

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

**EINFLUSS DES *β -site-APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1)*
AUF DIE SYNAPTISCHE TRANSMISSION UND
DAS ENTLADUNGSVERHALTEN VON
CA1-PYRAMIDENZELLEN DES HIPPOCAMPUS**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt von

MEIKE VÖLKEL

aus

Hamburg

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Alzheimer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Reiss

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2012

Zum Druck genehmigt: 16.05.2012

gez. Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi,
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|---------------|
| 1 | Einleitung | - 4 - |
| 1.1 | Morbus Alzheimer | - 4 - |
| 1.2 | Pathologie des M. Alzheimer | - 5 - |
| 1.3 | Das Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein, APP)..... | - 6 - |
| 1.4 | β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1) | - 8 - |
| 1.5 | BACE 1 Knockoutmäuse | - 10 - |
| 1.6 | Synaptische Transmission | - 11 - |
| 1.7 | Therapiemöglichkeiten des M. Alzheimer | - 12 - |
| 1.8 | Zielsetzung | - 12 - |
| 2 | Material und Methoden | - 14 - |
| 2.1 | Patch-clamp-Technik | - 14 - |
| 2.2 | Versuchstiere | - 15 - |
| 2.3 | Präparation und Herstellung von akuten Hirnschnitten des Maushippocampus | - 16 - |
| 2.4 | Verwendete Lösungen | - 18 - |
| 2.5 | Aufbau des Messplatzes | - 19 - |
| 2.5.1 | Praktischer Versuchsaufbau..... | - 21 - |
| 2.6 | Praktische Durchführung der Messungen | - 22 - |
| 2.7 | Messprotokolle | - 24 - |
| 2.7.1 | Untersuchungen zur synaptischen Transmission – postsynaptische Ströme | - 24 - |
| 2.7.2 | Untersuchungen zu Aktionspotentialen (Feuerverhalten) | - 26 - |
| 2.8 | Darstellung der Ergebnisse..... | - 30 - |
| 3 | Ergebnisse | - 31 - |
| 3.1 | Synaptische Transmission..... | - 31 - |
| 3.2 | Messung zum Feuerverhalten | - 34 - |
| 3.2.1 | Vergleich von Form und Verlauf einzelner Aktionspotentiale | - 34 - |
| 3.2.2 | Vergleich der Feuerfrequenzen und des Adaptationsverhaltens | - 35 - |
| 3.2.3 | Vergleich der hyperpolarisationsaktivierten Potentialänderung..... | - 39 - |
| 3.2.4 | Vergleich der Nachhyperpolarisation (AHP) | - 40 - |
| 4 | Diskussion der Ergebnisse | - 41 - |
| 4.1 | Synaptische Transmission | - 41 - |
| 4.2 | Einzelne Aktionspotentiale..... | - 43 - |
| 4.3 | Feuerfrequenzen | - 45 - |
| 4.3.1 | Eingangswiderstand | - 45 - |
| 4.3.2 | Aktionspotentialfrequenzen und Adaptationsverhalten | - 45 - |
| 5 | Zusammenfassung | - 48 - |
| 6 | Literaturverzeichnis | - 50 - |
| 7 | Abbildungsverzeichnis | - 61 - |
| 8 | Tabellenverzeichnis | - 61 - |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | - 62 - |
| 10 | Danksagung | - 64 - |
| 11 | Lebenslauf | -64 - |

1 Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

Der Morbus Alzheimer ist eine langsam progressive, neurodegenerative Erkrankung, die weltweit für die meisten Fälle (50 bis 60 %) von Demenz verantwortlich gemacht wird (Blennow et al., 2006). Mit zunehmendem Alter zeigt sich eine exponentielle Zunahme der Erkrankungshäufigkeit: unter 1 % der 65-Jährigen, 40 bis 50 % der 95-Jährigen (Wang und Ding, 2008). 2005 gab es weltweit 24 Millionen Patienten mit Demenz. Durch die steigende Lebenserwartung der Menschen wird sich diese Zahl voraussichtlich alle 20 Jahre verdoppeln (Ferri et al., 2005).

Erstmals wurde die Alzheimersche Erkrankung 1907 durch Alois Alzheimer beschrieben. Schon zu diesem Zeitpunkt wies er spezifische neuropathologische Veränderungen bei betroffenen Patienten nach, indem er postmortale Hirnschnittpräparate nach der Bielschowskyschen Silbermethode anfertigte. Mit Hilfe verschiedener Färbungen dieser Präparate entdeckte A. Alzheimer sowohl neurofibrilläre Bündel als auch ‚miliare Herdchen‘ (β -Amyloid-Plaques) in der Hirnrinde (Alzheimer, 1907). Erkenntnisse über die Bedeutung, den Aufbau und die pathologische Funktion dieser Veränderungen wurden jedoch erst in späteren Untersuchungen gewonnen.

Klinische Symptome des Morbus Alzheimer sind u. a. zunehmende Beeinträchtigung des episodischen Gedächtnisses, Aphasie, Apraxie sowie allgemeine kognitive Defizite. Hierzu zählen die Verminderung der Urteilskraft, der Entscheidungsfähigkeit und der Orientierung bis hin zur Handlungsunfähigkeit (Blennow et al., 2006).

Das Risiko an M. Alzheimer zu erkranken ist vornehmlich bei älteren Menschen vorhanden und steigt mit zunehmendem Lebensalter. Begünstigende Faktoren können darüber hinaus genetische Belastung, Schädel-Hirn-Traumata, Hypertension, Hypercholesterinämie und Diabetes mellitus sein (Scalco und Reekum, 2006). Prognostisch ist mit einer stetigen Verstärkung der Symptome zu rechnen, wobei die mittlere Überlebenszeit bei 6,5 Jahren nach Diagnosestellung liegt (Heyman et al., 1996). Der zeitliche Verlauf der Erkrankung kann sich jedoch individuell sehr variabel gestalten.

Diagnostisch bleibt für die Alzheimersche Erkrankung nur die Ausschlussdiagnose, da bisher weder Bildgebung noch Laboruntersuchungen eine eindeutige Krankheitserkennung zulassen. Gesichert wird die Diagnose letztlich erst mit einer postmortalen neuropathologischen Untersuchung des Hirngewebes (Jalbert et al., 2008).

1.2 Pathologie des M. Alzheimer

Die Alzheimersche Erkrankung wird durch zwei pathologische, cerebrale Veränderungen geprägt: die Entstehung von Amyloid-Plaques und die Bildung von neurofibrillären Bündeln.

Neurofibrilläre Bündel sind pathologische Aggregationen des Tau-Proteins innerhalb der Nervenzellen. Physiologisch bindet das Tau-Protein an die Mikrotubuli der Neurone. Das Tau-Protein trägt damit zur Stabilisation dieser intrazellulären Filamente bei. Dem gegenüber ist die Bindungsaffinität des Tau-Proteins zu den Mikrotubuli bei der Alzheimerschen Erkrankung durch eine Hyperphosphorylierung stark vermindert. Die fehlende Bindung führt zu einer Destabilisierung und zum Zerfall der Filamente und verhindert so den axonalen Transport der Zellen (Huang und Jiang, 2009). Hierdurch entsteht eine starke Beeinträchtigung der metabolischen Prozesse der Neurone und es kommt zum Untergang der betroffenen Nervenzellen. Das frei gewordene Tau-Protein bildet intrazellulär unlösliche Komplexe. Diese Aggregationen sind vor allem in den perinukleären Regionen der Nervenzellen zu finden. Das veränderte Tau-Protein selbst ist neurotoxisch und führt zu neuronalem Absterben und Demenz (Gong und Iqbal, 2008).

Amyloid-Plaques entstehen außerhalb der Nervenzellen aufgrund einer Störung des Gleichgewichtes zwischen Produktion und Abbau des Amyloid- β -Peptid (A β). Durch diese Störung kommt es zur Akkumulation des A β mit zellschädigender Wirkung (Arendt, 2009). Nach Snyder et al., 2005 lässt sich ein negativer Einfluss der Akkumulation des A β auf die synaptische Funktion und Plastizität der Neurone feststellen. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass es Zusammenhänge zwischen der Konzentration des A β , dem Verlust von Synapsen und dem kognitiven Defizit gibt (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999). Abgesehen von diesen aus einem Ungleichgewicht entstehenden pathologischen Eigenschaften wird dem A β eine Beteiligung an Veränderungen der synaptischen Aktivität als auch an der Regulation spannungsabhängiger Kaliumkanäle (K_v) zugeschrieben (Pearson und Peers, 2006).

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist noch nicht geklärt, welche der beiden Pathologien die dominierende Rolle in der Krankheitsentstehung des M. Alzheimer spielt. Die Anzahl der neurofibrillären Bündel scheint eine deutlich größere Korrelation mit dem Ausmaß der Demenz als die extrazellulären Amyloid-Ablagerungen zu haben (Arriagada et al., 1992; Hyman, 1997). Dies spräche für eine höhere Relevanz dieser Pathologie in der Krankheitsentwicklung.

Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen zu den erblich bedingten Alzheimerfällen. Alle bisher bekannten Genmutationen, die in Verbindung mit M. Alzheimer gebracht werden, sind mit einer Erhöhung der A β -Konzentration bzw. mit einer vermehrten Bildung von Amyloid-Plaques assoziiert. Dazu zählen Mutationen des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) auf Chromosom 21, des Presenilin 1 auf Chromosom 14, des Presenilin 2 auf Chromosom 1 und des Apolipoproteins E4 (Apo E4) (Lendon et al., 1997; Price und Sisodia, 1998). Genetische Veränderungen, die lediglich eine erhöhte Bildung neurofibrillärer Bündel hervorrufen, konnten bisher nicht in Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung gebracht werden (Götz et al., 2004; Eriksen und Janus, 2007). Allerdings kommt es bei Mutationen, welche die A β -Produktion betreffen, auch zu einer gesteigerten Produktion neurofibrillärer Bündel, während sich in umgekehrter Weise bei Mutationen des Tau-Gens keine vermehrte Bildung von Amyloid-Plaques einstellt (Lewis et al., 2001). Dies lässt die Vermutung zu, dass die extrazelluläre Entstehung von Amyloid-Plaques das zeitlich frühere Ereignis im Krankheitsprozess darstellt und nicht die Bildung von neurofibrillären Bündel (Hardy, 2003; Samura et al., 2006).

1.3 Das Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein, APP)

Bei der Untersuchung der Entstehung von Amyloid-Plaques wurde 1987 erstmalig das menschliche APP-Gen (amyloid precursor protein gene) auf Chromosom 21 identifiziert. Seitdem wurden über 25 Mutationen dieses Gens gefunden, die alle ursächlich für die hereditäre, familiäre Form der Alzheimerschen Erkrankung sind. Das APP selbst ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit einer großen extrazellulären und einer kleinen intrazellulären Domäne (Thinakaran und Koo, 2008).

Das APP wird in vielen verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert. Seit seiner Entdeckung werden diesem Molekül eine Reihe von Aufgaben zugeschrieben wie

u.a. die Modulation der synaptischen Plastizität und die Regulation der Expression bestimmter Ionenkanäle (Pearson und Peers, 2006). Die genaue physiologische Rolle ist allerdings bislang noch nicht vollständig geklärt.

Neben der noch nicht genau beschreibaren physiologischen Bedeutung ist das APP die Ausgangsverbindung für die extrazellulären Amyloid-Plaques, die sich hauptsächlich aus dem Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) mit einer Länge von 40-42 Aminosäuren zusammensetzen. $A\beta$ entsteht durch sequenzielle proteolytische Spaltung des APP – APP wird deshalb als Vorläuferprotein bezeichnet. Das APP kann auf zwei unterschiedlichen Wegen – amyloidogen und nicht amyloidogen – prozessiert werden (Abbildung 1).

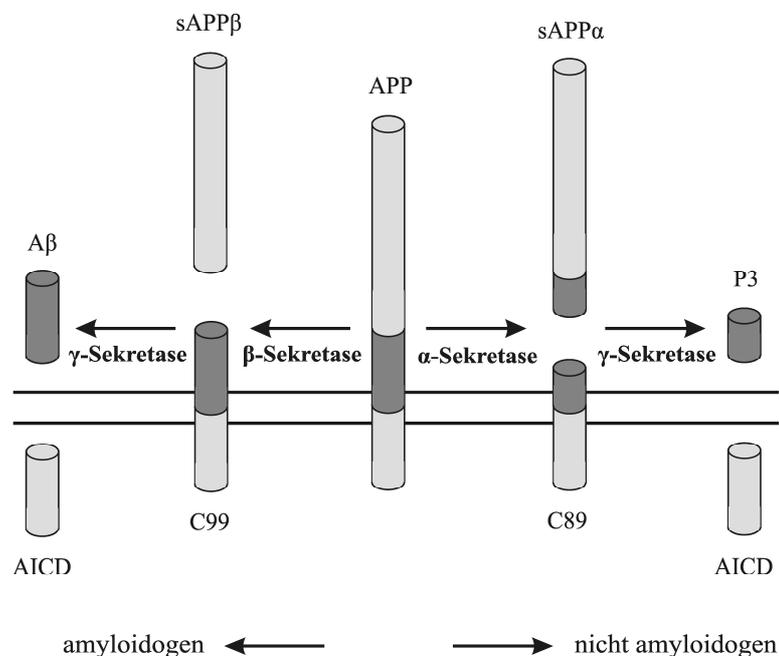


Abbildung 1: Amyloidogene und nicht amyloidogene Prozessierung des Amyloid precursor protein (APP). In der amyloidogenen Prozessierung entsteht über die Spaltung des APP durch die β - und γ -Sekretase das Amyloid- β -Peptid ($A\beta$), welches extrazellulär freigesetzt wird. Auf dem nicht amyloidogenen Weg der APP-Prozessierung entsteht über das Schneiden des APP durch die α - und γ -Sekretase das nicht amyloidogene 3-kDa-Peptid (P3). Das C-terminale Fragment AICD (APP intracellullar domain) entsteht auf beiden beschriebenen Wegen (verändert aus Cole und Vassar, 2007).

Bei der nicht amyloidogenen Prozessierung erfolgt eine zweistufige Spaltung durch die α - und γ -Sekretase. Hierbei entsteht extrazellulär ein nicht amyloidogenes 3-kDa-Peptid (P3) und intrazellulär das C-terminale Fragment AICD (APP intracellular domain).

Dem gegenüber führt die amyloidogene Prozessierung über die β - und γ -Sekretase zur Bildung des amyloidogenen extrazellulären A β und einer intrazellulären C-terminalen Domäne des APP (AICD). In der amyloidogenen Prozessierung schneidet die β -Sekretase das APP in ein 99 Aminosäure langes, membrangebundenes Ende (C99) und ein lösliches APP-Derivat (sAPP β – secreted amino terminal APP derivative). C99 wird anschließend durch die γ -Sekretase innerhalb der Zellmembran geschnitten. Hierdurch wird intrazellulär AICD (APP intracellular domain) und extrazellulär A β frei. A β akkumuliert und oligomerisiert in der Folge im extrazellulären Raum und bildet die für die Alzheimersche Erkrankung typischen Amyloid-Plaques. Die extrazellulären Ablagerungen von A β sind vor allem in den Regionen Neocortex, Hippocampus und limbisches System nachweisbar (Braak et al., 1996).

Der entscheidende Unterschied zwischen amyloidogener und nicht amyloidogener Prozessierung des APP liegt jeweils im ersten Schritt der zweistufigen Spaltung des APP. Dieser erste Schritt wird in der nicht amyloidogenen Prozessierung durch die α -Sekretase und bei der amyloidogenen Prozessierung durch die β -Sekretase vollzogen. Die γ -Sekretase ist in beiden Fällen für den zweiten Schritt der Spaltung verantwortlich. Hieraus wird deutlich, dass die Entstehung der für die Alzheimersche Erkrankung typischen Amyloid-Plaques wesentlich von der Spaltung des APP durch die β -Sekretase abhängt.

1.4 β -site-APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1)

Die zentrale Theorie für die Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung ist die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebene Amyloid-Hypothese, welche von einer Störung des Gleichgewichtes zwischen A β -Produktion und -Abbau ausgeht. Dieses Ungleichgewicht führt über die Bildung von extrazellulären Amyloid-Plaques im Krankheitsverlauf zu neuronaler Degeneration und Demenz (Hardy und Selkoe, 2002).

Der Zusammenhang zwischen synaptischer Dysfunktion und dem Auftreten von A β wurde in mehreren Studien nachgewiesen. Dodart et al., 2002 zeigten eine Besserung der neuropathologischen Auffälligkeiten bei APP-transgenen Mäusen nach Immunisierung mit

A β -Antikörpern. Zudem konnte eine passive wie auch aktive Immunisierung gegen A β die neuronale Degeneration vermindern (Buttini et al., 2005).

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, vermittelt die β -Sekretase den entscheidenden Spaltungsschritt in der Entstehung der extrazellulären Amyloid-Plaques. Dies zeigen auch die Untersuchungen von Chang et al., 2004. In Gehirnen von Mäusen mit M. Alzheimer konnten sie nach Gabe eines Blut-Hirn-Schranken-gängigen β -Sekretase-Inhibitors eine Reduktion des A β nachweisen.

Die β -Sekretase wird auch als β -site-APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1) bezeichnet. BACE 1 (Synonyme: Asp2, Memapsin2) wird ubiquitär exprimiert, erreicht jedoch im Pankreas und im Gehirn die größten Konzentrationen (Willem et al, 2009). 1999/2000 wurde die BACE 1 in mehreren unabhängigen Studien den Aspartatproteasen zugeordnet sowie als Vermittler der β -Sekretase-Aktivität identifiziert und somit als Ursache für die Entstehung des N-Terminus des A β gefunden (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999; Lin et al., 2000). BACE 1 vermittelt danach eine der Hauptreaktionen in der Amyloid-Plaque-Entstehung, in der das APP als Substrat fungiert. Hierauf deuten auch verschiedene Untersuchungen hin, die bei BACE 1 Knockoutmäusen (BACE 1 $-/-$) in Anwesenheit von humanem APP kein A β nachweisen konnten (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001). Ist die β -Sekretase-Konzentration vermindert wie bei APP-transgenen Mäusen mit einem heterozygoten BACE 1 Knockout (BACE 1 $+/-$), zeigt sich im höheren Alter eine deutliche geringere Amyloid-Plaque-Bildung als bei der BACE 1 homozygoten (BACE 1 $+/+$) Vergleichsgruppe (McConlogue et al., 2007).

Darüber hinaus konnte eine generelle Erhöhung der β -Sekretase-Aktivität in betroffenen Hirnregionen bei M. Alzheimer-Fällen gezeigt werden (Fukumoto et al., 2002; Li et al., 2004; Tyler et al., 2002; Yang et al., 2003).

Neben dem APP schneidet BACE 1 weitere Substrate, wie u.a. die β -Untereinheiten spannungsgesteuerter Natriumkanäle (Wong et al., 2005; Kim et al., 2007; Huth et al., 2009), Neuregulin1 (Hu et al., 2006; Willem et al., 2009), die α -2,6 Sialyltransferase (Kitazume et al., 2001), das Zell-Adhäsionsprotein P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (Lichtenthaler et al., 2003) und den Interleukin1-Rezeptor-Typ-II (Kuhn et al., 2007). Dies zeigt, dass BACE 1 neben der Bildung des A β auch an weiteren

wichtigen Abläufen im zentralen Nervensystem beteiligt ist, wie z. B. an kognitiven Prozessen und synaptischer Regulation (Stockley und O'Neill, 2008).

1.5 BACE 1 Knockoutmäuse

Für weitere Untersuchungen der Beteiligung von BACE 1 insbesondere an Abläufen im zentralen Nervensystem sind Mäuse besonders geeignete Versuchsobjekte, da an ihnen aufgrund kurzer Entwicklungszeiten in überschaubaren Zeiträumen Erkenntnisse gewonnen werden können. Es lassen sich BACE 1 Knockoutmäuse generieren, mit denen ein direkter Vergleich von Individuen ohne und mit normaler β -Sekretase-Aktivität möglich ist. Mit Hilfe derartiger Mäusestämme wurden schon diverse Untersuchungen zu möglichen therapeutischen Angriffspunkten in der Behandlung von M. Alzheimer durchgeführt

2001 wurden erste Studien über charakteristische Eigenschaften von BACE 1 Knockoutmäusen veröffentlicht. Die Mäuse waren überlebens- und fortpflanzungsfähig. Es konnten keine phänotypischen Auffälligkeiten, gemessen an der embryologischen Entwicklung, der Anatomie, der Morphologie, der klinischen Chemie und dem Verhalten, gefunden werden (Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001).

Dominguez et al., 2005 beschrieben einige Jahre später spezifische Veränderungen für homozygote BACE 1 Knockoutmäuse. Hierzu gehören eine erhöhte neonatale Mortalität und ein geringeres Körpergewicht im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Des Weiteren wiesen die Knockoutmäuse einen hyperaktiven Phänotyp auf, der sich durch eine erhöhte Lokomotion der Tiere kennzeichnet. In weiteren Verhaltenstests zeigte sich zusätzlich gegenüber der Vergleichsgruppe eine geringere Ängstlichkeit der Knockoutmäuse.

Den bisherigen Studien, die an Knockout- und Wildtyptieren durchgeführt wurden, fehlen allerdings weitestgehend Erkenntnisse zu den physiologischen Auswirkungen einer Beeinflussung der β -Sekretase. Mit den hieraus gewonnenen Ergebnissen könnte die Abschätzung therapeutischer Risiken bei einem Einsatz von β -Sekretase-Regulatoren verbessert werden.

1.6 Synaptische Transmission

Die synaptische Transmission ist die Übertragung von elektrischen Informationen zwischen erregbaren Zellen, die über Synapsen verbunden sind. Erreicht ein elektrisches Aktionspotential eine präsynaptische Endigung, werden spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet, was zu einem Calciumeinstrom führt. Durch die Erhöhung der Calciumkonzentration in der präsynaptischen Endigung werden Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt. Bei der schnellen erregenden wie hemmenden Übertragung binden diese an ligandengesteuerte Ionenkanäle auf der postsynaptischen Seite. Unter dem Einfluss dieser Transmitter öffnen sich die Kanäle und ermöglichen Ionenströme, sodass es zu einer Depolarisation oder Hyperpolarisation kommt. Das ehemals präsynaptische elektrische Signal wird so über die Zwischenstufe eines chemischen Signals (Neurotransmitter) postsynaptisch wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt. Der gesamte Vorgang dauert wenige Millisekunden.

Die synaptische Transmission ist u.a. die Basis für Lernen und Gedächtnis. Für das sog. deklarative Gedächtnis spielt der Hippocampus eine besondere Rolle (Scoville und Milner, 1957; Teyler und DiScenna, 1985; Barnes, 1988; Squire und Zola-Morgan, 1988; Bruel-Jungerman et al., 2007). Bei Verlust der synaptischen Integrität in diesem Bereich werden Lernen und Gedächtnis stark beeinträchtigt (Nicoll et al., 1988). Von besonderer Bedeutung für die Ausprägung dieser beiden Fähigkeiten ist die Effizienz der synaptischen Übertragung. Die Effizienz wiederum wird durch die sogenannte Plastizität der Synapse wesentlich beeinflusst. Bei dieser Plastizität unterscheidet man sowohl lang andauernde wie auch kurz wirksame Veränderungen (Mulkey und Malenka, 1992; Teyler et al., 1995; MacDonald et al., 2006; Gruart und Delgado-Garcia, 2007). Diese werden als Lang- bzw. Kurzzeitplastizität bezeichnet. Veränderungen der synaptischen Übertragung lassen sich daran erkennen, dass es durch eine kurzzeitige intensive Reizung der Synapse je nach Reizmuster zu einer Verstärkung (Facilitation) oder einer Abschwächung (Depression) der nachfolgenden postsynaptischen Antworten (Stromflüsse durch Ionenkanäle und Potentialänderungen) kommt. Direkt messbar sind diese Veränderungen dann als Vergrößerung oder Verkleinerung des sogenannten EPSCs (excitatory postsynaptic currents).

1.7 Therapiemöglichkeiten des M. Alzheimer

Die Behandlung des M. Alzheimer beschränkt sich derzeit auf eine symptomatische Therapie in den Frühstadien der Erkrankung. Eine der möglichen Therapieoptionen ist der Einsatz von Acetylcholinesterasehemmern (AChE-Hemmer), die eine längere Verfügbarkeit des Botenstoffes Acetylcholin (ACh) für die Neuronen herbeiführen. ACh steht somit länger für die Übertragung von Informationen zwischen den Nervenzellen zur Verfügung (Grutzendler und Morris, 2001). Dies setzt jedoch eine Restfunktion der Zellen voraus und ist daher nur in den frühen Stadien der Erkrankung möglich.

Ein speziellerer therapeutischer Ansatz ist das Zusammenwirken von Glutamat als Transmitter mit dem zugehörigen postsynaptischen NMDA-Rezeptor. Bei Alzheimer-Patienten sind die kontrollierte Glutamatfreisetzung und die Wiederaufnahme des Glutamats durch neurotoxische Faktoren (Ischämie, A β) gestört. Es kommt zu einer überhöhten Glutamatfreisetzung mit nachfolgendem übermäßigem Kalziumeinstrom in die Nervenzellen. Diese Störung des Kalziumgleichgewichtes führt zur Nervenzellschädigung und zum Zelltod. Hier setzt der N-Methyl-D-Aspartat-Antagonist (NMDA-Antagonist) Memantin an. Memantin bindet an die postsynaptischen NMDA-Rezeptoren, ohne einen Kalziumeinstrom auszulösen. Auf diese Weise wird die bei Alzheimer-Patienten gesteigerte Wirkung von Glutamat an den Synapsen reguliert und eine verstärkte Öffnung der NMDA-Rezeptoren mit entsprechendem postsynaptischem Kalziumeinstrom verhindert. Der Untergang der Neurone durch zu hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen kann so verringert werden (Parsons et al., 2007).

Auch die Senkung der endogenen Cholesterinproduktion durch Statine scheint einen positiven Effekt auf die Erkrankung zu haben (Austen et al., 2002). Es konnte bei einer geringeren Konzentration an Cholesterin eine sinkende Produktion des A β nachgewiesen werden (Wolozin, 2004). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Aktivität der β -Sekretase abhängig von der Cholesterinkonzentration ist (Sjögren und Blennow, 2005).

1.8 Zielsetzung

Obwohl die vorhandenen Therapieansätze stetig weiter entwickelt und verbessert werden, ist es bisher nicht gelungen, eine kurative Behandlungsmöglichkeit des M. Alzheimer zu finden. Die β -Sekretase scheint der Amyloid-Hypothese nach ein geeigneter Ansatzpunkt

für die kausale Behandlung der Erkrankung zu sein. Durch Beeinflussung der β -Sekretase könnte sehr früh die Entstehung des A β reguliert werden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen fehlender β -Sekretase auf basale Aktivitätsparameter im Hippocampus untersucht werden. Da der Hippocampus eine große Rolle in der Pathologie des M. Alzheimer spielt (Van Hoesen und Hyman, 1990), eignet er sich sehr gut für derartige Untersuchungen. Zudem weist er eine sehr klare Gliederung auf in eine Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale) und Zonen mit axonalen und dendritischen Verbindungen (Stratum radiatum, Stratum lacunosum / moleculare und Stratum oriens) (Knowles, 1992). So lassen sich die Pyramidenzellen lokal klar und eindeutig identifizieren. Dies bietet auch den Vorteil, die Untersuchungen an den Zellen durchzuführen, ohne sie aus ihrem natürlichen Zellverbund heraus zu lösen und damit ggf. unphysiologische Bedingungen zu schaffen. Ihrer in Abschnitt 1.5 dargestellten Eignung und der an ihnen bereits durchgeführten experimentellen Vergleiche wegen erfolgten die Untersuchungen an BACE 1 Knockout- und Wildtypmäusen, im Folgenden als BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäuse bezeichnet.

Schwerpunkte der Untersuchungen waren die synaptische Transmission und die Ausbildung von Aktionspotentialen. Zur Untersuchung der synaptischen Transmission wurde die Erregung durch Stimulation außerhalb des betrachteten Synapsenbereichs ausgelöst. Um dabei unbeeinflusste Ergebnisse zur synaptischen Übertragung zu erhalten, war es notwendig, die Ausbildung von postsynaptischen Aktionspotentialen zu unterdrücken. Dies geschah durch die Blockierung der postsynaptischen, spannungsabhängigen Natriumkanäle mit QX-314 (Lidocain-N-Ethyl-Bromide). Als Ergebnis konnten EPSCs ohne Überlagerung postsynaptischer Aktionspotentiale gemessen werden.

Analog zu den Untersuchungen der synaptischen Transmission unter Ausschluss von Aktionspotentialen wurde die Untersuchung der Ausbildung von Aktionspotentialen in entsprechender Weise unter Ausschluss synaptische Transmissionsvorgänge durchgeführt. Dies geschah durch direkte Stimulation einzelner CA1-Pyramidenzellen. Hier sollten Erkenntnisse über die Wirkung fehlender β -Sekretase auf das Erregungsverhalten bzw. auf die Funktion spannungsabhängiger Ionenkanäle gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patch-clamp-Technik

Die neuronale Übertragung von Signalen stellt einen sehr komplexen Ablauf aus Potentialänderungen, elektrochemischen Vorgängen und Permeabilitätsänderungen von Zellmembranen dar, wobei die einzelnen Vorgänge voneinander abhängig sind und sich gegenseitig beeinflussen. Es ist daher sinnvoll, die vielfältigen Beeinflussungen einzuschränken, um einzelne Abläufe spezifisch analysieren zu können.

Hierfür hat sich die Patch-clamp-Technik (Neher et al., 1978; Hamill et al., 1981) bewährt, mit der man sich in der Ganzzellkonfiguration einen direkten Zugang in intrazelluläre Räume verschaffen kann. Dies ermöglicht es bei den an und in Zellmembranen und Synapsen ablaufenden Vorgängen wahlweise von außen das Potential (Voltage-clamp Modus) bzw. den Strom (Current-clamp Modus) konstant zu halten, um Rückschlüsse auf Ströme durch Ionenkanäle bzw. sich ausbildende Aktionspotentiale und deren Veränderungen unter definierten Verhältnissen zu ziehen.

Mit diesen Möglichkeiten der Patch-clamp-Technik wurden in dieser Arbeit folgende vergleichende Messungen an CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus von BACE 1 ^{-/-} und BACE 1 ^{+/+} Mäusen durchgeführt:

- Postsynaptische Ströme, hervorgerufen durch Zwei- und Mehrfachstimulation der jeweiligen präsynaptischen Zelle bei konstantem Haltepotential an der postsynaptischen Zellmembran
- einzelne Aktionspotentialverläufe, hervorgerufen durch kurze stimulierende Stromimpulse, deren Stärke jeweils bis zum Erreichen des Schwellenpotentials gesteigert wurde
sowie
- Aktionspotentialfolgen (Aktionspotentialfrequenzen), hervorgerufen durch länger andauernde rechteckförmige Strominjektionen unterschiedlicher Stärke.

2.2 Versuchstiere

Alle Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an Mäusen durchgeführt. Sie ließen sich in vergleichbar kurzer Zeit einfach vermehren und dabei zugleich mit den benötigten genetischen Unterschieden züchten. Die Hippocampuszellen für die Messungen post-synaptischer Ströme im ersten Teil der Untersuchung stammten von vier bis acht Monate alten Mäusen (Durchschnittsalter ~ 204 Tage); die entsprechenden Zellen für die Messungen von Aktionspotentialen im zweiten Teil der Untersuchung von Mäusen, die ein bis drei Monate alt waren (Durchschnittsalter 58 Tage). Die genaue Genotypisierung der verwendeten Tiere mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie die Erhaltungszucht führte das Biochemische Institut der Christian-Albrechts Universität zu Kiel durch.

Die für die Untersuchungen benötigten genetisch veränderten Mäuse entstanden durch die von Dominguez et al., 2005 beschriebene Kreuzungsmethode. Diese ist mittlerweile bei der Züchtung geeigneter Versuchstiere zum Standard geworden. Ein vereinfachtes Schema gibt Abbildung 2 wieder.

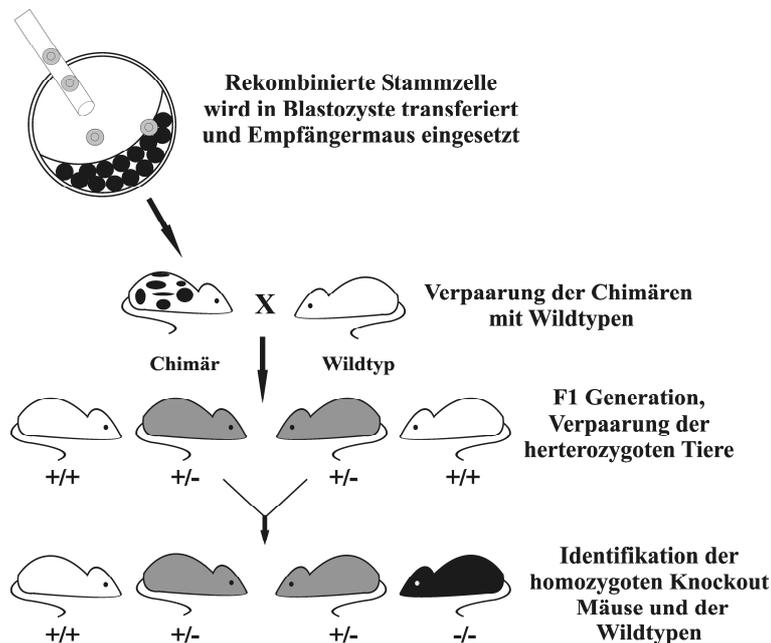


Abbildung 2: Entstehung der BACE 1 Knockoutmäuse. Embryonale Stammzellen werden nach Übertragung eines Inaktivierungsvektors für das BACE 1-Gen in Blastozysten der Mauslinie C57BL/6J eingesetzt. Die entstehenden Chimären werden mit Wildtypen der gleichen Mauslinie gekreuzt. Nach Verpaarung der heterozygoten Tiere der F1-Generation können aus der Folgeneration Wildtyp- und homozygote Knockoutmäuse separiert werden (verändert nach Braun, R.; Willnow, E., Die Knockout-Maus als Krankheitsmodell, Dtsch Arztebl 1996; 93(26): A-1766).

Wie Abbildung 2 zeigt, fand zu Beginn der Generierung der BACE 1-Versuchstiere die Übertragung eines Inaktivierungsvektors für das BACE 1-Gen mittels Elektroporation in entnommene embryonale Stammzellen (ES) statt. Die Integration dieses Vektors in das Genom erfolgte durch homologe Rekombination. Die rekombinierten ES wurden dann in Blastozysten eines Teils der für die Untersuchungen ausgewählte Mauslinie C57BL/6J eingesetzt und die so entstandenen Chimären mit Wildtypen der gleichen Linie C57BL/6J gekreuzt. Unter den Nachkommen in der F1-Generation fand anschließend eine Verpaarung der heterozygoten Tiere (BACE 1 +/-) statt. Damit konnten aus der Folgegeneration Wildtypmäuse (BACE 1 +/+) und homozygote Knockouttiere (BACE 1 -/-) für die Messungen separiert werden. Die Mäuse mit BACE 1 -/- besaßen so einen konstitutiven Knockout des BACE 1-Gens.

2.3 Präparation und Herstellung von akuten Hirnschnitten des Maushippocampus

Zur Vorbereitung der Präparation wurden die Versuchstiere anästhesiert. Die Anästhesie erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von 200 mg/kg Körpergewicht Ketamin HCL und 30 mg/kg Körpergewicht Xylazin HCL. Mittels am Schwanz gesetzter Schmerzreize konnte die Narkosetiefe überprüft werden. Sobald eine ausreichende Anästhesie sichergestellt war, wurden die Mäuse dekapitiert. Die weitere Präparation musste so zügig wie möglich erfolgen, um die Ischämie der Zellen durch die Präparation nicht länger als unbedingt notwendig andauern zu lassen. Dazu wurde die Schädelkalotte entlang der Sutura sagittalis von dorsal nach rostral eröffnet. Nach vollständiger Entfernung des Schädeldaches lag das Gehirn unter der Dura mater frei. Sofort nach der Entnahme erfolgte die Überführung des Gehirns in eine eisgekühlte artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF-Lösung). Diese wurde zuvor für mindestens 15 Minuten mit Carbogen (Gasgemisch aus 95 % CO₂ und 5 % O₂) begast, um einen stabilen pH-Wert einzustellen. Die Begasung der Flüssigkeit fand während aller folgenden Präparationsschritte weiter ohne Unterbrechung statt, um eine bestmögliche Versorgung der Zellen zu gewährleisten.

In der ACSF-Lösung wurden im nächsten Schritt Kleinhirn, Hirnstamm, Frontalpol sowie die unteren Temporalpole abgetrennt (Abbildung 3). Der Schnittwinkel bei der Abtrennung der unteren Temporalpole betragen ca. 30°, um später mit transversaler Schnittführung aus der Hippocampusregion Schnitte in entsprechenden Winkeln zu erhalten. So vorbereitet

ließen sich die Kaudalseiten des Gehirns auf einer vorgekühlten Schneideplattform eines Vibratoms (LEICA VT 1000S) nach Trennung beider Hemisphären entlang der Fissura longitudinalis mit Sekundenkleber fixieren. Dies schaffte die Voraussetzung für die Herstellung von 350 µm dicken Transversalschnitten (durchgezogene Linien in Abbildung 3) der Hippocampusregion mit dem Vibratom. Zur besseren Stabilisierung der beiden Hemisphären während der Schnittherstellung wurde zusätzlich ein Agarblock auf der Schneideplattform befestigt, der die rostralen Enden des Gehirns abstützte.

Abbildung 3 zeigt die Lage der 350 µm dicken Transversalschnitte in der Hippocampusregion (durchgezogene Linien).

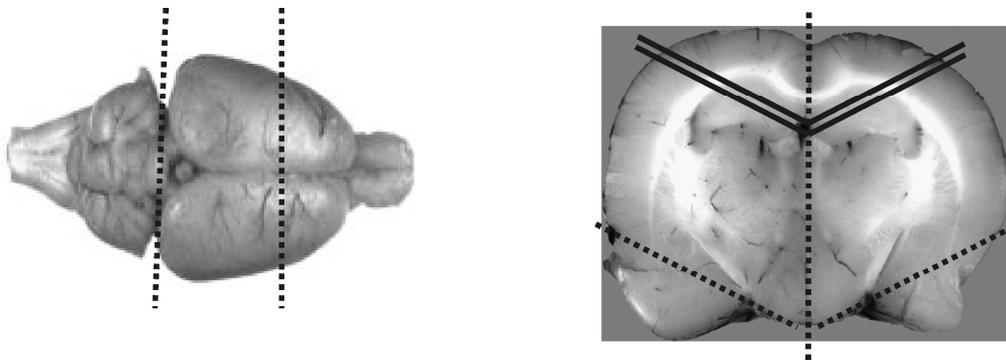


Abbildung 3: Schnittführung bei der Präparation. Dargestellt sind die gesetzten Schnitte zur Herstellung der Hippocampuschnitte. Gestrichelte Linien = vorbereitende Schnitte, durchgezogene Linien = definitive Präparatschnittführung. Links: Abtrennung von Kleinhirn, Hirnstamm und Frontalpol, rechts: Herstellung einer optimalen Schnittebene der Präparate (durchgezogene Linien). Verändert nach Synapse Web, Kristen Harris, PI.

Die angefertigten Hirnschnitte wurden in einer weiteren ACSF-Inkubationslösung für 30 Minuten bei 35 °C aufbewahrt und in der Folge ohne einen Wechsel der Lösung bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde gelagert, so dass eine ausreichende Adaptation der Zellen an die Lösung sichergestellt war. Sowohl bei der Inkubation als auch bei der weiteren Lagerung wurde eine konstante Begasung der Lösung mit Carbogen beibehalten.

2.4 Verwendete Lösungen

ACSF-Lösung:

| | |
|----------------------------------|-------------|
| NaCl | 125 mmol/l |
| KCl | 3 mmol/l |
| NaHCO ₃ | 25 mmol/l |
| NaH ₂ PO ₄ | 1,25 mmol/l |

Die ACSF-Lösung wurde in Form einer 10fach konzentrierten Stammlösung angesetzt und bei 4 °C gelagert. Zu Beginn eines Versuchstages wurde 10 mmol/l Glucose und nach 15 Minuten Carbogenbegasung CaCl₂ und MgCl₂ (s.u.) zugegeben.

| | | |
|---|------------------|------------|
| Zusatz zur ACSF-Lösung für die Präparation und Inkubation: (siehe Abschnitt 2.3) | Ca ²⁺ | 0,2 mmol/l |
| | Mg ²⁺ | 3,8 mmol/l |

| | | |
|--|------------------|----------|
| Zusatz zur ACSF-Lösung für die Extrazellulärlösung: (siehe Abschnitt 2.5) | Ca ²⁺ | 2 mmol/l |
| | Mg ²⁺ | 2 mmol/l |

Pipettenlösung (Intrazellulärlösung):
(siehe Abschnitt 2.6)

| | | |
|--|------------|--|
| K-Glukonat | 135 mmol/l | |
| HEPES | 5 mmol/l | |
| MgCl ₂ | 3 mmol/l | |
| EGTA | 5 mmol/l | |
| Na ₂ -ATP | 2 mmol/l | |
| Na ₂ -GTP | 0,3 mmol/l | |
| NaCl | 4 mmol/l | |
| Lidocain-N-Ethyl - Bromide (QX-314) | 4 mmol/l | (nur bei den Messungen postsynaptischer Ströme) |

2.5 Aufbau des Messplatzes

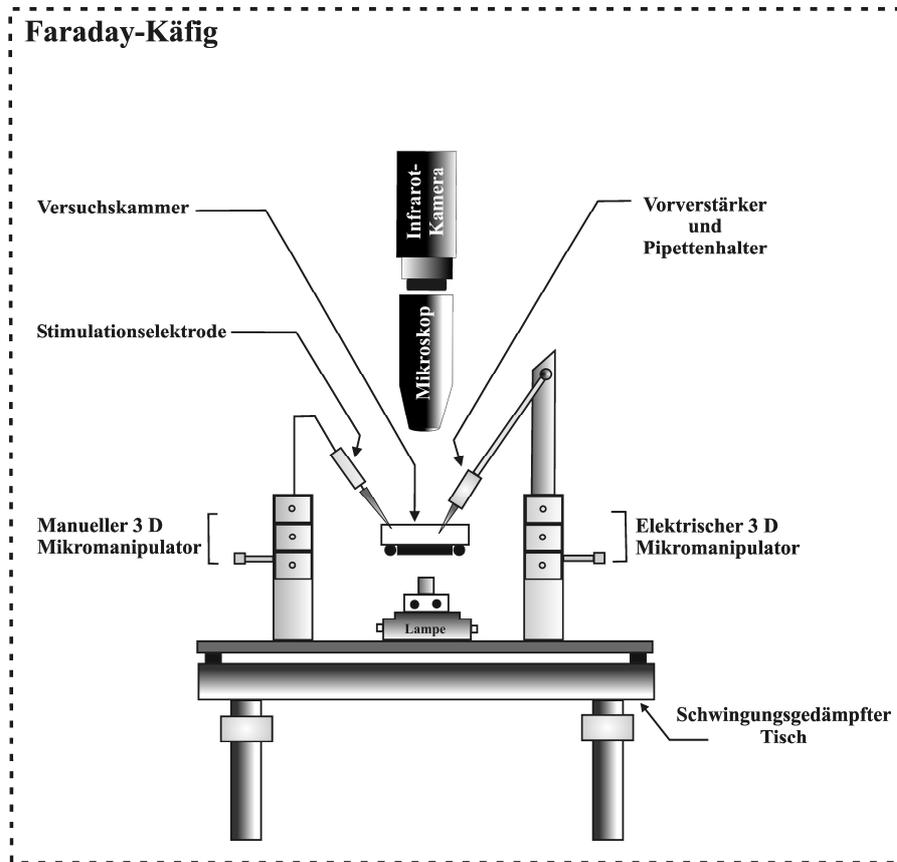


Abbildung 4: Prinzipieller Aufbau der verwendeten Patch-clamp-Anlage.

Der prinzipielle Aufbau des Messplatzes ist in Abbildung 4 dargestellt. Die für die Untersuchungen genutzte Patch-clamp-Anlage befand sich zur Vermeidung von äußeren Erschütterungen auf einem schwingungsgedämpften Tisch. Ein umgebender Faraday-Käfig diente der Abschirmung von elektrischen Störquellen. Mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops (Axioskop 2FS MOT / Wasserimmersionsobjektiv 40 x 0,08 W, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) konnte die Anordnung von Pipette, Stimulationselektrode und Hippocampuszellen in der Versuchskammer genau justiert werden. Die Versuchskammer wurde während der gesamten Messung kontinuierlich mit Extrazellulärflüssigkeit durchströmt (Durchflussgeschwindigkeit 1-2 ml/min). Ein Thermostat (Automatic Temperature Controller TC-324B, Warner Instruments Corporation, Hamden, USA) hielt die Temperatur der Versuchskammer konstant auf 30 °C.

Pipettenhalter und bipolare Stimulationselektrode (Katalog # CBASD75, Frederick Haer & Co, Bowdoin, USA) waren auf gegenüberliegenden Seiten der Versuchskammer angeordnet und ließen sich jeweils mit 3D-Mikromanipulatoren punktgenau im μm -Bereich positionieren. Für den Pipettenhalter kam ein motorgesteuerter Mikromanipulator (Mini 25, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) und für die Stimulationselektrode ein manueller 3D-Mikromanipulator (LN Unit MLM, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) zum Einsatz.

Der Patchvorgang konnte sowohl über die Okulare des Durchlichtmikroskops als auch über ein CCD-Kamerasystem auf einem Videomonitor verfolgt werden.

Ein Blockschaltbild des Messaufbaus gibt Abbildung 5 wieder.

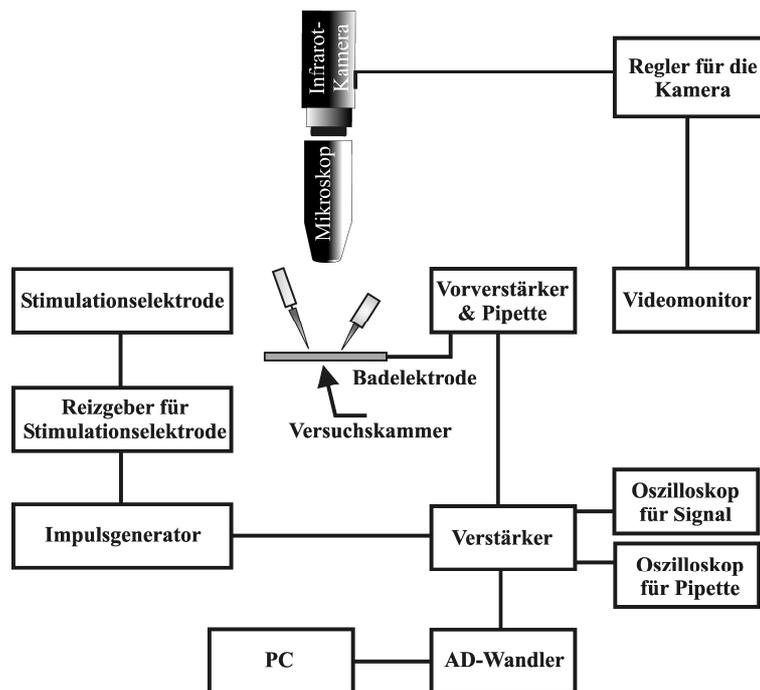


Abbildung 5: Blockschaltbild des Messaufbaus.

2.5.1 Praktischer Versuchsaufbau

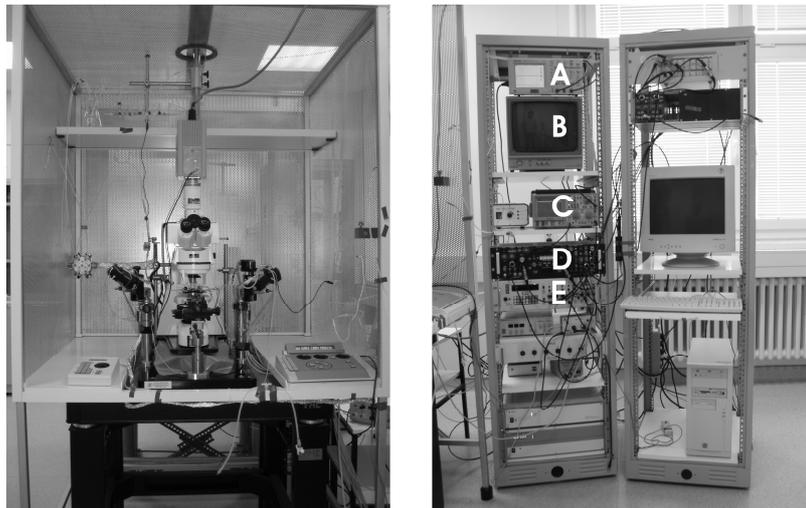
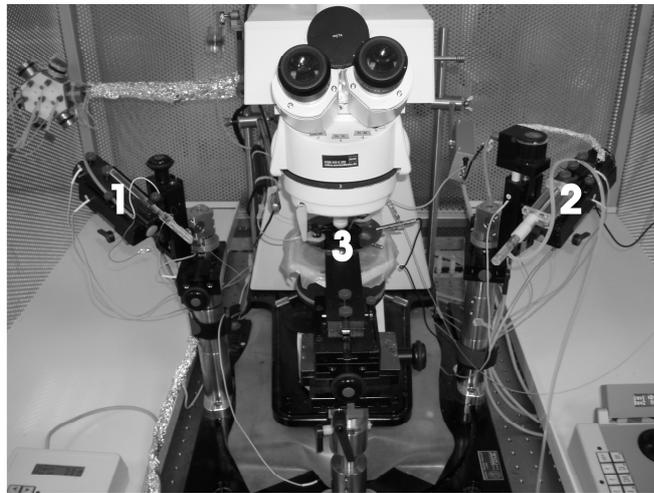


Abbildung 6: Versuchsaufbau. Oben: Nahaufnahme des Patchbereiches, links unten: Übersicht Patchaufbau, rechts unten: Übersicht des Geräteaufbaus. 1: Stimulationselektrode, 2: Pipettenhalter, 3: Messkammer, A: Oszilloskop, B: Videomonitor der CCD-Kamera, C: Oszilloskop, D: Verstärker, E: Impulsgenerator.

Verwendete Geräte und Hersteller:

- 1) Mikroskop (Axioskop 2FS MOT, Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- 2) Diskontinuierlicher Verstärker (SEC-10LX, NPI Electronic, Tamm, Germany)
Abbildung 6 (D)
- 3) AD-Wandler (Digidata 1322, Axon Instruments, Foster City, USA)
- 4) Oszilloskope:
Kapazitätskompensation (TDS 210, Tektronix, Beaverton, USA), Abbildung 6 (A)
Kompensation des Pipettenwiderstandes (HM 205-3, Hameg, Frankfurt a. M.,
Deutschland), Abbildung 6 (C)
- 5) Impulsgenerator (Master-8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel), Abbildung 6 (E)
- 6) Reizgeber für Stimulationselektrode (Iso-Flex, A.M.P.I., Jerusalem, Israel)
- 7) Charge Coupled Device (CCD)-Kamerasystem
(C 2400-07, Hamamatsu Photonics, Japan)
- 8) Video-Monitor (WV-BM 1410/G, Panasonic, Philippinen), Abbildung 6 (B)

2.6 Praktische Durchführung der Messungen

Als Vorstufe zur Herstellung der für die Erhebung der elektrophysiologischen Daten notwendigen Whole-cell-Konfiguration (Abbildung 7) wurde jeweils mittels Unterdruck ein mechanisch stabiler, elektrisch hochohmiger Kontakt zwischen der Glaspipette und der Membran der ausgewählten Zelle hergestellt (Gigaseal).

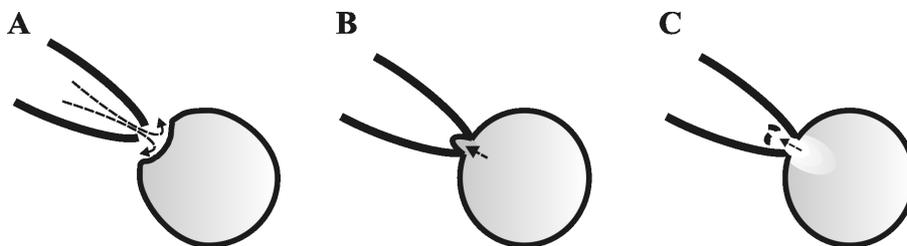


Abbildung 7: Herstellung der Whole-cell-Konfiguration. A: Annäherung der Patchpipette an die Zelle mit angelegtem Überdruck. B: Durch Ablassen des Überdrucks und evtl. Anlegen eines leichten Unterdrucks kommt es zur Ausbildung eines Gigaseals (Cell-attached-Konfiguration). C: Um die Whole-cell-Konfiguration zu erzeugen wird durch Erhöhung des Unterdrucks der Patchpipette der Membranbereich unter der Pipette durchbrochen. Innerhalb kurzer Zeit diffundiert die Pipettenlösung in das Zellinnere.

Die Zelle befand sich danach in der sogenannten Cell-attached-Konfiguration. Durch die Erhöhung des schon bestehenden Unterdrucks wurde direkt unter der Pipettenspitze ein Durchbruch der Zellmembran erreicht (Whole-cell-Konfiguration). Es entstand ein direkter Zugang zum Zytoplasma der Zelle und damit eine direkte elektrisch leitende Verbindung zwischen der in die Pipette eintauchenden Elektrode, einem mit Silberchlorid beschichteten Silberdraht, und dem intrazellulären Raum. Die Pipette war mit Intra-zellulärlösung (siehe Kapitel 2.4) gefüllt, die bei den Untersuchungen zur synaptischen Transmission auch den Natriumkanalblocker Lidocain-N-Ethyl-Bromid (QX-314) enthielt.

Direkt vor jeder Messung wurde für jede Zelle eine neue Patchpipette aus einer Borosilicate Glasskapillare 1,5 mm O.D. x 0,86 mm I.D. (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) mit einem DMZ-Universal Puller (Zeitz-Instruments, München, Deutschland) im Zweizugverfahren hergestellt. Der jeweils mit der Patch-clamp-Anlage gemessene Pipettenöffnungswiderstand betrug 2-5 M Ω in der Badlösung.

Bei den Untersuchungen postsynaptischer Ströme wurde das Membranpotential auf -70 mV geklemmt. Die präsynaptische Erregung geschah hier mittels elektrischer Stimulation von Axonen der Schaffer Kollateral/Kommissurenbahn. Das Halten der konstanten Spannung an der Pipettenelektrode erforderte einen Strom, der den Ionenstrom durch die Leitfähigkeitsänderungen im Bereich der Synapse bzw. der Zellmembran kompensierte. Bei der eingestellten Spannung entsprach dieser Strom damit dem transmembranalen Ionenstrom in die Zelle. Der transmembranale Ionenstrom selbst ist einer Messung unzugänglich.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen postsynaptischer Ströme diente bei den Messungen der Aktionspotentiale die Pipettenelektrode auch gleichzeitig als Erregungsquelle. Als Erregung wurde der Strom durch die Zellmembran vorgegeben und an der Pipettenelektrode die sich einstellenden Aktionspotentialverläufe gemessen.

Die Auswahl der untersuchten CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus geschah innerhalb der Hirnschnittpräparate mit dem Mikroskop nach optischen Kriterien wie Lokalisation, Zellform und -größe.

2.7 Messprotokolle

Im ersten Teil der Untersuchungen zur synaptischen Transmission wurden Messungen an der vollständigen Übertragungskette – präsynaptisches Axon, Synapse und postsynaptische Zelle – durchgeführt. Die Untersuchungen von Aktionspotentialen im zweiten Teil fanden demgegenüber an einzelnen Zellen innerhalb des Hirnschnittes statt.

2.7.1 Untersuchungen zur synaptischen Transmission – postsynaptische Ströme

Für die Untersuchung der synaptischen Transmission befand sich die Patch-clamp-Anlage im Voltage-clamp-Modus. Die Auslösung der erregenden postsynaptischen Ströme (excitatory postsynaptic currents, EPSCs) erfolgte mittels Stimulation präsynaptischer Axone. Dazu wurde eine Stimulationselektrode, wie von Igelmund und Heinemann, 1995 sowie Seeger et al., 2004 beschrieben, im Stratum radiatum des Hippocampus platziert (Abbildung 8). Mit ihr konnten die Schaffer Kollateralen, welche die synaptische Verbindung zwischen CA3- und CA1-Region des Hippocampus darstellen, gereizt und so eine monosynaptische Aktivierung der CA1-Pyramidenzellen erzeugt werden.

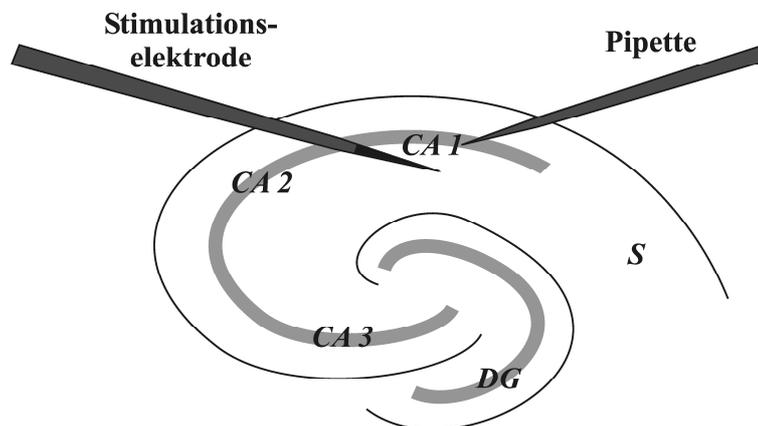


Abbildung 8: Lokalisation der Stimulationselektrode und der Pipette. Die Stimulationselektrode wurde im Stratum radiatum des Hippocampus platziert, um bei den Messungen postsynaptischer Ströme über eine Reizung der Schaffer Kollateralen eine monosynaptische Aktivierung der CA1-Pyramidenzellen zu erzeugen. Mit der Patchpipette wurden postsynaptische Ströme und Aktionspotentialverläufe der entsprechenden Pyramidenzellen der CA1-Region gemessen. CA: Cornu ammonis, DG: Gyrus dentatus, S: Subiculum.

Der Versuchsablauf an jeder Zell-Synapsen-Anordnung setzte sich aus zwei Abschnitten zusammen. Im ersten Abschnitt wurden über die Stimulationselektrode Doppelimpulse (Paired pulses), stufenweise von Messung zu Messung in 100 μA -Schritten steigend, bis zu einer Reizstärke von 1000 μA injiziert. Die beiden Impulse wiesen auf jeder μA -Stufe einen zeitlichen Abstand von 50 ms auf. Die Abfolge der Impulse wurde mit Hilfe des Master-8 generiert, der über eine Iso-Flexeinheit die Stimulationselektrode ansteuerte. Pro Stimulationsstufe wurden fünf Zellantworten gemessen und gemittelt.

Abbildung 9 zeigt beispielhaft den gemittelten Stromverlauf einer Stimulationsstufe.

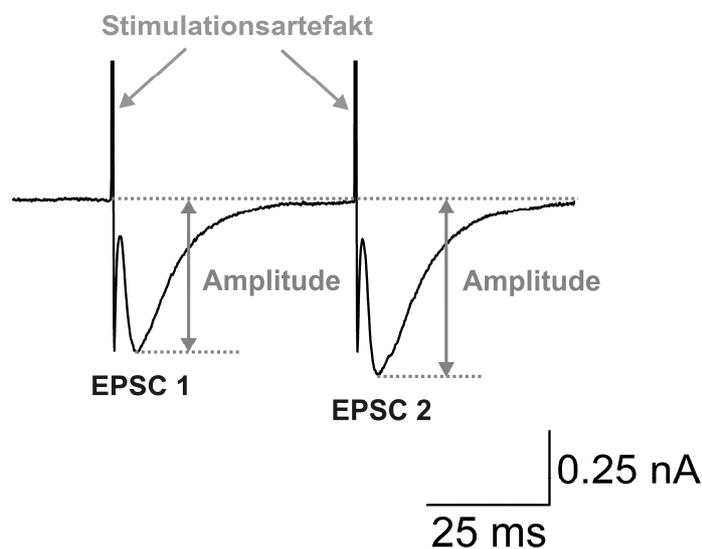


Abbildung 9: Durch elektrische Reizung der Schaffer Kollateralen erzeugte EPSCs in CA1-Pyramidenzellen. Darstellung der gemessenen Ströme während der Doppelpulsstimulation. Gemessen wurden jeweils die Amplituden des EPSC 1 und EPSC 2.

Ausgewertet wurden die Amplituden der jeweils ersten EPSCs der Strom-Antwort-Kurven. Diese lieferten über ihre Größe im Verhältnis zur verwendeten Höhe des Stimulationsstromes Rückschlüsse auf die Qualität der synaptischen Übertragung. Zusätzlich wurde das Amplitudenverhältnis EPSC 2 / EPSC 1 (Paired-pulse-Ratio) ermittelt (Abbildung 9). Hiermit sollten Anhaltspunkte über die Kurzzeitplastizität der Pyramidenzellen gewonnen werden (s. Abschnitt 3.1). Abweichungen des Amplitudenverhältnisses von 1 können sowohl prä- als auch postsynaptisch bedingt sein. Die Veränderungen lassen sich je nach Dauer ihres Auftretens in drei verschiedene Gruppen einteilen: synaptische Facilitation, Augmentation und posttetanische Potenzierung (Zucker, 2002; Wang et al., 1997).

Jeweils direkt im Anschluss an die Erregung mit Doppelimpulsen wurden die präsynaptischen Neurone der Pyramidenzellen im zweiten Abschnitt des Versuchsablaufs repetitiv mit Blöcken von jeweils sechs Impulsen (Seeger et al., 2004) mit einer Stärke von 500 μA stimuliert. Auch hier besaßen die einzelnen Impulse innerhalb jeden Blocks einen zeitlichen Abstand von 50 ms. Diese blockweise Stimulation wurden bei jeder Zell-Synapsen-Anordnung fünf Mal wiederholt und die dabei gemessenen fünf Zeitverläufe der postsynaptischen Ströme gemittelt. Um mögliche Unterschiede in der Kurzzeitplastizität zu erkennen, wurden die Amplituden der 5 Folge-EPSCs in jedem gemittelten Zeitverlauf ins Verhältnis zur Amplitude des jeweils ersten EPSCs gesetzt und wiederum über alle Zell-Synapsen-Anordnungen gemittelt.

2.7.2 Untersuchungen zu Aktionspotentialen (Feuerverhalten)

Im zweiten Teil der Untersuchung lag das Hauptaugenmerk auf Veränderungen des zeitlichen Spannungsverlaufes an einzelnen Zellen unter Vorgabe des Stroms (Feuerverhalten). Die verschiedenen Messungen mit der Patch-clamp-Anlage fanden im Current-clamp-Modus statt, ausgehend von einem eingestellten Potential von -70 mV über der Membran der untersuchten Zellen.

Vor Beginn der Hauptmessung wurde jeweils das vorhandene Eigenmembranpotential der untersuchten Zelle gemessen. Damit ergaben sich Anhaltspunkte für die Zellqualität und die Güte des sich zwischen Patchpipette und Zellmembran ausgebildeten Seals. Des Weiteren konnten Rückschlüsse auf die intrinsischen Eigenschaften der Pyramidenzellen gezogen werden. Zellen mit einem Ruhemembranpotential positiver als -40 mV wurden von den Messungen ausgeschlossen, da bei diesen Werten erfahrungsgemäß keine ausreichende Qualität der Zellen und des Seals mehr gewährleistet war.

Nach den Eingangs- bzw. Kontrolluntersuchungen wurden kurze, ca. 2 ms andauernde stimulierende Stromimpulse direkt über die Elektrode der Patchpipette in das Soma der Zelle injiziert. Die Stärke der injizierten Stromimpulse wurde von Impuls zu Impuls ausgehend von 0,01 nA langsam erhöht. Hierdurch fand eine zunehmende Depolarisation der Zellmembran statt, die bei Erreichen des Schwellenpotentials zur Ausbildung eines Aktionspotentials führte. Bei Generierung eines kompletten Aktionspotentials der Pyramidenzelle wurde jeweils die Messung beendet.

Für den Vergleich der einzelnen Aktionspotentiale miteinander wurden die gängigen Parameter herangezogen (Bean, 2007). Neben Schwellenwert und maximaler Amplitude sind dies die Anstiegssteilheit, die halbmaximale Breite und die Breite in Höhe des Schwellenwertes (Abbildung 10). Auf diese Werte reduziert, lässt sich der zeitliche Verlauf der Aktionspotentiale gezielt charakterisieren. Unterschiede können der De- und/oder Repolarisationsphase und damit bestimmten Kanalpopulationen zugeordnet werden.

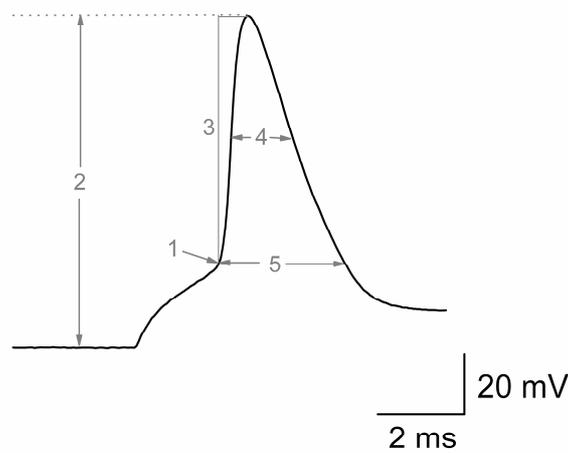


Abbildung 10: Gängige Aktionspotential-Parameter: 1 = Schwellenwert, 2 = maximale Amplitude, 3 = Anstiegsgeschwindigkeit zwischen dem Schwellenwert und dem maximalen Amplitudenwert, 4 = halbmaximale Breite, 5 = Breite in Höhe des Schwellenwertes.

Direkt im Anschluss an die Messung einzelner Aktionspotentiale wurde in die Pyramidenzellen eine Folge von abwechselnd de- und hyperpolarisierenden Strom-Rechteckimpulsen injiziert. Die abwechselnde Impulsfolge diente dazu, eine Inaktivierung der spannungsabhängigen Ionenkanäle zu verhindern. Die Länge der Rechteckimpulse betrug jeweils 1 Sekunde. Innerhalb der Folge stieg die Impulsamplitude sowohl der de- wie der hyperpolarisierenden Strom-Rechteckimpulse von 0,01 bis 0,2 nA in Schritten von 0,01 nA an (Abbildung 11). Dabei wurde die Amplitude der hyperpolarisierenden Stromrechteckimpulse nicht über den Wert gesteigert, der als Folge ein Membranpotential tiefer als -100 mV ausgelöst hätte, um eine Zellschädigung durch ein zu negatives Membranpotential zu vermeiden.

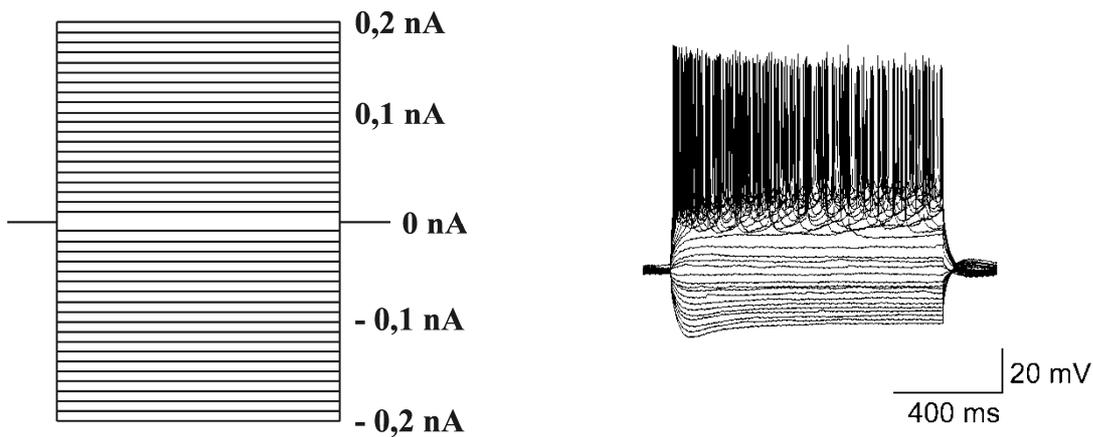


Abbildung 11: De- und hyperpolarisierende Stromrechteckimpulse (links) und resultierende Aktionspotentialfolgen einer CA1-Pyramidenzelle (rechts).

Durch die Injizierung zeigten die Zellen während der Dauer depolarisierender Stromrechteckimpulse sehr komplexe Aktionspotentialverläufe als Antwort. Entsprechend umfangreich war hier auch die Auswertung anzusetzen. Erfasst und verglichen wurden alle Aktionspotentiale, die mit ihrer maximalen Amplitude mind. 0 mV erreichten. Es wurden folgende Auswertungen vorgenommen bzw. Parameter bestimmt:

- Anzahl der Aktionspotentiale jeweils über die Dauer der depolarisierenden Stromimpulse
- Anzahl der sich ausbildenden Aktionspotentiale jeweils in den ersten bzw. letzten 400 ms der depolarisierenden Stromimpulse zur Erfassung der mittleren Frequenzadaptation über der Impulsdauer (Abbildung 12)

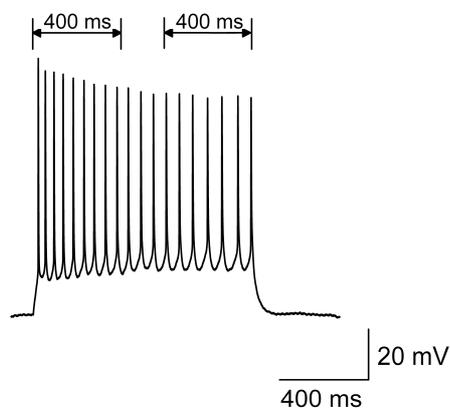


Abbildung 12: Auswertung der Anzahl der Aktionspotentiale in den ersten und letzten 400 ms. Originalspur einer 1 Sekunden Stimulation mit 0,1 nA.

- Zeitliche Abstände der jeweils ersten und letzten beiden Aktionspotentiale im Zuge der depolarisierenden Stromimpulse zur Erfassung der maximal auftretenden Frequenzadaptation von Impulsanfang bis Impulsende (Abbildung 13)

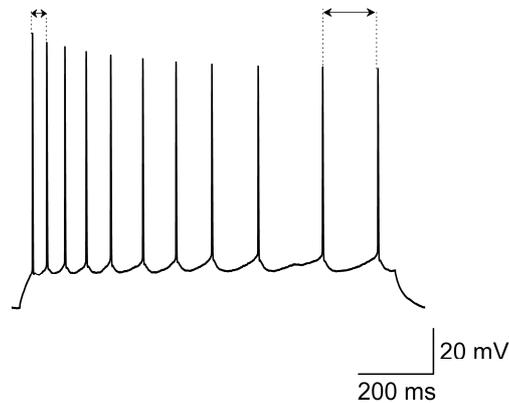


Abbildung 13: Auswertung der Abstände zwischen den ersten beiden und den letzten beiden Aktionspotentialen. Originalspur einer 1 Sekunden Stimulation mit 0,1 nA.

- Bestimmung des Potentialrückgangs während der Dauer hyperpolarisierender Stromimpulse nach Durchlaufen der maximalen Hyperpolarisation (Abbildung 14). Verglichen wurden alle Potentialverläufe, bei denen die maximale Hyperpolarisation in der Nähe von -85 mV lag.

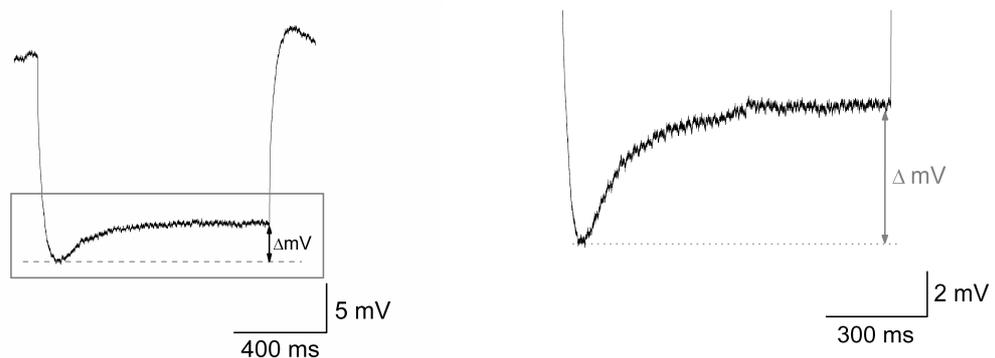


Abbildung 14: Auswertung des Potentialrückgangs (Δ mV). Potentialverlauf bei einer maximalen Hyperpolarisation auf ca. -85 mV. Links: Originalspur – Rechts: Vergrößerung des Rechtecks aus der linken Abbildung.

- Bestimmung des Potentialminimums während der Nachhyperpolarisationsphase bei allen depolarisierenden Stromimpulsen mit einer Amplitude von 0,1 nA (Abbildung 15)

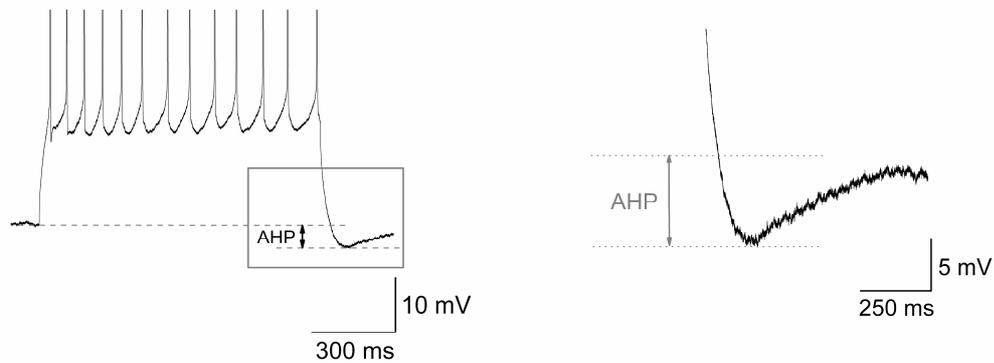


Abbildung 15: Auswertung der Nachhyperpolarisation (AHP). Links: Originalspur einer 1 Sekunden Stimulation mit 0,1 nA. Rechts: Vergrößerung des Rechtecks aus der linken Abbildung.

2.8 Darstellung der Ergebnisse

Die erhobenen Daten wurden mit den Programmen pClamp 9.2 (Axon Instruments, Foster City, USA) und OriginPro 7 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) ausgewertet und analysiert.

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler ermittelt. Die Angabe der Standardfehler erfolgte generell als Balkendarstellung in den Abbildungen zusammen mit den in Form von Mittelwerten dargestellten Ergebnispunkten. Da die Messwertkollektive keine – auch nicht näherungsweise – Normalverteilung zeigten, wurde die statistische Signifikanz mit dem nicht parametrischen Test nach Mann-Whitney überprüft. Die Unterschreitung bestimmter Signifikanzschwelle wurde in der üblichen Weise dargestellt. So sind statistisch signifikante Werte ($p < 0,05$) mit * und hoch signifikante Werte ($p < 0,01$) mit # gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Der eingangs in dieser Arbeit dargelegte Erkenntnisstand weist der β -Sekretase (BACE 1) eine bedeutende Rolle in der Pathologie der Alzheimerschen Erkrankung zu. Die Auswirkungen des Fehlens bzw. Blockierens dieses Enzyms auf die physiologischen Abläufe stehen deshalb vor Überlegungen zu therapeutischen Ansätzen als erstes im Blickpunkt des Interesses. Die im Folgenden vorgestellten elektrophysiologischen Ergebnisse von CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus sollen einen Beitrag zur Bedeutung der β -Sekretase für die zentralnervöse Erregbarkeit und Signalübertragung leisten.

Ebenso wie die Versuchsdurchführung erfolgt die Darstellung der Ergebnisse in zwei Teilen:

- Ergebnisse aus den Untersuchungen zur synaptischen Transmission
- Ergebnisse aus den Untersuchungen zur intrinsischen Erregbarkeit

3.1 Synaptische Transmission

Um die postsynaptischen Ströme frei von den Auswirkungen ‚ungeklemmter‘ Aktionspotentiale messen zu können, wurde der Pipettenlösung bei allen Versuchen in diesem Teil der Untersuchungen der Na^+ -Kanalblocker Lidocain-N-Ethyl-Bromide (QX-314) zugegeben (Strichartz, 1973; Yeh, 1978; Connors und Prince, 1982; Isaac und Wheal, 1993).

Wie im Methodenteil beschrieben (vgl. Kap. 2.7.1), wurden in CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 $-/-$ und BACE 1 $+/+$ Mäusen postsynaptische Ströme durch Doppelpulsstimulation mit ansteigender Reizstärke hervorgerufen. Nach Mittelung von jeweils 17 Stromverläufen, die für jede eingesetzte Reizstärke aus den Versuchen mit Hippocampusschnitten von BACE 1 $+/+$ Mäusen und von jeweils 15 Stromverläufen, die entsprechend für jede Reizstärke aus den Versuchen mit Hippocampusschnitten von BACE 1 $-/-$ Mäusen gewonnen wurden, ergaben sich für die Amplituden der ersten EPSCs die in Abbildung 16 dargestellten Verhältnisse. Wichtig zur Bewertung der Ergebnisse ist, dass jeder Stromverlauf bereits aus einer Mittelung von jeweils 5 Wiederholungen im zeitlichen Abstand von rund 2 Sekunden mit gleichem Stimulationsimpuls entstand, sodass

jedem gekennzeichneten Ergebnispunkt in Abbildung 16 letztlich die Mittelung über 85 aufgezeichnete Stromkurven bei BACE 1 +/+ Mäusen bzw. 75 aufgezeichnete Stromkurven bei BACE 1 -/- Mäusen zugrunde liegt. Generell zeigten die gemittelten Amplituden der ersten EPSCs bei den BACE 1 +/+ Mäusen unabhängig von der Stimulationsstufe zwar leicht höhere Werte gegenüber den gemittelten Amplituden bei den BACE 1 -/- Mäusen, die Unterschiede ließen sich jedoch nicht durch Signifikanz nachweisen.

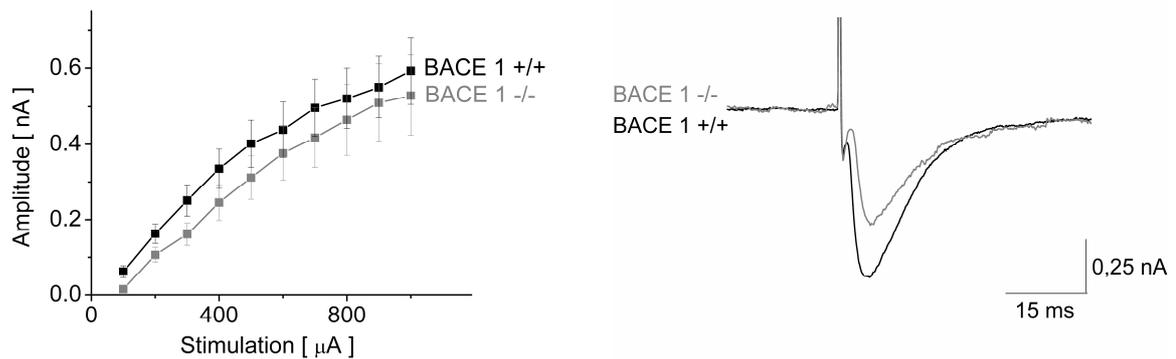


Abbildung 16: Amplitude des ersten EPSC. Links: Mittelwerte der Amplituden des ersten EPSCs der Wildtyp (BACE 1 +/+, n = 17) und Knockout (BACE 1 -/-, n = 15) Tiere, rechts: Originalspuren des EPSC 1 der Paired-pulse-Stimulation.

Analoges gilt auch für die Verhältnisse der gemittelten Amplituden EPSC 2 / EPSC 1 (Paired-pulse-Ratio) als Maß für die Kurzzeitplastizität beim Doppelpuls. Abbildung 17 zeigt die erhaltenen Ergebnisse. Auch hier liegt jedem gekennzeichneten Ergebnispunkt die Mittelungen über 85 Stromkurven bei BACE 1 +/+ Mäusen bzw. 75 Stromkurven bei BACE 1 -/- Mäusen zugrunde. Sowohl bei den BACE 1 +/+ Mäusen als auch bei den BACE 1 -/- Mäusen ließ sich zwar eine durchgehende Erhöhung (Paired-pulse-Facilitation (PPF), Ratio >1) der Amplitude des zweiten EPSCs um den Faktor rund 1,25 gegenüber der Amplitude des jeweiligen ersten EPSCs auf allen Stimulationsstufen feststellen, allerdings ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Tiergruppen (Abbildung 17).

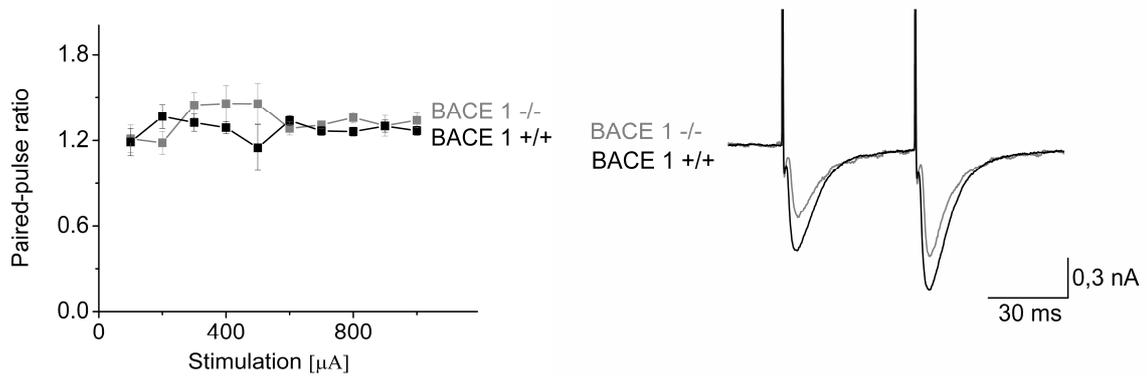


Abbildung 17: Paired-pulse-Ratio. Links: Dargestellt sind die Mittelwerte der Paired-pulse-Ratio von Wildtyp-Mäusen (BACE 1 +/+, n = 17) und Knockout Mäusen (BACE 1 -/-, n = 15) bei unterschiedlichen Stimulationsstärken, rechts: Originalspur einer Paired-pulse-Stimulation.

Zur weiteren Analyse der Kurzzeitplastizität folgte die Untersuchung der synaptischen Transmission an den CA1-Pyramidenzellen der BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäuse mit repetitiver Stimulation in Form von Sechserpulsen (Abbildung 18). Die gewählte Stärke der Impulse betrug 500 µA. Als Maß für die Kurzzeitplastizität bei mehrfach wiederholter Stimulation wurden hier die Amplituden der fünf Folge-EPSCs ins Verhältnis zur Amplitude des jeweils ersten EPSCs gesetzt (Sechserpuls-Ratio) (vgl. Kap. 2.7.1).

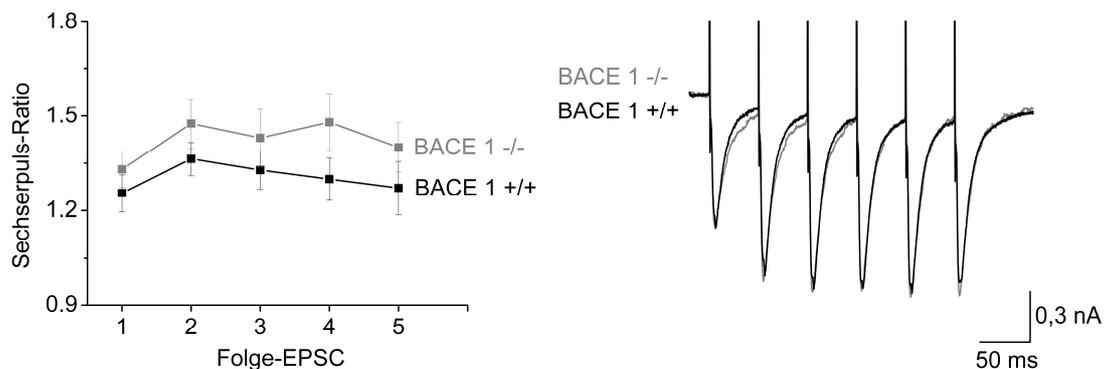


Abbildung 18: Sechserpulsstimulation bei 500 µA. Links: Normierung der fünf Folge-EPSCs zum ersten EPSC (BACE 1 +/+: n = 15, BACE 1 -/ -: n = 12), 1 = EPSC 2 / EPSC 1, 2 = EPSC 3 / EPSC 1 usw., rechts: Originalspuren der Sechserpuls-Stimulation.

Zwar zeigten hier die beiden Versuchstiergruppen eine leicht voneinander verschiedene Sechserpulsratio, jedoch ohne eine nachweisbare Signifikanz. Generell war für beide Tiergruppen festzustellen, dass die Amplituden aller Folge-EPSCs größer waren als die jeweilige Amplitude des ersten EPSCs. Es zeigte sich zunächst ein Anwachsen der

Amplituden unterschiedlich teils bis zur zweiten, teils aber auch bis zur vierten Wiederholung mit anschließendem leichten Rückgang.

3.2 Messung zum Feuerverhalten

Im Gegensatz zu den in der Synapse unter Beteiligung von Transmittern ablaufenden Vorgängen im ersten Teil der Untersuchungen standen im zweiten Teil die intrinsische Erregbarkeit der Pyramidenzellen im Blickpunkt des Interesses. Die Ergebnisse der zur vorbereitenden Kontrolle der Zellen durchgeführten Messungen des Ruhemembranpotentials gibt Tabelle 1 wieder.

Wie Tabelle 1 verdeutlicht, ergaben sich zwischen den beiden Versuchstiergruppen (BACE 1 +/+ und BACE 1 -/-) keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 1: Ruhemembranpotential der gemessenen CA1-Pyramidenzellen.

Im Vergleich der beiden Versuchstiergruppen (BACE 1 +/+ und BACE 1 -/-) miteinander zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Ruhemembranpotentials.

| | BACE 1 +/+ | BACE 1 -/- |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Mittelwert | -56,1 mV | -58,5 mV |
| Standardfehler | 2,1 mV | 2,0 mV |

3.2.1 Vergleich von Form und Verlauf einzelner Aktionspotentiale

Abbildung 21 zeigt beispielhaft den Zeitverlauf einzelner Aktionspotentiale, die an CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäusen nach Steigerung des transmembralen Stromes bis zur Aktionspotentialauslösung aufgenommen wurden. Das Kollektiv der 14 Zellen von BACE 1 +/+ Mäusen bzw. 11 Zellen von BACE 1 -/- Mäusen, an denen die Untersuchungen vorgenommen wurden, stammte von 3 Mäusen jeden Typs.

Weder in der Abbildung 19 noch in der Tabelle 2, in der die charakteristischen Größen der Zeitverläufe (s. Kap. 2.7.2, Abbildung 10) zusammengefasst sind, lassen sich signifikante Unterschiede feststellen.

Tabelle 2: Eigenschaften der Aktionspotentiale.

Alle Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler (vgl. Kap. 2.6.2 Abb. 8). Es zeigen sich bei keinem der gemessenen Werte signifikante Unterschiede zwischen BACE 1 $+/+$ und BACE 1 $-/-$ Tieren. Weder der zeitliche Verlauf noch die Ausprägung der Aktionspotentiale zeigen signifikante Differenzen.

| | BACE 1 $+/+$ (n = 14) | BACE 1 $-/-$ (n = 11) |
|---|-----------------------|-----------------------|
| Schwellenwert [mV] | $-32,6 \pm 1,7$ | $-31,9 \pm 1,3$ |
| max. Amplitude [mV] | $102,9 \pm 4,5$ | $102,9 \pm 3,4$ |
| Breite des Aktionspotentials am Schwellenwert [ms] | $3,3 \pm 0,4$ | $3,2 \pm 0,3$ |
| halbmax. Breite [ms] | $1,6 \pm 0,1$ | $1,6 \pm 0,08$ |
| Anstiegsgeschwindigkeit [mV/ms] | $107,6 \pm 14,3$ | $95,8 \pm 8,8$ |

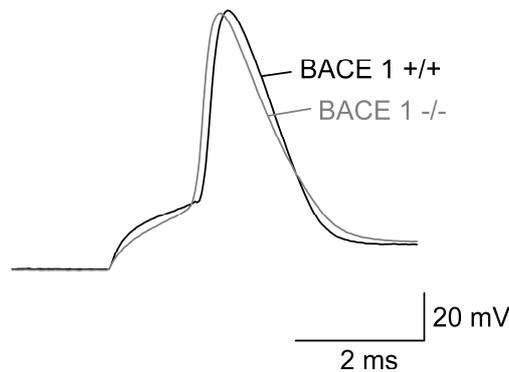


Abbildung 19: Verlauf eines Aktionspotentials im direkten Vergleich von BACE 1 $+/+$ und BACE 1 $-/-$. Dargestellt sind die Originalspuren der Aktionspotentiale einer BACE 1 $+/+$ und einer BACE 1 $-/-$ CA1-Pyramidenzelle.

3.2.2 Vergleich der Feuerfrequenzen und des Adaptionsverhaltens

Die weiteren Untersuchungen zum Feuer- und Adaptionsverhalten wurden in gleicher Versuchsanordnung an denselben Zellen vorgenommen, an denen zuvor die Messungen zum Verlauf einzelner Aktionspotentiale durchgeführt worden waren. Dies verbesserte die Voraussetzungen für Schlussfolgerungen über gegebenenfalls vorhandene Korrelationen zu den Ergebnissen der Einzelmessung von Aktionspotentialen.

Als erstes konnte aus den Ergebnissen der Versuche, die speziell auf der kleinsten Stufe bei den hyperpolarisierenden Rechteckimpulsen erhalten wurden, der Ohmsche Widerstand der Zellmembran von CA1-Pyramidenzellen der BACE 1 $-/-$ und BACE 1 $+/+$ Mäuse bestimmt werden. Dazu wurde das Verhältnis der während der Hyperpolarisationsphase gemessenen Spannungsabweichung (ΔV) zum vorgegebenen Strom (ΔI) gebildet (Abbildung 20). Mit den so bestimmten Widerständen ließ sich auf die elektrischen Ruheeigenschaften der Zellmembran bei noch nicht geöffneten spannungsabhängigen Kanälen schließen. Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen zeigten sich die Eingangswiderstände der Zellen von BACE 1 $-/-$ Mäusen signifikant größer als die der BACE 1 $+/+$ Mäuse.

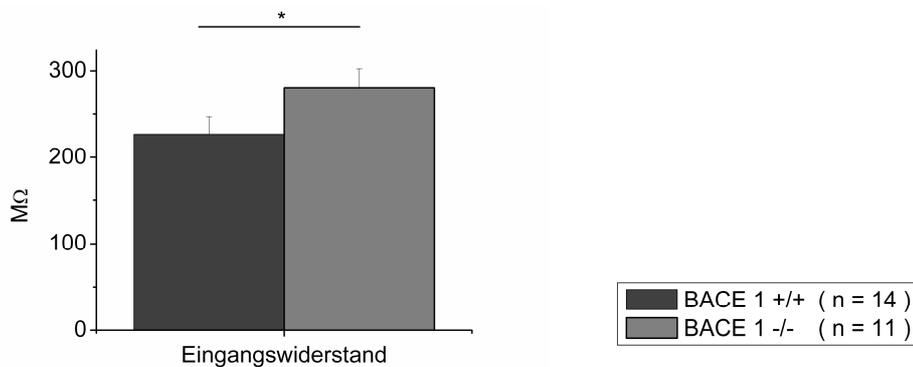


Abbildung 20: Eingangswiderstand der CA1-Pyramidenzellen bei BACE 1 $+/+$ (n = 14) und BACE 1 $-/-$ (n = 11) Mäusen.

Mit wachsender Stärke der stimulierenden Rechteckimpulse bildeten sich im weiteren Versuchsablauf während der depolarisierenden Phase nach Erreichen und Überschreiten der Aktionspotentialschwelle repetitive Aktionspotentiale aus, wobei die mittlere Folgefrequenz der Aktionspotentiale mit der Impulsstärke im untersuchten Bereich monoton zunahm und bei den höheren Stimulationsstufen alle Anzeichen eines Steady-state-Verhaltens zeigte. Dabei lagen die erreichten Feuerfrequenzen der CA1-Pyramidenzellen der BACE 1 $-/-$ Mäuse im Mittel fast durchgehend hoch signifikant über denen, die sich bei BACE 1 $+/+$ Mäusen zeigten (Abbildung 21).

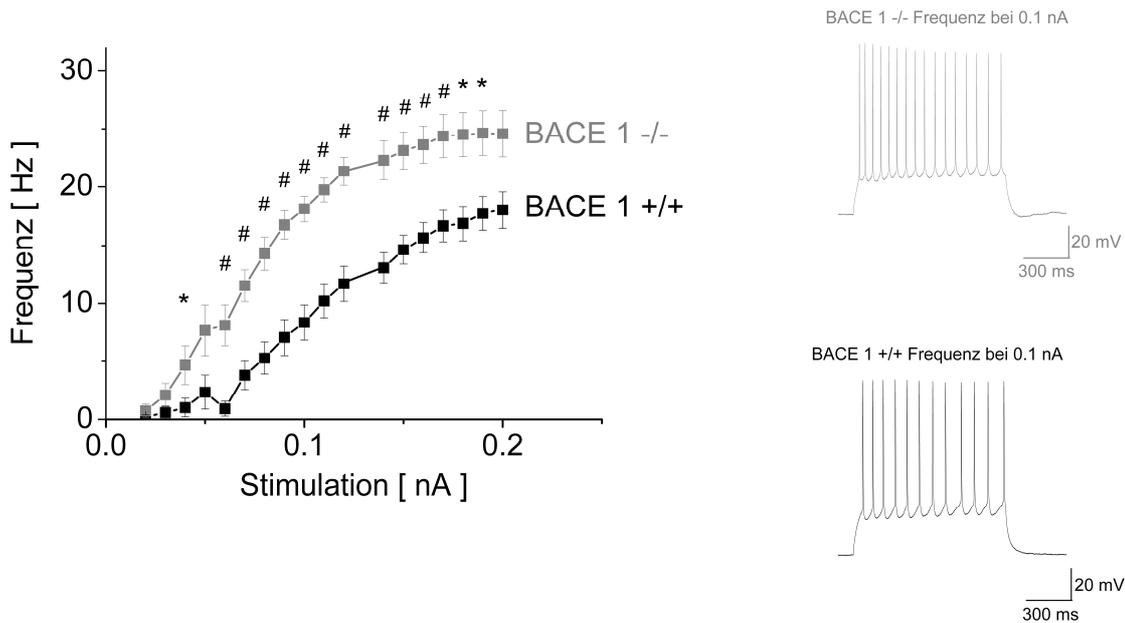


Abbildung 21: Mittlere Feuerfrequenzen der verschiedenen Stimulationsstufen. Dargestellt sind die gemittelten Aktionspotentialfrequenzen in Abhängigkeit von den verschiedenen Stimulationsstärken 0,02 bis 0,2 nA der Stromimpulse. BACE 1 +/+ : n = 9 – 14, BACE 1 -/- : n = 6 – 11. * = signifikante Unterschiede, # = hoch signifikante Unterschiede.

Die unterschiedliche Anzahl der gemessenen Zellen, die in Abbildung 21 in die Mittelwertbildung pro Stimulationsstufe eingegangen sind, lässt sich durch die nicht immer exakte Übereinstimmung von ablesbarer manueller Einstellstufe und tatsächlich eingestellter Stimulationsstärke am Impulsgenerator erklären, was sich erst nach genauer Auswertung der erhaltenen Daten feststellen ließ. Dies begründet auch das Fehlen des Wertes auf der Stimulationsstärke 0,13 nA. Dieser wurde aufgrund einer zu geringen Messwertanzahl von der Auswertung ausgeschlossen.

Da sich die Aktionspotentiale im Verlauf eines depolarisierenden Rechteckimpulses nicht periodisch mit konstanter Folgefrequenz darstellen, sondern in ihrer Frequenz abfallen, wurde zur weiteren Analyse des Feuerfrequenzverhaltens die Anzahl der Aktionspotentiale der CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäusen jeweils in den ersten 400 ms und den letzten 400 ms jeder Stimulationsantwort bestimmt und miteinander verglichen. Dies sollte eine erste Differenzierung insbesondere auch der Frequenzänderung zwischen der Anfangsphase (die ersten 400 ms) und dem Steady-state (die letzten 400 ms) der Frequenzverläufe ermöglichen.

Abbildung 22 zeigt anhand der Ergebnisse der Auszählung, dass die schon für die mittleren Feuerfrequenzen zwischen den CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 $-/-$ und BACE 1 $+/+$ Mäusen festgestellten hoch signifikanten Unterschiede bei allen Stimulationsstufen sowohl in der Anfangsphase wie auch in der Endphase der Depolarisierungsimpulse auftreten. Mit den Ergebnissen der Auszählung der Aktionspotentiale ließen sich die zugehörigen mittleren Frequenzen errechnen. Bei beiden Tiergruppen war die näherungsweise, über der erste Hälfte der Impulse gemittelte Frequenz doppelt so groß wie die entsprechende Frequenz der zweiten Hälfte.

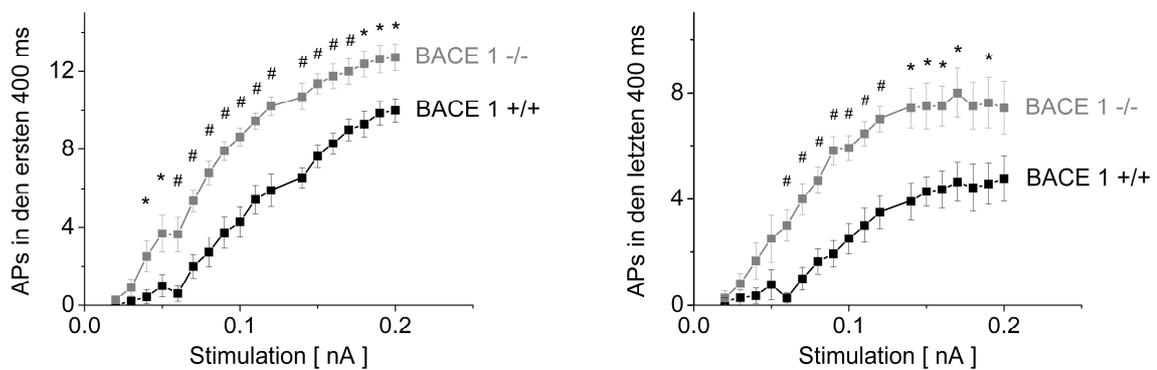


Abbildung 22: Anzahl der Aktionspotentiale in den ersten und den letzten 400 ms. Dargestellt sind die absoluten Werte der Anzahl an Aktionspotentialen in den ersten und in den letzten 400 ms der Zellantwort bei den verschiedenen großen Stimulationsstärken. BACE 1 $+/+$: n = 9 – 11, BACE 1 $-/-$: n = 6 – 11. * = signifikante Unterschiede, # = hoch signifikante Unterschiede.

Um die Aussagen hier weiter zu differenzieren wurde dieser mehr summarische Vergleich noch um den Vergleich der Abstände jeweils zwischen den ersten und letzten beiden Aktionspotentialen ergänzt (Abbildung 23). Mit den Kehrwerten der zeitlichen Abstände, jeweils als Periodendauer aufgefasst, ließen sich auch hier die zugehörigen Frequenzen ermitteln. Es zeigte sich, dass die Breite des von Anfang bis Ende der Depolarisationsimpulse durchlaufenen Frequenzbandes mit wachsender Stärke der Stromimpulse deutlich zunahm und bei den BACE 1 $-/-$ Mäusen rund doppelt so groß war wie bei den BACE 1 $+/+$ Mäusen. Die Frequenzen beider Tiergruppen unterschieden sich am Impulsende deutlich weniger voneinander als am Impulsanfang.

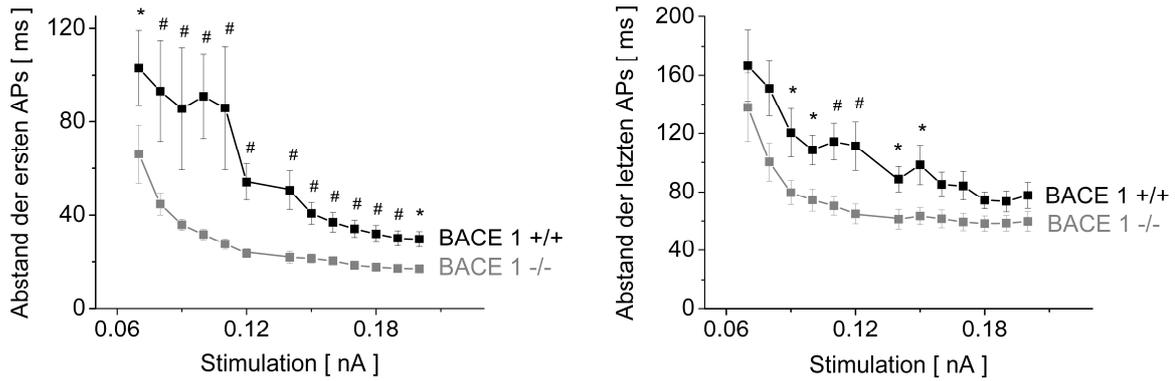


Abbildung 23: Abstände zwischen den ersten und den letzten beiden Aktionspotentialen. Dargestellt sind die Abstände der ersten beiden (links) und der letzten beiden (rechts) Aktionspotentialen innerhalb der Stimulationsantwort. BACE 1 +/+; n = 8 – 14, BACE 1 -/-; n = 7 – 11. * = signifikante Unterschiede, # = hoch signifikante Unterschiede. Stimulationsstärken unterhalb von 0.07 nA sind nicht gezeigt, da die Anzahl der Messungen zu gering war.

3.2.3 Vergleich der hyperpolarisationsaktivierten Potentialänderung

Zur weiteren Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften der Zellen wurde der Potentialverlauf während der hyperpolarisierenden Strominjektion in der vorangehenden Versuchsreihe und die durchlaufene Potentialdifferenz bei höchster Stromstärke ausgewertet. Durch die langsame Aktivierung hyperpolarisationsaktivierter Kationenkanäle kommt es bei anhaltender negativer Strominjektion zu einer allmählichen Abschwächung der Spannungsauslenkung, bis ein Steady-state-Wert erreicht wird. Die Differenz zwischen initialer und Steady-state-Hyperpolarisation wurde wie in Abbildung 14 beschrieben quantifiziert. In Abbildung 24 ist der Mittelwert aller gemessenen Potentialdifferenzen während maximaler negativer Strominjektion dargestellt. Im Vergleich der Mittelwerte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den CA1-Pyramidenzellen der BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäuse.

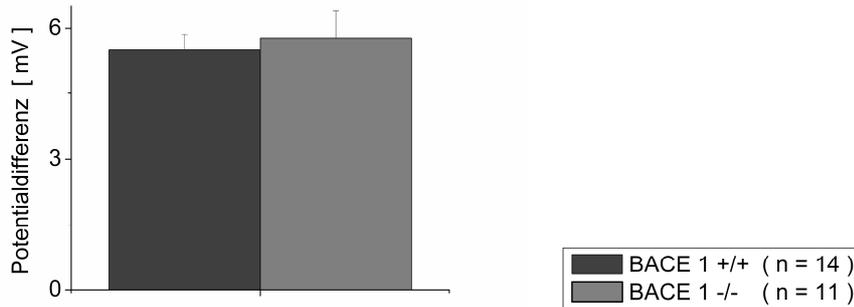


Abbildung 24: Vergleich der durch Hyperpolarisation induzierten Potentialdifferenz bei BACE 1 +/+ und BACE 1 -/- Mäusen.

3.2.4 Vergleich der Nachhyperpolarisation (AHP)

Nach Ende eines Depolarisationsimpulses setzt jeweils ein Ausgleichsvorgang ein, der die elektrischen Ruhewerte der Zellmembran wieder herzustellen sucht. Das Membranpotential fällt dabei temporär unter das Ruhepotential der Zelle (Nachhyperpolarisation), um sich danach dem Ruhepotential anzugleichen. Um die Nachhyperpolarisationen der Pyramidenzellen zu quantifizieren und zu vergleichen, wurden deren jeweilige Potentialminima wie in Abbildung 15 beschrieben bei einer mittleren Strominjektion von 0,1 nA bestimmt. Die in Abbildung 25 dargestellten Ergebnisse aus der Mittelung der jeweils bei den Pyramidenzellen von BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäusen gemessenen Nachhyperpolarisations-Amplituden zeigten bei großer Streuung der Mittelwerte keine mathematisch signifikanten Unterschiede.

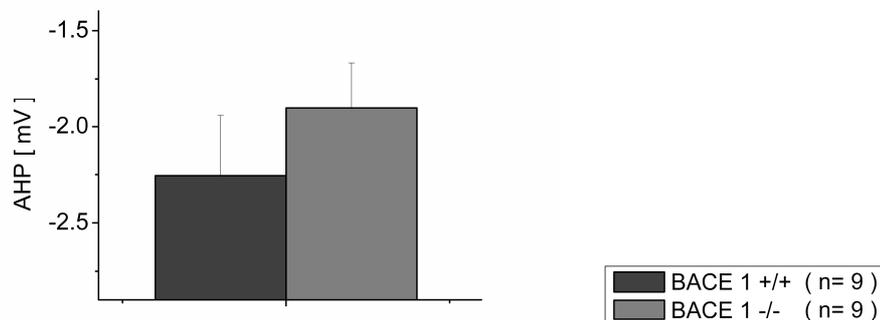


Abbildung 25: Nachhyperpolarisation (AHP) nach depolarisierender Strominjektion (0,1 nA, 1 s) bei BACE 1 +/+ und BACE 1 -/- Mäusen. In die Auswertung eingeschlossen wurden alle Zellen, die nach der Rechteckstimulation eine Nachhyperpolarisation aufwiesen.

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Synaptische Transmission

Die Untersuchung der postsynaptischen Erregung nach Stimulation präsynaptischer Axone mit Doppelpulsen (Paired pulses) gehört zu den etablierten Methoden, um die synaptische Kurzzeitplastizität zu dokumentieren (Leung und Fu, 1994). Von den dabei möglichen Messgrößen ist der Strom durch die Zellmembran, wie in dieser Arbeit gewählt, eine besonders direkte Möglichkeit, die Erregung aufzuzeichnen. Um darüber hinaus das Verhalten der Kurzzeitplastizität möglichst breit zu fassen, wurden in dieser Arbeit zusätzlich Stimulationen mit Sechserpulsblöcken untersucht.

Sowohl bei der Stimulation mit Doppelpulsen als auch bei der Stimulation mit Sechserpulsblöcken kann es entweder zu einer Verstärkung (Facilitation) oder zu einer Abschwächung (Depression) der zweiten bzw. der folgenden postsynaptischen Antworten kommen. Die Facilitation der Zellantwort wird mit einer erhöhten präsynaptischen Freisetzungswahrscheinlichkeit von Transmittern in Zusammenhang gebracht (Manabe et al., 1993; Lauri et al., 2007). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der höheren Konzentration freier Kalzium-Ionen in der präsynaptischen Endigung nach dem ersten Stimulationsimpuls. Eine Depression der synaptischen Antwort kann durch eine verminderte Anzahl sofort freisetzbarer Transmittervesikel, dem sog. Readily Releasable Pool, erklärt werden (Debanne et al., 1996; Thomson, 2000; Schneggenburger et al., 2002).

Bei den Untersuchungen mit Doppelpulsen zeigten sich in dieser Arbeit unabhängig vom Vorhandensein der β -Sekretase ausschließlich stärkere zweite postsynaptische Antworten. Auswertbare Unterschiede aus dem Verhältnis der maximalen Stromamplituden, als Maß für die Kurzzeitplastizität, wurden jedoch nicht erhalten. Unter den eingestellten Versuchsbedingungen wird der Vorgang der Freisetzung von Transmittern offenbar durch die β -Sekretase nicht oder nur in geringem Maße beeinflusst, zumal auch der Vergleich der gemessenen maximalen Stromamplituden bei vorhandener und fehlender β -Sekretase keinen signifikanten Unterschied ergab. Letzteres lässt den Schluss zu, dass hier weder präsynaptisch die Freisetzungsrates der Transmitter noch postsynaptisch Dichte und Funktion der Transmitter-aktivierten Ionenkanäle erkennbar von der β -Sekretase beeinflusst wurden.

Im Gegensatz zu den in dieser Dissertation gewonnenen Ergebnissen, ermittelten Laird et al., 2005 eine größere Paired-pulse-Ratio und eine Zunahme der Paired-pulse-Facilitation bei BACE 1 -/- gegenüber BACE 1 +/+ Mäusen. Zur Erklärung der Unterschiede der gemessenen Ergebnisse kann das Alter der untersuchten Mäuse eine wichtige Rolle spielen. Bei den vorliegenden Messungen hatten die Mäuse ein mittleres Alter von knapp 7 Monaten, während bei Laird et al., 2005 die Tiere 3 bis 6 Monate alt waren. Wie Zohar et al., 2005 zeigten, gibt es altersabhängige Unterschiede in der Expression der vier bekannten Spleißvarianten der β -Sekretase. Aktivitätsänderung der β -Sekretase in Korrelation zum Alter der Versuchstiere zeigten auch die Untersuchungen von Apelt et al., 2004.

Zudem unterschieden sich die während der Experimente von Laird et al. verwendeten Lösungen auch von denjenigen in der vorliegenden Arbeit. Hervorzuheben ist hierbei die unterschiedliche Konzentration von Ca^{2+} und Mg^{2+} in der Extrazellulärlösung (Tabelle 3). Insbesondere die höhere extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in Verbindung mit einer verminderten Mg^{2+} -Konzentration bei Laird et al. könnte eine vermehrte präsynaptische Freisetzung von Transmittern begünstigen. In der Folge ließe sich damit dann die größere Änderung der von Laird et al. bestimmten Kurzzeitplastizität bzw. die erhaltene größere Paired-pulse-Ratio erklären.

Auswirkungen auf die synaptische Transmission bei Veränderungen der extrazellulären Konzentration von Ca^{2+} und Mg^{2+} finden sich in vielen Untersuchungen. Eine Erniedrigung der Ca^{2+} - und eine Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration scheinen einen negativen Effekt auf die synaptische Transmission zu haben (Konnerth und Heinemann, 1983; Czéh und Somjen, 1989; Rausche et al., 1990).

In diesem Zusammenhang zeigten Wang et al., 2008, dass bei BACE 1 -/- Mäusen im Vergleich zu BACE 1 +/+ Mäusen u. a. präsynaptische Funktionsstörungen an Moosfaser-CA3-Synapsen in Form von verminderter Transmitterausschüttung auftraten, was in einer erhöhten Paired-pulse-Facilitation zum Ausdruck kam. Die bei BACE 1 -/- Mäusen fehlende Langzeitpotenzierung an der Moosfaser-CA3-Synapse ließ sich durch eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wiederherstellen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Vergleich des Ca^{2+} - Mg^{2+} - Verhältnisses in der Extrazellulärlösung zwischen den Untersuchungen von Laird et al. und den Messungen der vorliegenden Arbeit sowie Vergleich der Ca^{2+} -Konzentrationen in der Extrazellulärlösung.

| Quelle | Extrazellulärlösung | |
|---------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ | Ca^{2+} mmol/l |
| vorliegende Arbeit | 1,0 | 2 |
| Laird et al. (2005) | 1,67 | 2,5 |
| Wang et al. (2008) | | 5 |

Über die Betrachtung hinaus, dass BACE 1 Auswirkungen auf die synaptische Übertragung hat, sehen Kamenetz et al., 2003 und Ma et al., 2007 eine Wirkung der Spaltprodukte, vor allem des A β , die nach Prozessierung des APP durch BACE 1 entstehen, auf die synaptischen Übertragung. Während Kamenetz et al. diesen Spaltprodukten einen dämpfenden Einfluss zuschreiben, kommen Ma et al. zu dem Schluss, dass die Spaltprodukte in physiologischen Konzentrationen einen fördernden Einfluss auf die synaptische Übertragung und das Gedächtnis haben.

Auch bei der weiteren Analyse der Kurzzeitplastizität mittels Sechserpulsstimulation konnte kein Einfluss der β -Sekretase nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.1.2, Abbildung 18). Diese Untersuchungen erweiterten die Analyse zur Kurzzeitplastizität gegenüber Paired-pulses auf mehrere synaptische Folgereizungen und deren Antworten. Die Reihe der mit den maximalen Stromamplituden der postsynaptischen Folgeantworten bestimmten Kurzzeitplastizitäten zeigten nach anfänglicher Facilitation mit der dritten bzw. vierten Antwort einen leichten Rückgang. Keine der an den CA1-Pyramidenzellen der BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäuse gemessenen Verläufe ließ darauf schließen, dass das Fehlen oder Vorhandensein der β -Sekretase einen Einfluss hatte.

4.2 Einzelne Aktionspotentiale

Für die Untersuchung von Potentialen in bzw. an Zellen ist es wichtig, die potentialerzeugenden Eigenschaften der Zellmembran durch den Patchvorgang nicht mehr als unbedingt notwendig zu verändern. Zur Kontrolle wurde deshalb bei allen Zellen das

Ruhemembranpotential vor den Messungen in der Whole-cell-Konfiguration bestimmt. Werte, die eine ausreichende Qualität der CA1-Pyramidenzellen bestätigen, sind in der Literatur (Nagase et al., 2003: $-63,9 \pm 1,9$ mV; Lacinova et al., 2008: -64 ± 1 mV; Andrásfalvy et al., 2008: -55 bis -70 mV) zu finden. Bei den hier verwendeten Zellen wurden ähnliche Werte innerhalb eines vergleichsweise engen Bereichs (BACE 1 +/+ : $-56,1 \pm 2,1$ mV, BACE 1 -/- : $58,5 \pm 2$ mV) ermittelt. Ein Einfluss der β -Sekretase konnte nicht festgestellt werden. Die Ruhemembranpotentiale bei den BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäusen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Aktionspotentiale, die sich ausgehend vom Ruhemembranpotential entwickelten, hatten diesbezüglich von der β -Sekretase unbeeinflusste Anfangsbedingungen.

Die Ausbildung von Aktionspotentialen erfordert die Veränderung des Membranpotentials über einen Schwellenwert hinaus. Da es für die Ausprägung eines Aktionspotentials unabhängig von Art und Stärke des Reizes nur auf das Überschreiten des Schwellenwertes ankommt, wird der Verlauf des Aktionspotentials ausschließlich von spezifischen Zellparametern und Zellmembraneigenschaften bestimmt. Hier wird der β -Sekretase nach allen bisherigen Erkenntnissen ein Einfluss zugeschrieben, der über die Regulation der Eigenschaften spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle erfolgen soll (Kim et al., 2007; Huth et al., 2009; Vassar et al., 2009; Hu et al., 2010; Kovacs et al., 2010). Wenn die β -Sekretase einen spürbaren Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit hat, dann sollte sich hier bei den CA1-Pyramidenzellen der BACE 1 -/- Mäuse ihr Fehlen in Veränderungen der Aktionspotentialverläufe erkennen lassen. Alle den Verlauf eines Aktionspotentials kennzeichnenden Größen (vgl. Kap. 3.2.1, Tabelle 2) zeigen jedoch keinen verwertbaren signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Größen bei BACE 1 +/+ Mäusen. Hu et al., 2010 weisen in zwei Parametern, Anstiegsgeschwindigkeit und maximale Amplitude, signifikante Änderungen bei Aktionspotentialverläufen an CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 -/- und BACE 1 +/+ Mäusen nach. Zugeschrieben werden diese Unterschiede der höheren Oberflächenexpression spannungsabhängiger Natriumkanäle ($\text{Na}_v1.2$) bei den BACE 1 -/- Mäusen. Durch die höhere Anzahl der verfügbaren spannungsabhängigen Natriumkanäle kommt es danach im Zuge des Potentialverlaufes nach Überschreiten des Schwellenwertes zu einer höheren Anstiegsgeschwindigkeit sowie zu einer größeren maximalen Amplitude.

Eine Erklärung der Abweichungen der Ergebnisse in dieser Arbeit zu Hu et al. ist möglicherweise in den Unterschieden bei den eingesetzten Versuchstieren, der hergestellten Versuchs- bzw. Messumgebung und der Versuchsdurchführung zu finden. So sind die Versuchsbedingungen durch den Einsatz von Mäusen deutlich geringeren Alters, die Verwendung von Lösungen anderer Konzentrationen, das Einhalten einer anderen Badtemperatur sowie die Durchführung der Messungen an dissoziierten Zellen und nicht an Zellen innerhalb eines physiologischen Zellverbandes sehr voneinander abweichend. Inwieweit diese unterschiedlichen Bedingungen im Einzelnen zu den unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben, konnte im Rahmen dieser Arbeit mit den zur Verfügung stehenden Informationen nicht geklärt werden.

4.3 Feuerfrequenzen

4.3.1 Eingangswiderstand

Der Eingangswiderstand ist eine einfache, zugleich aber auch sehr aussagekräftige Größe, die es gestattet, Unterschiede zwischen den CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 $-/-$ und BACE 1 $+/+$ Mäusen im Bereich um das Ruhepotential darzustellen bzw. zu vergleichen. Er ist von großer Bedeutung für die Erregbarkeit der Neurone.

Bei den BACE 1 $-/-$ Mäusen zeigten sich signifikant höhere Widerstände. Dies ließ vermuten, dass bei den CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 $-/-$ Mäusen für das Erreichen des gleichen Schwellenpotentials ein depolarisierender Stromimpuls geringerer Stärke als bei BACE 1 $+/+$ Mäusen notwendig ist. In der Tat zeigte sich dieses auch bei den nachfolgenden Versuchen mit depolarisierenden Stromimpulsen. Im Mittel war für die Auslösung von Aktionspotentialen bei BACE 1 $+/+$ Mäusen fast die doppelte Stromstärke wie bei BACE 1 $-/-$ Mäusen notwendig. Zusammengefasst lässt sich daraus auf eine leichtere Erregbarkeit der CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 $-/-$ Mäusen schließen.

4.3.2 Aktionspotentialfrequenzen und Adaptationsverhalten

Im Gegensatz zum Verlauf einzelner Aktionspotentiale als Antwort auf kurze stimulierende Impulse, bilden die CA1-Pyramidenzellen bei länger anhaltender depolarisierender Erregung eine Folge rasch sich wiederholender Potentialänderungen aus. Die grundsätzliche Form der sich dabei wiederholenden Potentialänderungen, d.h. der Aktionspotentiale, bleibt solange die Erregung anhält erhalten. Sie erfährt im Wesentlichen

lediglich im Zuge fortschreitender Erregungsdauer eine zunehmende zeitliche Streckung, sodass der zeitliche Abstand der Maxima zweier aufeinander folgender Aktionspotentiale mit zunehmender Dauer der Erregung immer größer wird. Dieses Verhalten wird als Frequenzadaptation bezeichnet.

Als erstes ist den erhaltenen Ergebnissen bei beiden Tiergruppen zu entnehmen, dass die mittlere Feuerfrequenz mit der Stärke des depolarisierenden Rechteckimpulses zunahm und sich dabei offenbar einem Grenzwert annäherte. Generell waren die mittleren Feuerfrequenzen bei den BACE 1 $-/-$ Mäusen, also bei fehlender β -Sekretase, signifikant größer. Das Fehlen der β -Sekretase hat offenbar zur Folge, dass die Schwelle zur Auslösung des nächsten Aktionspotentials jeweils schneller erreicht wird. Dies gilt über die gesamte Dauer der Erregung, wie die Auszählung der Aktionspotentiale in den ersten und letzten 400 ms der depolarisierenden Rechteckimpulse zeigte. Eine noch weitere Differenzierung ergab der Vergleich der ersten und der letzten Feuerfrequenz innerhalb des jeweils durchlaufenen Frequenzbandes, ermittelt als Kehrwert der Abstände zwischen den ersten bzw. letzten beiden Aktionspotentialen. Der Vorgang des Feuerns begann mit einer deutlich höheren Frequenz bei fehlender β -Sekretase. Der Unterschied zur Anfangsfrequenz bei den Zellen der BACE 1 $+/+$ Mäuse wuchs mit zunehmender Erregungsstärke. Am Ende des Erregungsimpulses war die Frequenz zwar immer noch größer, ihr Unterschied zur Feuerfrequenz bei den Zellen der BACE 1 $+/+$ Mäuse war jedoch wesentlich kleiner. Am Ende des Erregungsimpulses näherten sich die Feuerfrequenzen nicht nur einander, sondern änderten sich auch mit wachsender Erregung sehr wenig – sie schienen ähnlich wie die mittleren Feuerfrequenzen einem Grenzwert zuzustreben. Extrapoliert man die graphischen Verläufe der ermittelten Abstände in Abhängigkeit von der Stimulation, kommt man zu der Vermutung, dass die durch die β -Sekretase regulierten ionalen Mechanismen am Ende eines genügend hohen Erregungsimpulses keinen Einfluss mehr auf die Feuerfrequenz haben. Demgegenüber zeigt sich ein sehr starker Einfluss auf die Höhe der Anfangsfrequenz des Feuerns.

In der Arbeit von Hu et al. werden die Unterschiede im Feuerverhalten von CA1-Pyramidenzellen von BACE 1 $-/-$ und BACE 1 $+/+$ Mäusen mit dem vermehrten Auftreten spannungsabhängiger Natriumkanäle in der Zellmembran erklärt. Allerdings weisen die mittleren Feuerfrequenzen in Abhängigkeit von der Erregungsstärke im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen zunächst alle einen gleichen bis 0,1 nA ansteigenden, dann aber in unterschiedlicher Weise fallenden Verlauf auf. Weder

ein anfänglich gleicher Anstieg der mittleren Feuerfrequenzen in Abhängigkeit von der Erregungsstärke, noch das Durchlaufen eines Maximums mit anschließendem Abfallen kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden. Wie im vorangehenden Abschnitt bereits dargelegt, lassen die offenkundigen Unterschiede der eingesetzten Versuchstiere, der hergestellte Versuchs- bzw. Messumgebung und der Versuchsdurchführung wenig Möglichkeiten, zu korrelierenden Erkenntnissen zu kommen.

Nach den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen bleibt am Ende offen, ob die verminderte Frequenzadaptation in den BACE 1 -/- Neuronen nur auf den aus der Literatur bekannten veränderten Eigenschaften der Na⁺-Kanäle beruht. Weitere Untersuchungen müssen klären, inwieweit BACE 1 auch regulierend auf andere Kanäle der Frequenzadaptation einwirkt. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte bereits ausgeschlossen werden, dass nach Ausschaltung der β -Sekretase der von hyperpolarisationsaktivierten Kationenkanälen getragene Schrittmacherstrom verändert ist. Ebenso wenig war die Nachhyperpolarisation, die durch eine Salve von Aktionspotentialen hervorgerufen wurde, in BACE 1-defizienten CA1-Pyramidenzellen vermindert.

Ein weiterer Angriffspunkt der β -Sekretase könnte dagegen der sog. M-Strom sein, ein Kalium-Strom, der besondere Bedeutung für die Frequenzadaptation besitzt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten sollten daher Anstoß sein, einen möglichen Einfluss der β -Sekretase auf den M-Strom näher zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die Beeinflussung der β -Sekretase scheint der Amyloid-Hypothese nach ein geeigneter Therapieansatz für die kausale Behandlung des M. Alzheimer zu sein. Zur Verfolgung dieses Therapieansatzes sind insbesondere Erkenntnisse über die sich aus einer Beeinflussung der β -Sekretase ergebenden Auswirkungen auf die synaptische Transmission und die Ausbildung von Aktionspotentialen wichtig. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu mit der Patch-clamp-Technik vergleichende Versuche an CA1-Pyramidenzellen in Hippocampusschnitten von BACE 1 Knockoutmäusen (BACE 1 $-/-$ Mäuse) und Wildtypmäusen (BACE 1 $+/+$ Mäuse) durchgeführt. Durch die Arbeit mit Hirnschnitten, bei denen die Neurone in ihrem physiologischen Netzwerk belassen wurden, ergaben sich Versuchsbedingungen, die sicherstellten, dass sich die Neurone, anders als nach einer akuten Dissoziation oder nach Kultivierung, in einem intakten Milieu befanden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen synaptischer Transmission mit Zwei- und Mehrfachstimulationen zeigten keine signifikanten Unterschiede, weder in der Ausprägung der als Reaktion gemessenen postsynaptischen Ströme noch in der aus den Verhältnissen der gemessenen Stromamplituden bestimmten Kurzzeitplastizität. Bei beiden Versuchstiergruppen ließ sich eine Verstärkung der Reaktion (Facilitation) auf kurzzeitig wiederholte bzw. mehrfach wiederholte Stimulationen feststellen. Die Ergebnisse ergaben aber keine Anhaltspunkte in Bezug auf unterschiedlich ablaufende Vorgänge bei der synaptischen Transmission in BACE 1-defizienten Präparaten.

Ebenso ließen sich auch aus den Ergebnissen der Untersuchung einzelner Aktionspotentiale keine Unterschiede zwischen BACE 1 $+/+$ und BACE 1 $-/-$ Neuronen entnehmen. Alle Parameter der aufgenommenen Potentialverläufe waren jeweils nahezu gleich und hatten nur wenig voneinander abweichende Standardfehler.

Unterschiede zeigten sich demgegenüber erst bei der Reaktion auf länger anhaltende depolarisierende Erregung. Das dadurch hervorgerufene repetitive Feuern wies bei den CA1-Pyramidenzellen der BACE 1 $-/-$ Mäuse nicht nur eine signifikant höhere mittlere Feuerfrequenz auf, sondern durchlief über der gleichen Variationsbreite der Erregung auch ein größeres Frequenzband mit höheren Feuerfrequenzen.

Es fanden sich allerdings in den weiteren Untersuchungen keine Hinweise, dass BACE 1 Schrittmacherströme reguliert oder die langsame Nachhyperpolarisation beeinflusst. Es bleibt daher offen, ob und inwieweit BACE 1 neben den bekannten Wirkungen auf Na⁺-Kanäle andere ionale Angriffspunkte hat, um das Entladungsverhalten der Neurone zu modulieren.

In jedem Fall stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Studie von Hu et al., 2010 im Einklang, wonach die gentechnische Ausschaltung von BACE 1 zu epileptischen Anfällen führen kann. Hinsichtlich des Einsatzes von pharmakologischen Inhibitoren der β -Sekretase bei der Behandlung von M. Alzheimer sind offenbar mögliche Nebenwirkungen auf die zentralnervöse Erregbarkeit zu berücksichtigen.

6 Literaturverzeichnis

Alzheimer A.

Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde

Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin. 1907 Jan;64:146-8

Andrásfalvy BK, Makara JK, Johnston D, Magee JC

Altered synaptic and non-synaptic properties of CA1 pyramidal neurons in Kv4.2 knockout mice.

J Physiol. 2008 Aug 15;586(16):3881-92. Epub 2008 Jun 19

Apelt J, Bigl M, Wunderlich P, Schliebs R

Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology.

Int J Dev Neurosci. 2004 Nov;22(7):475-84

Arendt T.

Synaptic degeneration in Alzheimer's disease.

Acta Neuropathol. 2009 Apr 24

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT.

Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease.

Neurology. 1992 Mar;42(3 Pt 1):631-9

Austen B, Christodoulou G, Terry JE

Relation between cholesterol levels, statins and Alzheimer's disease in the human population.

J Nutr Health Aging. 2002;6(6):377-82

Barnes CA.

Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat.

Trends Neurosci. 1988 Apr;11(4):163-9

Bean BP

The action potential in mammalian central neurons.

Nat Rev Neurosci. 2007 Jun;8(6):451-65

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.

Alzheimer's disease.

Lancet. 2006 Jul 29;368(9533):387-403

Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RA, Jansen EN, Bohl J.

Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases.

J Neural Transm. 1996;103(4):455-90

Braun R, Willnow E

Die "Knockout"-Maus als Krankheitsmodell

Dtsch Arztebl 1996; 93(26): A-1766

Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S.

Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses.

Rev Neurosci. 2007;18(2):93-114

Buttini M, Masliah E, Barbour R, Grajeda H, Motter R, Johnson-Wood K, Khan K, Seubert P, Freedman S, Schenk D, Games D.

Beta-amyloid immunotherapy prevents synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease.

J Neurosci. 2005 Oct 5;25(40):9096-101

Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC.

BACE 1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons.

Nat Neurosci. 2001 Mar;4(3):233-4

Chang WP, Koelsch G, Wong S, Downs D, Da H, Weerasena V, Gordon B, Devasamudram T, Bilcer G, Ghosh AK, Tang J.

In vivo inhibition of Abeta production by memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors.

J Neurochem. 2004 Jun;89(6):1409-16

Cole SL, Vassar R.

The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE 1.

Mol Neurodegener. 2007 Nov 15;2:22

Connors BW, Prince DA

Effects of local anesthetic QX-314 on the membrane properties of hippocampal pyramidal neurons.

J Pharmacol Exp Ther. 1982 Mar;220(3):476-81

Czéh G, Somjen GG

Changes in extracellular calcium and magnesium and synaptic transmission in isolated mouse spinal cord.

Brain Res. 1989 May 8;486(2):274-85

Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM

Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release.

J Physiol. 1996 Feb 15;491 (Pt 1):163-76

Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM.

Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model.

Nat Neurosci. 2002 May;5(5):452-7

Dominguez D, Tournoy J, Hartmann D, Huth T, Cryns K, Deforce S, Serneels L, Camacho IE, Marjaux E, Craessaerts K, Roebroek AJ, Schwake M, D'Hooge R, Bach P, Kalinke U, Moechars D, Alzheimer C, Reiss K, Saftig P, De Strooper B.

Phenotypic and biochemical analyses of BACE 1- and BACE 2-deficient mice.

J Biol Chem. 2005 Sep 2;280(35):30797-806

Eriksen JL, Janus CG.

Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration.

Behav Genet. 2007 Jan;37(1):79-100. Epub 2006 Oct 28

Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M; Alzheimer's Disease International.

Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.

Lancet. 2005 Dec 17;366(9503):2112-7

Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC.

Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease.

Arch Neurol. 2002 Sep;59(9):1381-9

Götz J, Schild A, Hoernkli F, Pennanen L.

Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models.

Int J Dev Neurosci. 2004 Nov;22(7):453-65

Gong CX, Iqbal K.

Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease.

Curr Med Chem. 2008;15(23):2321-8

Gruart A, Delgado-García JM.

Activity-dependent changes of the hippocampal CA3-CA1 synapse during the acquisition of associative learning in conscious mice.

Genes Brain Behav. 2007 Jun;6 Suppl 1:24-31

Grutzendler J, Morris JC.

Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease.

Drugs. 2001;61(1):41-52

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ.

Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.

Pflugers Arch. 1981 Aug;391(2):85-100

Hardy J, Selkoe DJ.

The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.

Science. 2002 Jul 19;297(5580):353-6. Review. Erratum in: Science 2002 Sep 27;297(5590):2209

Hardy J.

The relationship between amyloid and tau.

J Mol Neurosci. 2003 Apr;20(2):203-6

Heyman A, Peterson B, Fillenbaum G, Pieper C.

The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part XIV: Demographic and clinical predictors of survival in patients with Alzheimer's disease.

Neurology. 1996 Mar;46(3):656-60

Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R.

BACE 1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system.

Nat Neurosci. 2006 Dec;9(12):1520-5. Epub 2006 Nov 12

Hu X, Zhou X, He W, Yang J, Xiong W, Wong P, Wilson CG, Yan R.

BACE 1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration.

J Neurosci. 2010 Jun 30;30(26):8819-29

Huang HC, Jiang ZF.

Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease.

J Alzheimers Dis. 2009 Jan;16(1):15-27

Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G.

Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase.

Mol Cell Neurosci. 1999 Dec;14(6):419-27

Huth T, Schmidt-Neuenfeldt K, Rittger A, Saftig P, Reiss K, Alzheimer C.

Non-proteolytic effect of beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1) on sodium channel function.

Neurobiol Dis. 2009 Feb;33(2):282-9. Epub 2008 Nov 8

Hyman BT.

The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: clinical-pathological studies.

Neurobiol Aging. 1997 Jul-Aug;18(4 Suppl):S27-32

Igelmund P, Heinemann U

Synaptic transmission and paired-pulse behaviour of CA1 pyramidal cells in hippocampal slices from a hibernator at low temperature: importance of ionic environment.

Brain Res. 1995 Aug 14;689(1):9-20

Isaac JT, Wheal HV

The local anaesthetic QX-314 enables enhanced whole-cell recordings of excitatory synaptic currents in rat hippocampal slices in vitro.

Neurosci Lett. 1993 Feb 19;150(2):227-30

Jalbert JJ, Daiello LA, Lapane KL.

Dementia of the Alzheimer type.

Epidemiol Rev. 2008;30:15-34. Epub 2008 Jul 16

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R.

APP processing and synaptic function.

Neuron. 2003 Mar 27;37(6):925-37

Kim DY, Carey BW, Wang H, Ingano LA, Binshtok AM, Wertz MH, Pettingell WH, He P, Lee VM, Woolf CJ, Kovacs DM.

BACE 1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity.

Nat Cell Biol. 2007 Jul;9(7):755-64. Epub 2007 Jun 18

Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Shirotani K, Saido TC, Hashimoto Y.

Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Nov 20;98(24):13554-9. Epub 2001 Nov 6

Knowles WD.

Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation.

J Clin Neurophysiol. 1992 Apr;9(2):252-63

Konnerth A, Heinemann U

Presynaptic involvement in frequency facilitation in the hippocampal slice.

Neurosci Lett. 1983 Dec 11;42(3):255-60

Kovacs DM, Gersbacher MT, Kim DY.

Alzheimer's secretases regulate voltage-gated sodium channels.

Neurosci Lett. 2010 Dec 10;486(2):68-72. Epub 2010 Sep 15

Kuhn PH, Marjaux E, Imhof A, De Strooper B, Haass C, Lichtenthaler SF.

Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase.

J Biol Chem. 2007 Apr 20;282(16):11982-95. Epub 2007 Feb 16

Lacinova L, Moosmang S, Langwieser N, Hofmann F, Kleppisch T

Cav1.2 calcium channels modulate the spiking pattern of hippocampal pyramidal cells.

Life Sci. 2008 Jan 2;82(1-2):41-9. Epub 2007 Oct 26

Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee HK, Wong PC

BACE 1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions.

J Neurosci. 2005 Dec 14;25(50):11693-709

Lauri SE, Palmer M, Segerstrale M, Vesikansa A, Taira T, Collingridge GL

Presynaptic mechanisms involved in the expression of STP and LTP at CA1 synapses in the hippocampus.

Neuropharmacology. 2007 Jan;52(1):1-11

Lendon CL, Ashall F, Goate AM.

Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics.

JAMA. 1997 Mar 12;277(10):825-31

Leung LS, Fu XW.

Factors affecting paired-pulse facilitation in hippocampal CA1 neurons in vitro.

Brain Res. 1994 Jul 4;650(1):75-84

Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E.

Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP.

Science. 2001 Aug 24;293(5534):1487-91

Li R, Lindholm K, Yang LB, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, Wong P, Price D, Shen Y.

Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 9;101(10):3632-7. Epub 2004 Feb 20

Lichtenthaler SF, Dominguez DI, Westmeyer GG, Reiss K, Haass C, Saftig P, De Strooper B, Seed B.

The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE 1.

J Biol Chem. 2003 Dec 5;278(49):48713-9. Epub 2003 Sep 24

Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J.

Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Feb 15;97(4):1456-60

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J.
Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease.

Am J Pathol. 1999 Sep;155(3):853-62

Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R.

Mice deficient in BACE 1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation.

Nat Neurosci. 2001 Mar;4(3):231-2

Ma H, Lesné S, Kotilinek L, Steidl-Nichols JV, Sherman M, Younkin L, Younkin S, Forster C, Sergeant N, Delacourte A, Vassar R, Citron M, Kofuji P, Boland LM, Ashe KH.

Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 8;104(19):8167-72. Epub 2007 Apr 30

MacDonald JF, Jackson MF, Beazely MA.

Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors.

Crit Rev Neurobiol. 2006;18(1-2):71-84

Manabe T, Wyllie DJ, Perkel DJ, Nicoll RA

Modulation of synaptic transmission and long-term potentiation: effects on paired pulse facilitation and EPSC variance in the CA1 region of the hippocampus.

J Neurophysiol. 1993 Oct;70(4):1451-9

McConlogue L, Buttini M, Anderson JP, Brigham EF, Chen KS, Freedman SB, Games D, Johnson-Wood K, Lee M, Zeller M, Liu W, Motter R, Sinha S.

Partial reduction of BACE 1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice.

J Biol Chem. 2007 Sep 7;282(36):26326-34. Epub 2007 Jul 6

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL.
Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease.

Ann Neurol. 1999 Dec;46(6):860-6

Mulkey RM, Malenka RC.

Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus.

Neuron. 1992 Nov;9(5):967-75

Nagase T, Ito KI, Kato K, Kaneko K, Kohda K, Matsumoto M, Hoshino A, Inoue T, Fujii S, Kato H, Mikoshiba K

Long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 neurons of mice lacking the IP(3) type 1 receptor.

Neuroscience. 2003;117(4):821-30

Neher E, Sakmann B, Steinbach JH.

The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes.

Pflugers Arch. 1978 Jul 18;375(2):219-28

Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC.

The current excitement in long-term potentiation.

Neuron. 1988 Apr;1(2):97-103

Numberger M, Draguhn A.

Patch-Clamp Technik

Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996

Parsons CG, Stöffler A, Danysz W.

Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse.

Neuropharmacology. 2007 Nov;53(6):699-723. Epub 2007 Aug 10

Pearson HA, Peers C.

Physiological roles for amyloid beta peptides.

J Physiol. 2006 Aug 15;575(Pt 1):5-10. Epub 2006 Jun 29

Price DL, Sisodia SS.

Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models.

Annu Rev Neurosci. 1998;21:479-505

Rausche G, Igelmund P, Heinemann U

Effects of changes in extracellular potassium, magnesium and calcium concentration on synaptic transmission in area CA1 and the dentate gyrus of rat hippocampal slices.

Pflugers Arch. 1990 Feb;415(5):588-93

Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, Johnson-Wood K, Kappenman KE, Kawabe TT, Kola I, Kuehn R, Lee M, Liu W, Motter R, Nichols NF, Power M, Robertson DW, Schenk D, Schoor M, Shopp GM, Shuck ME, Sinha S, Svensson KA, Tatsuno G, Tintrup H, Wijsman J, Wright S, McConlogue L.

BACE 1 knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics.

Hum Mol Genet. 2001 Jun 1;10(12):1317-24

Samura E, Shoji M, Kawarabayashi T, Sasaki A, Matsubara E, Murakami T, Wuhua X, Tamura S, Ikeda M, Ishiguro K, Saido TC, Westaway D, St George Hyslop P, Harigaya Y, Abe K.

Enhanced accumulation of tau in doubly transgenic mice expressing mutant betaAPP and presenilin-1.

Brain Res. 2006 Jun 13;1094(1):192-9. Epub 2006 May 19

Scalco MZ, van Reekum R.

Prevention of Alzheimer disease. Encouraging evidence.

Can Fam Physician. 2006 Feb;52:200-7

Schneggenburger R, Sakaba T, Neher E

Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse.

Trends Neurosci. 2002 Apr;25(4):206-12

Scoville WB, Milner B.

Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1957 Feb;20(1):11-21

Seeger T, Fedorova I, Zheng F, Miyakawa T, Koustova E, Gomeza J, Basile AS, Alzheimer C, Wess J

M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity.

J Neurosci. 2004 Nov 10;24(45):10117-27

Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V.

Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain.

Nature. 1999 Dec 2;402(6761):537-40

Sjögren M, Blennow K.

The link between cholesterol and Alzheimer's disease.

World J Biol Psychiatry. 2005;6(2):85-97

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P.

Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta.

Nat Neurosci. 2005 Aug;8(8):1051-8. Epub 2005 Jul 17

Squire LR, Zola-Morgan S.

Memory: brain systems and behavior.

Trends Neurosci. 1988 Apr;11(4):170-5

Stockley JH, O'Neill C.

Understanding BACE 1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease.

Cell Mol Life Sci. 2008 Oct;65(20):3265-89

Strichartz GR

The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine.

J Gen Physiol. 1973 Jul;62(1):37-57

Teyler TJ, DiScenna P.

The role of hippocampus in memory: a hypothesis.

Neurosci Biobehav Rev. 1985 Fall;9(3):377-89

Teyler TJ, Cavus I, Coussens C.

Synaptic plasticity in the hippocampal slice: functional consequences.

J Neurosci Methods. 1995 Jun;59(1):11-7

Thinakaran G, Koo EH.

Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function.

J Biol Chem. 2008 Oct 31;283(44):29615-9. Epub 2008 Jul 23

Thomson AM

Facilitation, augmentation and potentiation at central synapses.

Trends Neurosci. 2000 Jul;23(7):305-12

Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ.

Alpha- and beta-secretase: profound changes in Alzheimer's disease.

Biochem Biophys Res Commun. 2002 Dec 6;299(3):373-6

Van Hoesen GW, Hyman BT.

Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease.

Prog Brain Res. 1990;83:445-57

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M.

Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE 1.

Science. 1999 Oct 22;286(5440):735-41

Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC.

The beta-secretase enzyme BACE 1 in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential.

J Neurosci. 2009 Oct 14;29(41):12787-94

Wang H, Song L, Laird F, Wong PC, Lee HK.

BACE1 knock-outs display deficits in activity-dependent potentiation of synaptic transmission at mossy fiber to CA3 synapses in the hippocampus.

J Neurosci. 2008 Aug 27;28(35):8677-81

Wang JH, Ko GY, Kelly PT

Cellular and molecular bases of memory: synaptic and neuronal plasticity.

J Clin Neurophysiol. 1997 Jul;14(4):264-93

Wang XP, Ding HL.

Alzheimer's disease: epidemiology, genetics, and beyond.

Neurosci Bull. 2008 Apr;24(2):105-9

Willem M, Lammich S, Haass C.

Function, regulation and therapeutic properties of beta-secretase (BACE 1).

Semin Cell Dev Biol. 2009 Apr;20(2):175-82. Epub 2009 Jan 20

Wolozin B.

Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease.

Neuron. 2004 Jan 8;41(1):7-10

Wong HK, Sakurai T, Oyama F, Kaneko K, Wada K, Miyazaki H, Kurosawa M, De Strooper B, Saftig P, Nukina N.

Beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE 1) and gamma-secretase.

J Biol Chem. 2005 Jun 17;280(24):23009-17. Epub 2005 Apr 11

Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME.

Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity.

Nature. 1999 Dec 2;402(6761):533-7

Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, Beach T, Sue L, Wong P, Price D, Li R, Shen Y.

Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease.

Nat Med. 2003 Jan;9(1):3-4

Yeh JZ

Sodium inactivation mechanism modulates QX-314 block of sodium channels in squid axons.

Biophys J. 1978 Nov;24(2):569-74

Zohar O, Pick CG, Cavallaro S, Chapman J, Katzav A, Milman A, Alkon DL

Age-dependent differential expression of BACE 1 splice variants in brain regions of tg2576 mice.

Neurobiol Aging. 2005 Aug-Sep;26(8):1167-75. Epub 2005 Jan 7

Zucker RS, Regehr WG

Short-term synaptic plasticity.

Annu Rev Physiol. 2002;64:355-405

7 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|--------|
| Abbildung 1: Amyloidogene und nicht amyloidogene Prozessierung des Amyloid precursor protein (APP)..... | - 7 - |
| Abbildung 2: Entstehung der BACE 1 Knockoutmäuse | - 15 - |
| Abbildung 3: Schnittführung bei der Präparation..... | - 17 - |
| Abbildung 4: Prinzipieller Aufbau der verwendeten Patch-clamp-Anlage..... | - 19 - |
| Abbildung 5: Blockschalbild des Messaufbaus..... | - 20 - |
| Abbildung 6: Aufbau des Setup | - 21 - |
| Abbildung 7: Herstellung der Whole-cell-Konfiguration | - 22 - |
| Abbildung 8: Lokalisation der Stimulationselektrode und der Pipette | - 24 - |
| Abbildung 9: Durch elektrische Reizung der Schaffer Kollateralen erzeugte EPSCs . | - 25 - |
| Abbildung 10: Gängige Aktionspotential-Parameter | - 27 - |
| Abbildung 11: De- und hyperpolarisierende Stromrechteckimpulse und resultierende Aktionspotentialfolgen einer CA1-Pyramidenzelle | - 28 - |
| Abbildung 12: Auswertung der Anzahl der Aktionspotentiale in den ersten und letzten 400 ms..... | - 28 - |
| Abbildung 13: Auswertung der Abstände zwischen den ersten beiden und den letzten beiden Aktionspotentialen..... | - 29 - |
| Abbildung 14: Auswertung des Potentialrückgangs (Δ mV) | - 29 - |
| Abbildung 15: Auswertung der Nachhyperpolarisation (AHP) | - 30 - |
| Abbildung 16: Amplitude des ersten EPSC | - 32 - |
| Abbildung 17: Paired-pulse-Ratio | - 33 - |
| Abbildung 18: Sechserpulsstimulation bei 500 μ A..... | - 33 - |
| Abbildung 19: Verlauf eines Aktionspotentials im direkten Vergleich von BACE 1 +/+ und BACE 1 -/- | - 35 - |
| Abbildung 20: Eingangswiderstand der CA1-Pyramidenzellen..... | - 36 - |
| Abbildung 21: Mittlere Feuerfrequenzen der verschiedenen Stimulationsstufen | - 37 - |
| Abbildung 22: Anzahl der Aktionspotentiale in den ersten und den letzten 400 ms | - 38 - |
| Abbildung 23: Abstände zwischen den ersten und den letzten beiden Aktionspotentialen..... | - 39 - |
| Abbildung 24: Vergleich der durch Hyperpolarisation induzierten Potentialdifferenz . | - 40 - |
| Abbildung 25: Nachhyperpolarisation (AHP)..... | - 40 - |

8 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|--------|
| Tabelle 1: Ruhemembranpotential der gemessenen CA1-Pyramidenzellen | - 34 - |
| Tabelle 2: Eigenschaften der Aktionspotentiale..... | - 35 - |
| Tabelle 3: Vergleich des Ca^{2+} - Mg^{2+} -Verhältnisses in der Extrazellulärlösung zwischen den Untersuchungen von Laird et al. und den Messungen der vorliegenden Arbeit sowie Vergleich der Ca^{2+} -Konzentrationen in der Extrazellulärlösung..... | - 40 - |

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| A β | - Amyloid- β -Peptid |
| Ach | - Acetylcholin |
| AChE | - Acetylcholinesterase |
| ACSF | - artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit |
| AHP | - Nachhyperpolarisation |
| AICD | - APP intracellular domain |
| AP | - Aktionspotential |
| APP | - amyloid precursor protein |
| BACE 1 | - β -site-APP-cleaving enzyme 1 |
| CA 1/2/3 | - Cornu ammonis 1/2/3 |
| DG | - Gyrus dentatus |
| EPSC | - excitatory postsynaptic current |
| ES | - embryonale Stammzelle |
| K _v | - voltage gated K ⁺ -channel |
| Na _v | - voltage gated Na ⁺ -channel |
| NMDA | - N-Methyl-D-Aspartat |
| P3 | - 3-kDa-Peptid |
| PCR | - polymerase chain reaction |
| PPF | - Paired-pulse-Facilitation |
| PPR | - Paired-pulse-Ratio |
| QX-314 | - Lidocain-N-Ethyl-Bromide |
| S | - Subiculum |
| sAPP | - secreted amino terminal APP derivative |

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Alzheimer für die Bereitstellung des Themas, die geduldige Betreuung und die sehr schnelle Korrektur dieser Dissertation danken.

Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Alzheimer für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, in der ich meine Dissertation schreiben durfte. Besonders bedanke ich mich bei Dr. Elke Edelman und Dr. Fang Zheng, die mir die wichtigsten Grundlagen der Laborarbeit vermittelten und mich in die Präparation von akuten Hirnschnitten und das Arbeiten mit der Patch-clamp-Anlage eingeführt haben. Des Weiteren danke ich Dr. Tobias Huth, der immer ein offenes Ohr für alle Fragen rund um die Erstellung meiner Dissertation hatte sowie Didier Gremelle, der mich bei der Lösung von technischen Problemen unterstützte.

Bei Dr. Andrea Rittger aus dem Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Zucht und Genotypisierung der verwendeten Knockout- und Wildtypmäuse.

Für die Hilfe bei EDV-Problemen danke ich Dr. Harald Wiese, der mir jederzeit bei kleinen und großen technischen Schwierigkeiten geholfen hat.

Bei meinen/-er Mitdoktoranden/-in Katja Lammert, Philipp Bergmann und Matthias Nissen bedanke ich mich für die mentale Unterstützung und die Begleitung durch die vielen Hochs und Tiefs der experimentellen Wissenschaft.

Ein besonderer Dank geht an alle engagierten Korrekturleser, die mir neben Grammatik- und Rechtschreibfehlern auch sprachliche Verständnisprobleme sowie logische Brüche aufzeigten und dabei trotz mehrmaligen Durchsehens dieser Dissertation nicht die Motivation verloren.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mich während meines gesamten Medizinstudiums und in der Zeit meiner Dissertation unterstützt haben und mir zu jedem Zeitpunkt bedingungslos zur Seite standen. Ohne sie hätte ich nicht die notwendige Ruhe und Sicherheit zur Vollendung dieser Dissertation gefunden.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Meike Völkel
Anschrift : Maßmannstrasse 8, 24118 Kiel
Geboren am : 03.10.1980 in Hamburg

Studium

Okt. 2004 – Nov. 2010 Studium der Humanmedizin,
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Okt. 2006 – heute Dissertation

Effekte des β -site-APP-cleaving enzyme 1 (BACE 1) auf die
synaptische Transmission und das Entladungsverhalten von
CA1-Pyramidenzellen des Hippocampus

Berufliche Tätigkeit

Jan. 2004 – Sept. 2004 Physiotherapeutin,
Asklepios Schlossberg Klinik Bad König

Berufsausbildung

Nov. 2000 – Okt. 2003 Ausbildung zur Physiotherapeutin,
Johann Hermann Lubinus Schule für Physiotherapie, Kiel

Schulbildung

Aug. 1991 – Juni 2000 Abitur, Altes Gymnasium Flensburg