspartnern von APP (Reinhard *et al.*, 2005).

Bisher ist die physiologische Funktion von APP noch nicht endgültig geklärt, auch wenn zahlreiche mögliche Aktivitäten vorgeschlagen wurden (Reinhard *et al.*, 2005). Experimente mit *knock-out*-Mäusen geben diverse Hinweise auf die Funktion. Eine APP-Defizienz weist keine oder nur geringe Phänotypen auf (Zheng *et al.*, 1995), wohingegen *knock-out*-Mäuse für die gesamte APP-Genfamilie bereits vor der Geburt versterben und schwere neurologische Defekte aufweisen (Herms *et al.*, 2004). Eine detaillierte Analyse der funktionellen Zusammenhänge steht bisher noch aus. Allerdings scheint APP in Prozessen der Zell-Zell-Interaktion (Wang und Ha, 2004), Zelladhäsion (Soba *et al.*, 2005) und dem Zellwachstum, insbesondere dem Auswachsen von Axonen (Jin *et al.*, 1994; Mattson, 1997; Ninomiya *et al.*, 1993), eine bedeutende Rolle zu spielen. Für die Peptide A $\beta$ <sub>40/42</sub> wurde vor kurzem neben der zytotoxischen Wirkung auch eine differentielle physiologische Funktion in der Lipid-Homöostase beschrieben (Grimm *et al.*, 2005). Die AICD-



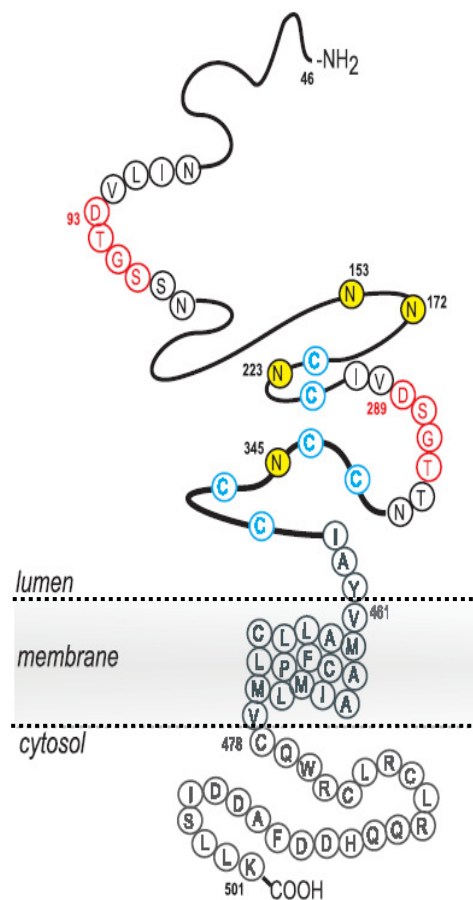
Region (*APP intracellular domain*) ist für viele Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich und weist nach Translokation in den Zellkern transkriptionelle Aktivität auf (Cao und Sudhof, 2001; Von Rotz *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist die These aufgestellt worden, APP und dessen Spaltprodukte kontrollierten die neuronale Aktivität über den Mechanismus einer negativen Rückkopplung (Kamenetz *et al.*, 2003; Venkitaramani *et al.*, 2007) und induzierten die endozytotischen Reduktion von Glutamat-Rezeptoren an der Zelloberfläche (Hsieh *et al.*, 2006) (s. auch Abschnitt 1.2.2 *Pathomechanismen bei Morbus Alzheimer*).

#### 1.2.4. Bedeutung und Funktion von BACE1

Das Enzym BACE1 (*beta-site-APP-cleaving enzyme 1*), auch Memapsin2 oder Asp2 genannt, ist eine Aspartylprotease bestehend aus 501 Aminosäuren. Wie der Abbildung 1. 7 zu entnehmen ist, handelt es sich um ein Typ-I-Transmembranprotein (s.o.). Am luminalen Abschnitt befinden sich zwei aktive Motive (rot markiert), die für die enzymatische Aktivität von Bedeutung sind. Der transmembranäre Abschnitt liegt zwischen den Aminosäuren 461-477. Ein Charakteristikum von BACE1 ist das sog. *flap*, eine Tasche, die aus den Resten 65-79 besteht. Ist kein Inhibitor an diese Tasche gebunden, befindet sie sich in einer offenen Position und weist eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur sowie diverse Wasserstoffbrücken auf (Braun, 2007). Nach Bindung eines Inhibitors (s.u.) werden diese Wechselwirkungen aufgehoben.

Neben der oben skizzierten zentralen Bedeutung der  $\beta$ -Sekretase BACE1 bei der Entstehung von Amyloid- $\beta$ -Peptid im Rahmen von Morbus Alzheimer (s. Abb. 1. 6), ist mittlerweile bekannt, dass BACE1 auch eine physiologische Rolle im gesunden Körper spielt. So ist beobachtet worden, dass BACE1 notwendig für die Bildung von Myelinscheiden ist. In Tierversuchen mit BACE1-*knock-out*-Mäusen ist nachgewiesen worden, dass die Nervenfasern sowohl geringer myelinisiert als auch ungeordneter gebündelt sind (Willem *et al.*, 2006). Es hat sich sogar gezeigt, dass die *knock-out*-Mäuse eine überdurchschnittlich hohe Sterberate direkt nach der Geburt, und die überlebenden Mäuse Auffälligkeiten wie geringeres Wachstum, vermehrte Ängstlichkeit und Hyperaktivität aufweisen (Dominguez *et al.*, 2005) sowie eine ausgeprägte Ataxie (Kobayashi *et al.*, 2008).

Bei gesunden neugeborenen Mäusen liegt zu dem Zeitpunkt, zu dem die Myelinscheide ausgebildet wird, eine besonders hohe Konzentration von BACE1 vor. Im weiteren Verlauf des Lebens, wenn die Myelinscheidenbildung bereits abgeschlossen ist, ist die Konzentration von



**Abb. 1. 7**  
Schematische Darstellung von BACE1  
nach Nawrot, (2004)

BACE1 dagegen geringer (Willem et al., 2006). Obwohl also Dominguez et al. zeigten, dass eine komplette Ausschaltung von BACE1 zwar pathologische Nebeneffekte mit sich führen kann, scheint es gleichwohl als möglicher Therapieansatz im Rahmen von Morbus Alzheimer vorstellbar, BACE1 nach Erfüllung seiner physiologischen Funktion zumindest partiell zu unterdrücken, um so die Entstehung von A $\beta$ -Peptid zu reduzieren. So konnte anhand von Mäusen, die aus der Kreuzung von eine APP-Mutante exprimierenden Tieren mit homozygot oder heterozygot BACE1-*knock-out* Tieren stammten, nachgewiesen werden, dass auch bereits eine Reduktion der BACE1-Konzentration ausreicht, die Bildung von A $\beta$ -Plaques signifikant zu verringern (McConlogue et al., 2007). Bei den Tieren, die eine heterozygote BACE1-Expression aufwiesen, zeigte sich die A $\beta$ -Produktion gegenüber den Mäusen mit dem BACE1 $^{+/+}$  -Genotyp als dermaßen verlangsamt, dass diesen Tiere im Alter von 13 Monaten lediglich 10%, im Alter von 18 Monaten nur 50% der Plaques-Konzentration im Vergleich zu den BACE1 $^{+/+}$  - Mäusen nachgewiesen werden konnte (McConlogue et al., 2007). Eine vollständige Inhibition von BACE1-Proteinen scheint somit für eine effektive Reduktion der Amyloid-Bildung nicht Bedingung zu sein.

BACE1-Inhibitoren können als peptidisch und nicht-peptidisch klassifiziert werden. In einigen Fällen ist diese Klassifikation nicht genau möglich, da der Übergang von peptidischen zu nicht-peptidischen Inhibitoren schrittweise verläuft. Außerdem existieren auch Modulatoren von BACE1, die das Enzym blockieren, indem sie außerhalb des aktiven Zentrums binden (Kornacker et al., 2005). Zu den peptidischen Inhibitoren gehören Molekülstrukturen wie Statine, Norstatine, Hydroxyethylamine, Hydroxyethylurea und Hydroxyethylene sowie Isophthalamide. Nachteile der Peptid-basierten Inhibitoren mit ihrem großen Molekulargewicht sind neben den hohen Produktionskosten ihre geringe Stabilität und orale Bioverfügbarkeit sowie die mangelhafte Liquorgängigkeit (Umbreen, 2007). Die Triazine und Guanidine gehören neben Coumarinyl-, Naphthyl- und anderen Derivaten zu den nicht-peptidischen Inhibitoren. Diese Substanzen weisen eine höhere Stabilität und ein niedrigeres Molekulargewicht auf und dementsprechend eine bessere orale Bioverfügbarkeit sowie Liquorgängigkeit (Braun, 2007).

### 1.3. Fragestellung der vorliegenden Dissertation

In der vorliegenden Arbeit wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften des spannungsabhängigen Natriumkanals Na $_v$ 1.2 untersucht. Ziel der Experimente war dabei, Einflüsse der  $\beta$ -Sekretase BACE1 auf die Aktivierung und Inaktivierung des Natriumkanals zu überprüfen und festzustellen, inwieweit BACE1 einen sicheren therapeutischen Angriffspunkt darstellt. Ausgangspunkte waren die Befunde von Wong et al. (2005), die die  $\beta$ -Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen erstmals als Substrate des Enzyms BACE1 mittels Westernblot-Untersuchungen identifizierten (Wong et al., 2005).

Zur Klärung dieser Fragestellung sollte zunächst anhand von *patch-clamp*-Messungen das Öffnungsverhalten des spannungsabhängigen Natriumkanals Na $_v$ 1.2a beobachtet und anschließend in erneuten Messungen der Einfluss der  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta$ 2 und  $\beta$ 4 auf dieses Öffnungsverhalten festgehalten werden. Die im Weiteren folgenden Experimente zielten darauf ab, im Rahmen von Kotransfektionen von BACE1 entweder mit einer  $\beta$ -Untereinheit oder ohne diese Untereinheit

zusätzliche Änderungen in der Aktivierung und der Inaktivierung zu charakterisieren. Der Einsatz des BACE1-Inhibitors C3 und die Verwendung einer proteolytisch inaktiven BACE1-Mutante ergaben sich ebenso wie die Zusammenstellung der Kontrollversuche aus der Überlegung, eine bestmögliche Quantifizierung möglicher BACE1-Effekte zu gewährleisten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Molekularbiologie

Im Anhang sind die verwendeten Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterialien und Geräte aufgelistet. Sofern nicht anders angegeben, entspricht die Handhabung den Protokollen der Hersteller.

#### 2.1.1. Zellkultur

Alle Arbeitsschritte mit HEK293-Zellen wurden, soweit nicht anders beschrieben, an einer Sterilwerkbank nach vorausgegangener Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion durchgeführt.

#### **HEK293-Zellen (ATCC Nummer [[www.atcc.org](http://www.atcc.org)]: CRL-1573)**

Die Zelllinie HEK293 (HEK = *human embryonic kidney*) ist eine permanente Linie aus menschlichen embryonalen Nierenzellen, die mit dem Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977). HEK293-Zellen zeigen eine hohe Teilungsrate und ein epithelial adhärentes Wachstumsmuster. Dabei sind sie relativ tolerant gegenüber der Zusammensetzung des Nährmediums, pH- und Temperaturänderungen sowie der Behandlung mit Trypsin zum Ablösen der Zellen. Da die Zellmembran überdies direkt ohne enzymatische Vorbehandlung den patch-clamp-Pipetten zugänglich ist, eignet sich diese Zellkultur durch die einfache Handhabung ideal für elektrophysiologische Experimente.

HEK293-Zellen weisen intrinsische Kaliumkanäle auf. Gunthorpe et al. (2001) konnten zwar die Existenz endogener protonenaktivierter Natriumkanäle nachweisen (sog. ASICs = *acid-sensing ion channels*), bisher gibt es allerdings keinerlei Anhaltspunkte für die Anwesenheit endogener spannungsgesteuerter Natriumkanäle. Auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Kontrollmessungen haben keinen Hinweis auf intrinsische Natriumkanäle ergeben (s. Kap. 3.1.).

#### **Brutschrank**

Die HEK293-Zellen wurden in einem Brutschrank (innova<sup>TM</sup> 4230, New Brunswick, Nürtingen, Deutschland) bei 37 °C, 5% O<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Luftfeuchtigkeit wurde dabei über Wasserspeicher im Brutschrank konstant gehalten, die regelmäßig mit Aqua dest. aufgefüllt wurden.

#### **Medium**

Für die Kultur der HEK293-Zellen wurde ein D-MEM-Medium (*modified eagle medium* mit 1000mg/l Glukose-Zusatz) mit 10% FCS (*fetal calf serum*) verwendet. Dem Medium wurden 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt, um das Risiko einer Bakterienkontamination zu reduzieren.

## Kultur

Die Zellen wurden in gasdurchlässigen 25cm<sup>2</sup>/75cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage vollständig ausgetauscht. Im Falle einer totalen optischen Konfluenz wurden die Zellen vor dem Medienwechsel gesplittet (s. Zählen der Zellen). Optische Konfluenz und Zustand der Zellen wurden vor jedem Füttern oder Aussetzen der Zellen unter einem Inversmikroskop (Axiovert25, Zeiss, Jena, Deutschland) mit Phasenkontrast kontrolliert.

Zum Passagieren (Ausdünnen/Umsetzen) wurden die Zellen zweimal in der Kulturflasche mit 1-2ml PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin-EDTA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5min bei 37°C wurden die Zellen abgeklopft bzw. abgespült und im Verhältnis 1:5 bis 1:20 gesplittet.

## Zählen der Zellen

Das Zählen der Zellen, aus dem anschließend die jeweils benötigte Zellzahl berechnet werden konnte, war zum Aussetzen der Zellen für die Transfektion bzw. für die *patch-clamp*-Messungen, zum Einfrieren und zum Klonieren der Zellen wichtig.

Die HEK293-Zellen wurden dazu mit 1-2ml PBS in der Kulturflasche gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin-EDTA während einer Inkubationszeit von 5min bei 37°C abgelöst. Das Trypsin-EDTA-Zell-Gemisch wurde daraufhin in 1,5ml-Tubes pipettiert und in der *Spectrafuge Mini* für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellett mit 1ml Medium aufgenommen. Durch das FCS, das sich in diesem Medium befand, wurde das Resttrypsin inaktiviert. Vorsichtiges Resuspendieren führte zu einer homogenen Verteilung der Zellen im Medium. Nach dem Zusatz von 10µl der Zellsuspension auf 190µl Trypanblau wurden 10µl dieses Gemisches in eine Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) gegeben und die sich darin befindenden Zellen ausgezählt. Mithilfe dieser Zählungen konnte Einfluss darauf genommen werden, wie viele Zellen ausgesetzt bzw. eingefroren wurden.

## Einfrieren

Das Einfrieren von Sicherheitskulturen (sog. *backup*-Kulturen) ist für die Zellkulturen sehr wichtig. Morphologie und Eigenschaften der Zellen ändern sich mit zunehmendem Alter, so dass z.B. der Anteil der transfizierten Zellen bei einer älteren Kultur niedriger sein kann als bei einer frisch angelegten Kultur. Auf der anderen Seite kann es gelegentlich trotz aller Vorsichtsmaßnahmen zu Kontaminationen der Zellkulturen mit Bakterien oder Pilzen kommen. In solchen Fällen ist ein Austausch gegen eine frische Zellkultur nötig.

Für eine möglichst große Zellausbeute wurde vor dem Anlegen von Sicherheitskulturen der Inhalt einer 25cm<sup>2</sup>-Kulturflasche in eine 75cm<sup>2</sup>-Flasche überführt. Sobald diese optisch konfluent war, wurden die Zellen ausgezählt (s. Zählen der Zellen) und jeweils 1,5-2,5 Millionen HEK293-Zellen in 0,75ml Medium in ein Kryotube (1,5ml Fassungsvermögen) gegeben. Anschließend wurden weitere 0,75ml Medium mit 20% DMSO (Dimethylsulfoxid) hinzugefügt. Aufgrund der hohen Zelltoxizität von DMSO musste gewährleistet sein, dass die Zellen zügig in einen -80°C

Gefrierschrank überführt werden konnten. Eine Aufbewahrung in einem mit Schaumstoff ausgekleideten Karton schützte dabei vor zu schnellem Herunterkühlen.

### Auftauen

Das Auftauen der Zellen und das Einbringen in frisches Medium erfolgten möglichst zügig, um die toxische Wirkung des DMSO zu minimieren.

Die Kryotubes wurden bereits in angetautem Zustand in eine Zentrifuge (Spectrafuge mini, neolab, Heidelberg, Deutschland) gegeben und ca. 2min zentrifugiert. Anschließend wurde der sich bis dahin gebildete Überstand abpipettiert und durch frisches Medium ersetzt. Dies wurde 1-2 Mal wiederholt, bis die Zellen vollständig aufgetaut waren und sich als Pellet abgesetzt hatten. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1ml Medium aufgenommen und in eine 25cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit 8-10ml Medium überführt. In der Regel konnten die Zellen eine Woche später gesplittet bzw. für Messungen verwendet werden.

### Aussetzen

24 Stunden vor Transfektion bzw. mindestens eine Stunde vor *patch-clamp*-Messungen wurden die mit Trypsin vorbehandelten Zellen nach dem Zählen (s. *Zählen der Zellen*) mit 2ml Medium in Petrischalen für adhärente Zellen mit 35mm Durchmesser ausgesetzt (pro Schale ca. 300 000 Zellen), in denen sich die vitalen Zellen anschließend auf den Schalenboden hefteten.

## 2.1.2. Vektoren und Bakterien

### Vektoren und Plasmide

Die verwendeten Plasmide und Konstrukte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

**Tab. 2.1** Verwendete Plasmide und die dazugehörigen Vektoren

Plasmid	Vektor	Bezugsquelle des Plasmids
rNav1.2a	pCDM8	W. A. Catterall (University of Washington, Seattle, USA)
mβ2 und mβ4	pCMV6	N. Nukina (RIKEN Brain Science Institute, Saitama, Japan)
5HT1A	pCDNA3.1	A. Karschin (Universität Würzburg)
mBACE1	pCDM8	D. I. Dominguez (University of Leuven, Belgien)
mBACE1 D289N	pCDM8	Mutante aus mBACE1 (hergestellt im Institut für Biochemie, CAU Kiel)
EGFP	pEGFP-C1	Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA) (# U55763)
EGFP-F	pEGFP-F	Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA) (# U55763)

### Bakterien

Die eingesetzten Vektoren sind zusammen mit den Bakterienstämmen, durch die sie vermehrt werden können, in Tabelle 2.2 aufgeführt.

**Tab. 2.2** Verwendete Vektoren und die dazugehörigen Bakterienstämme zur Vermehrung

Vektor	Bakterien	Bezugsquelle des Vektors
pCDM8	<i>E. coli</i> (TOP10/P3)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pCMV6	<i>E. coli</i> (TOP10/P3)	OriGene, Rockville, MD
pCDNA3.1	<i>E. coli</i> (TOP10/P3)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pEGFP-C1	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA) (# U55763)
pEGFP-F	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA) (# U55763)

Der kompetente *E.coli*-Stamm TOP10/P3 wurde von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Dessen *low-copy*-Plasmid P3 von einer Größe von 60kb enthält Resistenzgene für Kanamycin, Ampicillin und Tetracyclin. Während die Resistenzgene für Ampicillin und Tetracyclin durch eine Mutation ausgeschaltet sind, ist das Resistenzgen für Kanamycin funktionsfähig, worüber eine Selektion von P3-Plasmidhaltigen Zellen vorgenommen werden kann, da die Resistenzgene durch das Zusammentreffen von P3 mit dem pCDM8 aktiviert werden.

Aufgrund der hohen Rate von Spontanmutationen der Resistenzgene wurden zur Kultur der TOP10/P3-Zellen 10 $\mu$ g/ml Tetracyclin und 100 $\mu$ g/ml Ampicillin bei der Verwendung von LB (*lysogeny broth base*)-Agarplatten und LB-Flüssigmedium eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C kultiviert.

Der *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  wurde ebenfalls über Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die Bakterienkultur wurde mit 25 $\mu$ g/ml Kanamycin versetzt und bei 37°C kultiviert.

### 2.1.3. Bakterienklonierung und Plasmidgewinnung

#### Transformation

Wie in der Anleitung des Herstellers angegeben, wird die Transformation der chemisch kompetenten *E.coli* über einen Temperaturschock erreicht. Die transformierten Bakterien werden anschließend auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Inkubationsschrank bei 37°C gelagert.

#### Selektion

Zur Vermehrung einzelner Klone wurden einzelne der ausplattierten Kolonien mittels autoklavierter Pipettenspitzen aufgenommen und in 5ml-Ampullen mit *lysogeny-broth*-Medium eingebracht. Im Schüttler wurden die Flaschen bei 37°C und 300rpm über Nacht inkubiert, bis das Medium deutlich getrübt war. Von der Flüssigkultur wurde 1-4ml entnommen und der jeweilige Vektor mittels einer Miniprep (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

Der Klon, der die größte Plasmid-Ausbeute aufweist, wurde zur weiteren Nutzung konserviert (s.u.) und ggf. in größerem Maßstab vermehrt.

#### Konservierung

Kurzfristig, d.h. für einige Wochen, können sowohl die LB-Agarplatten als auch die Flüssig-LB-Flaschen im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Zur dauerhaften Aufbewahrung werden die kultivierten Klone in 1,5ml Glycerol-Stocks (10% Glycerin + 90% LB-Medium) bei -80°C konserviert.

## Plasmidgewinnung

Die transformierten Plasmide wurden über Maxipreps von Qiagen und Sigma gewonnen. Zur Maximierung der Ausbeute kann die Menge des Flüssigmediums von 125ml auf bis zu 1000ml erhöht werden. Dazu wird die größere Menge Mediums mit 200-500µl einer 5ml-Flüssigkultur angeimpft und inkubiert.

Die DNS-Extraktion wurde mit einigen Abweichungen nach Herstellerangaben durchgeführt. Um größere Bakterien-Pellets verarbeiten zu können und somit die Ausbeute zu erhöhen, wurden die benötigten Medienvolumina verdoppelt und mittels eines sterilisierten *Mira cloth* Filters vorgefiltert. Als weitere Abweichung gegenüber den Herstellerangaben wurde der Tris-Elutionspuffer (Sigma Maxiprep) auf 65°C erhitzt, was zu einer deutlichen Steigerung der Plasmid-Ausbeute führte.

Nach Gewinnung der DNS wurde die Quantifizierung der Menge über photometrische Messung der Absorption bei 260nm im ND-1000 Spektrophotometer *NanoDrop*<sup>®</sup> (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) erreicht.

Ausbeuten >0,2µg/µl werden bei -80°C aufbewahrt und können unaufbereitet zur Transfektion verwendet werden. Niedrigere Mengen können mittels Ethanolfällung (s. Tab. 2.3) aufkonzentriert und anschließend für Transfektionen eingesetzt werden. Allerdings ist eine Ethanolfällung durch hohen Zeitaufwand und DNS-Verlust gekennzeichnet, so dass der Einsatz eines Sigma-Kits in den meisten Fällen vorzuziehen ist, um so eine hohe DNS-Konzentration zu erzielen.

**Tab. 2. 3** Aufkonzentrieren und Entsalzen der DNS durch Ethanolfällung

Sämtliche Zentrifugationsschritte werden wegen des großen Probenvolumens bis 50ml in einer Zentrifuge bei 15000g und 4°C durchgeführt.

<b>Einzelschritte der Ethanolfällung</b>
Zugabe von 3M Natriumacetat pH 5,0 (10% des Probenvolumens)
Zugabe von Ethanol abs. (250% des Probenvolumens)
Mischen (Vortex, langsamste Stufe)
Lagerung für 30min bei -80°C
60min zentrifugieren
Überstand verwerfen
Waschen mit 1ml 70% Ethanol (-20°C)
5min zentrifugieren, Überstand verwerfen
Erneut 5min zentrifugieren, Überstand verwerfen
Pellet bei 37°C trocknen lassen
Aufnahme des Pellets in sterilen Tris-Puffer (Maxikit Sigma)

### 2.1.4. Nachweismethoden

#### Restriktionsverdau

Zum Nachweis der korrekten Selektion der benötigten Plasmid-Klone wurde ein Enzymverdau des jeweiligen Vektors mithilfe von Restriktionsenzymen eingesetzt (Versuchsprotokoll s. Tab. 2.4) und



der erfolgreiche Verdau mittels einer Gelelektrophorese (s.u.) auf einem 1,2%igen Agarosegel zusammen mit einer 1kb Basenladder nachgewiesen. Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammen von der Firma Promega GmbH, Madison, WI, USA.

**Tab. 2. 4**

Versuchsprotokoll für Restriktionsverdau

<b>Restriktionsverdau, 60 min bei 37°C</b>	
Plasmid-DNS	→ 1µl (Miniprep)
Multicorepuffer (1:10)	→ 2µl
Enzym	→ 1µl (10 units)
H <sub>2</sub> O	→ ad 20µl

### **DNS-Elektrophorese**

Zu den Agarosegelen wurde nach Abkühlung der Farbstoff *SYBR Safe<sup>TM</sup> DNA Gel Stain* (Invitrogen) im Verhältnis 1:10 000 hinzugefügt. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Flachbettgelen. Durch die Interkalation von *SYBR Safe<sup>TM</sup>* in die DNS konnte diese mittels eines Transilluminators (LTF Labortechnik, Wasserburg) durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Mithilfe eines Videodokumentationssystems (LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland) wurden die jeweiligen Bandenmuster dokumentiert.

### **2.1.5. Polymerase-Kettenreaktion und TOPO-Cloning**

#### **Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird zur exponentiellen Amplifikation einer bestimmten DNS-Sequenz eingesetzt. Hierzu werden Oligonukleotid-Primere benötigt, die an den sich gegenüberliegenden Strängen hybridisieren und die Zielsequenz eingrenzen. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben (Promega, Mannheim, Deutschland).

#### **Erstellung der βN- bzw. βC-terminalen Fragmente mittels TOPO-Cloning im Gateway-System**

Zur Herstellung der N- bzw. C-terminalen Fragmente der β-Untereinheiten wurde das sog. *TOPO-Cloning* eingesetzt. Die Methode des *TOPO-Clonings* dient der Klonierung von PCR-Produkten, die mit Hilfe der Taq-Polymerase generiert wurden (Shuman, 1994). Hierzu wurde der Vektor pcDNA-DEST47 Gateway<sup>®</sup> im Rahmen des *pENTR<sup>TM</sup> Directional TOPO<sup>®</sup> Cloning Kits* (Invitrogen) verwendet. Die Durchführung der Klonierung erfolgte nach Herstellerangaben, indem zuerst das PCR-Produkt in den Entry-Vektor, der Entry-Vektor anschließend in den Gateway-Vektor eingebracht wurde. Als PCR-Produkt wurde die jeweilige DNS der zu verwendenden β-Untereinheiten genutzt. Die jeweiligen Primer (*forward* und *reverse* grenzen den entsprechenden Fragmentabschnitt ein) wurden anhand der bekannten Sequenz der betreffenden β-Untereinheit bestimmt (s. *Anhang*) und zur Klonierung entweder des N-terminalen oder C-terminalen Fragments eingesetzt. Im Anschluss an die Fragmenterstellung erfolgte der Nachweis der korrekten Konstrukte ebenfalls mittels Geldokumentation. Dabei werden die jeweiligen Konstrukte auf Agarosegel

aufgetragen, die Länge der sichtbaren Bande anhand eines zugefügten Basenladders bestimmt und mit der errechneten Länge verglichen.

**Tab. 2.5** Thermoprotokoll für die PCR vor Beginn des *TOPO-Cloning*

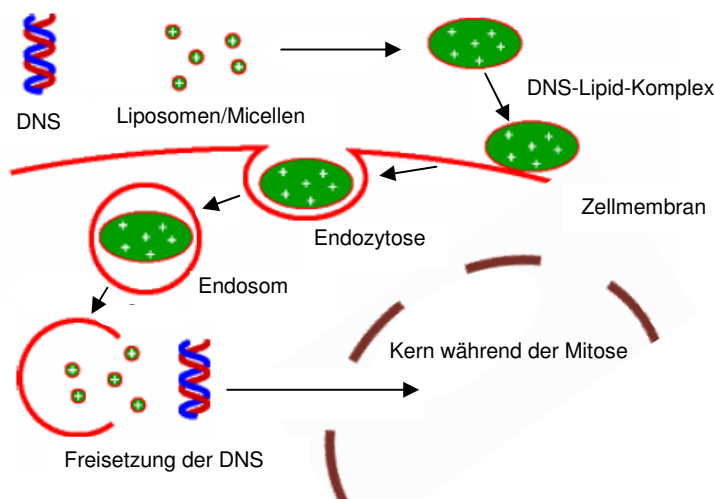
Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	2 min	94 °C	1x
Denaturierung	1 min	94 °C	25x
Abkühlung	1 min	55 °C	
Extension	1 min	72 °C	
Finale Extension	7 min	72 °C	1x

**Tab. 2.6** Reagenzien für die *TOPO-Cloning*-Reaktion, abweichend von den Herstellerangaben

PCR-Produkt	0,5-4µl
Salz-Lösung	0,5µl
Steriles Wasser	ad 2,5µl
TOPO® Vektor	0,5µl
Endvolumen	3µl

### 2.1.6. Transfektion

Das Einschleusen der Vektor-DNS in die HEK-293 Zellen wird mittels liposomaler Transfektion (Felgner et al., 1987; Budker et al., 1997) erzielt. Der Transfektionsablauf ist in Abbildung 2. 1 schematisch dargestellt.



**Abb. 2. 1** Schema der liposomalen Transfektion  
Die Vektor-DNS wird als DNS/Lipidkomplex mittels Endozytose von der Zelle aufgenommen, freigesetzt und während der Mitose in den Zellkern geschleust (Tranfection Technology, Biontexas, München, Deutschland).

Die Transfektionssubstanz (Superfect®, Qiagen, Hilden, Deutschland) enthält Liposomen, die mit der Vektor-DNS Komplexe (Micellen) bildet. Diese Komplexe werden über Endozytose von der Zelle aufgenommen. Darüber hinaus erfüllt die Transfektionssubstanz die Funktion, die DNS aus den Endosomen freizugeben, so dass diese in den Zellkern gelangen kann, sofern sich der Kern gerade in der Teilungsphase befindet. Anschließend werden die kodierten Proteine biosynthetisiert.

Ist die Vektor-DNS dauerhaft in den Zellkern integriert worden und wird auch bei Zellteilungen weitergegeben, so wird dies eine stabile Transfektion genannt. Als transiente Transfektion wird hingegen bezeichnet, wenn die Vektor-DNS wieder aus dem Zellkern entfernt und abgebaut wird. Diese Art der Transfektion ist am weitesten häufigsten anzutreffen. Aus den Experimenten resultierend lässt sich lediglich eine stabil transfizierte Zelle auf 10 000 transient transfizierte abschätzen. Daraus ergibt sich, dass nach der Transfektion gewisse Zeiträume eingehalten werden müssen, in denen die Zellen zur Messung genutzt werden können (s. Abschnitt *Versuchsdurchführung*).

Der Erfolg einer Transfektion hängt von der Transfektionseffizienz, der Expressionsstärke und von der Toxizität der Transfektionssubstanz für die Zellen ab. Die Transfektionseffizienz beschreibt den Anteil der Zellen von der Gesamtzellzahl, die eine Expression der Fremdproteine aufweisen.

Einflussnehmende Größen sind die Zelldichte zum Transfektionszeitpunkt, die Menge der Vektor-DNS im Verhältnis zur Menge an Transfektionssubstanz und die Inkubationszeit. Die HEK293-Zellen geben Mediatoren in das Medium ab, die einen Proliferationsstimulus für die Zellen darstellen. Dieser Stimulus führt erst ab einer gewissen Stärke, d.h. einer gewissen Mediatorenkonzentration zu einer deutlich gesteigerten Zellteilung. Auf die Transfektion bezogen bedeutet eine schnellere Teilung eine raschere Vektor-DNS Aufnahme. Liegen die Zellen allerdings zu dicht, befinden sich also zu viele Mediatoren im Medium, verlangsamt sich die Zellteilung. Eine Transfektion wäre in diesem Fall also behindert.

Das Verhältnis zwischen den Mengen an Vektor-DNS und Transfektionssubstanz sollte sich stets im gleichen Rahmen befinden. Wird zuwenig DNS zur Transfektionssubstanz gegeben, kann es sein, dass die Zellen die erforderlichen Proteine zu schwach exprimieren und die Messergebnisse verfälscht sind. Ist die DNS-Menge zu hoch, kann dies einen toxischen Effekt haben.

Die Zeit, die die HEK293-Zellen für einen Mitosezyklus benötigen, beträgt ungefähr 24 Stunden. Werden die Zellen zu früh für Messungen genutzt, kann der Erfolg der Transfektion noch nicht garantiert werden.

Auch die Reinheit der Vektor-DNS spielt eine Rolle bei der Transfektion. So können Verunreinigungen zu einer Störung der Micellenbildung führen.

### **Transfektion**

Die erforderliche bzw. gewünschte Vektor-DNS wird im Rahmen einer transienten Kotransfektion in die Zelle geschleust. Dabei werden ein Markerprotein (EGFP) und das zu exprimierende Protein auf jeweils verschiedenen Vektoren eingebracht. Bei der Kotransfektion kommt das Alles- oder Nichts-Prinzip zur Geltung: Wenn sich die Zellen in der Mitose-Phase befinden, nehmen sie entweder alle anwesenden Vektoren auf und exprimieren die jeweiligen Proteine oder nicht. Dies ist eine wesentliche Grundlage für die Interpretation der vorliegenden Experimente, bei denen verschiedene Vektoren in unterschiedlicher Zahl und Kombination transfiziert worden sind. Der Nachweis der

gelungenen Transfektion konnte insbesondere durch die Visualisierung am konfokalen Mikroskop erbracht werden (s. Abschnitt 2.1.7).

**Tab. 2. 7** Transfektionsprotokoll für die Transfektion mit Superfect® (Qiagen, Hilden, Deutschland)

<b>1. Aussaat</b>	Auszählen in der Zählkammer von 500 000 Zellen/3,5cm Petrischale, für 24h inkubieren und absetzen lassen
<b>2. Zelldichte</b>	Vor der Transfektion die optische Zelldichte im Mikroskop kontrollieren
<b>3.1 Transfektionsreagenzien</b>	0,5µg EGFP-C1 + 1µg jedes anderen Konstruktes in 100µl Medium (ohne FCS/PS) aufnehmen 10µl Superfect (Qiagen)/vorgesehene 3,5cm Petrischale hinzugeben
<b>3.2 Mischen</b>	mittels vorsichtigen Rührens mit einer Pipettenspitze
<b>3.3 Inkubieren</b>	Lösung bei 20 °C für 10min inkubieren
<b>4.1 Zellen</b>	Medienwechsel mit 1ml frischen Serums (mit FCS/PS)
<b>4.2 Zugabe der Reagenzien</b>	Transfektionsreagenzien hinzugeben und vorsichtig vermischen
<b>5. Inkubation</b>	Im Brutschrank für 90min bei 5% CO <sub>2</sub> und 37 °C inkubieren
<b>6. Medienwechsel</b>	Medienwechsel mit 2ml frischen Serums (mit FCS/PS)/3,5cm Petrischale nach 90min
<b>7. patch-clamp-Messung</b>	s. Abschnitt 3.2.6. <i>Versuchsdurchführung</i>

### Transfektionsprotokolle

Das Transfektionsprotokoll, das der in dieser Arbeit angewendeten transienten Transfektion zugrunde liegt, ist der Tabelle 2.7 zu entnehmen.

Darüber hinaus erfolgte die Vorinkubation bzw. Zugabe des BACE-Inhibitors C3 nach folgendem Schema in der Tabelle 2.8.

**Tab. 2. 8** Schema zur Zugabe des BACE-Inhibitors C3

<b>Zeitangabe</b>	<b>Arbeitsschritt</b>
<b>½ h vor Transfektion</b>	0,25 µl C3 auf 1 ml Medium pro Petrischale (Ø 3,5cm)
<b>bei Schritt 4.2 der Transfektion</b>	0,25 µl C3 auf 1 ml Medium pro Petrischale (Ø 3,5cm)
<b>bei Schritt 6 der Transfektion</b>	0,25 µl C3 auf 1 ml Medium (statt 2 ml) pro Petrischale (Ø 3,5cm)
<b>12 h nach Transfektion</b>	0,25 µl C3 pro Schale zum enthaltenen Medium dazugeben
<b>24 h nach Transfektion</b>	0,25 µl C3 pro Schale zum enthaltenen Medium dazugeben
<b>nach 36 h nach dem Splitten</b>	0,1 µl C3 auf 1 ml Medium pro Petrischale (Ø 3,5cm)

### 2.1.7. Immunfluoreszenz-Darstellung

Um die subzelluläre Lokalisation der Proteine näher zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von HEK293-Zellen durchgeführt, die jeweils in unterschiedlichen Konstellationen transfiziert worden waren. Die Darstellung mithilfe eines konfokalen Mikroskops (LSM510, Zeiss, Jena, Deutschland) erfolgte über GFP-Markierungen der  $\beta$ -Untereinheiten und myc-Markierung von BACE1. Die myc-Markierung wurde mittels zweier Antikörper (1.AK: *polyclonal*

*rabbit anti-myc* (Santa Cruz Biotechnology); 2.AK: ALEXA 633 *goat anti-rabbit*, Molecular Probes, Invitrogen) sichtbar gemacht (s. Tab. 2.9), wovon der Zweitantikörper ALEXA 633 fluoresziert.

**Tab. 2. 9** Protokoll der Immunfluoreszenz-Färbungen

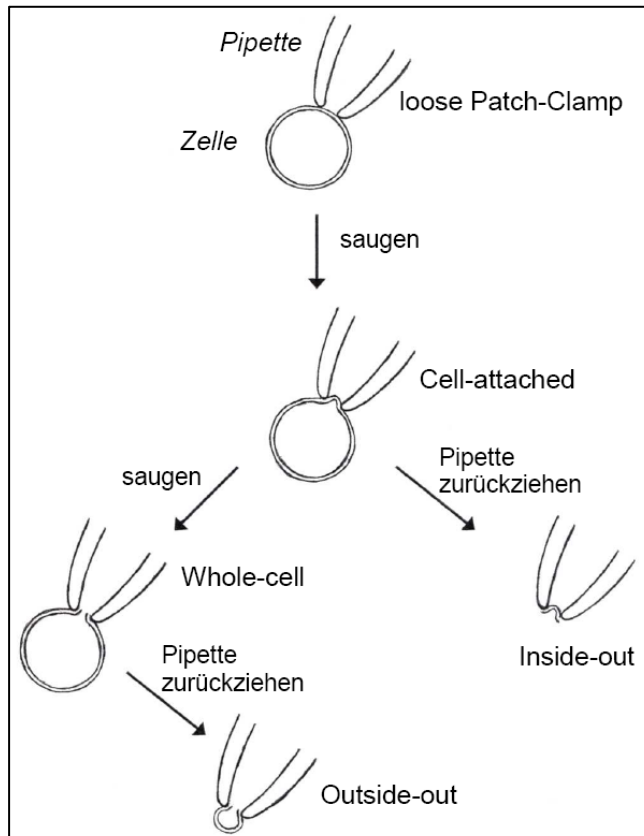
1.	ausgesetzte Zellen 2x mit PBS waschen
2.	10 min mit -20°C Methanol inkubieren
3.	1 min -20°C Aceton inkubieren
4.	3x Waschen mit PBS
5.	je nach Antikörper (AK) ggf. 20 min Blocken mit 5% Normal-Ziegenserum in 1% PBS bei Raumtemperatur
6.	3x Waschen mit PBS
7.	Aufbringen des Erst-AK
8.	über Nacht in feuchter Kammer + Deckglas im Kühlschrank inkubieren
9.	3x Waschen mit PBS
10.	Aufbringen des Zweit-AK
11.	60 min abgedunkelt bei Raumtemperatur + Deckglas inkubieren
12.	3x Waschen mit PBS
13.	Eindeckmedium (Invitrogen) zugeben + Deckglas, mit Parafilm abdecken

Die Fluoreszenz-Darstellung ist eine Kombination aus Fluoreszenzmikroskopie mit hochauflösenden Videokameras und geeigneten Bildverarbeitungsprogrammen am Computer. Das Grundprinzip dieses Verfahrens ist die effektive Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs und die gleichzeitige Registrierung des von ihm emittierten Lichtes. Dabei wird das Licht mit der Anregungswellenlänge  $\lambda_1$  durch Reflexion mithilfe eines Farberteilers auf den Farbstoff gelenkt. Dieser Farbteiler wird so gewählt, dass er das Anregungslicht zwar umlenkt, für das emittierte Licht der Wellenlänge  $\lambda_2$  ( $\lambda_2 > \lambda_1$ ) aber durchlässig ist, so dass auf diese Weise das Anregungslicht vom emittierten Licht getrennt werden kann. Die Nachbearbeitung der Bilder erfolgt anschließend am Computer mit entsprechenden Bearbeitungsprogrammen (Axon Instruments, Foster City, CA, USA).

## 2.2. Elektrophysiologie

### 2.2.1. patch-clamp-Technik

Grundlage dieser Arbeit ist die sogenannte *patch-clamp*-Technik (Hamill et al., 1981), welche von Neher und Sakmann (1976) ausgehend von der Spannungsklemme (*voltage-clamp*) entwickelt wurde. Durch diese Technik ist es möglich, kleine Membranabschnitte elektrisch zu isolieren und Ionenströme, die im Bereich dieses Fleckens (*patch*) durch einzelne Kanäle fließen, zu messen. Die zuvor nötige Isolation der Membranbezirke ist in verschiedenen Konfigurationen möglich, von denen die vier wichtigsten der Abbildung 2. 2 zu entnehmen sind.

**Abb. 2. 2**

Die vier wichtigsten Messkonfigurationen der *patch-clamp*-Technik und ihre Herstellung.  
(nach Hamill et al., 1981)

Die sog. *whole-cell*-Konfiguration ermöglicht zusätzlich die elektrische Kontrolle der gesamten Zellmembran und dementsprechend die Beobachtung der Ionenströme über die gesamte Zelle.

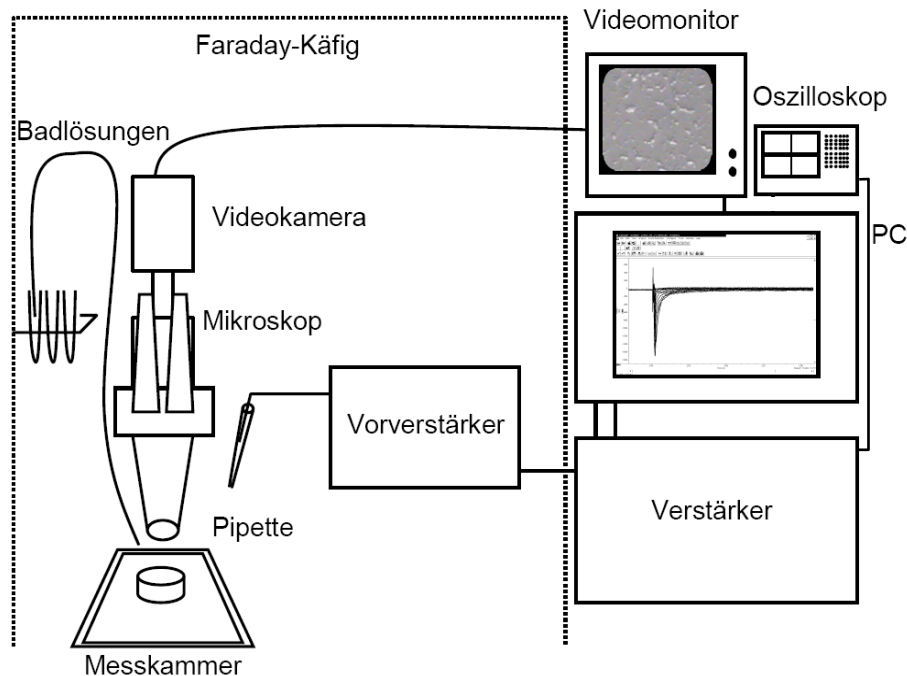
Prinzipiell ist die *patch-clamp*-Technik an allen Zellen einsetzbar. Wichtige Voraussetzung ist der freie Zugang zur Zelloberfläche mit der Pipettenspitze.

Die *patch-clamp*-Technik ermöglicht die direkte Messung zweier elektrischer Parameter einer Zelle. In der Versuchsanordnung, die als Spannungsklemme (*voltage-clamp*) bezeichnet wird, wird der über die Zellmembran fließende Strom, in der sog. Stromklemme (*current-clamp*) die vorhandene transmembranäre Potentialdifferenz gemessen.

Zum vereinfachten Verständnis der *voltage-clamp*-Anordnung ist die Zellmembran als ein einfaches R-C-Glied eines elektrischen Stromkreises anzusehen. Die Doppellipidmembran wirkt hierbei als Kondensator, der Ionenkanal stellt einen Widerstand dar. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird die über der Zellmembran anliegende Spannung konstant gehalten. Dies wird folgendermaßen ermöglicht: Die vorgegebene Kommandospannung wird mit der tatsächlich über eine Elektrode gemessenen Spannung verglichen. Nun hängt die tatsächliche Potentialdifferenz über eine porenhaltige Membran im Idealfall hauptsächlich vom Ionenfluss durch eben diese Poren ab. Fließt ein Strom  $I$  über einen Widerstand  $R$ , hier der Ionenkanal, so ändert sich entsprechend dem Ohmschen Gesetz die Spannung  $U$ . Um diese Spannung konstant zu halten, muss ein dem fließenden Strom entgegengesetzter, gleichgroßer Strom in die Zelle injiziert werden. Dieser wird nun in der *voltage-clamp* Anordnung gemessen und entspricht dem Ionenfluss durch die Membranporen und dem gleichzeitig auftretenden sog. Leckstrom, der durch Undichtigkeiten des *giga-seal* fließt.

### 2.2.2. *patch-clamp*-Aufbau

Die *patch-clamp*-Anlage (s. Abb. 2. 3) befindet sich auf einem vibrationsisolierten Tisch und ist von einem zur Seite der messenden Person hin offenen Faradaykäfig umgeben. Dadurch wird einerseits eine mechanische, andererseits eine elektrische Abschirmung gewährleistet.



**Abb. 2. 3**

Schematische Darstellung des *patch-clamp*-Aufbaus inklusive angeschlossener Geräte (Erläuterung: s.Text)

Die Petrischale, in der sich die zu untersuchenden Zellen befinden, ist in einer Messkammer im Mikroskop fixiert. Bei dem Mikroskop handelt es sich um ein inverses Mikroskop (Axiovert35, Zeiss, Jena, Deutschland), bei dem nach Bedarf Fluoreszenzlicht zugeschaltet werden kann. Das Fluoreszenzlicht spielt für die Auswahl der zu messenden Zelle eine bedeutende Rolle, da in diesem Licht nur die mit dem fluoreszierenden Markerprotein EGFP transfizierten Zellen leuchten.

Zusätzlich ist an dem Mikroskop eine Videokamera angebracht, mit der Bilder der Zellen auf einem Videomonitor dargestellt werden können. Auf diese Weise können während einer Messung die Lage der Ableit- und Perfusionspipette sowie eventuelle Zellveränderungen beobachtet und kontrolliert werden.

Die jeweils benötigten Badlösungen werden über Pipetten perfundiert, deren Abstand zur Petrischale mittels zwei-dimensionaler ( $x$ ,  $y$ ) hydraulischer Mikromanipulatoren eingestellt werden kann. Über ähnliche drei-dimensionale ( $x$ ,  $y$ ,  $z$ ) Mikromanipulatoren wird auch die Feineinstellung der Pipette geregelt. Die Pipette ist in einer speziellen Halterung befestigt, in die sie eingeschraubt und gewendet werden kann. An diese Halterung sind ein Dreiwegehahn und ein flüssigkeitsgefülltes U-Rohr angeschlossen, welche das Anlegen des für die Messung nötigen Unterdruckes ermöglichen.

Die gemessenen Daten werden auf einem Computer gespeichert. Anhand eines zusätzlich angebrachten Oszilloskops (PM3215, Philips, Hamburg, Deutschland) können Widerstands-

änderungen der Pipette sowie eventuelle Spannungssprünge direkt während der Messungen beobachtet werden. Mithilfe des Oszilloskops können aber vor allem die korrekte Parametereinstellung im Datenerfassungsprogramm und die erforderlichen Kalibrierungen kontrolliert werden. Zur Einhaltung standardisierter Messbedingungen wurde die Raumtemperatur im Messraum über eine Klimaanlage konstant gehalten.

### 2.2.3. Pipetten und ihre Herstellung

Die Patchpipetten wurden vor dem Messen jeweils frisch hergestellt. Benutzt wurden dazu Borosilicat-Glaskapillaren (Harvard Apparatus, Edenbridge, Kent, UK) von 10cm Länge mit einem Innendurchmesser von 0,86mm und einer Wandstärke von 0,32mm. Diese wurden mittels eines horizontalen Pipettenziehgerätes (*DMZ-Universal-Puller*; Zeitz-Instruments, München, Deutschland) zu jeweils zwei Pipetten gezogen. Dafür wurden die Kapillaren in eine Vorrichtung eingespannt, durch eine Heizspirale geschmolzen und währenddessen in drei Schritten auseinander gezogen. Es wurde darauf geachtet, dass durch das Ziehen ein Pipettenwiderstand von ca. 3 M $\Omega$  in der Badlösung erzielt wurde.

### 2.2.4. Messlösungen

Für die *patch-clamp*-Messungen mit HEK293-Zellen wurden jeweils zwei Messlösungen (s. Tab. 2.10) benutzt, die sich erheblich in ihren Natrium- und Kaliumkonzentrationen unterschieden, sowie eine TTX-Lösung (entspricht der Badlösung mit Zusatz von 1 $\mu$ M Tetrodotoxin). Die Badlösung, im Weiteren "externe Lösung" genannt, und das TTX wurden mithilfe eines Schwerkraft-getriebenen *y-tube*-Systems zugegeben. Die externe Lösung entsprach hinsichtlich der Ionenzusammensetzung und Osmolarität dem Extrazellulärmilieu eines eukaryotischen Zellverbands. Die Pipettenlösung, auch als "interne Lösung" bezeichnet, kam dem Intrazellulärmilieu eukaryotischer Zellen gleich. Die fertigen Lösungen wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Externe Lösung	mMol/l
NaCl	135,0
KCl	4,0
CaCl <sub>2</sub>	1,8
MgCl <sub>2</sub>	1,2
D-Glucose	5,0
HEPES	5,0
TEA	10,0

**Tab. 2. 10**

Zusammensetzungen der externen und der internen Messlösungen

Interne Lösung	mMol/l
NaCl	5,0
CsF	125,0
MgCl <sub>2</sub>	1,2
HEPES	5,0

Die Pipettenlösung wurde mit CsOH auf einen pH von 7,2 eingestellt, die externe Lösung mit NaOH auf einen pH von 7,4.



Zusätzlich zu NaCl und KCl enthielten die Lösungen folgende Bestandteile:

**a) CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>**

CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> dienen der Membranstabilisierung und somit einer Erleichterung bzw. Verbesserung der Sealbildung.

**b) D-Glucose**

D-Glucose erhält die Vitalität der Zellen über den Zeitraum der Messung und gewährleistet somit eine gleich bleibende Messqualität.

**c) HEPES**

Beide Lösungen wurden mit HEPES gepuffert. Durch den Puffer werden eventuelle pH-Wert Schwankungen minimiert.

**d) TEA**

TEA-Cl (Tetraethylammoniumchlorid) ist ein potenter und nahezu unselektiver Kaliumkanal-Blocker, der eingesetzt wurde, um die Natriumkanal-Messungen möglichst wenig durch Kaliumkanalströme zu überlagern.

**e) CsF**

Caesiumfluorid, welches der internen Lösung zugegeben wurde, erfüllt zweierlei Aufgaben: Zum einen blockieren die Caesium-Ionen die Kaliumströme, zum anderen werden die Natriumströme durch die Fluorid-Ionen stabilisiert.

### **2.2.5. Versuchsdurchführung**

Die transfizierten Zellen können zwischen 36 und 72 Stunden für Messungen verwendet werden. Dieser Zeitrahmen ergibt sich aus der Überlegung, dass die Transfektion zwar erfolgreich, der anschließend beginnende Abbau der Fremd-DNS aber möglichst gering sein sollte. Der optimale Zeitpunkt für elektrophysiologische Messungen wurde bei den hier beschriebenen Daten bei 48 Stunden nach Transfektion gewählt.

#### **Chlorierung der Pipettenelektrode**

Zu Beginn eines Messtages wurde die Silberelektrode des Pipettenhalters mit Schmirgelpapier gesäubert oder durch einen neuen Silberdraht ersetzt und im Elektrolysebad (1 molare NaCl-Lösung) mit etwa 1 mA für ca. 30min chloriert.

#### **Aufbereitung der Zellen**

Die zu messenden Zellen wurden, um starke Temperaturschwankungen zu vermeiden, möglichst kurz vor der Messung aus dem Brutschrank entnommen. Das Nährmedium wurde gegen die Messlösung nach dreimaligem Waschen mithilfe einer Spritze ausgetauscht. Anschließend wurde die Petrischale auf dem Objektisch befestigt und die Badelektrode in die Messlösung eingebracht.

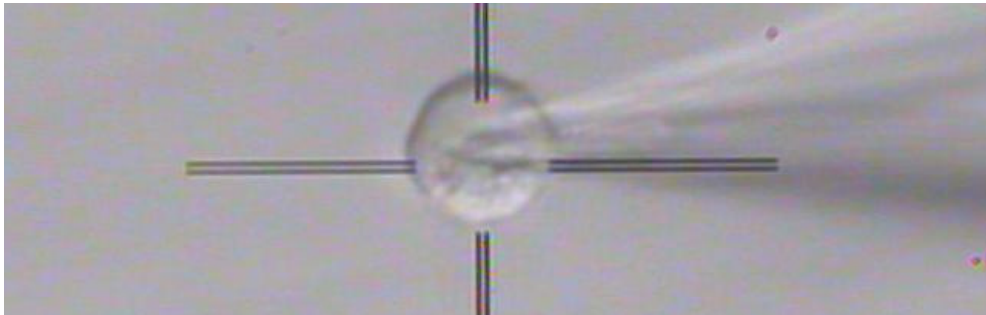
#### **Pipettenfüllung**

Mithilfe einer Mikrospritzenpipette wurden die fertig gezogenen Glaspipetten (s.o.) etwa bis zur Hälfte mit der Pipettenlösung befüllt. Eventuell entstandene Luftblasen in der Flüssigkeit wurden

durch leichtes Beklopfen der Pipette mit den Fingerspitzen entfernt. Anschließend wurde die Pipette in den Pipettenhalter eingespannt.

### Auswahl der zu messenden Zelle

Für gelungene Messungen ist unter anderem die Auswahl der zu messenden Zellen nach mehreren Kriterien von Bedeutung. Bei HEK293-Zellen sollten möglichst einzeln liegende runde Zellen für Ganzzelleableitungen ausgewählt werden, da sich bei diesen eine spätere Kompensation am einfachsten gestaltet, wenn eine Kopplung mit anderen Zellen ausgeschlossen ist. Diese Zellen besitzen besonders gute elektrische Eigenschaften, wie z.B. eine geringe Kapazität und das Fehlen von *space-clamp*-Artefakten, wobei diese Artefakte durch nicht ausreichend von der Spannungsklemme erfassbaren Bereiche einer Zelle entstehen, die hinter Verzweigungsstellen wie Axonen oder Dendriten liegen und in denen Teile der Spannung abfallen.



**Abb. 2. 4** Bild einer typischen HEK293-Zelle zur *patch-clamp*-Messung. Die zu messende Zelle sollte einzeln liegen und eine möglichst regelmäßige runde Form aufweisen (Erläuterung s. Text). Rechts im Bild: Messpipette

Nach Kotransfektion der zu untersuchenden Proteine zusammen mit dem fluoreszierenden Markerprotein EGFP können geeignete Zellen anhand der Fluoreszenz ausgewählt werden. Eine möglichst hohe Fluoreszenzintensität, mittlere Größe und möglichst gleichmäßige Form der Zellen haben sich als positive Indikatoren für die Qualität der Messungen erwiesen, da hier von einer guten Transfektion ausgegangen werden kann, die eine Messung ausreichend großer Ströme erlaubt.

### Herstellung eines dichten Pipettenkontaktes

Mithilfe einer luftgefüllten Spritze wurde ein leichter Überdruck an die Pipette angelegt, die daraufhin bis knapp unter die Oberfläche der Messlösung abgesenkt wurde. Der Verstärker wurde in den *voltage-clamp*-Modus geschaltet (*seal-Test*=10mV, *gain*=1mV/pA *whole cell*). Anhand des Verstärkersignals am Oszilloskop konnten Änderungen des Pipettenwiderstands beobachtet werden. Die Pipette wurde ungefähr im 60°-Winkel über der Zelle positioniert und über die Mikromanipulatoren bis fast auf die Zelloberfläche herabgelassen. Jetzt erfolgte der Nullabgleich am Verstärker (*manual offset correction*). Wurde jetzt die Pipette weiter heruntergelassen, konnte eine Zunahme des Pipettenwiderstands bei Näherung an die Zelloberfläche auf dem Oszilloskop beobachtet werden. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks durch die Spritze wurde beinahe schlagartig ein *giga-seal* erreicht.

Änderungen der Kommandospannung verursachen kapazitative Artefakte, die die eigentlichen Messsignale beeinträchtigen. Bei der daher erforderlichen Kapazitätskompensation wird die Kommandospannung außer zum Strom-Spannungs-Wandler auch über ein RC-Glied geleitet, so dass der entstehende Strom nicht mehr im eigentlichen Stromsignal sichtbar wird. Die aktive Kompensation erfolgte bei mindestens 75%, nachdem der Serienwiderstand soweit kompensiert wurde, dass ein Rechtecksignal auf dem Oszilloskop sichtbar wurde. Der Serienwiderstand wurde gegebenenfalls nachkompensiert, bevor mit der Messung begonnen wurde.

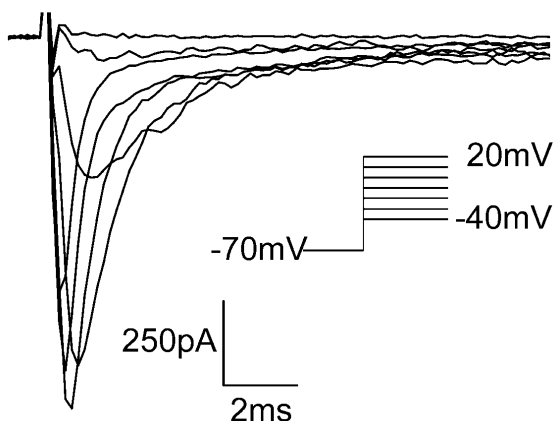
Nach Erreichen eines *gigaseal* und des anschließenden *whole-cell*-Modus wurde ca. 5min gewartet, bis die Zelle vollständig von Pipettenlösung perfundiert wurde. Nach jeder Messung wurde die Kompensation überprüft und ggf. nachjustiert.

### 2.2.6. Messprotokolle

Alle Stromkurvenverläufe sind im Rahmen von Ganzzelleableitungen aufgezeichnet worden.

Die Parameter, die im Einzelnen untersucht worden sind, waren die Aktivierung und die Inaktivierung. Bei der Aktivierung wird die Membranspannung durch den Verstärker fixiert und die Natriumkanäle mit zunehmender Depolarisation geöffnet. Bei den Aktivierungskurven handelt es sich um die grafische Darstellung, bei welchem Membranpotential welcher Anteil der geöffneten Kanäle erreicht ist. Im Gegensatz dazu beschreiben die steady-state-Inaktivierungskurven die Verfügbarkeit der Natriumkanäle bei verschiedenen Testpotentialen.

Eine grafische Darstellung des Aktivierungsprotokolls findet sich in Abbildung 2. 5. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-70\text{mV}$  wurden schrittweise Spannungsänderungen durchgeführt, im Rahmen derer die Amplitude in  $10\text{mV}$ -Schritten erhöht wurde, wobei zwischen den Einzelschritten die Spannung wieder bei  $-70\text{mV}$  lag. Der erste Schritt erfolgte somit von  $-70\text{mV}$  auf  $-40\text{mV}$ , der letzte von  $-70\text{mV}$  auf  $+20\text{mV}$ . Ein Einzelschritt dauerte insgesamt  $2,325\text{sec}$ , wobei nach  $2\text{sec}$  die Depolarisation für die Dauer von  $250\text{ms}$  durchgeführt wurde.



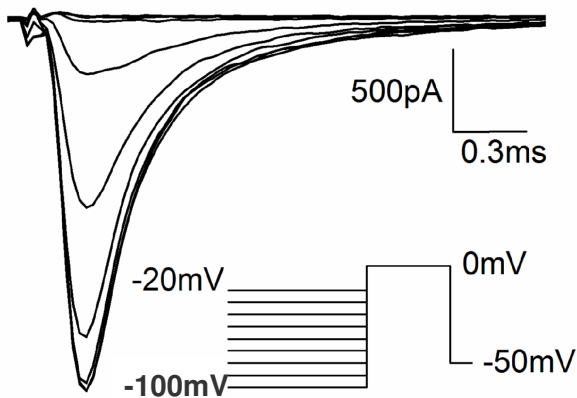
**Abb. 2. 5**

Darstellung einer typischen Natriumstromantwort auf depolarisierende Spannungsschritte zunehmender Amplitude im voltage-clamp-Modus.

Eingefügt ist das Aktivierungsprotokoll ausgehend von einem Haltepotential von  $-70\text{mV}$ .

Das entsprechende Inaktivierungsprotokoll zeigt Abbildung 2. 6. Es wurden depolarisierende Vorpulse angelegt, die bei einem Potential von  $-100\text{mV}$  begannen und in  $10\text{mV}$ -Schritten bis zu einem Potential von  $-20\text{mV}$  durchgeführt wurden. Nach dem jeweiligen Vorpuls erfolgte eine

Depolarisation auf 0mV für die Dauer von 100ms, anschließend erfolgte bei -50mV die Repolarisation.



**Abb. 2. 6**

Darstellung einer typischen Natriumstromantwort auf depolarisierende Vorpulse abnehmender Amplitude im *voltage-clamp*-Modus.

Eingefügt ist das Inaktivierungsprotokoll ausgehend von einem Potential von -100mV.

### 2.3. Darstellung der Problemfelder

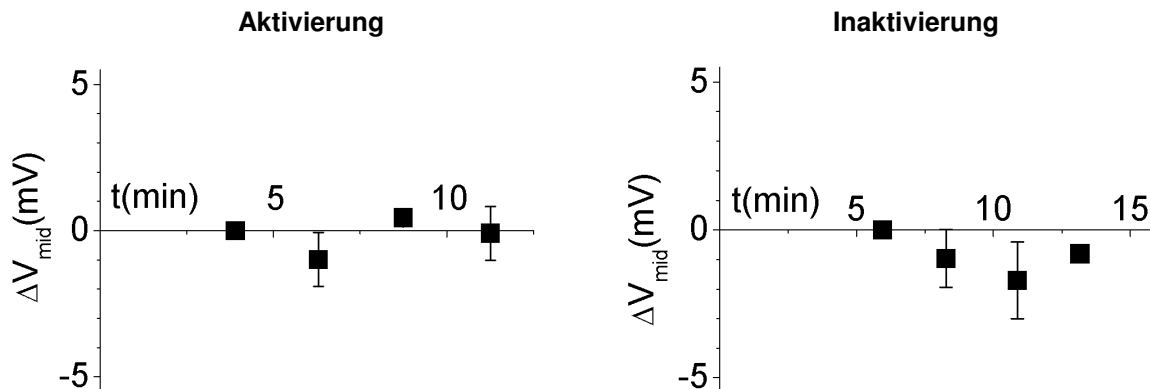
Bei den Kontrolleexperimenten war eine der Grundvoraussetzungen der eingesetzten Proteine das Aufweisen eines ähnlichen Aufbaus wie der Natriumkanal, der  $\beta$ -Untereinheiten oder BACE1. Sogenannte "Singlepass"-Transmembranproteine, die die Biomembran einmal durchqueren, werden von den "Multipass"-Transmembranproteinen unterschieden, bei denen die Durchquerung mehrfach erfolgt. Des Weiteren werden die "Singlepass"-Transmembranproteine unterteilt in Typ-I- und Typ-II-Proteine, je nachdem, ob der N-Terminus extrazellulär (Typ-I) oder intrazellulär (Typ-II) liegt.

Die  $\alpha$ -Untereinheit des  $\text{Na}_v1.2a$ , pEGFP und der Serotoninrezeptor 5-HT1A gehören zur Gruppe der "Multipass"-Transmembranproteine (s.o.). Bei den anderen in dieser Arbeit verwendeten Proteinen wie die  $\beta$ -Untereinheiten 2 und 4, BACE1 und ihre inaktive Mutante, sowie der  $\beta$ -Untereinheit KCNE1 des spannungsabhängigen Kaliumkanals KCNQ1 handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine. Diese Eigenschaft ist speziell für die Eiweißmoleküle der Kontrollgruppe und hier besonders unter dem Gesichtspunkt der Vergleichbarkeit von Bedeutung.

Um systemische Fehler im Rahmen der elektrophysiologischen Messungen auf ein Minimum zu reduzieren, wurde auf Einheitlichkeit der Messzeitpunkte geachtet. Im Verlauf einer mehrere Minuten dauernden Messungen kommt es für gewöhnlich zu Änderungen im Pipetten-Zell-Kontakt. Außerdem verliert die geklemmte Zelle durch Verletzung der Membran zunehmend an Vitalität. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ableitungen wurden diese jeweils nach ca. 5. Minuten nach Beginn der Messung aufgezeichnet.

Neben diesen zeitabhängigen Möglichkeiten, die *patch-clamp*-Messungen zu beeinflussen, spielen auch die Ionenzusammensetzungen der verwendeten Lösungen eine große Rolle bei der Vergleichbarkeit der Aufnahmen. Die Zugabe von Caesiumfluorid zu den Messlösungen erfüllt zwar wichtige Funktionen (s. *Material und Methoden*), steht aber in Verdacht, zeitabhängige Verschiebungen sowohl der Aktivierung als auch der Inaktivierung zu verursachen. Zur Überprüfung

dieses möglicherweise vorliegenden Effektes wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils die Aktivierung und Inaktivierung aufgezeichnet wurden.



**Abb. 2. 7** Darstellung der jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Natriumstromantworten von HEK293-Zellen unter Verwendung von Caesiumfluorid (CsF) in der Pipettenlösung.

Auf die y-Achse wurden jeweils die Mittelwerte der Halbaktivierungsspannung (links) und Halbinaktivierungsspannung (rechts) gegen die Zeit aufgetragen. In der Aktivierung und der Inaktivierung ist in diesem Zeitfenster kein signifikanter zeitabhängiger Einfluss des CsF zu verzeichnen.

Im Rahmen dieser Experimente konnte zwar ein zeitabhängiger Effekt festgestellt werden, allerdings zeigte sich die Tendenz einer Linksverschiebung erst nach mehr als 20min. Die hier beschriebenen elektrophysiologischen Messungen wurden allerdings zu einem früheren Zeitpunkt (s. o.) nach Erreichen des *whole-cell*-Modus durchgeführt, so dass eine Fluorid-induzierte Verschiebung der Kurven nicht stattfand.

Eine weitere Quelle der Potentialverfälschung entsteht an den Grenzflächen von Flüssigkeiten unterschiedlicher Zusammensetzung. Dieses *liquid junction potential* (LJP) entsteht bei Ganzzelleableitungen sowohl an der Grenzfläche von Pipettenlösung und Zellinhalt als auch am Übergang des intrazellulären Milieus zur extrazellulären Lösung. Da davon ausgegangen werden kann, dass es bei korrekter Messung zu einer ausreichenden Perfusion des Zellvolumens mit der Pipettenlösung kommt, kann man die tatsächlich vorliegende Potentialdifferenz über der Zellmembran ( $U_M$ ) mit folgender Gleichung beschreiben.

$$U_M = U_P - E_L$$

Dabei ist  $U_P$  das gemessene Spannungspotential und  $E_L$  das LJP zwischen Pipetten- und Badlösung (Schilling, 2001). Die Potentialdifferenz der hier verwendeten Lösungen führte allerdings zu einem so geringen *liquid junction potential*, dass es bei der Auswertung der Experimente ignorierbar ist.

Der Verstärker, der im Rahmen von *patch-clamp*-Messungen eingesetzt wird, verursacht abhängig von der Größe der gemessenen Ströme einen eigenen Spannungsfehler, der gegebenenfalls bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muss. Bei den vorliegenden Messungen beträgt der verursachte Spannungsfehler ca. 1mV/1000pA. Die Ströme, die im Rahmen der durchgeführten Experimente gemessen wurden, betragen im Mittel  $1236 \pm 150$ pA. Der hier

vorliegende Spannungsfehler beträgt also ca. 1,2mV und ist somit so gering, dass er bei der Interpretation der Ergebnisse vernachlässigt werden kann.

Obwohl, wie im Abschnitt 2.1.6 (*Transfektion*) dargestellt, alle transfizierten Plasmide exprimiert werden, kann die Quantität variieren. Der daraus resultierende systematische Fehler, der somit bei den elektrophysiologischen Messungen entsteht, kann durch eine Erhöhung der Anzahl der gemessenen Zellen sowie der Anzahl der Transfektionsansätze möglichst gering und für alle Versuchsreihen möglichst konstant gehalten werden.

In der hier vorliegenden Arbeit sind die Einflüsse der  $\beta$ 2- und  $\beta$ 4-Untereinheiten untersucht worden, obwohl auch die  $\beta$ 1- und  $\beta$ 3-Untereinheit als Substrate von BACE1 identifiziert worden waren. Da aus Gründen des zeitlichen Aufwandes eine Auswahl getroffen werden musste, ist diese zugunsten der  $\beta$ -Untereinheiten ausgefallen, die in den Westernblot-Experimenten von Kim et al. (2005) die deutlichsten Hinweise auf mögliche Interaktionen mit BACE1 gegeben hatten. Dies schließt zusätzliche Einflüsse von  $\beta$ 1 und/oder  $\beta$ 3 auf die durchgeführten Messungen nicht aus.

#### 2.4. Aufzeichnungs-, Auswertungs- und Darstellungsverfahren

Die Messungen wurden mit 100kHz abgetastet und mit 5kHz gefiltert, wobei der Axopatch 200B-Verstärker in Verbindung mit dem Digidata 1322A-Interface und der pClamp9-Software (alles von *Axon Instruments, Inc., Foster City, Kalifornien*) zum Einsatz kam. Der Eingangswiderstand in der *whole-cell*-Konfiguration betrug  $<10\text{M}\Omega$  vor der Serienwiderstand-Kompensation ( $\geq 75\%$ ). Der Pipettenwiderstand in der Badlösung betrug ca.  $3\text{M}\Omega$ . Die Aufnahmen der Natriumkanal-Aktivierung wurden mit dem P/4-Paradigma durchgeführt, um die Leckströme und die Kapazitätsartefakte zu minimieren.

Um die Spannungsabhängigkeit der Aktivierungsströme zu bestimmen, wurden für die gemessenen Ströme zunächst die Natriumionenleitfähigkeit zu jedem Testpotential unter Anwendung der Gleichung  $G=I/(V-E_{\text{rev}})$  berechnet, wobei  $I$  der (Spitzen-) Amplitude des Natriumstroms beim Membranpotential  $V$  und  $E_{\text{rev}}$  dem Gleichgewichtspotential für Natriumionen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen entspricht (HEK-Zellen 83mV, N1E115-Zellen 85mV).  $G$  wurde normalisiert auf die maximale Natriumionenleitfähigkeit, und die relative Natriumionenleitfähigkeit wurde als die Funktion des Membranpotentials dargestellt.

Die Inaktivierungskurven wurden als Anteil des Spitzenstroms bezogen auf den maximalen Strom dargestellt. Dabei beschreibt diese sog. *steady-state*-Inaktivierung (*steady-state* wegen der konstanten Ausgangsbedingungen) den Anteil der Kanäle, die nach einem depolarisierenden Vorpuls noch aktivierbar sind.

Die Datenpunkte wurden mit einer standard-sigmoidalen (Boltzmann-) Gleichung der Form  $y=(A_1-A_2)/(1+e^{(x-x_0)/dx})+A_2$  gefittet, wobei  $V_{\text{mid}}$  dem Mittelpunkt der Aktivierungs- bzw. Inaktivierungskurve und  $k$  der Steigung entsprechen. Die statistischen Analysen wurden unter Gebrauch von one-way-ANOVA durchgeführt, dem sich Tukey's Test anschloss. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt.

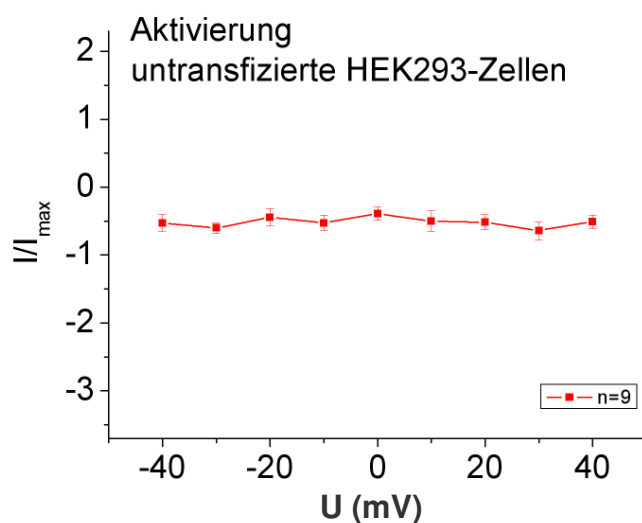
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Einflüsse der $\beta$ -Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 4$ auf das Öffnungsverhalten des Natriumkanals $Na_v 1.2a$

Um die modulierenden Einflüsse der  $\beta$ -Untereinheiten  $\beta 2$  und  $\beta 4$  genau untersuchen zu können, wurden Messreihen am heterologen Expressionssystem durchgeführt, an dessen Anfang die Untersuchung von nur  $Na_v 1.2a$ -exprimierenden Zellen stand. Anschließend erfolgten die Kotransfektionen mit jeweils einer der beiden  $\beta$ -Untereinheiten und die Wiederholung der Messaufzeichnungen, um so eventuelle Veränderungen des Schaltverhaltens erfassen zu können. Nach zusätzlicher Transfektion von BACE1 wurden die Messungen nach den gleichen Protokollen wiederholt. Dies sollte den Einfluss von BACE1 zeigen. Zur Kontrolle, inwieweit die enzymatische Aktivität von BACE1 für die Änderungen verantwortlich ist, kam der BACE1-Inhibitor C3 zum Einsatz, wiederum im Rahmen der gleichen elektrophysiologischen Aufzeichnungen. Bei dem Inhibitor handelt es sich um einen peptidischen Blocker (s. Kap. 1.2.4. *Bedeutung und Funktion von BACE1*), der an das enzymatische Zentrum des BACE bindet.

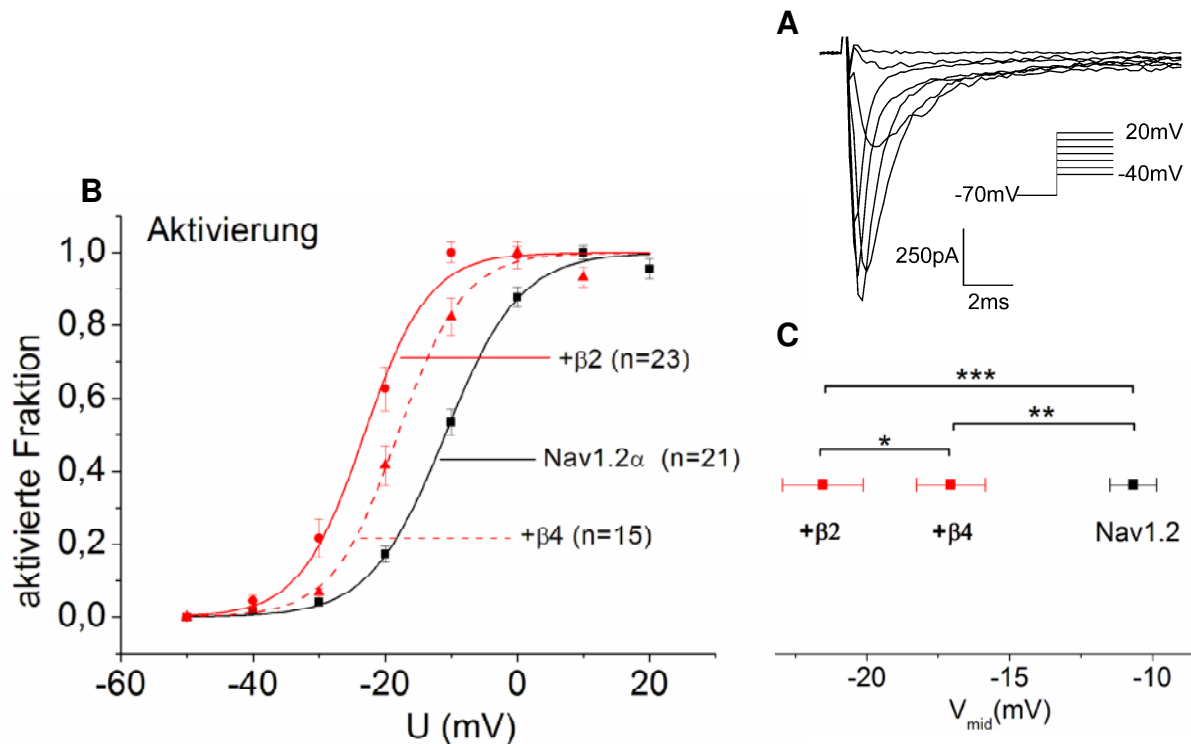
#### Aktivierung

Um die Effekte von BACE1 und der BACE1-vermittelten Spaltung der  $\beta$ -Untereinheiten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Natriumkanäle zu analysieren, wurden *whole-cell* Natriumströme von HEK293-Zellen aufgezeichnet, die transient  $Na_v 1.2a$   $\alpha$ -Untereinheiten exprimierten. Ausgehend von einem Haltepotential von  $-70\text{mV}$  wurden Depolarisationsstufen in  $10\text{mV}$ -Schritten bis zu  $+40\text{mV}$  durchgeführt, die transiente Einwärtsströme hervorriefen, die mittels Tetrodotoxin geblockt werden konnten ( $1\mu\text{M}$ ). Durch die Blockierbarkeit mittels Tetrodotoxin konnten die gemessenen Ströme den transfizierten Natriumkanälen zugeordnet werden, da untransfizierte HEK293-Zellen im Gegensatz hierzu keine Natriumströme zeigen (s. Abb. 3. 1).



**Abb. 3. 1** Aktivierungskurve von untransfizierten HEK293-Zellen. Es sind keine Natriumströme zu verzeichnen, die genauen Messbedingungen entsprachen denen der übrigen Messungen.

Der durchschnittliche Mittelpunkt der Aktivierungskurven, die bei Zellen gemessen wurden, die lediglich die  $\text{Na}_v1.2\alpha$  Untereinheit enthielten, betrug  $-10,67 \pm 0,81\text{mV}$  ( $n=21$ , Abb. 3.1). Dieser Wert ist vergleichbar mit den bisher veröffentlichten Daten über HEK293-Zellen (Yu et al., 2003).



**Abb. 3. 2**

A: Originalmessung der spannungsabhängigen Aktivierung von transfiziertem  $\text{Na}_v1.2\alpha$  in HEK-Zellen. Grafik A zeigt zudem das eingesetzte Spannungsprotokoll.

B: Aktivierungskurven von  $\text{Na}_v1.2\alpha$  in HEK293-Zellen; schwarze Kurve:  $\text{Na}_v1.2\alpha$ -transfizierte HEK-Zellen, rote durchgehende Kurve:  $\text{Na}_v1.2\alpha+\beta2$ -kotransfizierte HEK-Zellen, rote unterbrochene Kurve:  $\text{Na}_v1.2\alpha+\beta4$ -kotransfizierte HEK-Zellen. Beide  $\beta$ -Untereinheiten verursachen eine deutliche Linksverschiebung der Aktivierungskurve.

C: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus B) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

Die Koexpression von  $\beta2$  verursachte eine signifikante Verschiebung der Aktivierungskurve nach links (s. Abb. 3. 2).

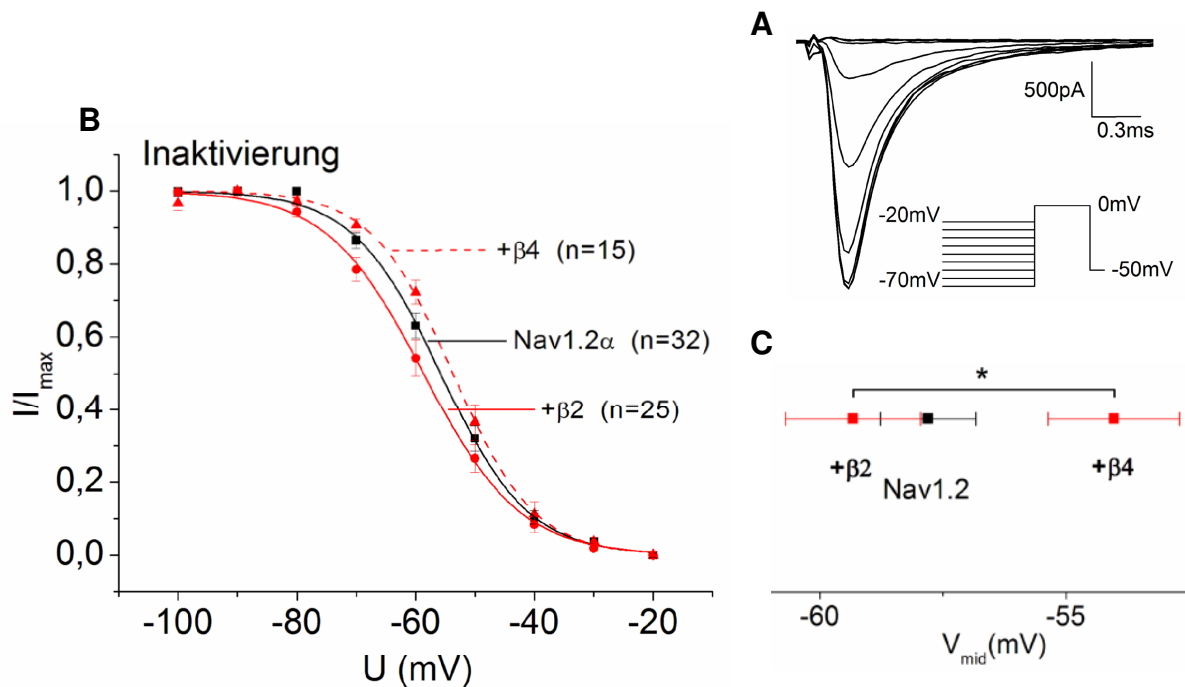
Da  $\beta4$  ebenso als Substrat von BACE1 bekannt ist, wurden die oben beschriebenen Experimente unter Einsatz von  $\beta4$  anstelle von  $\beta2$  durchgeführt. Ähnlich wie der beobachtete Effekt der  $\beta2$ -Untereinheit, rief  $\beta4$  ebenfalls eine signifikante Linksverschiebung der  $\text{Na}_v1.2\alpha$  Aktivierung hervor (s. Abb. 3. 2), die allerdings deutlich schwächer ausfiel als die durch  $\beta2$  verursachte Verschiebung.

### Inaktivierung

Bei Messungen der *steady-state*-Inaktivierung nach dem Inaktivierungsprotokoll (s. Kap. 2.2.7. Messprotokolle) ist nach Kotransfektion entweder der  $\beta2$ - oder der  $\beta4$ -Untereinheit weder für die eine noch für die andere eine signifikante Änderung der Spannungsabhängigkeit feststellbar



gewesen (s. Abb. 3. 3). Dies stimmt ebenfalls mit bisher erhobenen Beobachtungen überein (Yu et al., 2003). Daher konzentrierten sich die folgenden Versuchsreihen, sofern nicht anders angegeben, auf die Messungen der Aktivierung, deren Ergebnisse im Weiteren beschrieben werden.



**Abb. 3. 3**

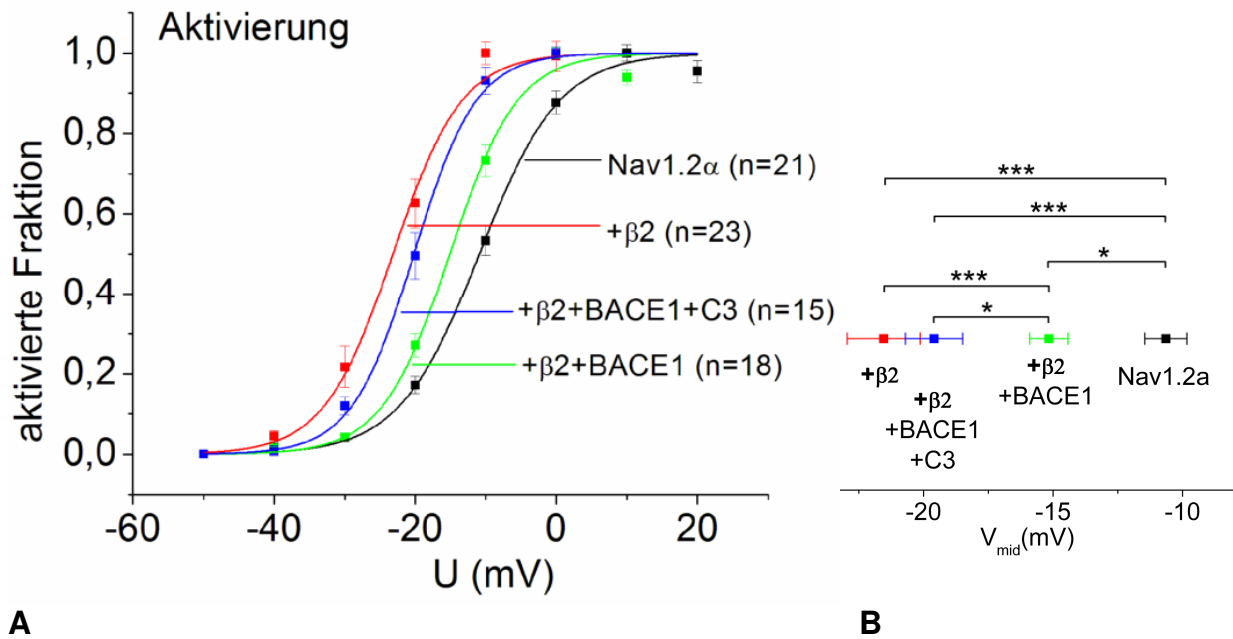
A: Originalmessung der spannungsabhängigen Inaktivierung von transfiziertem  $Na_v1.2a$  in HEK-Zellen. Grafik A zeigt zudem das eingesetzte Spannungsprotokoll.

B: Inaktivierungskurven von  $Na_v1.2a$  (schwarze Kurve), nach Kotransfektion von  $\beta 2$  (rote durchgehende Kurve) und von  $\beta 4$  (rote gestrichelte Kurve). Weder  $\beta 2$  noch  $\beta 4$  führen zu einer signifikanten Verschiebung gegenüber der Referenzkurve.

C: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Inaktivierungskurven aus B) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

### 3.2. Proteolytische Wirkung von BACE1

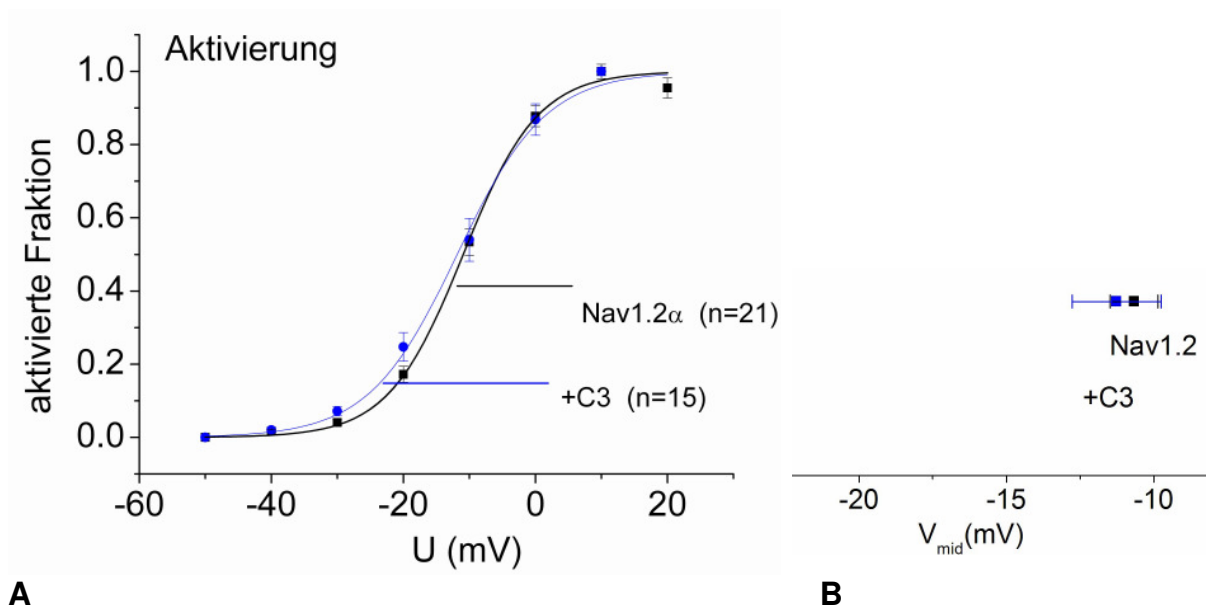
Whole-cell-Ableitungen von HEK293-Zellen, die mit BACE1,  $Na_v1.2a$  und  $\beta 2$  kotransfiziert waren, zeigten deutlich, dass die enzymatische Spaltung der  $\beta$ -Untereinheit eine signifikante Umkehr der  $\beta 2$ -vermittelten Linksverschiebung der Aktivierungskurve bewirkte (s. Abb. 3. 4).

**Abb. 3. 4**

A: Aktivierungskurven von  $Na_v1.2a$  in HEK293-Zellen zur Untersuchung des Effektes der  $\beta 2$ -Untereinheit. Die  $\beta 2$ -Untereinheit verlagert die Aktivierungskurve deutlich nach links (rote Kurve), unter Einfluss von BACE1 wird dieser Effekt partiell aufgehoben (grüne Kurve). Die Vorinkubation von C3 führt zu einer signifikanten Hemmung des BACE1-Einflusses (blaue Kurve).

B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus A) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

Um zu demonstrieren, dass dieser Effekt abhängig von der proteolytischen Aktivität von BACE1 war, wurde dieses Experiment mit HEK293-Zellen wiederholt, die bereits 48h mit dem BACE1-Inhibitor C3 vorbehandelt waren. Wie in Abbildung 3. 4 dargestellt, hebt C3 wiederum den Effekt von BACE1 auf die Aktivierung auf. Kontrollversuche mit lediglich die  $Na_v1.2a$ - $\alpha$ -Untereinheit exprimierenden HEK293-Zellen schlossen aus, dass der Inhibitor bereits einen intrinsischen Effekt auf die Aktivierung hat (s. Abb. 3.5).



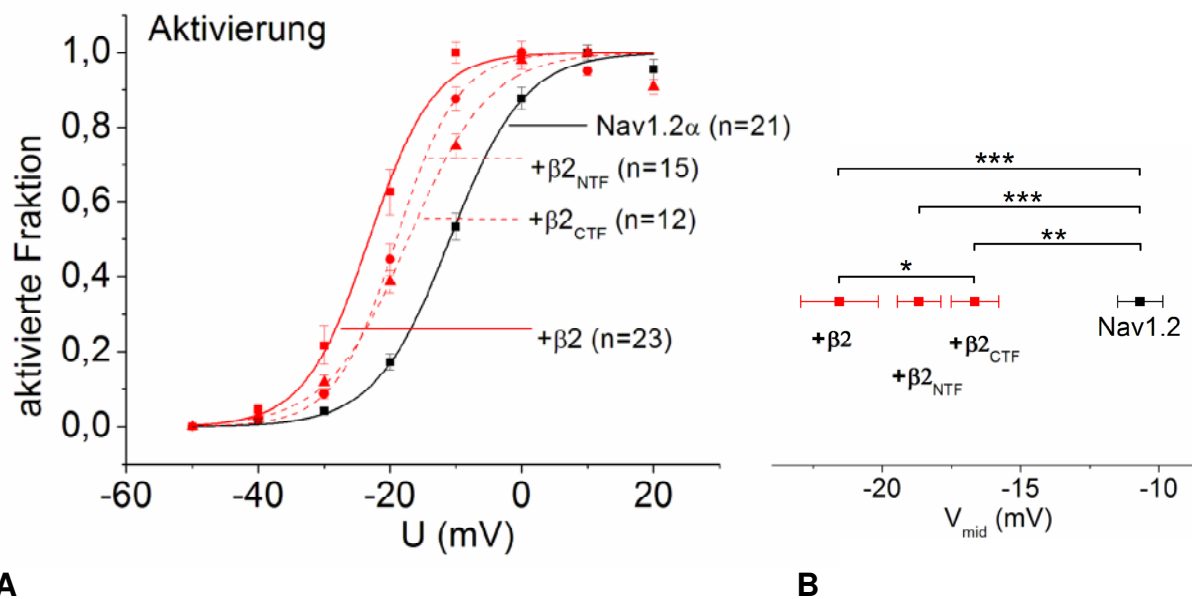
**Abb. 3. 5**

A: Aktivierungskurven von  $\text{Na}_v1.2\alpha$  in HEK-Zellen nach Vorinkubation mit dem BACE1-Inhibitor C3 (blaue Kurve); schwarze Kurve: Referenzkurve von  $\text{Na}_v1.2\alpha$ . Der BACE1-Inhibitor hat keinen signifikanten intrinsischen Einfluss auf die Aktivierungskurve von  $\text{Na}_v1.2\alpha$ .

B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus A) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

### 3.3. Endogener Einfluss der N- bzw. C-terminalen Fragmente der $\beta$ -Untereinheiten

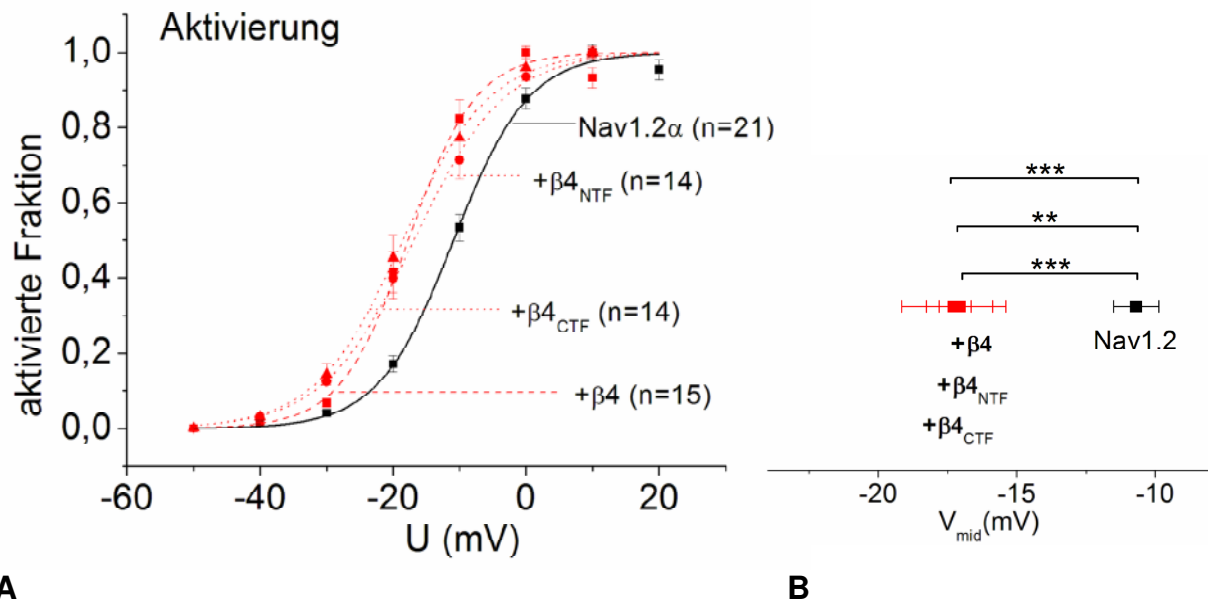
Die Tatsache, dass BACE1 zwar eine starke, aber dennoch keine komplette Umkehr des  $\beta$ -Einflusses auf die Aktivierung bewirkte, warf die Vermutung auf, dass die N-terminalen und / oder die C-terminalen Fragmente (NTF, CTF), die im Rahmen der enzymatischen Spaltung von  $\beta$  entstehen, einen eigenen Effekt haben könnten. Dies sollte mithilfe weiterer *patch-clamp*-Messungen spezifiziert werden. Folglich wurde die  $\text{Na}_v1.2\alpha$ -Untereinheit entweder mit  $\beta_{\text{NTF}}$  oder mit  $\beta_{\text{CTF}}$  kotransfiziert und gemessen. Dabei wurde beobachtet, dass in der Tat beide Fragmente im Stande sind, eine merkliche Linksverschiebung der Aktivierungskurve von  $\text{Na}_v1.2\alpha$  zu verursachen (s. Abb. 3. 6), die allerdings nicht ganz dem Einfluss entsprach, den die intakte  $\beta$ -Untereinheit ausübte.

**Abb. 3. 6**

A: Aktivierungskurven von  $\text{Na}_v1.2\alpha$  in HEK293-Zellen, die mit der  $\beta$ 2-Untereinheit bzw. dem N- oder C-terminalen Fragment der Untereinheit kotransfiziert wurden. Die Linksverschiebung, die von den Fragmenten ausgelöst wird, entspricht ungefähr jeweils dem halben Effekt der kompletten  $\beta$ 2-Untereinheit. Schwarze Kurve: Referenzkurve von HEK-Zellen, die nur  $\text{Na}_v1.2\alpha$  exprimieren

B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus A) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

Zur Überprüfung dieses Effektes durch die N-terminalen und C-terminalen Fragmente der  $\beta 4$ -Untereinheit, wurde der oben beschriebene Versuch unter Einsatz von  $\beta 4$  statt  $\beta 2$  wiederholt. Nach Kotransfektion mit  $\text{Na}_v1.2a$  zeigte sich, dass sowohl das  $\beta 4_{\text{NTF}}$  als auch das  $\beta 4_{\text{CTF}}$  eine Linksverschiebung der Aktivierungskurve bewirkten, die annähernd der entsprach, die die intakte  $\beta 4$ -Untereinheit verursachte (s. Abb. 3. 7).



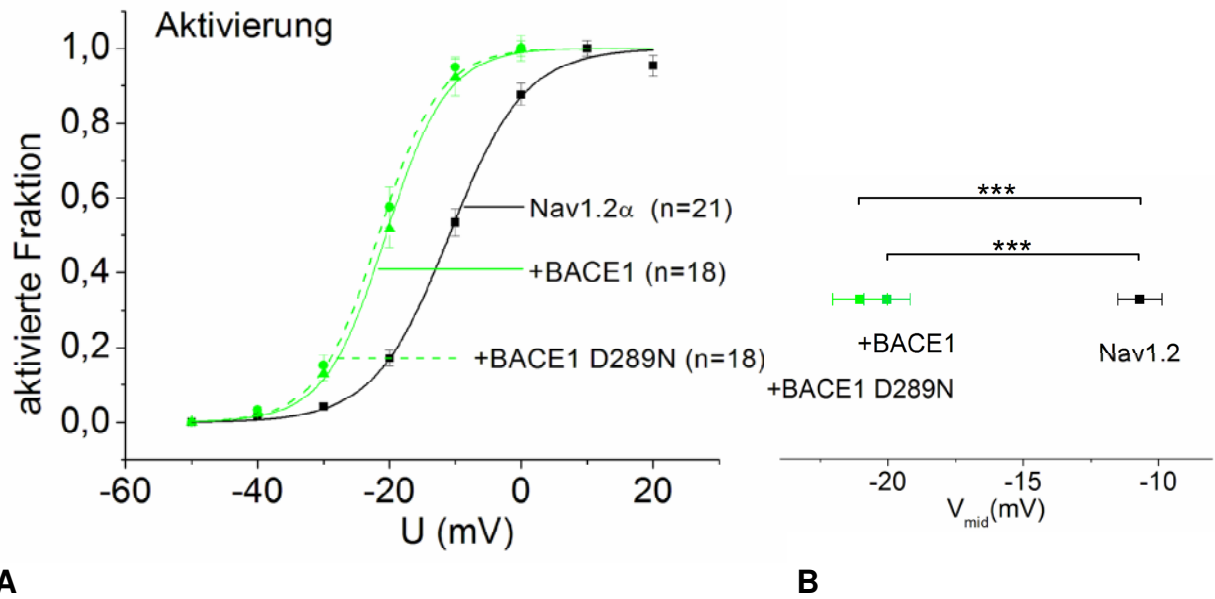
**Abb. 3. 7**

A: Aktivierungskurven von  $\text{Na}_v1.2a$  in HEK293-Zellen, die mit der  $\beta 4$ -Untereinheit bzw. dem N- oder C-terminalen Fragment der Untereinheit kotransfiziert wurden. Die Verschiebung der Kurve, die durch die Fragmente verursacht wird, unterscheidet sich nicht wesentlich von der der ungeschnittenen  $\beta 4$ -Untereinheit. Schwarze Kurve: Referenzkurve von HEK-Zellen, die nur  $\text{Na}_v1.2a$  exprimieren  
 B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus A) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

### 3.4. Nicht-proteolytischer Einfluss von BACE1

Als augenfällig erwies sich die Tatsache, dass im Gegensatz zum Einfluss von BACE1 auf  $\beta 2/ \text{Na}_v1.2a$ -Zellen sich nach Koexpression von BACE1 in  $\beta 4/ \text{Na}_v1.2a$ -Zellen keine Aufhebung der  $\beta$ -Untereinheiten-bedingten Verschiebung auf die Aktivierung zeigte. Stattdessen wurde der Mittelwert der Aktivierungskurve sogar noch verstärkt nach links verschoben (s. Abb. 3. 8).





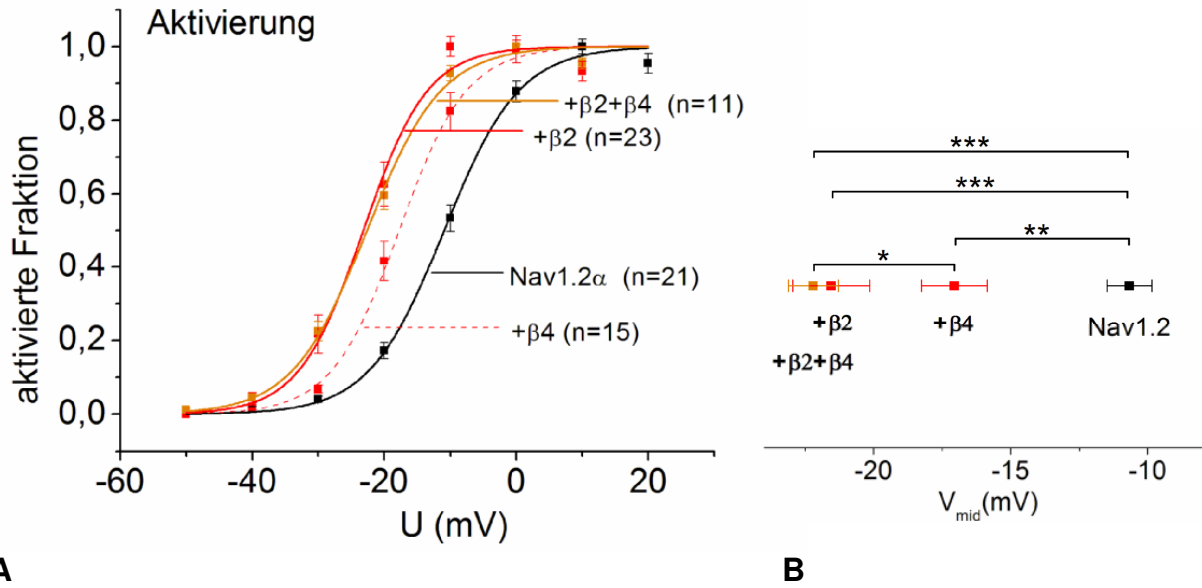
**Abb. 3. 9**

A: Aktivierungskurven von Nav<sub>v</sub>1.2a in HEK293-Zellen, die mit dem aktiven Enzym BACE1 (grüne durchgehende Kurve) oder der inaktiven Mutante (grüne gestrichelte Kurve) jeweils zusammen mit Nav<sub>v</sub>1.2a kotransfiziert wurden. Beide BACE1-Varianten rufen eine hochsignifikante Linksverschiebung der Aktivierungskurve hervor. Schwarze Kurve: Referenzkurve von Nav<sub>v</sub>1.2a

B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus A) (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001)

Dies wies überzeugend darauf hin, dass BACE1 eine direkte und funktionell relevante Bedeutung auf das Schaltverhalten der Nav<sub>v</sub>1.2a-Kanäle haben könnte, die nicht mit der proteolytischen Aktivität assoziiert ist.

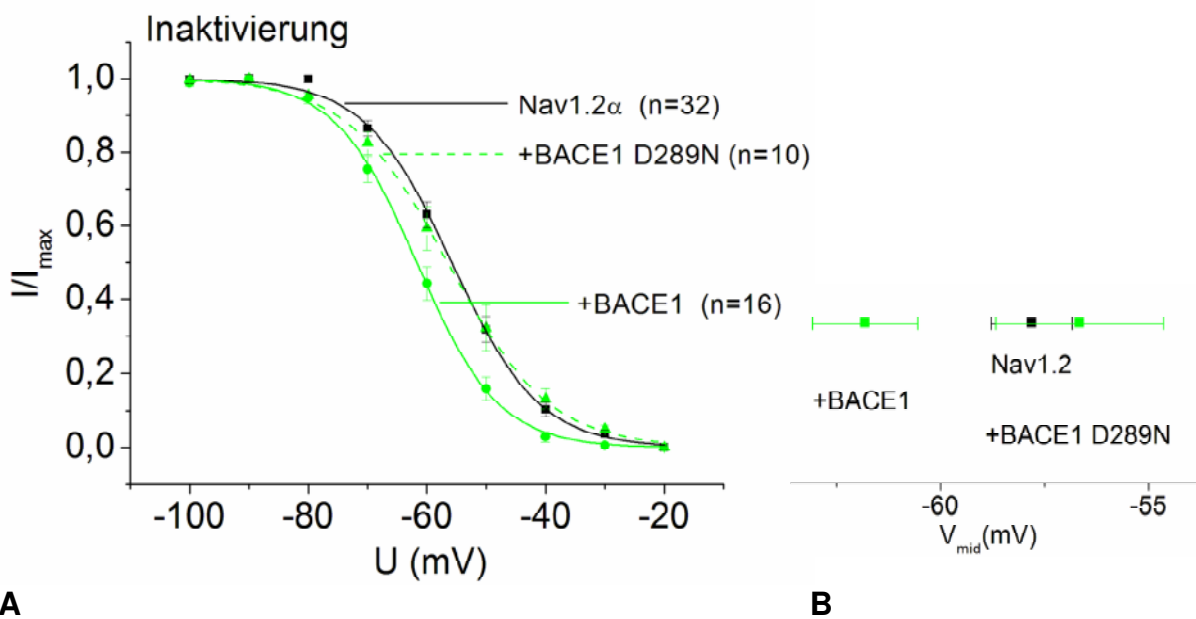
Es ist erwähnenswert, dass in vorangegangenen Experimenten C3-inhibierte BACE1 nur dann imstande war, die Aktivierung von Nav<sub>v</sub>1.2a zu modulieren, wenn sie koexprimiert mit  $\beta$ 4 vorlag, nicht aber zusammen mit  $\beta$ 2 (Abb. 3. 8 und Abb. 3. 4). Folglich scheinen sich die jeweiligen Effekte von pharmakologisch blockierter BACE1 und  $\beta$ 2 gegenseitig auszuschließen, wohingegen die Einflüsse der C3-inhibierten BACE1 und  $\beta$ 4 sich aufsummieren zu scheinen, was darauf schließen lässt, BACE1 könne als Ersatz für  $\beta$ 2 aber nicht für  $\beta$ 4 fungieren. Die Tatsache, dass die Koexpression von Nav<sub>v</sub>1.2a und  $\beta$ 4 zusammen mit  $\beta$ 2 die gleiche Linksverschiebung in der Aktivierung hervorrief wie die Kotransfektion von Nav<sub>v</sub>1.2a und  $\beta$ 4 mit BACE1 in der Anwesenheit des Inhibitors C3 (s. Abb. 3. 10), bekräftigt diese Hypothese.

**A****B****Abb. 3. 10**

A: Aktivierungskurven von  $Na_v1.2a$  in HEK293-Zellen, die zusätzlich zu  $Na_v1.2a$  mit der  $\beta 2$ -, der  $\beta 4$ - oder beiden  $\beta$ -Untereinheiten kotransfiziert wurden. Die Linksverschiebung von  $\beta 2$  (rote durchgehende Kurve) fällt stärker aus als die von  $\beta 4$  (rote gestrichelte Kurve). Werden beide Untereinheiten zusammen zugegeben, summiert sich dieser Effekt allerdings nicht auf, sondern erreicht das Niveau, das auch durch die  $\beta 2$ -Untereinheit hervorgerufen wird (orange farbene Kurve). Schwarze Kurve: Referenzkurve von  $Na_v1.2a$

B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus A) (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

Für HEK293-Zellen, denen neben  $Na_v1.2a$  entweder die aktive BACE1-Variante oder die inaktive Mutante D289N bei der Transfektion zugegeben worden sind, wurden zur Kontrolle auch Messungen nach dem Inaktivierungsprotokoll durchgeführt. Aber auch hier zeigte sich bei beiden Proteinen kein signifikanter Einfluss im Vergleich zur Referenzkurve (s. Abb. 3. 11).

**A****B**

**Abb. 3. 11**

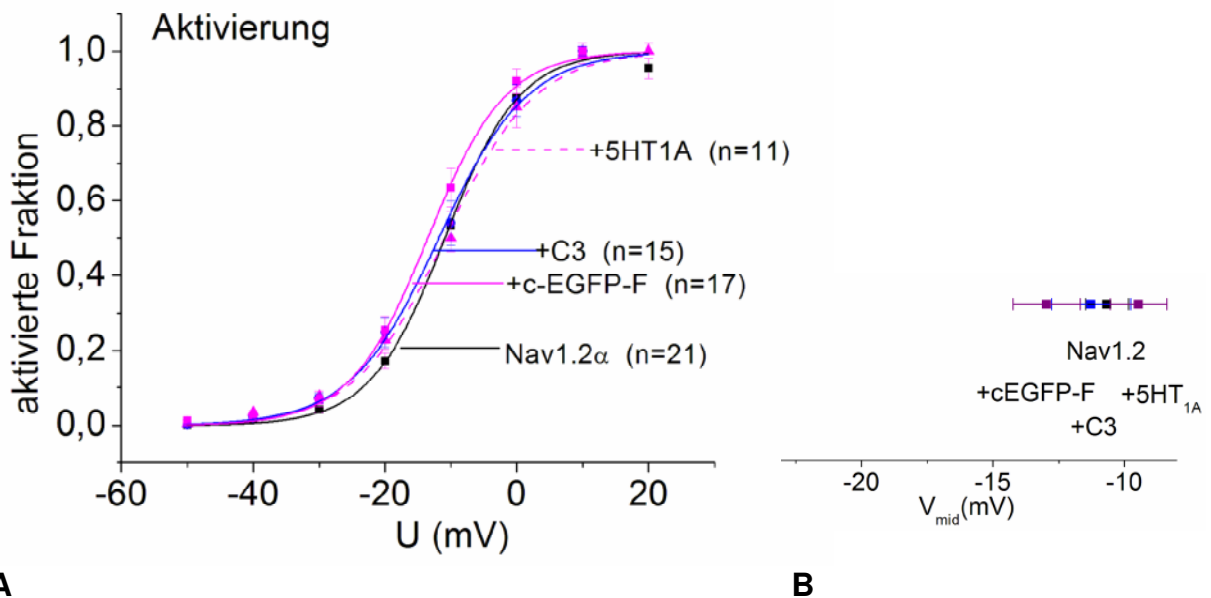
A: Inaktivierungskurven von  $\text{Na}_v1.2a$  in HEK293-Zellen, die entweder die aktive BACE1-Variante (grüne durchgehende Kurve) oder die inaktive BACE1-Mutante D289N (grüne gestrichelte Kurve) zusätzlich zu  $\text{Na}_v1.2a$  exprimieren. Obwohl die aktive BACE1 die Tendenz einer Linksverschiebung der Inaktivierungskurve aufweist, ist dieser Effekt wie auch die Wirkung der inaktiven Variante nicht signifikant unterschiedlich zur Referenzkurve von  $\text{Na}_v1.2a$  (schwarze Kurve).

B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Inaktivierungskurven aus A)

**3.5. Kontrollversuche**

Zum Ausschluss eines systematischen Fehlers, der zum Beispiel durch eine Beeinflussung der Natriumkanal-Funktion durch Kotransfektion beliebiger Membranproteine hätte entstehen können, wurden Kontrollversuche durchgeführt, in denen jeweils HEK293-Zellen zusätzlich zur  $\text{Na}_v1.2a$   $\alpha$ -Untereinheit mit verschiedenen anderen Membranproteinen kotransfiziert wurden. So wurden die Zellen mit dem Serotoninrezeptor  $5\text{HT}_{1A}$  sowie dem fluoreszierenden Protein cEGFP-F kotransfiziert, dass starke strukturelle Ähnlichkeit zu dem Fluoreszenzprotein hat, welches als Markerprotein bei den oben beschriebenen *patch-clamp*-Versuchen eingesetzt wurde. Außerdem wurde in einem weiteren Kontrollexperiment, wie oben bereits erwähnt, HEK-Zellen mit dem BACE1-Inhibitor C3 vorinkubiert, um so einen intrinsischen Effekt von C3 auszuschließen.

Die Kontrollversuche zeigten eindeutig, dass die Aktivierung der Natriumkanäle nicht durch Kotransfektion beliebiger Membranproteine zu beeinflussen ist. So wurde in sämtlichen Kontrollexperimenten keinerlei Verschiebung der Aktivierungskurve gezeigt (s. Abb. 3. 12).

**Abb. 3. 12**

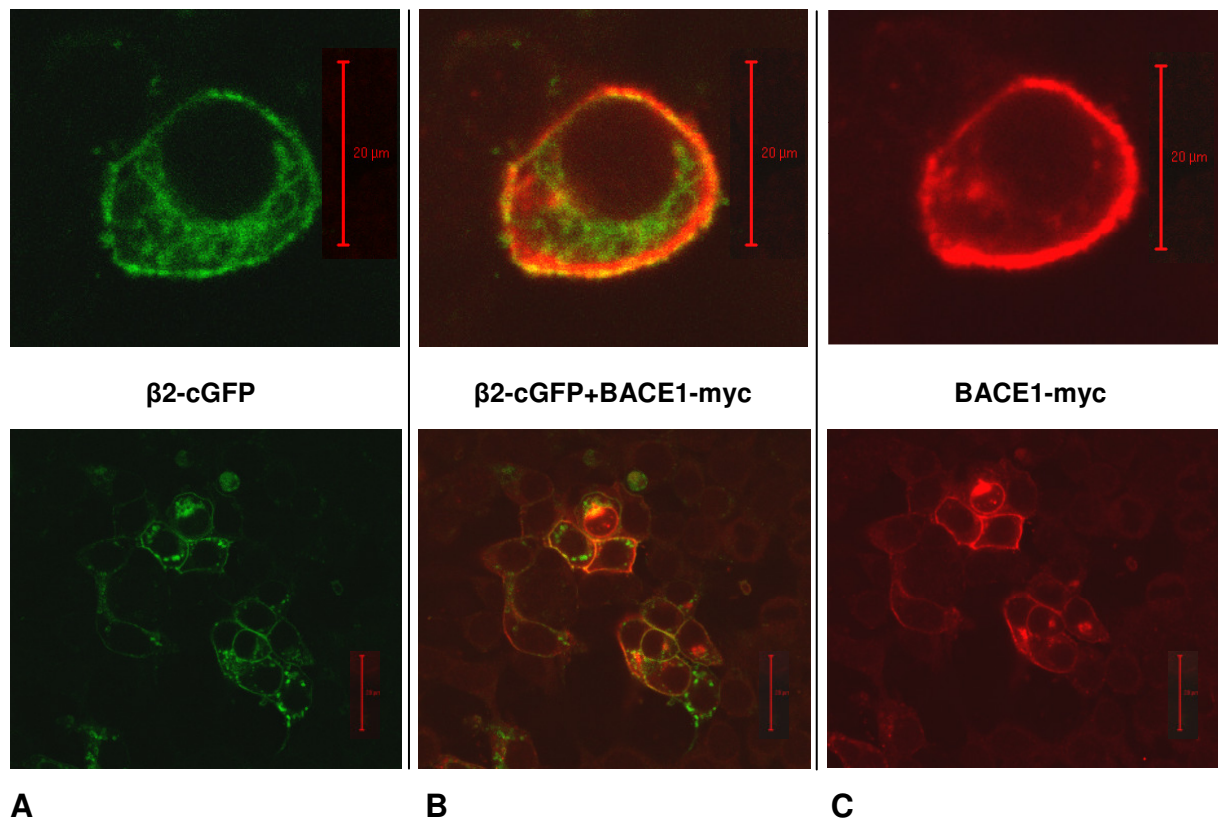
A: Aktivierungskurven von  $\text{Na}_v1.2a$  in HEK293-Zellen aus den Kontrollversuchen. Zusätzlich zu  $\text{Na}_v1.2a$  wurde entweder der Serotoninrezeptor  $5\text{HT}_{1A}$  (magenta gestrichelte Kurve), der BACE1-Inhibitor C3 (blaue durchgehende Kurve) oder das Fluoreszenzprotein cEGFP-F kotransfiziert. Es zeigte sich bei keiner der Messreihen ein signifikanter Einfluss auf die Aktivierungskurve. Schwarze Kurve: Referenzkurve von  $\text{Na}_v1.2a$

B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus A)

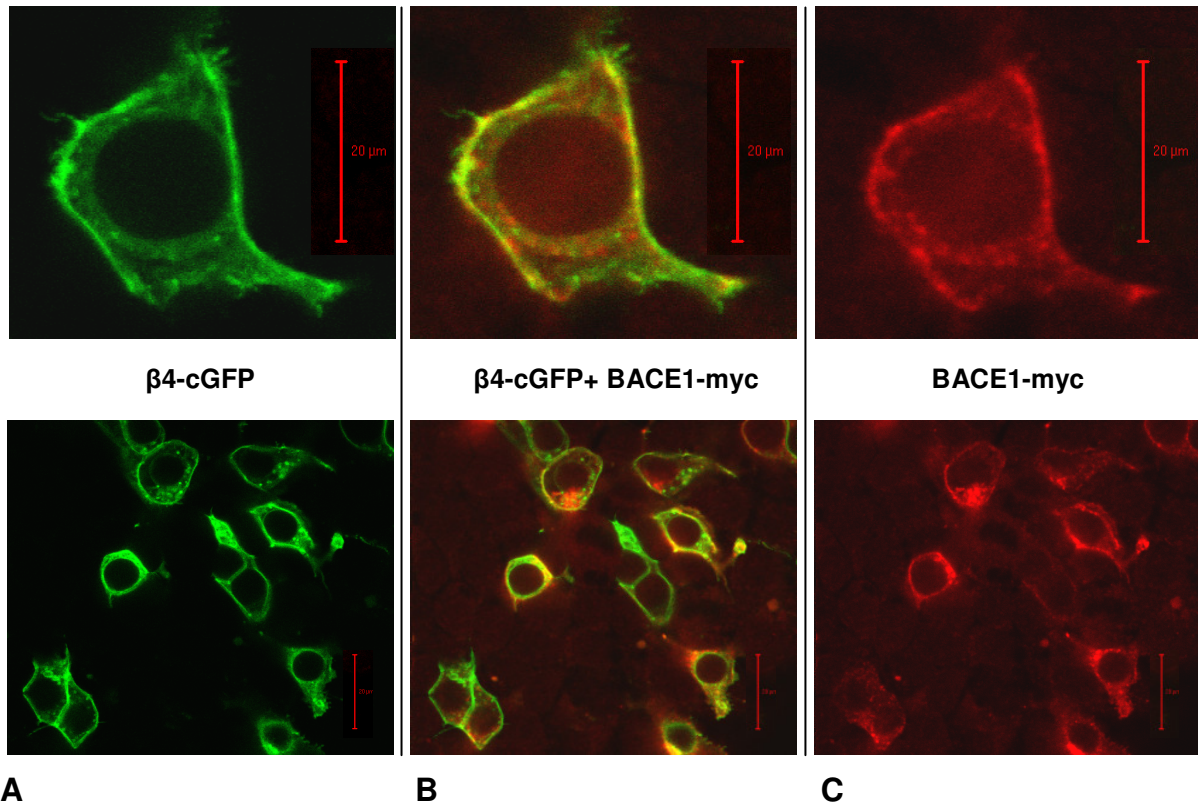


### 3.6. Immunfluoreszenz-Darstellung

Mithilfe konfokaler Aufnahmen von HEK293-Zellen, die zuvor mit GFP-markierten  $\beta$ 2- oder  $\beta$ 4-Untereinheiten transfiziert worden waren, konnten sowohl die Expressionsmuster als auch der Einbau in die Membranoberfläche eindrucksvoll gezeigt werden (Abb. 3. 13 und Abb. 3. 14, je linke Spalte). Die zusätzliche Kotransfektion von myc-markierter BACE1 ließ die Präsenz dieses Enzyms hauptsächlich in und unterhalb der Plasmamembran erkennen (Abb. 3. 13 und Abb. 3. 14, je rechte Spalte). Die Fusion der Immunfluoreszenz von  $\beta$ 2 und BACE1 in derselben Zelle machte die Kolokalisation dieser beiden Proteine kenntlich (Abb. 3. 13, mittlere Spalte). Die Doppelimmunfluoreszenz-Darstellung von Zellen, die mit GFP-markierter  $\beta$ 4 und myc-markierter BACE1 kotransfiziert worden waren, offenbarte ebenfalls eine ausgeprägte Kolokalisation dieser Proteine (Abb. 3. 14, mittlere Spalte).



**Abb. 3. 13** Konfokale Aufnahmen von GFP- $\beta$ 2- und myc-BACE1-kotransfizierten HEK293-Zellen. Die linke Spalte (A) zeigt die GFP-markierte  $\beta$ 2-Untereinheit. In der rechten Spalte (C) ist das myc-transfizierte BACE1 dargestellt, das über Antikörperfärbung sichtbar geworden ist. In der mittleren Spalte (B) sind beide Bilder übereinander gelegt worden, hier wird die Kolokalisation beider Proteine deutlich.



**Abb. 3. 14** Konfokale Aufnahmen von GFP- $\beta$ 4- und myc-BACE1-kotransfizierten HEK293-Zellen. In der linken Spalte (A) ist die GFP-markierte  $\beta$ 4-Untereinheit dargestellt. Die rechte Spalte (C) zeigt das myc-transfizierte BACE1, welches mittels Antikörperfärbung sichtbar geworden ist. Die mittlere Spalte (B) stellt die Übereinanderlagerung beider Bilder dar, hier wird die ausgeprägte Kolokalisation beider Proteine deutlich.

## 4. Diskussion

### 4.1. $\beta$ -Untereinheiten als Substrate von BACE1

Nachdem Wong et al. (2005) erstmals die  $\beta$ -Untereinheiten von spannungsabhängigen Natriumkanälen als Substrate des Enzyms BACE1 identifizieren konnten, warf dies die Frage nach möglichen Auswirkungen auf das Öffnungsverhalten der Kanäle auf. Die Aufdeckung des proteolytischen Einflusses von BACE1 auf die  $\beta$ -Untereinheiten war mittels Westernblot-Untersuchungen erfolgt (Wong et al., 2005). Entsprechend wurden von den für die *patch-clamp*-Messungen angelegten und je nach Protokoll transfizierten Zellkulturen Proben zur Aufbereitung im Westernblot verwendet. So sollte zusätzlich abgesichert sein, dass eventuelle elektrophysiologische Auswirkungen der Kotransfektionen mit BACE1 auch tatsächlich auf das proteolytische Verhalten des untersuchten Enzyms zurückzuführen sind.

Im Rahmen der engen Zusammenarbeit an diesem Projekt wurden die Westernblots im Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität Kiel von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Saftig / Prof. Dr. K. Reiss durchgeführt und für die Diskussion der elektrophysiologischen Befunde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Im Westernblot konnte nach Kotransfektion von  $\beta 2$  und BACE1 in HEK293-Zellen das 18 kDa-große C-terminale Spaltprodukt der  $\beta$ -Untereinheit nachgewiesen werden (s. Anhang *Westernblot-Experimente und Ko-Immunopräzipitation*, Abb. A). Die Bildung dieses Spaltproduktes war in Anwesenheit des BACE1-spezifischen Inhibitors C3 reduziert. Vergleichbare Ergebnisse wurden nach Kotransfektion von BACE1 und der Untereinheit  $\beta 4$  beobachtet. Die Spezifität dieser Spaltung wurde des Weiteren durch den Einsatz der katalytisch inaktiven BACE1-Mutante D289N gezeigt, die keine Spaltprodukte der  $\beta 4$ -Untereinheit erzeugte.

Mithilfe der Westernblots konnte somit erfolgreich bestätigt werden, dass die  $\beta$ -Untereinheiten des Natriumkanals Substrate des Enzyms BACE1 darstellen.

### 4.2. *Modulation des $Na_v 1.2$ durch $\beta$ -Untereinheiten und Proteolyse durch BACE1*

Mithilfe der elektrophysiologischen Messungen wurden zunächst bereits publizierte Daten über modulatorische Wirkungen von  $\beta$ -Untereinheiten auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Yu et al., 2003) bestätigt. Sowohl die in dieser Arbeit untersuchte  $\beta 2$ - als auch die  $\beta 4$ -Untereinheit verursachten signifikante Linksverschiebungen der  $Na_v 1.2a$ -Aktivierungskurve ( $\beta 2$  stärker als  $\beta 4$ ), jedoch keine signifikanten Veränderungen in den Inaktivierungskurven (s. Abb. 3. 2 und Abb. 3. 3).

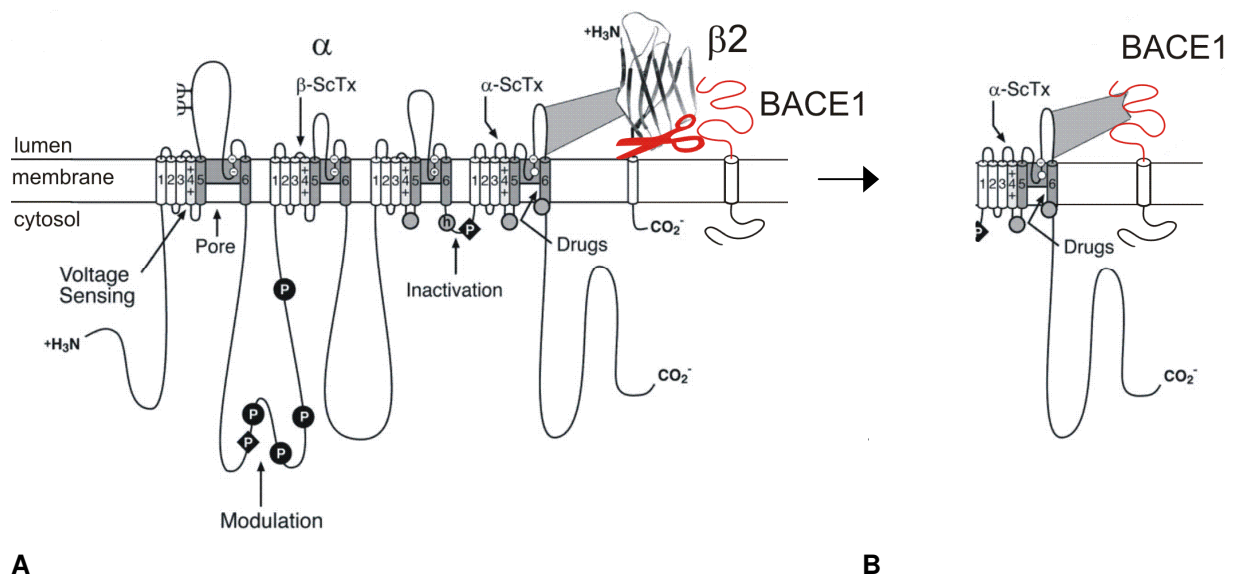
Im Laufe der Untersuchungen zur Wirkung von BACE1 auf die  $\beta 2$ -Untereinheit zeigte sich deutlich in der Aktivierungskurve die Reduktion der Linksverschiebung aufgrund des proteolytischen Einflusses von BACE1, der durch den BACE-Inhibitor C3 reversibel war (s. Abb. 3. 4). Die Ausgangshypothese, BACE1 könne mittels enzymatischer Aktivität den modulatorischen Einfluss der  $\beta$ -Untereinheiten beeinflussen, wurde somit durch diese Experimente bekräftigt.

### 4.3. BACE1 zeigt nicht-proteolytische Effekte

In HEK293-Zellen, die entweder Na<sub>v</sub>1.2a/β2- oder Na<sub>v</sub>1.2a/β4-Natriumkanalkomplexe exprimieren, verursachte BACE1 überraschenderweise elektrophysiologische Effekte, die nur partiell mit der enzymatischen Spaltung der β-Untereinheiten assoziiert waren. Vereinfacht dargestellt hätte man erwartet, dass BACE1 mit der Spaltung von β2 bzw. β4 den jeweiligen Effekt der Untereinheiten auf das Öffnungsverhalten des Kanals hätte umkehren müssen, und zwar bei der Aktivierung in dem Maße, in dem die Untereinheiten eine Verschiebung der Kurven verursacht hatten. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung hob BACE1 tatsächlich den Effekt von der β2-Untereinheit auf die Na<sub>v</sub>1.2a-Aktivierung weitgehend wieder auf, was implizierte, dass seine enzymatische Aktivität intakt war.

In Kontrast dazu hatte BACE1 die gegensätzliche Wirkung bei den Na<sub>v</sub>1.2a/β4-Kanalkomplexen, in denen es eine verstärkte Hyperpolarisation bezogen auf den Mittelpunkt der Aktivierungskurven verursachte, anstatt diese aufzuheben. Als ebenso unerwartet erwies sich die Tatsache, dass eine deutlich signifikante Wirkung von BACE1 auch dann zu beobachten war, wenn die enzymatische Spaltung der β4-Untereinheit pharmakologisch mithilfe des BACE-Inhibitors C3 unterdrückt worden war. Folglich wurde also der Idee nachgegangen, dass BACE1 neben enzymatischen Einflüssen auch nicht-proteolytische Effekte aufweisen könnte. Tatsächlich war auch die enzymatisch inaktive Mutante von BACE1 im Stande, das Öffnungsverhalten des Natriumkanals zu modulieren, wenn sie allein mit Na<sub>v</sub>1.2a koexprimiert wurde.

Wenngleich die Hypothese durch weitere biochemische Untersuchungen wie z.B. Ko-Immunopräzipitation abgeklärt werden muss, erscheint es daher als denkbar, dass BACE1 direkt an die α-Untereinheit binden und so die Aktivierung des Kanals analog zur Wirkung von β2 beeinflussen kann. Möglicherweise besitzen β2 und BACE1 eine gemeinsame Bindungsstelle an der α-Untereinheit. Alternativ könnte BACE1 auch an einer anderen Seite der α-Untereinheit binden, die lediglich in Abwesenheit gebundener β2-Untereinheit zugänglich ist. Detaillierte Struktur-Funktions-Studien sollten helfen, die exakte Bindungsstelle zu spezifizieren.



**Abb. 4. 1**

A: Kolokalisation von  $\text{Na}_v1.2\alpha$ , der  $\beta 2$ -Untereinheit und BACE1 in der Membran. Das Modell zeigt die enzymatische Spaltung der  $\beta 2$ -Untereinheit durch BACE1.

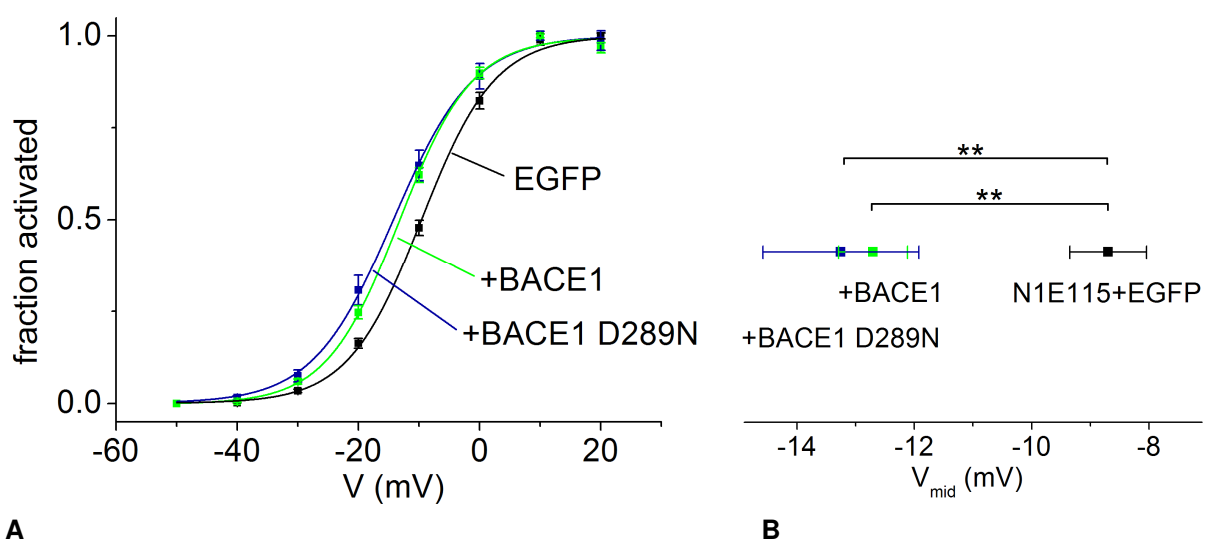
B: Modell zur Kolokalisation von  $\text{Na}_v1.2\alpha$ , der  $\beta 2$ -Untereinheit und BACE1 in der Membran. In der Abwesenheit von  $\beta 2$  lagert sich BACE1 selbst an den  $\text{Na}_v1.2\alpha$ -Kanal an.

#### 4.4. Bestätigung der BACE1-Wirkung im Neuroblastom-Zellsystem

Die elektrophysiologischen Messungen an N1E115-Zellen wurden von Dr. Tobias Huth vom Physiologischen Institut der CAU Kiel durchgeführt und für die Diskussion dieser Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Um den nicht-proteolytischen Einfluss von BACE1 in einem definierten, allerdings möglichst physiologischen System untersuchen zu können, wurden Messungen von endogenen Natriumströmen von kultivierten Neuroblastom N1E115-Zellen durchgeführt. Diese Zellen sind mit endogener BACE1-mRNS und -Proteinen ausgestattet. Interessanterweise exprimieren N1E115-Zellen keine  $\beta 2$ - oder  $\beta 4$ -Untereinheiten, wohingegen  $\beta 1$ - und  $\beta 3$ -Untereinheiten beide nachgewiesen werden konnten (T. Huth, persönliche Mitteilung).

Da die Neuroblastom-Zellen die beiden in dieser Arbeit untersuchten  $\beta$ -Untereinheiten nicht besitzen, sollte die Überexpression von BACE1 oder der proteolytisch inaktiven Mutante denselben Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Natriumstrom-Aktivierung haben. Tatsächlich führte die Überexpression je einer der BACE1-Varianten zu einer Verschiebung des Mittelwerts der Aktivierungskurve im Sinne einer Hyperpolarisation, die sich untereinander nicht unterschieden, jedoch signifikant zum Kurvenverlauf der scheintransfizierten Zellen waren (Abb. 4. 2). Diese Daten unterstreichen die funktionelle Bedeutung des nicht-proteolytischen Einflusses von BACE1 auf erregbare Zellen.



**Abb. 4. 2**

A: Aktivierungskurven von Neuroblastom-Zellen (Linie N1E115) ohne Überexpression einer BACE1-Variante (schwarz) und mit Überexpression von aktivem BACE1 (grün) und inaktivem BACE1 (blau). Beide BACE1-Varianten führen zu einer signifikanten Linksverschiebung.

B: Darstellung der Signifikanzniveaus (statistischer Vergleich der Mittelpunkte der Aktivierungskurven aus A) (\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

#### 4.5. *Klinische Konsequenz der Ergebnisse*

Es ist bekannt, dass Alzheimer-Patienten ein erhöhtes Risiko für epileptische Aktivität aufweisen (Amatniek et al., 2006), was mit der Vermutung übereinstimmt, dass Morbus Alzheimer mit einer abnormen Erhöhung der neuronalen Aktivität assoziiert ist oder sogar partiell durch diese verursacht wird (Palop et al., 2007). Erst kürzlich wurde von Kim et al. (2007) vermutet, dass die folgende Ereignissequenz zu einer neuronalen Hyperexzitabilität im Rahmen von Morbus Alzheimer führen könnte. Die Hochregulation von BACE1-Proteinen und deren mit der Alzheimer-Krankheit assoziierten Aktivität verursachen die erwähnte Spaltung der  $\beta 2$ -Untereinheit. In Abwesenheit dieser Untereinheit wird die Oberflächenexpression von Natriumkanal- $\alpha$ -Untereinheiten reduziert, und mit der verminderten Kanaldichte wird letztendlich die Balance zwischen Exzitation und Inhibition in betroffenen Hirnregionen gestört. Obwohl die Studie von Kim et al. (2007) eindeutig die Bedeutung von BACE1-vermittelter Spaltung von  $\beta 2$  demonstriert, bleibt noch festzulegen, wie der hier erstmals beschriebene nicht-proteolytische Effekt von BACE1 die Exzitabilität der ZNS-Neurone und der Netzwerke, in denen diese eingebettet sind, tangiert. Gemäß den in dieser Arbeit erhobenen Daten könnte das vermehrt vorliegende BACE1 als funktioneller Ersatz von  $\beta 2$  fungieren und, wie die  $\beta 2$ -Untereinheit, die Wirkung der  $\beta 4$ -Untereinheit überspielen.

Interessanterweise sind die Expressionsmuster von der  $\beta 2$ - und der  $\beta 4$ -Untereinheit im Wesentlichen komplementär in den Regionen, die vorzugsweise von der Alzheimer-Krankheit betroffen sind, wie z.B. der Hippokampus und der zerebrale Kortex (Yu et al., 2003). Somit erscheint es sehr wohl vorstellbar, dass die Alzheimer-assoziierte Hochregulation von BACE1 die Natriumkanalfunktion nicht nur in Regionen mit dichter Expression von  $\beta 2$  (infolge der proteolytischen Wirkung), sondern auch in Regionen, die überwiegend mit  $\beta 4$  ausgestattet sind (infolge der nicht-proteolytischen Wirkung), beeinflusst. Aus dieser Sicht leisten wohl beide Effekte einen Beitrag zur modifizierten neuronalen Exzitabilität bei Alzheimer-Patienten.

Verschiedene neueste Untersuchungen beschreiben entscheidende Einflüsse vom  $\gamma$ -Sekretase/Presenilin-Komplex, die nicht in Zusammenhang mit seiner enzymatischen Aktivität zu stellen sind (Baki et al., 2004; Huppert, Ilagan, De et Kopan, 2005; Tu et al., 2006; Repetto, Yoon, Zheng et Kang, 2007). Die hier vorliegende Arbeit berichtet zum ersten Mal, dass dies ebenso für die  $\beta$ -Sekretase BACE1 gilt, und verdeutlicht die Multifunktionalität von BACE1 sowohl im Rahmen der gesunden Hirnfunktion als auch der Pathogenese des Morbus Alzheimer.

Allerdings muss auch die Entwicklung möglicher medikamentöser Angriffspunkte neu überdacht werden. Die Entwicklung der oben beschriebenen BACE1-Inhibitoren (s. Abschnitt 1.2.4) basiert auf der Vorstellung, dass mithilfe dieser Medikamente die enzymatische Aktivität von BACE1

blockiert wird. Die Konsequenz eines nicht-proteolytischen Effektes von BACE1 wäre nicht nur eine geringere Funktion der Inhibitoren als bisher angenommen, sondern eventuell auch eine zusätzliche Modulation von Proteinen wie den Natriumkanälen durch die BACE1-Inhibitor-Komplexe. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten werfen also nicht nur ein neues Licht auf die Funktionen der  $\beta$ -Sekretase und mögliche Modulationsmechanismen von Natriumkanälen, sondern haben auch denkbare Folgen für mögliche Therapieansätze des Morbus Alzheimer.

## 5. Zusammenfassung

Die Akkumulation von  $\beta$ -Amyloid-Peptid spielt eine essentielle Rolle in der Entstehung von Morbus Alzheimer. Eines der wesentlichen Enzyme bei der Entstehung der Amyloid-Plaques ist das  *$\beta$ -site-amyloid-precursor-protein (APP)-cleaving enzyme 1* (BACE1, auch  $\beta$ -Sekretase 1 genannt). Da Alzheimer-Patienten eine signifikant erhöhte Expression und Aktivität von BACE1 aufweisen, wurde dieses Enzym ein primäres Ziel medikamentöser Therapieversuche. Allerdings ist zurzeit noch kein Medikament, das auf diesem vielversprechenden Ansatz basiert, zur Therapie zugelassen.

Mittlerweile gilt es als gesichert, dass APP nicht das einzige und wahrscheinlich auch nicht das Hauptsubstrat von BACE1 darstellt. Kürzlich sind die  $\beta$ -Untereinheiten der spannungsgesteuerten Natriumkanäle ebenfalls als Substrate des Enzyms identifiziert worden. Diese  $\beta$ -Untereinheiten modifizieren das Öffnungsverhalten der Kanäle und beeinflussen aufgrund ihrer intra- und extrazellulären Interaktionen den Einbau der Kanalkomplexe in spezifische Oberflächenregionen der Zelle. Das Ziel dieser Arbeit war es, Einsicht über die Rolle von BACE1 bei der Natriumkanalfunktion zu erhalten, da im Falle einer Spaltung der  $\beta$ -Untereinheiten mit elektrophysiologisch sichtbaren Konsequenzen für das Schaltverhalten des Natriumkanals zu rechnen war. Für diese Experimente unter Einsatz der *patch-clamp*-Technik eignete sich das HEK293-Zellsystem aufgrund der guten Kontrollierbarkeit einzelner Zellparameter besonders gut.

In dieser Arbeit wird die überraschende Entdeckung beschrieben, dass BACE1 das Schaltverhalten von Natriumkanälen nicht nur über die Spaltung der  $\beta$ -Untereinheiten beeinflusst, sondern vermutlich auch über eine direkte, nicht-proteolytische Interaktion mit der  $\alpha$ -Hauptuntereinheit. Diese Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass in HEK293-Zellen, die entweder  $\text{Na}_v1.2/\beta2$ - oder  $\text{Na}_v1.2/\beta4$ -Kanalkomplexe exprimieren, BACE1 elektrophysiologische Effekte aufweist, die nur partiell mit der enzymatischen Spaltung dieser Untereinheiten assoziiert, sondern eher mit einem nicht-proteolytischen Einfluss vereinbar sind. So zeigten sich deutliche Änderungen in der Aktivierung des Natriumkanals im Sinne einer gesteigerten Erregbarkeit des Kanals, die nicht nur nach erfolgreicher Spaltung der  $\beta$ -Untereinheiten zu verzeichnen war, sondern ebenfalls bei der Koexpression von BACE1 mit der  $\alpha$ -Untereinheit des Kanals in Abwesenheit der  $\beta$ -Untereinheiten. Darüber hinaus war auch eine katalytisch inaktive Mutante von BACE1 in der Lage, das Öffnungsverhalten des Natriumkanals auch dann zu beeinflussen, wenn sie lediglich mit der  $\text{Na}_v1.2$   $\alpha$ -Untereinheit zusammen exprimiert wurde.

Die Entwicklung von Medikamenten mit dem Ziel, BACE1 zu blockieren, ist somit zwar nach wie vor ein wesentlicher Schritt in Richtung einer Therapie der Alzheimer Erkrankung, allerdings gilt es nach den nun vorliegenden Ergebnissen zu überdenken, inwieweit auch medikamentös inaktiviertes BACE1 Effekte verursacht, die die therapeutische Wirkung beeinträchtigen könnten. Die *in vivo*-Therapie mit BACE1-Inhibitoren ist zwar anhand dieser Ergebnisse nicht ausreichend beurteilbar, allerdings ist eine eventuelle Quelle möglicher Nebenwirkungen auf die neuronale Erregbarkeit aufgezeigt worden.



## Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1990) Molekularbiologie der Zelle, 2. Auflage, VCH, Weinheim
- Alzheimer, A.: Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. (1907) Allg. Z. Psychiat. Psych.-Gerichtl. Med. **64**, Nr. 1-2, 146–148.
- Amano, T., Richelson, E. and Nirenberg, M. (1972) Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc Natl Acad Sci USA*, **69**: 258-263.
- Armstrong, C.M. (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol Rev*, **61**: 644-683.
- Baker, M.D. and Wood, J.N. (2001) Involvement of Na<sup>+</sup> channels in pain pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, **22**: 27-31.
- Birks, J., Grimley Evans, J. (2007) Ginkgo biloba for cognitive impairment and dementia. *Cochr Data of Syst Rev*, **2**
- Blaustein, R.O. and Miller, C. (2004) Ion channels: shake, rattle or roll? *Nature*, **427**:499-500.
- Braun, H. (2007) Synthese von  $\beta$ -Sekretase- und Proteasom-Inhibitoren: Derivatisierung von Peptidaldehyden. Dissertationsarbeit
- Budker, V., Hagstrom, J.E., Lapina, O., Eifrig, D., Fritz, J. and Wolff, J.A. (1997) Protein/amphipatic polyamine complexes enable highly efficient transfection with minimal toxicity. *Biotechniques*, **23**: 139, 142-7.
- Bush, A. I., Multhaup, G., Moir, R. D., Williamson, T. G., Small, D. H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K. und Masters, C. L. (1993). A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **268**: 16109-16112.
- Bush, A. I., Pettingell, W. H., Jr., de Paradis, M., Tanzi, R. E. und Wasco, W. (1994). The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zincmodulated heparin-binding superfamily. *J Biol Chem*, **269**: 26618-26621.
- Cantrell, A.R., Ma, J.Y., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1996) Muscarinic modulation of sodium current by activation of protein kinase C in rat hippocampal neurons. *Neuron*, **16**: 1019-1026.
- Cantrell, A.R., Smith, R.D., Goldin, A.L., Scheuer, T. and Catterall, W.a. (1997) Dopaminergic modulation of sodium current in hippocampal neurons via cAMP-dependent phosphorylation of specific sites in the sodium channel alpha subunit. *J Neurosci*, **17**: 7330-7338.
- Cao, X. und Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science*, **293**: 115-120.
- Catterall, W.A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **26**: 13-25.
- Catterall, W., Goldin, A.L., Waxman, S.G. (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels, *Pharmacol Rev* **57**:397-409.
- Cole, S.L. and Vassar, R. (2007) The Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegen*, **2**: 22
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, **173**: 33-38.

DeKosky, S.T., Fitzpatrick, A., Ives, D.G., Saxton, J., Williamson, J., Lopez, O.L., Burke, G., Fried, L., Kuller, L.H., Robbins, J., Tracy, R., Woolard, N., Dunn, L., Kronmal, R., Nahin, R., Furberg, C. (2006) The Ginkgo Evaluation of Memory (GEM) study: Design and baseline data of a randomized trial of Ginkgo biloba extract in prevention of dementia. *Contemp Clin Trials* **27**:238–253.

Dominguez, D., Tournoy, J., Hartmann, D., Huth, T., Cryns, K., Deforce, S., Serneels, L., Camacho, I.E., Marjaux, E., Craessaerts, K., Roebroek, A.J.M., Schwake, M., D'Hooge, R., Bach, P., Kalinke, U., Moechars, D., Alzheimer, C., Reiss, K., Saffig, P., De Strooper, B. (2005) Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem*, **280**: 30797-30806.

Dudel, J. (2000) Allgemeine Physiologie der Zelle und der interzellulären Kommunikation. Aus „Physiologie des Menschen“, Hrsg. Schmidt, R.F., Thews, G., 28. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 3-66.

Eaholtz, G., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1994) Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron*, **12**: 1041-1048.

Esler, W.P., Wolfe, M.S. (2001) A portrait of Alzheimer secretases – new features and familiar faces. *Science* **293**, 1449-1454.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**: 7413-7417.

Giovannini, M.G., Scali, C., Prosperi, C., Belluci, A., Vannucchi, M.G., Rosi, S., Pepeu, G., Casamenti, F. (2002)  $\beta$ -Amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the rat brain *in vivo*: involvement of the p38MAPK pathway. *Neurobiol Dis*, **11**: 257-274.

Goldin, A.L. (2003) Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol*, **13**: 284-290.

Gong, B., Rhodes, K.J., Bekele-Arcuri, Z., Trimmer, J.S. (1999) Type I and type II Na<sup>+</sup> channel alpha subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain. *J Comp Neurol*, **412**: 342-352.

Graeber MB, Koesel S, Egensperger R, Banati RB, Mueller U, Bise K, Hoff P, Moeller HJ, Fujisawa K, Mehraein P (1997) Rediscovery of the case described by Alois Alzheimer in 1911: historical, histological and molecular genetic analysis. *Neurogenetics*. **1**, 73-80.

Graham, F.L., Smiley, J., Russel, W.C. and Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformes by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**: 59-74.

Grimm, M. O., Grimm, H. S., Patzold, A. J., Zinser, E. G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J. A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J. *et al.* (2005). Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol*, **7**: 1118-23.

Gunthorpe, M., Smith, G., Davis, J., Randall, A. (2001) Characterisation of a human acid-sensing ion channel (hASIC1a) endogenously expressed in HEK293 cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Springer Berlin/ Heidelberg

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**: 85-100.

Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S. und Muller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *Embo J*, **23**: 4106-4115.

Hesse, L., Beher, D., Masters, C. L. und Multhaup, G. (1994). The [beta] A4 amyloid precursor protein binding to copper. *FEBS Letters*, **349**: 109-116.

Hilber, K., Sandter, W., Kudlacek, O., Glaaser, I.W., Weisz, E., Kyle, J.W., French, R.J., Fozzard, H.A., Dudley, S.C. and Todt, H. (2001) The selectivity filter of the voltage-gated sodium channel is involved in channel activation. *J Biol Chem*, **276**: 27831-27839.

Hilber, K., Sandter, W., Kudlacek, O., Schreiner, B., Glaaser, I., Schutz, W., Fozzard, H.A., Dudley, S.C. and Todt, H. (2002) Interaction between fast and ultra-slow inactivation in the voltage-gated sodium channel. Does the inactivation gate stabilize the channel structure? *J Biol Chem*, **277**: 37105-37115.

Hille, B. (1984) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, First Edition, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts

Hille, B. (2001) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, Third Edition, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts

Hirschberg, B., Rovner, A., Liebermann, M. and Patlak, J. (1995) Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol*, **106**: 1053-1068.

Hochberg, F.H., Rottenberg, D. *Neurological classics in modern translation*. New York: Hafner Press 1977

Hodgkin A.L. & Huxley, A.F. (1939) Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature*, **144**: 710-711.

Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*, **117**: 500-544.

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

Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., Catterall, W.A. (1992) Primary structure and functional expression of the  $\beta$ 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science* **256**: 839-842.

Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F., Scheuer, T., Catterall, W.A. (1995) Structure and function of the  $\beta$ 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* **83**: 433-442.

Isom, L. L. (2001) Sodium channel beta subunits: anything but auxiliary. *Neuroscientist* **7**, 42-54.

Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., MacKinnon, R. (2003) The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature*, **423**: 42-48.

Jin, L., Ninomiya, H., Roch, J., Schubert, D., Masliah, E., Otero, D. Saitoh, T. (1994). Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J Neurosci*, **14**: 5461-5470.

Kaether, C., Haass, C., Steiner, H. (2006) Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neuro-degenerative diseases*. **3 (4-5)**:275-283.

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

Kellenberger, S., West, J.W., Catterall, W.A. and Scheuer, T. (1997b) Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol*, **109**: 607-617.

Kellenberger, S., West, J.W., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1997a) Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na<sup>+</sup> channels. *J Gen Physiol*, **109**: 589-605.

- Kieffer, B. L. (1991) Optimised cDNA size selection and cloning procedure for the construction of representative plasmid cDNA libraries. *Gene*, **109**: 115-119.
- Kim, D.Y., Carey, B.W., Wang, H., Ingano, L.A.M., Binshtok, A.M., Wertz, M.H., Pettingell, W.H., He, P., Lee, V.M.-Y., Woolf, C.J., Kovacs, D.M. (2007) BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nat Cell Biol*, **9**: 755-764.
- Kobayashi, D., Zeller, M., Cole, T., Buttini, M., McConlogue, L., Sinha, S., Freedman, S., Morris, R.G.M., Chen, K.S (2008) BACE1 gene deletion: Impact on behavioural function in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiol of Aging*, **29**: 861-873.
- Kornacker, M.G., Lai, Z., Witmer, M., Ma, J., Hendrick, J., Lee, V.G., Riexinger, D.J., Mapelli, C., Metzler, W., Copeland, R.A. (2005) An inhibitor binding pocket distinct from the catalytic active site on human beta-APP cleaving enzyme. *Biochemistry*, **44**, 11567.
- Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A., Pidoplichko, V.I. and Veselovsky, N.S. (1978) Ionic currents in the neuroblastoma cell membrane. *Neuroscience*, **3**: 327-332.
- Ma, J.Y., Catterall, W.A. and Scheuer, T. (1997) Persistent sodium currents through brain sodium channels induced by G protein betagamma subunits. *Neuron*, **19**: 443-452.
- Makita, N., Bennett, P.B. and George A.L.J.r. (1996) Molecular determinants of beta 1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels. *J Neurosci*, **16**: 7117-7127.
- Mantegazza, M., Yu, F.H., Powell, A.J., Clare, J.J., Catterall, W.A. and Scheuer, T. (2005) Molecular determinants for modulation of persistent sodium current by G-protein betagamma subunits. *J Neurosci*, **25**: 3341-3349.
- Mattson, M. P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev*, **77**: 1081-1132.
- Maurice N., Mercer, J., Chan, C.S., Hernandez-Lopez, S., Held, J., Tkatch, T., Surmeier, D.J. (2004) D2 dopamine receptor-mediated modulation of voltage-dependent Na<sup>+</sup>channels reduces autonomous activity in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci*, **24**: 10289-10301.
- Maurice, N., Tkatch, T., Meisler, M., Sprunger, L.K., Surmeier, D.J. (2001) D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> dopamine receptor activation differentially modulates rapidly inactivating and persistent sodium currents in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurosci*, **21**: 2268-2277.
- Maynard, C. J., Cappai, R., Volitakis, I., Cherny, R. A., White, A. R., Beyreuther, K., Masters, C. L., Bush, A. I. und Li, Q.-X. (2002). Overexpression of Alzheimer's Disease Amyloid-beta Opposes the Age-dependent Elevations of Brain Copper and Iron. *J Biol Chem*, **277**: 44670-44676.
- McConlogue, L., Buttini, M., Anderson, J.P., Brigham, E.F., Chen, K.S., Freedman, S.B., Games, D., Johnson-Wood, K., Lee, M., Zeller, M., Liu, W., Motter, R., Sinha, S. (2007) Partial Reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP transgenic mice. *JBC*, **36**: 26326-26334.
- McDonald, D.R., Brunden, K.R., Landreth, G.E. (1997) Amyloid fibrils activate tyrosine kinase-dependent signalling and superoxide production in microglia. *J Neurosci*, **17**: 2284-2294.
- Mitrovic, N., George AL, J.r. and Horn, R. (2000) Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation. *J Gen Physiol*, **115**: 707-718.
- Mittmann, T. and Alzheimer, C. (1998) Muscarinic inhibition of persistent Na<sup>+</sup> current in rat neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, **79**: 1579-1582.

- Miyazaki, H., Oyama, F., Wong, H.K., Kaneko, K., Sakurai, T., Tamaoka, A., Nukina, N. (2007) BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel  $\beta 4$  subunit. *Biochem Biophys Res Comm*, **361**: 43–48.
- Moolenaar, W.H. and Spencer, I. (1978) Ionic currents in cultured mouse neuroblastoma cells under voltage-clamp conditions. *J Physiol*, **278**: 265-286.
- Motoike, H.K., Liu, H., Glaaser, I.W., Yang, A.S., Tateyama, M. and Kass, R.S. (2004) The Na<sup>+</sup> channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol*, **123**: 155-165.
- Nagy, K., Kiss, T., and Hof, D. (1983) Single Na channels in mouse neuroblastoma cell membrane. Indications for two open states. *Pflugers Arch*, **399**: 302-308.
- Nawrot, B. (2004) Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids - a future for Alzheimer's disease therapy? *Acta Biochem Polonica*, **51**, 431-444.
- Ninomiya, H., Roch, J., Sundsmo, M., Otero, D. und Saitoh, T. (1993). Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J Cell Biol*, **121**: 879-886.
- Numberger, M. and Draguhn, A. (1996) Patch-Clamp-Technik, Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford
- Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapor, N., Mazaki, E., Inoue, I., Takeuchi, T., Shigeyoshi, I., Yanagawa, Y., Obata, K., Furuichi, T., Hensch, T.K., Yamakawa, K. (2007) Na<sub>v</sub>1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: acircuit basis for epileptic seizures in mice carrying an scn1a gene mutation. *J Neurosci* **27**: 5903-5914.
- O'Reilly, J.P., Wang, S.Y. and Wang, G.K. (2001) Residue-specific effects on slow inactivation at V787 in D2-S6 of Na(v)1.4 sodium channels. *Biophys J*, **81**: 2100-2111.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, **111**: 229-233.
- Qu, Y., Rogers, J.C., Chen, S.F., McCormick, K.A., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1999) Functional roles of the extracellular segments of the sodium channel alpha subunit in voltage-dependent gating and modulation by beta1 subunits. *J Biol Chem*, **274**: 32647-32654.
- Reinhard, C., Hebert, S. S. und De Strooper, B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *Embo J*, **24**: 3996-4006.
- Richelson, E. (1973) Regulation of tyrosine hydroxylase activity in mouse neuroblastoma clone N1E-115. *J Neurochem*, **21**: 1139-1145.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- Sastre, M., Dewachter, I., Rossner, S., Bogdanovic, N., Rosen, E., Borghgraef, P., Evert, B.O., Dumitrescu-Ozimek, L., Thal, D.R., Landreth, G., Walter, J., Klockgether, T., van Leuven, F., Heneka, M.T. (2006) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress  $\beta$ -secretase gene promoter activity by the activation of PPAR $\gamma$ . *PNAS* **103**: 443-448.
- M. Schäfer, Forscher: Alzheimer wird zum Massenphänomen, *wissenschaft.de*, 11. Juni 2007.
- Schilling, T. (2001) Morphologische, immunphänotypische und elektrophysiologische Eigenschaften deaktiverter muriner Mikroglia in vitro. Dissertationsarbeit

- Schmidt, J.W., Rossie, S., Catterall, W.A. (1985) A large intracellular pool of inactive Na<sup>+</sup> channel alpha subunits in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 4847-4851.
- Schmidt, J.W., Catterall, W.A. (1986) Biosynthesis and processing of the alpha subunit of the voltage-sensitive sodium channel in rat brain neurons. *Cell*, **46**: 437-445.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, **81**: 741-766.
- Shuman, S. (1994) Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J Biol Chem*, **269**: 32678-32684.
- Silbernagl, S., Despopoulos, A. (2007) Taschenatlas Physiologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 7. Auflage
- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Lower, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R. *et al.* (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *Embo J*, **24**: 3624-3634.
- Starace, D.M., Bezanilla, F. (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field. *Nature*, **427**: 548-553.
- Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H. and Numa, S. (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature*, **339**: 597-603.
- Trimmer, J.S., Rhodes, K.J. (2004) Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu. Rev. Physiol.*, **66**: 477-519.
- Ulbricht, W (2005) Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev*, **85** (4): 1271-301.
- Umbreen, S. (2007) Synthesis and Biological Evaluation of  $\beta$ -Secretase Inhibitors, Proteasome Inhibitors and Losartan Active Metabolites. Dissertationsarbeit
- Vassilev, P.M., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science*, **241**: 1658-1661.
- Vassilev, P., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (1989) Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 8147-8151.
- Venkitaramani, D.V., Chin, J., Netzter, W.J., Gouras, G.K., Lesne, S., Malinow, R., Lombroso, P.J. (2007)  $\beta$ -amyloid modulation of synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci*, **27**: 11832-11837.
- Vilin, Y.Y., Fujimoto, E. and Ruben, P.C. (2001) A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel slow inactivation. *Biophys J*, **80**: 2221-2230.
- Von Rotz, R. C., Kohli, B. M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R. M., Konietzko, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci*, **117**: 4435-4448.
- Wagner, S.L & Munoz, B. (1999) Modulation of amyloid  $\beta$  protein precursor processing as a means of retarding progression of Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, **15**: **104** (10): 1329-1332.
- Wang, Y. & Ha, Y. (2004). The X-Ray Structure of an Antiparallel Dimer of the Human Amyloid Precursor Protein E2 Domain. *Molecular Cell*, **15**: 343-353.
- Wertkin, A. M., Turner, R. S., Pleasure, S. J., Golde, T. E., Younkin, S. G., Trojanowski, J. Q. und Lee, V. M. (1993). Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 9513-9517.

- West, J.W., Patton, D.E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A.L. and Catterall, W.A. (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 10910-10914.
- Westenbroek, R.E., Merrick, D.K., Catterall, W.A. (1989) Differential subcellular localization of RI and RII Na<sup>+</sup> channel subtypes in central neurons. *Neuron* **3**: 695-704.
- Westenbroek, R.E., Noebels, J.L., Catterall, W.A. (1992) Elevated expression of type II Na<sup>+</sup> channels in hypomyelinated axons of shiverer mouse brain. *J Neurosci*, **12**: 2259-2267.
- Westmeyer, G.G., Willem, M., Lichtenthaler, S.F., Lurman, G., Multhaup, G., Assfalg-Machleidt, I., Reiss, K., Saftig, P., Haass, C. (2004) Dimerization of  $\beta$ -site  $\beta$ -amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem* **279**: 31504-53212.
- Willem, M., Garrat, A.N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., Haass, C. (2006) Control of peripheral nerve myelination by the  $\beta$ -secretase BACE1. *Science*, **314**: 664-666.
- Wong, H.K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De, S.B., Saftig, P., Nukina, N. (2005) beta subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* **280**, 23009-23017.
- Yu, F.H., Mantegazza, M., Westenbroek, R.E., Robbins, C.A., Kalume, F., Burton, K.A., Spain, W.J., McKnight, G.S., Scheuer, T., Catterall, W.A. (2006) Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci* **9**: 1142-1149.
- Yu, F.H., Westenbroek, R.E., Silos-Santiago, I., Mc Cormick, K.A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., DiStefano, P.S., Catterall, W.a., Scheuer, T., Curtis, R. (2003) Sodium Channel beta 4, a New Disulfide-Linked Auxiliary Subunit with Similarity to beta 2. *J Neurosci* **23**, 7577-7585.
- Yuste, R., Bonhoeffer, T. (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci*, **5**: 24-34.
- Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M., Shao, P., Hitt, B., O'Connor, T., Logan, S., Maus, E., Citron, M., Berry, R., Binder, L., Vassar, R. (2007)  $\beta$ -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Levels Become Elevated in Neurons around Amyloid Plaques: Implications for Alzheimer's Disease Pathogenesis. *J Neurosci* **27**: 3639-3649.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J. S., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S. und Conner, M. W. (1995). [beta]-amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, **81**: 525-531.

## Anhang

## Anhang: Chemikalien

Substanz	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
1 kb DNS-Ladder	#G5711	Promega (Mannheim, Deutschland)
Agarose	#11380.03	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ampicillin	#A0104	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Tetracyclin	#35866	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Bacto™ Agar	#214010	Difco (Heidelberg, Deutschland)
Ethanol (absolut)	#510	Walter (Kiel, Deutschland)
Kanamycin	#k0126	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
LB Base, Miller Medium	#241420	Difco (Heidelberg, Deutschland)
Natriumacetat	#6267	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	#6400	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KCl	#P9333	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
GENETICIN®(G-418 Sulfate)	#11811-031	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin / Streptomycin	#2213	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Trypsin-EDTA	#T4049	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Minimum Essential Medium (MEM)	#41090-028	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	#D2650	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Trypan Blau	#15250-061	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Fetales Kälberserum	#S0115	Biochrom (Berlin, Deutschland)
CO <sub>2</sub>	#0474	Messer (Krefeld, Deutschland)
Glycerin	#104092	Merck (Darmstadt, Deutschland)
TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	#106029	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hepes	#H3375	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	#H15-002	PAA (Pasching, Deutschland)
NaOH	#6498	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CaCl <sub>2</sub>	#2382	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MgCl <sub>2</sub>	#5833	Merck (Darmstadt, Deutschland)
D-Glucose	#G-7528	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
D-Saccharose	#7653	Merck (Darmstadt, Deutschland)
TEA-Chlorid	#T5634	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
SYBR Safe™ DNA Gel Stain	#S33100	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Superfect Transfektionsreagenz	#301305	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Chloramin T	#C7080	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Eindeckmedium	#37852A	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

## Anhang: Enzyme, Kits, DNS

Substanz	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
Hind III	#R6041	Promega (Mannheim, Deutschland)
Cla I	#R6551	Promega (Mannheim, Deutschland)
Sac I	#R6065	Promega (Mannheim, Deutschland)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	#27104	Qiagen (Hilden, Deutschland)



Omniscript RT Kit	#20511	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Rneasy Plant Mini Kit	#74904	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	#12262	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Maxiprep Kit	#NA0300S	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
TOPO-Cloning-Kit	#K2400-20	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
One Shot Top10/P3 kompetente Zellen	#C505003	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
1 kb DNS Ladder	#G5711	Promega (Mannheim, Deutschland)
PCR Master Mix	#M7505	Promega (Mannheim, Deutschland)
Nuclease-Free Water	#P1193	Promega (Mannheim, Deutschland)
Primer		MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)
Primer – Sequenzierung		Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Sequenzierkit – Dynamic ET-Kit	#US81090	Amersham (Braunschweig, Deutschland)

### Anhang: Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Katalog-Nr.	Bezugsquelle
Petrischale 100 mm	#82.1473.001	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen, Reagiergefäße, etc.		Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturplatten 96 Well	#83.1835	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturplatten 24 Well	#83.18356	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Gewebekulturplatten 6 Well	#83.1839	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten 10 ml	#9380135	Eydam (Kiel, Deutschland)
Serologische Pipetten 25 ml	#4251	Costar (Bodenheim, Deutschland)
250 ml Kulturflaschen	#156499	Nunc (Wiesbaden, Deutschland)
50 ml Kulturflaschen	#83.1810.002	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Petrischale 35 mm	#430165	Corning (Corning, NY, USA)
Sterile Filtrationsvorsätze 0,20 µm	#90491	Eydam (Kiel, Deutschland)
Filtrationsvorsätze 0,20 µm	#9049934	Eydam (Kiel, Deutschland)
Sterile Tubes 50 ml	#62.547.254	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sterile Tubes 15 ml	#62.554.001	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Kryotubes	#72.694.005	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Miracloth	#475855	Calbiochem (Darmstadt, Deutschland)
Spritzenfilamente – Microfil 34A WG	#MF34G-5	World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA)
Borosilikatglas-Rohlinge	#1155150	Harvard Apparatus (Edenbridge, Kent, England)

### Anhang: Geräte

iCycler	BIO-RAD (München, Deutschland)
Elektrophoreseeinheit PowerPac 300	BIO-RAD (München, Deutschland)
Gel Doc 2000 <sup>TM</sup>	BIO-RAD (München, Deutschland)
UV-Transilluminator 2000	BIO-RAD (München, Deutschland)
Biofuge fresco	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)
Multifuge 3S-R	Heraeus (Langenselbold, Deutschland)
Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Spectrafuge mini	neolab (Heidelberg, Deutschland)

Inkubator (innova™ 4230)	New Brunswick (Nürtingen, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
ND-1000 Spectrophotometer NanoDrop®	peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
Vortex (REAX top)	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Inverses Mikroskop Axiovert 25 mit Phasenkontrast für Zellkultur	Zeiss (Jena, Deutschland)
CO <sub>2</sub> -Brutschrank für Zellkultur	Tritec (nicht mehr im Handel)
3-Wege-Magnetventil – Z110A	Sirai (Steinhöring, Deutschland)
Neubauer Zählkammer (improved)	Assistent (Sondheim, Deutschland)
Microplate Reader (Photometer) –GENios	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Photometer – U2001	Hitachi (Cambridge, UK)
Pipettierhilfe – Pipetus standars	Eydam (Kiel, Deutschland)
Cleanbench – HeraSafe	Heraeus (Langensfeld, Deutschland)
Bunsenbrenner mit Fußschalter – flammyS	Schütt (Göttingen, Deutschland)
Autoklave	Webecke & Co (Bad Schwartau, Deutschland)
Konfokales Mikroskop – LSM510	Zeiss (Jena, Deutschland)
Patch-clamp-Verstärker – 3900A Whole-cell-Expander – 3911A	Dagan (Minneapolis, MN, USA)
Schwing.gedämpft. Tisch – Vibraplane 9101	Kinetic Systems (Boston, MA, USA)
Hydraulischer Mikromanipulator – 188	Narishige (London, UK)
D/A-Karte – PCI-BASE 300	BMCM Mess-Systeme (Maisach, Deutschland)
A/D-Karte – Model 25	Dalanco Spry (Rochester, NY, USA)
Klimaanlage – Pingoino eco	DeLonghi (Seligenstadt, Deutschland)
Oszilloskop – PM3215	Philips (Hamburg, Deutschland)
DMZ-Universal-Pipettenpuller	Zeitz-Instruments (München, Deutschland)
Axopatch200B-Verstärker	Axon Instrument, Doster City, Kalifornien, USA)
Digidata 1322A-Interface	Axon Instrument, Doster City, Kalifornien, USA)
pClamp9-Software	Axon Instrument, Doster City, Kalifornien, USA)

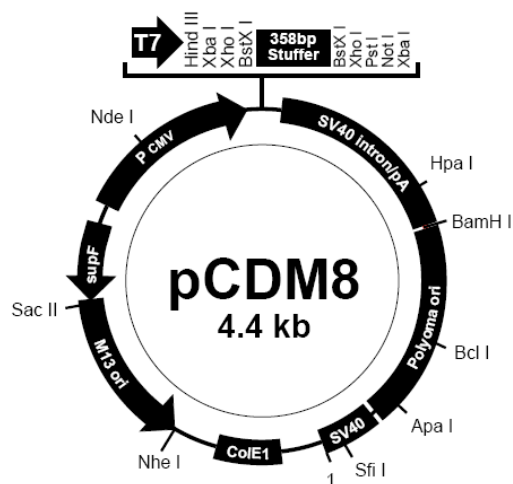
#### Anhang: Plasmide und Konstrukte

rNav1.2a in pCDM8	W. A. Catterall (University of Washington, Seattle, WA, USA)
pCDM8	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
mβ2 und mβ4	N. Nukina (RIKEN Brain Science Institute, Saitama, Japan)
mBACE1	D. I. Dominguez (University of Leuven, Belgien)
pEGFP-C1	Clontech (Mountain View, CA, USA) (# U55763)
pEGFP-F	Clontech (Mountain View, CA, USA) (# U55763)
5HT1A in pCDNA3.1	A. Karschin (Universität Würzburg)
pCDNA3.1	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
mBACE1 D289N	Mutante aus mBACE1 (hergestellt im Institut für Biochemie, CAU Kiel)

#### Anhang: Primer für β2 und β4

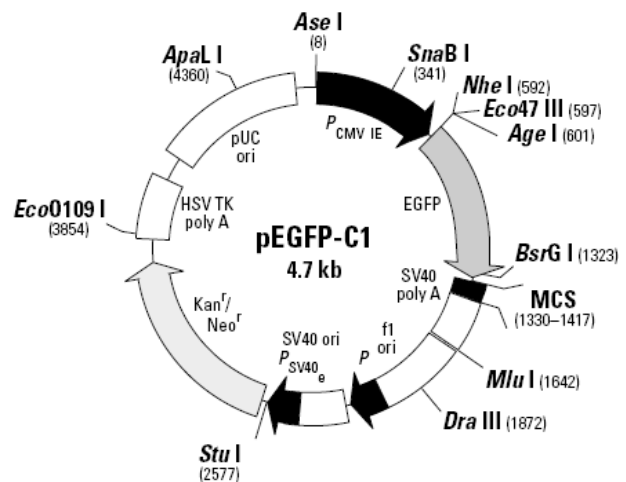
β2-Untereinheit	β4-Untereinheit
β2-forward: atgcacagggatgctctgg	Primer β4-forward: caccatgtcccgggctgggaa
β2-reverse: ttacttgggtccatctccgc	Primer β4-reverse: cacttttgggtggcttctc

## Anhang: Natriumkanal- und EGFP-Vektor



**pCDM8:**  
**pMB1 origin (pBR322):** bases 1-587  
**M13 origin:** bases 588-1182  
**SupF gene:** bases 1183-1384  
**Synthetic supF gene:** bases 1183-1384  
**CMV promoter:** bases 2171-2189  
**Polylinker and stuffer fragment:** bases 2198-2655  
**Splice and polyadenylation signals:** bases 2656-3352  
**Polyoma origin and enhancers:** bases 3353-4188  
**SV40 origin (enhancer less):** bases 4189-4352

**pEGFP-C1:**  
**Human cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter:** 1-589  
**Enhancer region:** 59-465  
**TATA box:** 554-560  
**Transcription start point:** 583  
**C->G mutation to remove Sac I site:** 569  
**Enhanced green fluorescent protein gene**  
**Kozak consensus translation initiation site:** 606-616  
**Start codon (ATG):** 613-615; **Stop codon:** 1408-1410  
**Insertion of Val at position 2:** 616-618  
**GFPmut1 chromophore mutations (Phe-64 to Leu; Ser-65 to Thr):** 805-810  
**His-231 to Leu mutation (A->T):** 1307  
**Last amino acid in wild-type GFP:** 1327-1329  
**MCS:** 1330-1417



**SV 40 early mRNA polyadenylation signal**  
**Polyadenylation signals:** 1550-1555 & 1579-1584  
**mRNA 3' ends:** 1588 & 1600  
**f1 single-strand DNA origin:** 1647-2102  
**(Packages the noncoding strand of EGFP.)**  
**Bacterial promoter for expression of Kanr gene -35 region:** 2164-2169; **-10 region:** 2187-2192  
**Transcription start point:** 2199  
**SV40 origin of replication:** 2443-2578  
**SV40 early promoter**  
**Enhancer (72-bp tandem repeats):** 2276-2347 & 2348-2419  
**21-bp repeats:** 2423-2443, 2444-2464 & 2466-2486  
**Early promoter element:** 2499-2505  
**Major transcription start points:** 2495, 2533, 2539 & 2544  
**Kanamycin/neomycin resistance gene**  
**Neomycin phosphotransferase coding sequences:**  
**Start codon (ATG):** 2627-2629; **stop codon:** 3419-3421  
**G->A mutation to remove Pst I site:** 2809  
**C->A (Arg to Ser) mutation to remove BssH II site:** 3155  
**Herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase (TK) polyadenylation signal**  
**Polyadenylation signals:** 3657-3662 & 3670-3675  
**pUC plasmid replication origin:** 4006-4649

Anhang: *Genesequenz von Nav1.2a*

**Basensequenz (6018 Basen) des rNav1.2a von 5' nach 3'**

CTGCTATCGAACAGCGCATTGCAGAAGAGAAAGCTAAGAGACCCAAACAGGAACGCAAGGACG  
AAGACGATGAAAATGGCCCAAAGCCAAATAGTGAAGCAGGAAAATCCCTTCCTTTTATT  
TATGGAGACATTCCTCCAGAGATGGTGTGACAACCACTGGAGGACCTGGACCCCTACTATATCA  
ATAAGAAAACCTTTATAGTATTGAATAAGGGGAAAGCAATCTCGCGGTTTCAGCGCCACCTCTGC  
CCTGTACATTTTAACTCCCTTCAACCCCATAGAAAATTAGCTATTAAGATTTTGGTACATTCTTT  
ATTCAATGTGCTTATCATGTGCACAATTCTTACCAACTGTGTGTTTATGACCATGAGTAACCCTC  
CAGACTGGACAAAGAATGTGGAGTATACTTTTACAGGAATTTATACTTTTGAATCACTTATTA  
TCCTTGAAGGGGCTTTTATGGCACGGTCAGTGTGTTACCTCCAGGACCTGACAGCTTCCGC  
TTCTTTACCAGGGAATCCCTTGGTCTAGAAGATTTACATTTCTACGGGATCCCTGGAATTGGT  
GGATTTACAGTCATTACTTTTGCATATGTGACAGAGTTTGTGGACCTGGGCAATGTCTCAGCG  
CTGAGAACGTTTCAGAGTTCTCCGAGCATTGAAAACAATATCAGTCATTCCAGGCCTGAAGACCA  
TCGTGGGGGGCCCTGATCCAGTCAGTGAAGAAGCTCTCTGACGTCATGATCCTCACCGTGTCT  
GTCTCAGTGTCTTTGCTCTAATCGGGCTGCAGCTCTTCATGGGCAACCTGAGGAATAAATGCTT  
GCAGTGGCCCCCAGACAATTCTACCTTTGAAATAAATATCACTTCCCTTCTTTAATAACTCATTGGA  
TTGGAATGGTACTGCCTTCAATAGGACGGTGAACATGTTTAACTGGGACGAATATATTGAAGATA  
AAAGTCACTTTTATTTTTTGAAGGACAAAACGATGCTCTGCTTTGTGGGAACAGCTCGGATGCT  
GGACAGTGTCCAGAAGGATACATCTGTGTGAAGGCTGGGAGAAACCCCACTACGGCTACACA  
AGTTTTGACACCTTCAGCTGGGCCTTCTTGTCTTATTTCTGCTCATGACTCAAGACTTCTGGGA  
AAACCTTTATCAGCTGACCTTGCCTGCTGCCGGGAAAACATACATGATATTTTTTGTGCTGGTCA  
TTTTCTTGGGCTCATTCTACCTGATAAATTTGATCCTGGCTGTGGTGGCCATGGCCTACGAGGA  
ACAGAACCAGGCCACACTGGAGGAGGCTGAACAGAAGGAGGCAGAGTTTCAGCAGATGCTGG  
AGCAACTGAAGAAGCAGCAGGAGGAAGCTCAGGCAGCAGCTGCAGCAGCGTCCGCAGAATCC  
AGAGACTTCAGCGGGGCAGGCGGGATAGGTGTTTTCTCGGAGAGTTTCGTGAGTACCTCAAAG  
TTAAGTTCCAAAAGTGAAAAGGAGTTGAAAACAGAAGAAAGAAAAGAAACAGAAAGAACAGG  
CTGGGGAGGAAGAGAAGGAAGACGCGGTGCGGAAATCTGCCTCTGAGGACAGCATAACGAAAG  
AAAGGCTTCCGGTTTTCCCTGGAAGGAAGTAGATTGACCTACGAGAAGAGATTTTCTCTCCGC  
ACCAGTCTCTTTGAGCATCCGAGGCTCCCTATTTTCTCCAAGACGCAACAGTAGAGCAAGCCT  
TTTCAGCTTCAAAGGTGAGTGAAGGATATTGGTTCCGAAAATGACTTTGCAGACGATGAACAC  
AGCACATTTGAGGACAACGACAGCAGAAGAGACTCTCTATTTGTACCACACAGACATGGAGAAA  
GGCGTCTAGCAATGTCAGCCAGGCCAGCCGTGCCTCCCGGGGGATACCCACTCTACCCATGA  
ATGGGAAGATGCACAGTGCAGTGGACTGCAACGGTGTGGTGTCCCTGGTTGGAGGCCCTCTG  
CGCTCACATCGCCTGTGGGGCAGCTGCTGCCGGAGGGCACAACACTACTGAGACAGAAATAAGGA  
AGAGGAGATCCAGTTCTTACCACGTCTCTATGGACTTGTGGAAAGACCCTTCAAGGCAAAGGGC  
AATGAGTATGGCCAGTATTTTACGAACACTATGGAAGAAGTGAAGAATCCAGACAGAAATGC  
CCACCCTGCTGGTATAAATTTGCTAATATGTGCCTGATTTGGGACTGTTGTAAGCCATGGCTAAA  
GGTAAAACACGTTGTCAATCTGGTAGTGATGGATCCATTTGTTGACCTGGCCATCACCATCTGC  
ATTGTGTTAAATACGCTCTTCATGGCCATGGAGCACTACCCCATGACTGAGCAGTTCAGCAGTG  
TGCTGTCTGTTGGGAATTTGGTCTTCACTGGGATCTTACGGCAGAAATGTTTCTCAAGATAATA  
GCCATGGATCCATATTACTTCCAAGAAGGCTGGAATATCTTTGATGGCTTTATAGTGAGCCT  
TAGTTTAAATGGAAGTTCGGCTTGGCGAATGTGGAAGGATTGTCAGTTCTCCGATCATTCCGGCTG  
CTTAGAGTCTTCAAGTTGGCAAAGTCTTGGCCCACTGAACATGCTCATTAAAGATCATCGGCA  
ACTCGGTGGGTGCACTGGGCAACCTGACCCTGGTGTGGCCATCATCGTCTTCATTTTTGCTGT  
GGTCCGCATGCAGCTGTTTGGAAAGAGCTACAAGGAGTGTGTCTGTAAGATTTCCAATGATTGT  
GAGTCCCAGCTGGCAGATGCACACTTCTTCCACTCCTTCCCTGATCGTGTTTTCGAGTGTGT  
GTGGGGAGTGGATAGAGACCATGTGGGACTGCATGGAGGTCGCGGGCCAGACCATGTGCCTT  
ACTGTCTTCATGATGGTCATGGTATTGGGAACCTTGTGTCTGAACCTCTTCTTGGCCTTGTCT  
CCTCAGTTCTTTCAGCTCAGACAACCTGGCTGCCACAGATGACGATAACGAAATGAACAACCTC  
CAGATAGCCGTGGGAAGGATGCAGAAGGGAATTGATTTTGTAAAAGGAAGATACGTGAATTC  
TTCAGAAAGCCTTTGTCAGAAAGCAGAAAGCTTTAGATGAAATCAAACCGCTGGAAGATCTGAAT  
AACAAAGAAAGACAGTTGTATCTCCAACCACACGACCATAGAAATAGACAAGGACCTCAATTACCT  
CAAAGATGGAACGGGACGACCAGTGGCATAGGCAGCAGTGTGGAGAAGTATGTGGTAGATGA  
GAGTGATTACATGTCGTTTATAAACAACCCAGCCTCACCGTGACTGTGCCCATCGCCCTTGA  
GAGTCTGACTTTGAAAACCTTAAACACGGAAGAATTGAGTAGTGAGTCAGATATGGAAGAAAGCA  
AGGAGAAATTGAATGCAACTAGCTCATCTGAGGGCAGTACGGTTGATATAGGCGCTCCGGCAG  
AGGGAGAGCAGCCAGAGGCCGAACCGGAAGAATCGCTTGAACCAGAAGCGTGTTCACAGAA  
GACTGTGTGAGAAAGTTCAAGTGTGTGTCAGATAAGCATAGAAGAGGGCAAAGGCAAGCTCTGGT  
GGAAGTTGAGGAAAACGTGCTACAAGATAGTAGAGCATAACTGGTTTGAACCTTCATCGTCTTT

ATGATTCTGCTCAGCAGTGGTGGCTCTGGCCTTTGAAGACATTTATATTGAGCAGCGAAAGACCA  
 TCAAGACCATGCTGGAGTATGCTGACAAGGTTTTCACTTATATCTTCATCCTGGAGATGCTTCTA  
 AAGTGGGTGGCCTATGGTTTCAAATGTATTTACCAATGCCTGGTGGCTGGACTTCCCTGA  
 TCGTTGATGTCTCCTTGGTTAGCTTAAGTGAATGCCTTGGGCTATTCGGAACCTTGGTGCCATC  
 AAGTCCCTCCGAACGTTAAGAGCTCTGAGACCTCTACGAGCCTTATCCCGATTTGAAGGAATGA  
 GGGTTGTTGTAACGCTCTCTTAGGCGCCATCCCCTCCATAATGAACGTAAGTCTGGTCTGCCT  
 GATCTTTTGGCTAATATTCAGTATCATGGGGTTGAATCTCTTTGCTGGCAAGTCTACCATTGCA  
 TCAACTACACCACGGGGGAAATGTTTGTATGTGAGCGTGGTCAACAACCTACAGTGAATGCCAAGC  
 TCTCATTGAGAGCAATCAGACGGCCAGGTGAAGAACGTGAAGGTCAACTTCGATAACGTGGG  
 ACTCGGATACCTTTCTCTGCTCCAAGTAGCCACCTTTAAGGATGGATGGATATCATGTATGCAG  
 CTGTTGACTCAAGAAATGTAGAAGTGCAGCCCAATACGAAGACAATCTACATGTACCTTTAC  
 TTTGTCTCTTTCATCTTTCGGCTCATTCTTACCCTGAACTGTTTCATTGGTGTGCATCATAGAC  
 AACTTCAACCAGCAGAAGAAGAAGTTTGGAGGTCAAGACATCTTTATGACAGAAGAACAGAAGA  
 AATACTACAATGCAATGAAGAAGCTCGGCTCCAAGAAACCGCAGAAGCCATTCCCTCGGCCTGC  
 AAACAAATTTCAAGGGATGGTCTTTGATTTTGTAAACAAACAAGTCTTTGACATCAGCATCATGAT  
 CCTCATCTGCCTCAACATGGTGACCATGATGGTGGAAACAGACGACCAGAGTCAGGAGATGAC  
 CAACATTCTGTACTGGATCAACCTGGTGTTCATTGTCTGTTACGGGGCAGTGTGTGCTGAAG  
 CTCATCTCCCTCCGCCATTATTATTTACCATCGGCTGGAATATTTTTGATTTTGTGGTAGTCATC  
 CTCTCCATTGTAGGAATGTTTCTCGCGGAGCTGATAGAGAAGTATTTTCGTGTCCCCTACCCTGTT  
 CCGAGTCATCCGCCTGGCCAGGATTGGACGAATCCTACGCCTGATCAAAGGCGCCAAGGGGAT  
 CCGCACTCTGCTCTTTGCTCTGATGATGTCCCTTCTGCGCTGTTCAACATCGGCCTCCTGCTT  
 TTCCTGGTCATGTTTCATCTACGCCATCTTTGGGATGTCCAACCTTTGCCTACGTTAAGAGGGAAAGT  
 TGGAATTGATGACATGTTCAACTTTGAGACTTTTGGCAACAGCATGATCTGCCTGTTCCAAATCA  
 CCACCTCTGCGGGCTGGGACGGACTGCTGGCCCCTATACTAAATAGCGGACCTCCCGACTGTG  
 ACCCTGAAAAAGATCACCTGGAAGCTCGGTGAAGGGGGACTGTGGGAACCCATCCGTGGGG  
 ATTTTCTTTTTTGTGAGCTACATCATATCCTTCCCTGGTGGTGGTGAACATGTACATCGCTGTC  
 ATCCTGGAGAACTTCAGCGTCGCCACCGAAGAAAGTGCAGAGCCCCTGAGTGAGGACGACTTT  
 GAGATGTTCTACGAGGTCTGGGAGAAGTTCGACCCTGACGCCACTCAGTTCATAGAGTTCTGCA  
 AGCTTTCTGACTTTGCAGCTGCCCTGGATCCTCCCCTCCTCATCGCAAAGCCAAACAAGTCCA  
 GCTCATTGCCATGGACCTGCCATGGTGAAGTGGAGACCGCATCCACTGCCTGGACATCTTGTTT  
 GCTTTTACAAAGCGGGTCTGGGCGAGAGTGGAGAGATGGACGCTCTTCGAATCCAGATGGAA  
 GAAAGGTTTCATGGCTTCCAACCCCTCCAAGGTCTCTTATGAGCCCATTACCACCACCCTGAAAC  
 GGAAACAAGAGGAGGTGTCTGCTATTGTATCCAGCGAGCATAACAGGCGGTATCTCCTGAAGC  
 AGAAAGTTAAGAAAGTTTCGTCTATCTATAAAAAAGACAAGGTAAGAAGACGAGGGGAACGCC  
 CATCAAAGAAGACATCATCACAGATAAACTGAACGAGAATTCAACTCCAGAGAAGACTGATGTG  
 ACACCTTCCACAACCTTCCACCTTCTACGATAGCGTACGAAACCGGAGAAGGAAAAATTTG  
 AAAAGGACAAATCAGAAAAAGAGGACAAAGGGAAAGATATCAGGGAAAGTAAAAAGTAA

*Anhang: Gensequenz von  $\beta 2$  und  $\beta 4$*

**$\beta 2$ :**

1 aaagcttct caatgttga tatgtcttg aagtacatcc gtgcatttc tttttagca  
 61 ttttaaccatt cctacctgt ggtccttgg cctcaatca cctttccca cagcccacc  
 121 gcctaacgtc acagtctcg aaaatgcaca gggatgctg gctacctgc cctgcctca  
 181 gtctcacggg gctcagctg ttttctct tgggtcccc ggggaggagc atggaagtca  
 241 cagcggccac cactctagt gtcctcaat ggtccgatac ccgctgccc tgtacctca  
 301 actcctgcta caccgtgaac cacaagcagt tctctctaa ctggactac caggagtga  
 361 acaattgcac agaggagatg ttctccagt tccgaatgaa gatcattaac ctgaagctg  
 421 agcggtttg agaccgctg gattctcag ggaacccag taagtacgac gtgtcagtga  
 481 ctctaaagaa cgtgcagta gaagacgaag gcattacaa ctgctacatt accaacctc  
 541 cagaccgcca ccgcgccac ggcaagatt acctgcaggt cctctagaa gtaccccg  
 601 agcgggactc cacgtggcg gtcacgtgg gtgcctcag ggggggttc ctggctgtg  
 661 tcatcttgg gctgatggg gcaaatgtg tgaggaggaa aaaagagcag aagctgagca  
 721 cgatgacct gaagactgaa gaggaaggca agatggatg tgagggcaac gcggaagat  
 781 gcaccaagta accggaagcc tgccctgaag cccctcccc tgccctatct cctctcact  
 841 tctgacctg acagtgtgac cccgctgct ctctcttgg gtgcttct tgaataggac  
 901 cccagaatc acctggggc tacttccca tgccccacc cctatacaa gggatgctc  
 961 cctcccttc atctgaaaac tgccctgga tctgagattc gggagtcca gggagaacag  
 1021 agaagggctg tagcctgca gctttgagg aagaaagact tgtgtgtcc caaagacag

1081 atgggggagg gagggcagtg ggagaagagg tctgctgacc atctgtcta aggcttggc  
 1141 tggggcgat taaactgtg ggagtagcag tgtgtgtgtt ggcgggggtc tgtgctgacc  
 1201 agaggcacca tgggaatgac ttgtgaagat ggctagggaa cagccatcag ctggagatga  
 1261 aggtggggc ctaccatttg tgaagcact atttaaaggg atgactgtgc attccaggg  
 1321 tactcaagg

**β4:**

1 atgtcccggg ctgggaaccg aggcaatact caggcgagat ggctgggcac tgggctttg  
 61 ggtctctcc tgcttccat gtacctgtc ttggaggtat ctgtgggaaa ggccaccacc  
 121 atctacgcta ttaacggctc atcgatcctg ctgccctgca cttctccag ctgttatggc  
 181 ttgagaacc tctacttcaa gtgtcctac aataacagcg aaacatccag gattctcatc  
 241 gacgggatcg tgaagaacga taagtctgac ctaagggtga gagtgaagga tgatgatcga  
 301 atcaccttag agggctccac caaggagaag acgaataaca tctccatcct ctgagtgac  
 361 ctggagtca gtgacacggg cagatacacc tgcttctgta ggaaccccaa ggagaaggac  
 421 ttgaacaact ctgccacat cttctccaa gtgggtgata aattggaaaa agtggacaac  
 481 acggtgact tcatcatcct ggctgtgtg ggcgggggtca ttggacttct tgtttgcatc  
 541 cttctgtga agaagctcat caccttcatc ctgaagaaga cccgagagaa gaagaaggag  
 601 tgtctctgta gttcctctgg gaatgacaac acagagaacg ggttgctctg ctccaaggca  
 661 gaagagaagc caccacaaaa agtgtga

**Anhang: Gensequenz von pCDMA8**

1 GCGTAATCT GCTGCTTGCA AACAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT  
 51 TTGTTTGCCG GATCAAGAGC TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAAGTGGCT  
 101 TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA  
 151 GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC TCGCTCTGCT  
 201 AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG  
 251 GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA  
 301 ACGGGGGGTT CGTGCACAGA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA  
 351 ACTGAGATAC CTACAGCGTG AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG  
 401 GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG GCAGGGTCGG AACAGGAGAG  
 451 CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGCTATCTTT ATGATCCTGT  
 501 CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTTGTGA TGCTCGTCAG  
 551 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCAAGCTA GCTTCTAGCT  
 601 AGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTTAAA ATTCGCGTTA AATTTTTGTT  
 651 AAATCAGCTC ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT  
 701 AAATCAAAG AATAGCCCGA GATAGGGTTG AGTGTTGTTT CAGTTTGAA  
 751 CAAGAGTCCA TATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAA GGGCGAAAAA  
 801 CCGTCTATCA GGGCGATGGC CGCCCACTAC GTGAACCATC ACCCAAATCA  
 851 AGTTTTTTGG GGTGAGGTG CCGTAAAGCA CTAATCGGA ACCCTAAAGG  
 901 GAGCCCCCGA TTTAGAGCTT GACGGGGAAA GCCGGCGAAC GTGGCGAGAA  
 951 AGGAAGGGAA GAAAGCGAAA GGAGCGGGCG CTAGGGCGCT GGCAAGTGTA  
 1001 GCGGTCACGC TGC GCGTAAC CACCACACC GCCGCGCTTA ATGCGCCGCT  
 1051 ACAGGGCGCG TACTATGGTT GCTTTGACGA GACCGTATAA CGTGCTTTCC  
 1101 TCGTTGGAAT CAGAGCGGGA GCTAAACAGG AGGCCGATTA AAGGGATTTT  
 1151 AGACAGGAAC GGTACGCCAG CTGGATTACC GCGGTCTTTC TCAACGTAAC  
 1201 ACTTTACAGC GGCGCGTCAT TTGATATGAT GCGCCCCGCT TCCCGATAAG  
 1251 GGAGCAGGCC AGTAAAAGCA TTACCCGTGG TGGGGTTCC GAGCGGCCAA  
 1301 AGGGAGCAGA CTCTAAATCT GCCGTCATCG ACTTCGAAGG TTCGAATCCT  
 1351 TCCCCACCA CCATCACTTT CAAAAGTCCG AAAGAATCTG CTCCCTGCTT  
 1401 GTGTGTTGGA GGTCGCTGAG TAGTGCGCGA GTAAAATTA AGCTACAACA  
 1451 AGGCAAGGCT TGACCGACAA TTGCATGAAG AATCTGCTTA GGGTTAGGCG  
 1501 TTTTGCCTG CTTGCGGATG TACGGGCCAG ATATACGCGT TGACATTGAT  
 1551 TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT AGTTCATAGC  
 1601 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAATG GCCCGCCTGG  
 1651 CTGACCGCCC AACGACCCC GCCCATTGAC GTCATAATG ACGTATGTTT  
 1701 CCATAGTAAC GCCAATAGGG ACTTTCCATT GACGTCAATG GGTGGACTAT  
 1751 TTACGGTAAA CTGCCCACTT GGCAGTACAT CAAGTGTATC ATATGCCAAG  
 1801 TACGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCCGCT TGGCATTATG

1851 CCCAGTACAT GACCTTATGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA  
 1901 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACATCAATGG  
 1951 GCGTGGATAG CGGTTTACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTTG  
 2001 ACGTCAATGG GAGTTTGTG TGGCACAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA  
 2051 TGTCGTAACA ACTCCGCCCC ATTGACGCAA ATGGGCGGTA GGCGTGTACG  
 2101 GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCTCTG GCTAACTAGA GAACCCACTG  
 2151 CTTACTGGCT TATCGAAATT AATACGACTC ACTATAGGGA GACCCAAGCT  
 2201 TCTAGAGATC CCTCGACCTC GAGATCCATT GTGCTGGCGC GGATTCTTTA  
 2251 TCACTGATAA GTTGGTGGAC ATATTATGTT TATCAGTGAT AAAGTGTCAA  
 2301 GCATGACAAA GTTGCAGCCG AATACAGTGA TCCGTGCCGG CCCTGGACTG  
 2351 TTGAACGAGG TCGGCGTAGA CGGTCTGACG ACACGCAAAC TGGCGGAACG  
 2401 GTTGGGGGTG CAGCAGCCGG CGCTTTACTG GCACTTCAGG AACAAGCGGG  
 2451 CGCTGCTCGA CGCACTGGCC GAAGCCATGC TGGCGGAGAA CATACGCTT  
 2501 CCGTGCCGAG AGCCGACGAC GACTGGCGCT CATTCTGAT CGGGAATCCC  
 2551 GCAGCTTCAG GCAGGCGCTG CTCGCCTACC GCCAGCACAA TGGATCTCGA  
 2601 GGGATCTTCC ATACCTACCA GTTCTGCGCC TGCAGGTCGC GGCCGCGACT  
 2651 CTAGAGGATC TTTGTGAAGG AACCTTACTT CTGTGGTGTG ACATAATTGG  
 2701 ACAAACCTACC TACAGAGATT TAAAGCTCTA AGGTAAATAT AAAATTTTTA  
 2751 AGTGTATAAT GTGTAAACT ACTGATTCTA ATTGTTGTGG TATTTTAGAT  
 2801 TCCAACCTAT GGAACCTATG AATGGGAGCA GTGGTGGAAAT GCCTTTAATG  
 2851 AGGAAAACCT GTTTTGCTCA GAAGAAATGC CATCTAGTGA TGATGAGGCT  
 2901 ACTGCTGACT CTCAACATTC TACTCCTCCA AAAAAGAAGA GAAAGGTAGA  
 2951 AGACCCCAAG GACTTTCCTT CAGAATTGGT AAGTTTTTTG AGTCATGCTG  
 3001 TGTTTAGTAA TAGAACTCTT GCTTGCTTTG CTATTTACAC CACAAAGGAA  
 3051 AAAGCTGCAC TGCTATACAA GAAAATTATG GAAAAATATT TGATGTATAG  
 3101 TGCCTTACT AGAGATCATA ATCAGCCATA CCACATTTGT AGAGGTTTTA  
 3151 CTTGCTTTAA AAAACCTCCC ACACCTCCCC CTGAACCTGA AACATAAAAT  
 3201 GAATGCAATT GTTGTGTTA ACTTGTAT TGCAGCTTAT AATGGTTACA  
 3251 AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTCACAA ATAAAGCATT TTTATCACTG  
 3301 CATTCTAGTT GTGGTTTGT CAAACTCATC AATGTATCTT ATCATGTCTG  
 3351 GATCCCGCCA TGGTATCAAC GCCATATTTT TATTTACAGT AGGGACCTCT  
 3401 TCGTTGTGTA GGTACCGCTG TATTCCTAGG GAAATAGTAG AGGCACCTTG  
 3451 AACTGTCTGC ATCAGCCATA TAGCCCCCGC TGTTCGACTT ACAAACACAG  
 3501 GCACAGTACT GACAAACCCA TACACCTCCT CTGAAATACC CATAGTTGCT  
 3551 AGGCCTGTCT CCGAACTCAT TACACCCTAC CAAGTGAGAG CTGTAATTTT  
 3601 GCGATCAAGG GCAGCGAGGG CTTCTCCAGA TAAAATAGCT TCTGCCGAGA  
 3651 GTCCCGTAAG GGTAGACACT TCAGCTAATC CCTCGATGAG GTCTACTAGA  
 3701 ATAGTCAGTG CGGCTCCCAT TTTGAAAATT CACTTACTTG ATCAGCTTCA  
 3751 GAAGATGGGC GAGGGCCTCC AACACAGTAA TTTTCTCCC GACTCTTAAA  
 3801 ATAGAAAATG TCAAGTCAGT TAAGGAGGAA GTGGACTAAC TGACGCAGCT  
 3851 GGCCGTGCGA CATCCTCTTT TAATTAGTTG CTAGGCAACG CCCTCCAGAG  
 3901 GGCGTGTGGT TTTGCAAGAG GAAGCAAAAG CCTCTCCACC CAGGCCTAGA  
 3951 ATGTTTCCAC CCAATCATT CTATGACAAC AGCTGTTTTT TTTAGTATTA  
 4001 AGCAGAGGCC GGGGACCCCT GGGCCCGCTT ACTCTGGAGA AAAAGAAGAG  
 4051 AGGCATTGTA GAGGCTTCCA GAGGCAACTT GTCAAACAG GACTGCTTCT  
 4101 ATTTCTGTCA CACTGTCTGG CCCTGTCACA AGGTCCAGCA CCTCCATACC  
 4151 CCCTTTAATA AGCAGTTTGG GAACGGGTGC GGGTCTTACT CCGCCCATCC  
 4201 CGCCCTAAC TCCGCCAGT TCCGCCATT CTCCGCCCA TGGCTGACTA  
 4251 ATTTTTTTA TTTATGCAGA GGCCGAGGCC GCCTCGGCCT CTGAGCTATT  
 4301 CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTTGGAGG CCTAGGCTTT TGCAAAAAGC  
 4351 TAATTC

*Anhang: Gensequenz von pCDM3.1*

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGC  
 ATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAA  
 TTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGT  
 TTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTA  
 TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGCTTACATAACTTACG

GTAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG  
TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACT  
GCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGG  
TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACA  
TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGA  
TAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTG  
GCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCG  
GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGC  
TACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTTAACTT  
AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTCTGCAGATATCCAGCACA  
GTGGCGCGCTCGAAGCTTCGACGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAA  
ATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAAGCATTTCCAG  
TCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTA  
AAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCAT  
CCGGAATTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTA  
CACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCC  
GGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCT  
AAAGGGTTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGAT  
TTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAAATATTATACGCAA  
GGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTGAGTTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCATG  
TCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTT  
TAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGTGCTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATG  
AATGGCAGAAATTCGTGAAGCTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTG  
CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGC  
CACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTC  
TATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA  
TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGG  
GTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGT  
GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCA  
CGTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAATCGGGGGCTCCCTTLAGGGTTCCGATTTAGTGCT  
TTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGTTTACAGTGTGGGCCATCGCCCT  
GATAGACGGTTTTTCGCCCTTTCGCTTTCGCTTTCGCTTTCCTTCTTCTCGCCA  
CTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTTGGCGATTTCCG  
CCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGT  
CAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGTCATCTCA  
ATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCAT  
GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGC  
CCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTATGCAGAGGCCGAGGCC  
GCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA  
AAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTC  
GCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGG  
CTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGTGTTCGGGCTGTCAGCGCAG  
GGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGG  
CAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCA  
CTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTATCTC  
ACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTAT  
CCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATCGGATGG  
AAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAT  
GTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGC  
CTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGG  
GTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGG  
CGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCC  
TTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCG  
ACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCG  
GAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTT  
CGCCACCCCAACTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT  
CACAAATAAAGCAATTTTTCTACTGCATTTAGTTGTGGTTTTGTTCCAAACTCATGATGATCTTAT  
CATGTCTGATATACCGTGCACCTCTAGCTAGAGCTTGGGTAATCATGAGTCATGATGTTTTCTGT  
GTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCT  
GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCG



GGAAACCTGTGCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGT  
 ATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGCGAG  
 CCGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA  
 GAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTT  
 TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA  
 ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT  
 CCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC  
 ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA  
 CGAACCCCGGTTTACGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCG  
 GTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG  
 TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTT  
 GGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAA  
 ACAAACCACCGCTGGTAGCGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGAT  
 CTC AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAA ACTCACGTTAA  
 GGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTT  
 TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGG  
 CACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAA  
 CTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTC  
 ACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTT  
 GCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCC  
 AGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTG  
 GTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGC  
 AAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATC  
 ACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGT  
 GACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCC  
 CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAA  
 CGTTCTTCGGGGCGAAA ACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCAC  
 TCGTGCACCCA ACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAG  
 GAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGG AATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC  
 CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTA  
 TTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

*Anhang: Gensequenz von BACE1 zur Herstellung der inaktiven Mutante D289N*

forward Primer in Vektor: AGTCGAGGCTGATCAGCGAG

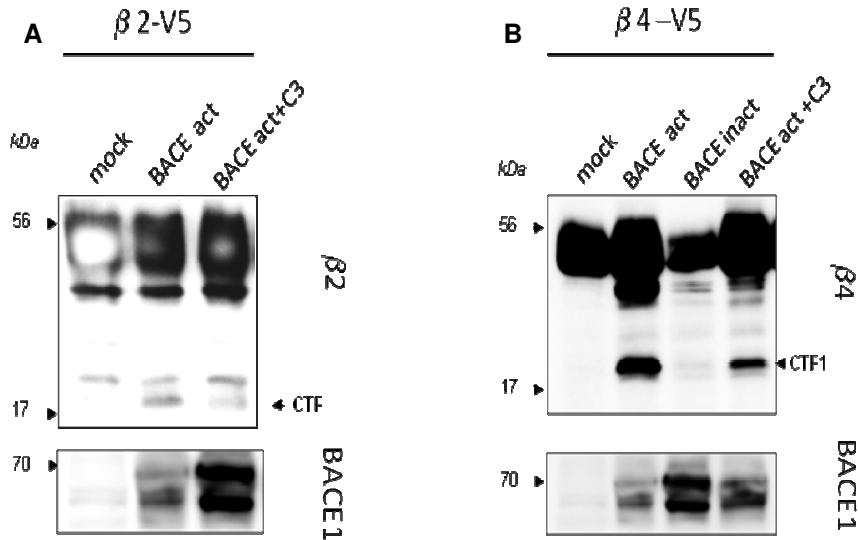
ATGGCCCCAGCGCTGCACTGGCTCCTGCTATGGGTGGGCTCGGGAATGCTGCCTGCCAGGGA  
 ACCCATCTCGGCATCCGGCTGCCCTTCGCAGCGGCCTGGCAGGGCCACCCCTGGGCCTGAGG  
 CTGCCCGGGAGACCGACGAGGAATCGGAGGAGCCTGGCCGGAGAGGCAGCTTTGTGGAGAT  
 GGTGGACAACCTGAGGGGAAAGTCCGGCCAGGGCTACTATGTGGAGATGACCGTAGGCAGCCC  
 CCCACAGACGCTCAACATCCTGGTGGACACGGGCAGTAGTA ACTTTGCAGTGGGGGCTGCCCA  
 CACCCTTTCCTGCATCGCTACTACCAGAGGCAGCTGTCCAGCACATATCGAGACCTCCGAAAGG  
 GTGTGTATGTGCCCTACCCCAGGGCAAGTGGGAGGGGGAACTGGGCACCGACCTGGTGAGCA  
 TCCCTCATGGCCCCAACGTC ACTGTGCGTGCCAACATTGCTGCCATCACTGAATCGGACAAGTTC  
 TTCATCAATGGTTCCA ACTGGGAGGGCATCTAGGGCTGGCCTATGCTGAGATTGCCAGGCCCG  
 ACGACTCTTTGGAGCCCTTCTTTGACTCCCTGGTGAAGCAGACCCACATTCCAACATCTTTTCC  
 CTGCAGCTCTGTGGCGCTGGCTTCCCCCTCAACCAGACCGAGGCACTGGCCTCGGTGGGAGGG  
 AGCATGATCATTGGTGGTATCGACCACTCGCTATACACGGGCAGACTCTGGTACACACCCATCCG  
 GCGGGAGTGGTATTATGAAGTGATCATTGTACGTGTGGAATCAATGGTCAAGATCTCAAGATGG  
 ACTGCAAGGAGTACAAC **TACGACAAGAGCATTGTGACAGTGGGACCACCAAC**CTTCGCTTGCC  
 CAAGAAAGTATTTGAAGCTGCCGTCAAGTCCATCAAGGCAGCCTCCTCGACGGAGAAGTTCCCG  
 GATGGCTTTTGGCTAGGGGAGCAGCTGGTGTGCTGGCAAGCAGGCACGACCCCTTGGAACTTT  
 TCCCAGTCATTTCACTTTACCTCATGGGTGAAGTCACCAATCAGTCCTTCCGCATCACCATCCTTC  
 CTCAGCAATACCTACGGCCGGTGGAGGACGTGGCCACGTCCCAAGACGACTGTTACAAGTTCG  
 TGTCTCACAGTCATCCACGGGCACTGTTATGGGAGCCGTCATCATGGAAGTTTCTATGTCGTCT  
 TCGATCGAGCCCGAAAGCGAATTGGCTTTGCTGTGACGCTTGGCATGTGCACGATGAGTTCAG  
 GACGGCGGCAGTGAAGGTCCGTTTGTACGGCAGACATGGAAGACTGTGGCTACAACATTCCC  
 CAGACAGATGAGTCAACACTTATGACCATAGCCTATGTGATGGCGGCCATCTGCGCCCTTTCAT  
 GTTGCCACTCTGCCTCATGGTATGTGAGTGGCGCTGCCTGCGTTGCCTGCGCCACCAGCAGCAT

GACTTTGCTGATGACATCTCCCTGCTCAAG **STOPweg** **GAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTT**  
**GTAG**

Revers Primer in Vektor: AGTCGAGGCTGATCAGCGAG

Primer mit Codon-Mutation GAC -> AAC = Asp -> Asn (D 289 -> N); Nukleotid G 865 -> A

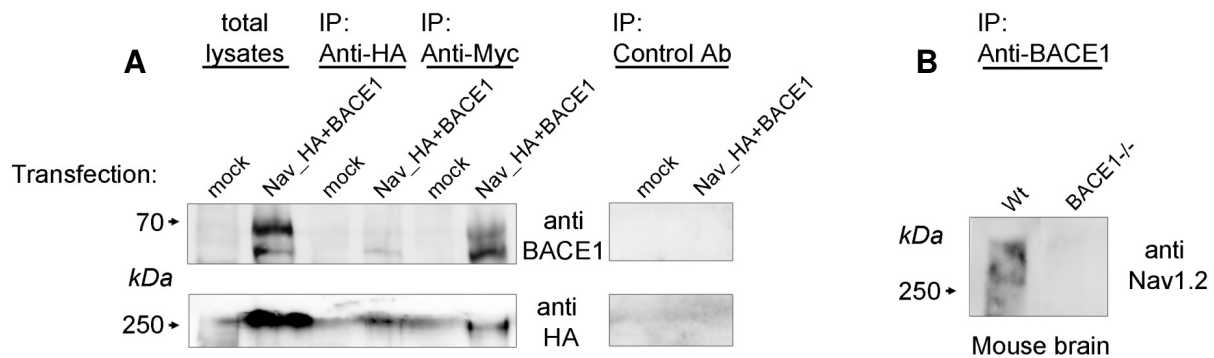
### Anhang: Western-Blot-Experimente und Ko-Immunopräzipitation



#### Abb. A

(A) HEK293-Zellen wurden mit V5-markierter  $\beta 2$ -Untereinheit und Wildtyp-BACE1 kotransfiziert. Die Färbung erfolgte mithilfe von Antikörpern gegen die C-terminale V5-Markierung. Nach Überexpression von BACE1 ließen sich die 18 kDa großen C-terminalen Fragmente darstellen. (B) Die Kotransfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit der  $\beta 4$ -Untereinheit oder zusammen mit Wildtyp-BACE1 oder der katalytisch inaktiven BACE1-Mutante 289A. Für die Darstellung im Blot wurden wiederum Antikörper gegen die V5-Markierung eingesetzt. Die Entstehung von CTF wurde durch Zugabe von C3 reduziert.

Beide Immunoblots wurden rückgetestet mittels anti-BACE1-Antikörper (untere Felder).



#### Abb. B

Immuno-Kopräzipitation von BACE1 und  $\text{Nav}_{1.2}$  in HEK293-Zellen (A) und in Maus-Gehirn (B).

(A) Die Zellen wurden mit HA-markiertem  $\text{Nav}_{1.2}$  und myc-markiertem Wildtyp-BACE1 bzw. in der Kontrolle mock transient transfiziert. Die Lysate der HEK293-Zellen wurden mit anti-HA- oder anti-myc-Antikörpern immunopräzipitiert und auf SDS-PAGE-Membran aufgetragen. Die Färbung erfolgte entsprechend mittels anti-BACE1- oder anti-HA-Antikörpern. Die Spezifität der Präzipitation wurde durch eine unspezifische Kontrolle bestätigt, die weder zu einem BACE1- noch zu einem  $\text{Nav}_{1.2}$ -Nachweis führte.

(B) Jeweils gleiche Mengen an Wildtyp- oder BACE1-defizienten Maus-Ganzhirn-Lysaten (5.Tag postnatal) wurden mit anti-BACE1-Antikörpern immunopräzipitiert und auf SDS-PAGE-Membran aufgetragen. Der Immunoblot wurde mit anti-  $\text{Nav}_{1.2}$ -Antikörpern gefärbt.

## Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
Ω	Ohm	<b>EGFP</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<b>Aβ-Peptid</b>	Amyloid-β-Peptid	<b>EGTA</b>	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
<b>Aβ<sub>40/42</sub></b>	Amyloidpeptid aus 40 bzw. 42 Aminosäuren	<b>FACS</b>	<i>fluorescence assisted cell sorting</i>
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i>
<b>abs.</b>	absolut	<b>g</b>	Fallbeschleunigung ( $g = 9,80665 \text{ m/s}^2$ (DIN 1305))
<b>AD</b>	<i>Alzheimer Disease</i>	<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>ADAM10 /17</b>	<i>a disintegrin and metallo-proteinase domain 10 / 17</i>	<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>AK</b>	Antikörper	<b>GmbH</b>	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
<b>ALEXA633</b>	fluoreszierender Antikörper	<b>G-Protein</b>	Guaninnukleotid bindendes Protein
<b>APH-1</b>	<i>anterior pharynx-defective 1</i>	<b>h</b>	Stunde
<b>APP</b>	<i>amyloid precursor protein</i>	<b>HA</b>	Kontrollantigen
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>Asp2</b>	Aspartylprotease 2 =BACE1	<b>5-HT1A</b>	Serotoninrezeptor
<b>BACE1</b>	<i>β-site-APP-cleaving enzyme 1</i>	<b>HEK (293)</b>	<i>human embryonic kidney cells</i> (Zelllinie 293)
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanesulfonsäure
<b>C3</b>	BACE1-Inhibitor	<b>I</b>	Strom
<b>C83 / C99</b>	Spaltprodukte von APP	<b>IFM</b>	Inaktivierungssegment aus den Aminosäuren Isoleucin (I), Phanylalanin (F), Methionin (M)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid	<b>K<sup>+</sup></b>	Kaliumion
<b>CAU</b>	Christian-Albrechts-Universität (Kiel)	<b>Kap.</b>	Kapitel
<b>Cla I</b>	Restriktionsenzym	<b>kb</b>	kilo Basenpaare
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	<b>KCNE1</b>	spannungsabhängiger Kaliumkanal
<b>CsOH</b>	Caesiumhydroxid	<b>KCNQ1</b>	Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals KCNE1
<b>CsF</b>	Caesiumfluorid	<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>CTF</b>	C-terminales Fragment	<b>kHz</b>	Kilo Hertz
<b>DA-Wandler</b>	Digital-Analog-Wandler	<b>KOH</b>	Kaliumhydroxid
<b>D289N</b>	enzymatisch inaktive BACE-Mutante	<b>LB</b>	<i>lysogeny broth</i> , Medium
<b>DH5α</b>	E.coli-Stamm	<b>LTF</b>	Firma für Labortechnik
<b>d.h.</b>	das heißt	<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>DNA</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>	<b>µl</b>	Mikroliter
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>µm</b>	Mikrometer
<b>D-MEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	<b>M</b>	Mol, molar
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>mA</b>	Milliampere
<b>E. coli</b>	Escherichia coli, Bakterium	<b>MG</b>	Molekulargewicht

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid	<b>PS Complex</b>	Presenilin-Komplex
<b>min</b>	Minute	<b>R</b>	Widerstand
<b>ml</b>	Milliliter	<b>R<sub>f</sub></b>	Rückkopplungswiderstand (f für <i>feedback</i> )
<b>mm</b>	Millimeter	<b>R-C-Glied</b>	Widerstand-Kondensator-Glied
<b>mMol</b>	Millimol	<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure
<b>mock</b>	Kontrollantigen	<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>mΩ</b>	Megaohm	<b>rtPCR</b>	reverse transcriptase PCR
<b>mRNS</b>	<i>messenger RNS</i>	<b>s.</b>	siehe
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie	<b>Sac I</b>	Restriktionsenzym
<b>ms/msec</b>	Millisekunde	<b>ScTX</b>	<i>scorpiontoxin</i> <i>sodium dodecylsulfate</i>
<b>mV</b>	Millivolt	<b>SDS-PAGE</b>	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>myc</b>	Kontrollantigen	<b>sec.</b>	Sekunde
<b>N1E115</b>	Neuroblastomzelllinie	<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>n</b>	Anzahl	<b>sog.</b>	sogenannte/r/s
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natriumion	<b>s.u.</b>	siehe unten
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid	<b>SYBR Safe™</b>	Elektrophoresefarbstoff
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid	<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>ND-1000</b>	Nano Drop® Spectrophotometer	<b>TACE</b>	<i>tumor-necrosis-factor-α-converting enzyme</i>
<b>NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	protonierte Amminogruppe	<b>TBE-Puffer</b>	Tris-Borat-EDTA-Puffer
<b>nm</b>	Nanometer	<b>TOP10/P3-Zellen</b>	E.coli-Zellkulturlinie
<b>NMDA</b>	N-Methyl-D-Aspartat	<b>Tris-Puffer</b>	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid	<b>TTX</b>	Tetrodotoxin
<b>NTF</b>	N-terminales Fragment	<b>TEA (-Cl)</b>	Tetraethylammonium (chlorid)
<b>OD600</b>	optische Dichte bei 600nm	<b>U</b>	Spannung
<b>OPA</b>	operational amplifier	<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>P6</b>	Spaltprodukt von APP	<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>	<b>usw.</b>	und so weiter
<b>PC</b>	personal computer	<b>UV-Licht</b>	Ultraviolett-Licht
<b>pc-DEST47</b>	Gateway-Vektor	<b>V</b>	Volt
<b>pCDM8</b>	Natriumkanal-Vektor	<b>V5</b>	Kontrollantigen
<b>pA</b>	Piko-Ampere	<b>vgl.</b>	vergleiche
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>	<b>V<sub>mid</sub></b>	Halb(in-/aktivierungs-)spannung
<b>pEGFP</b>	<i>plasmid enhanced green fluorescent protein</i>	<b>wc</b>	<i>whole cell</i>
<b>PEN-2</b>	<i>presenilin enhancer 2</i>	<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>pH</b>	potentia Hydrogenii, Maß für die Stärke der sauren bzw. basischen Wirkung einer wässrigen Lösung	<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b>PHF</b>	<i>paired helical filaments</i>	<b>z.T.</b>	zum Teil
<b>PS</b>	Penicillin-Streptomycin-Mischung		

## Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Christian Alzheimer für das Thema meiner Doktorarbeit und ganz besonders herzlich für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit Ideenreichtum, unerschöpflicher Geduld, langjähriger Erfahrung und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben und stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Fragen und Probleme gehabt.

Gleichzeitig gilt mein herzlicher Dank Dr. rer. nat. Tobias Huth, der diese Studie von Beginn an begleitet und betreut hat und mein Lehrer von der ersten Stunde an gewesen ist. Ohne seine Unterstützung und Motivation wäre die vorliegende Arbeit niemals zu dem geworden, was sie jetzt ist.

Andrea Rittger, Dr. rer. nat. Michael Schwake, Prof. Dr. rer. nat. Karina Reiss sowie Prof. Dr. rer. nat. Paul Saftig vom Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität Kiel sei außerordentlich für ihre Mitarbeit an diesem Projekt gedankt. Die ausgesprochen herzliche Arbeitsatmosphäre wird mir in besonderer Erinnerung bleiben.

Kerstin Kronenbitter danke ich für die Anfertigung der Immunfluoreszenzfärbungen, auf deren herausragende Qualität immer Verlass war (weiterhin toi, toi, toi...). Desweiteren danke ich Didier Gremelle für die kontinuierliche Bereitstellung und Pflege der benötigten Utensilien. Bei Eike Tallone möchte ich mich für die Anfertigung so mancher exzellenter Grafik bedanken.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meiner früheren Kollegin Dr. rer. nat. Elke Edelmann für die vielen fachlichen und nicht ganz so fachlichen Gespräche, die entscheidend zu einem freundschaftlichen Arbeitsklima beigetragen haben. In diesem Zusammenhang sei aber auch allen Mitgliedern des Physiologischen Instituts der CAU Kiel gedankt, dank derer mir das Institut manches Mal ein zweites Zuhause war!

Unaussprechlicher Dank gilt meinem Mann, der sowohl meine Begeisterungsausbrüche bei Versuchsfortschritten, als auch Momente der Niedergeschlagenheit bei suboptimalem Vorankommen voller Empathie mit mir geteilt und bis zur Vollendung dieser Arbeit mit mir mitgefiebert hat. Weiterhin geht mein besonderer Dank an die restlichen Mitglieder des „Trauma-Teams“, die mir immer zu Seite standen, mich gegebenenfalls aufbauten und nicht zuletzt für manchmal erforderliche Abwechslung sorgten. Ihr vier seid das Synonym für Lebensqualität – Danke!

## Lebenslauf

	<b>Ausbildung</b>
Erwerb der allgemeinen Hochschulreife	2000
<b>Studium</b>	
Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel	WS 2000/01
Ärztliche Vorprüfung	WS 2002/03
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	Herbst 2007
<b>Praktisches Jahr</b>	
II. Medizinische Klinik des UK-SH Campus Kiel	Aug. 2006 – Dez. 2006
Diakonissenanstalt Flensburg, Abteilung für Gynäkologie	Dez. 2006 – April 2007
Kantonsspital St. Gallen Schweiz, Abteilung für Chirurgie	April 2007 – Juli 2007
<b>Promotion &amp; Veröffentlichungen</b>	
Beginn der Dissertationsarbeit am Physiologischen Institut der CAU Kiel	01.04.2005
Posterpräsentation " <i>Cleavage of <math>\beta</math>2 subunit by BACE1 alters sodium channel gating</i> " auf dem Jahreskongress der <i>Deutschen Physiologischen Gesellschaft</i> in München	26.-29.03.2006
Vortrag " <i>Voltage-gated Na<sup>+</sup>-channels as possible targets for <math>\beta</math>-secretase BACE1</i> " auf der Jahrestagung „ <i>Treffen hansischer Physiologen des Ostseeraumes</i> “ in Lübeck	19.-20.05.2006
Poster " <i>Effects of BACE1 on Sodium Channel Gating</i> " auf dem Jahreskongress der <i>Deutschen Neurowissenschaftlichen Gesellschaft</i> in Göttingen	29.-31.03.2007
Poster " <i>Effects of BACE1 on Nav1.2a sodium channel activation</i> " auf dem Jahreskongress der <i>Society for Neuroscience</i> in San Diego/Kalifornien	03.-07.11.2007
Paper " <i>Non-proteolytic effect of beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) on sodium channel function</i> " von Huth, T., Schmidt-Neuenfeldt, K., Rittger, A., Saftig, P., Reiss, K., Alzheimer, C. in <i>Neurobiology of Disease</i> , 2008.	November 2008

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Ausarbeitung hat noch keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Ergebnisse dieser Arbeit sind zum Teil bereits veröffentlicht worden.

---

Karoline Schmidt-Neuenfeldt