Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **8**

1.1 Die Alzheimer-Krankheit 8

1.1.1 Krankheitsbild 8

1.1.2 Pathologie der Krankheit 9

1.1.2.1 Amyloid Plaques 9

1.1.2.2 Neurofibrilläre *tangles* 10

1.2 Genetisch bedingte Alzheimerfälle 11

1.2.1 Das Amyloid-precursor-protein (App) 12

1.2.2 Die Preseniline (PS1, PS2) 14

1.3 Amyloid-Bildung 17

1.3.1 Beeinflussende Faktoren 17

1.3.2 Intrazelluläres Aβ 19

1.4 Derzeitige und zukünftige Therapiemöglichkeiten 19

1.5 Zelluläre Ca^{2+}-Homöostase 20

1.5.1 Aktivierung von Ca^{2+} durch Glutamat 23

1.5.2 Glutamat als endogenes Neurotoxin 26

1.5.3 Ca^{2+}-Veränderungen bei der familiären Alzheimer-Krankheit 27

1.5.4 Die Rolle von Ca^{2+} in der neuronalen Zellschädigung 29

1.6 Zielsetzung 31

2. Material und Methoden **32**

2.1 Versuchstiere 32

2.1.1 Transgene Presenilin-Mäuse 32

2.1.2 Transgene App-Mäuse 33

2.1.3 App-*knock-out*-Mäuse 34

2.1.4 Neuronen-spezifische Presenilin-*knock-out*-Mäuse 34

2.1.5 Transgene App-Mäuse auf einem PS1 [-/-]-Hintergrund 35

2.1.6 Transgene Presenilin-Mäuse auf einem App [-/-]-Hintergrund 36

2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien 36
2.3 Genotypisierung transgener Mäuse mittels der PCR-Methode 37
2.4 MTT-Assay 40
2.5 Herstellung transversaler Hippokampusschnitte 40
2.6 Enzymatische Dissoziation hippokampaler Neurone 41
2.7 Hippokampale Langzeitkulturen 42
2.7.1 Vorbereiten der Kulturgefäße 42
2.7.2 Herstellung einer adhärenten (feeder-layer) Astrozytenschicht 43
2.7.3 Herstellung neuronaler Primärzellkulturen 43
2.8 Versuchsaufbau 44
2.9 *patch-clamp*-Technik zum Einbringen des Fura-2 48
2.10 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ 49
2.11 Transfektion von Primärzellen 52
2.11.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen 52
2.11.2 Transformation von Bakterien 53
2.11.3 Präparation von Plasmid-DNA 53
2.11.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA 54
2.11.5 Transfektion kultivierter hippokampaler Neurone 54
2.12 Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot 55
2.12.1 Herstellung von Hirnhomogenaten 55
2.12.2 Proteinbestimmung mit Bradford-Reagenz. 55
2.12.3 Proteinfällung 55
2.12.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 56
2.12.5 Western-Transfer-Analyse (Western-Blot) 56
2.13 Datenaufnahme und Auswertung 57

3. Ergebnisse 58
3.1 Viabilität hippokampaler Neurone von transgenen Mäusen mit einer PS1-Mutation 58
3.2 Ermittlung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Glutamat in Neuronen mit einer PS1-Mutation 59
3.2.1 Kultivierte hippokampale Neurone 59
3.2.2 Dissoziierte hippokampale Neurone 62

3.3 Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren 65
3.3.1 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Aktivierung des NMDA-Rezeptors 65
3.3.2 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Aktivierung von IP_3 67
3.4 Blockierung von ER-Ca^{2+}-ATPasen in hippokampalen Neuronen 69
3.5 Untersuchungen zum Auffüllungsmechanismus der ER-Ca^{2+}-Speicher (kapazitativer Ca^{2+}-Einstrom/CCE) 73
3.5.1 Einfluss der Expression einer PS1-Mutation auf den CCE 73
3.5.2 Einfluss der Expression von App auf den CCE 75
3.5.3 Einfluss der PS1-Mutation auf den CCE auf einem App [-/-]-Hintergrund 77
3.6 Ermittlung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Inhibition des CCE durch SKF96365 78
3.7 Proteinexpression von Transient-Rezeptor-Potential-Proteinen 80
3.8 Veränderung der Ca^{2+}-Homöostase durch C-terminale App-Spaltprodukte 81
3.8.1 Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ durch C99-Spaltprodukte 81
3.8.2 Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Aβ 84
3.8.3 Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ durch C99-Spaltprodukte im Gewebeschnitt 86
3.9 Einfluss der App-Expression auf Ca^{2+}-Modulationen durch PS1-Mutationen 88
3.9.1 Untersuchung der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen von App-knock-out-Mäusen 88
3.9.2 Untersuchung der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen von Mäusen mit einer PS1-Mutation 90
3.10 Transfektion von hippokampalen Neuronen mit einem C99-GFP-Fusions-Protein 92

4. Diskussion 95
4.1 Vitalität hippokampaler Neurone von transgenen Mäusen mit einer PS1-Mutation 95

4.2 Einfluss von Kalium und Glutamat auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen mit einer PS1-Mutation 96
4.3 Aktivierung des NMDA-Rezeptors und der metabotropen Glutamat-Rezeptor-Signalkaskade 99
4.4 Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER mit Thapsigargin (Thg) in hippokampalen Neuronen mit einer PS1-Mutation 101
4.5 Veränderung des CCE in kultivierten Neuronen mit einer PS1-Mutation 102
4.6 Zum Einfluss C-terminaler App-Spaltprodukte auf die Ca^{2+}-Homöostase 105
4.7 Einfluss der App-Expression auf Ca^{2+}-Modulationen durch PS1-Mutationen 111
4.8 Klinische Aspekte und Ausblick 112

5. Zusammenfassung 114
6. Literaturverzeichnis 116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metabolismus des Amyloid-precursor-proteins (App) 13
Abbildung 2: Topologie des PS1-Proteins in der Membran des ER 15
Abbildung 3: Modell für die Regulation der intrazellulären Ca^{2+}-Homöostase 23
Abbildung 4: Metabotroper Glutamat-Rezeptor 24
Abbildung 5: Ca^{2+}-Permeabilität von AMPA-Rezeptoren 25
Abbildung 6: Permeabilität des NMDA-Rezeptors 26
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Maus thy-1 Genpromotorkonstrukts 33
Abbildung 8: Aminosäure-Sequenz von Aβ 34
Abbildung 9: Auftrennung des PS1-Amplikons durch Gelelektrophorese 38
Abbildung 10: Verdau der aufgereinigten PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym DdeI 39
Abbildung 11: Auftrennung der App-Amplikons durch Gelelektrophorese 39
Abbildung 12: Plexiglasapparaturzur Herstellung dissoziierter hippokampaler Neurone (Seitenansicht) 42
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Apparatur zur Calcium-Imaging-Analyse 47
Abbildung 14: Strukturformel von Fura-2 49
Abbildung 15: Absorptionsmaxima des Fura-2 50
Abbildung 16: Effekt unterschiedlicher Glutamat-Konzentrationen auf das Überleben hippokampaler Neurone 59
Abbildung 17: Kultivierte Hippokampusneurone nach 19 Tagen in Kultur 61
Abbildung 18: Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten hippokampalen Neuronen nach Kalium- und Glutamat-Applikation 61
Abbildung 19: Einzelmessungen der $[Ca^{2+}]_i$ in dissoziierten hippokampalen Neuronen nach Applikation von Kalium- und Glutamat 64
Abbildung 20: Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in dissoziierten Neuronen nach Kalium- und Glutamat-Zugabe 65
Abbildung 21: Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Neuronen nach Applikation von NMDA und Glycin. 66
Abbildung 22: Einzelmessungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Bradykinin (BK) in kultivierten Neuronen 68

Abbildung 23: Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Bradykinin (BK) in Pseudofarben 68
Abbildung 24: Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Neuronen nach Applikation von Bradykinin (BK) 69
Abbildung 25: Einzelkinetikverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ in hippokampalen Neuronen nachZugabe von Thapsigargin (Thg) 71
Abbildung 26: Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Thapsigargin (Thg) in Pseudofarben 72
Abbildung 27: Inhibition der endoplasmatischen Ca^{2+}-ATPase in hippokampalen Neuronen durch Thapsigargin (Thg) 73
Abbildung 28: Verringerung des kapazitativen Ca^{2+}-Einstroms (CCE) beim Vorliegen einer PS1-Mutation 75
Abbildung 29: Kapazitativer Ca^{2+}-Einstrom (CCE) in Neuronen von PS1 [WT]- und App [-/-]-Mäusen 76
Abbildung 30: Reduktion des CCE durch Expression einer PS1-Mutation auf einem App-*knock-out*-Hintergrund 78
Abbildung 31: Effekt von SKF96365 auf die durch Thg ausgelösten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Neuronen von FVB/N- und App [-/-]-Mäusen Neuronen von FVB/N-Mäusen 80
Abbildung 32: Western-Blot-Analyse der TRP4-Protein-Expression in verschiedenen Mauslinien 81
Abbildung 33: Durch Thg ausgelöste Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in dissoziierten Neuronen von PS1 [-/-]- und doppeltransgenen AppldxPS1[-/-]-Mäusen 83
Abbildung 34: Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Applikation von Thg in dissoziierten Neuronen von Appld- und PS1[A246E]-Mäusen 85
Abbildung 35: Fura-2-geladenes Neuron im transversalen Hippokampusgewebeschnitt 86
Abbildung 36: Durch Thg ausgelöste Veränderung der$[Ca^{2+}]_i$ in CA1 Neuronen von Hippokampusgewebeschnitten (150 µm) unterschiedlicher transgener Mäuse 88

Abbildung 37: Effekt von Thg auf die $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten hippokampalen Neuronen (19-21 DIV) von App [-/-]- und Kontroll-Mäusen App [-/-]-Mäusen 90
Abbildung 38: Effekt von Thg auf die $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Neuronen (19-21 DIV) von PS1[A246E]- und App[-/-]xPS1[A246E]-Mäusen 91
Abbildung 39: Zusammenfassung der Untersuchungen der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten und dissoziierten hippokampalen Neuronen verschiedener transgener PS1- und App-Mauslinien 92
Abbildung 40: C99-GFP-transfiziertes hippokampales Neuron (4 DIV) 93
Abbildung 41: Änderung der$[Ca^{2+}]_i$ in C99-GFP-transfizierten hippokampalen Neuronen (3-4 DIV) nach Applikation von BK 94
Abbildung 42: Auslösung apoptotischer Stimuli durch eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ 99
Abbildung 43: Mechanismen, die zu oxidativem Stress in Neuronen mit einer PS1-Mutation führen können 102
Abbildung 44: Akkumulation von C-terminalen Fragmenten und von Aβ40/42 in den Hirnen von PS1 [-/-]-Mäusen 106
Abbildung 45: Einfluss von App-Spaltprodukten auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase 108
Abbildung 46: App-Spaltprodukte aktivieren unterschiedliche Mechanismen in der Zelle 110
Abbildung 47: Beeinflussung der β-Amyloid-Konzentration 113

Zur Homepage der Dissertation

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Krankheit

Im Jahr 1907 berichtete Alois Alzheimer zum ersten Mal über eine Erkrankung des Gehirns, die hauptsächlich Menschen höheren Alters betrifft und mit einem fortschreitenden Verlust der mentalen Fähigkeiten verbunden ist. Das Gehirn dieser Patienten zeigte neben einem Nervenzellverlust die Bildung von Plaques und Neurofibrillen. Dieses Krankheitsbild wird seit 1910, geprägt durch Kraepelin als Alzheimer-Krankheit bezeichnet (Kraepelin, 1910).
Die Alzheimer-Krankheit ist eine zur Demenz führende, primär degenerative Hirnerkrankung, die für mindestens die Hälfte aller Demenzfälle verantwortlich ist. In Industrieländern hat sich die Alzheimer-Krankheit nach Herzerkrankungen, Krebs und Hirninfarkten mittlerweile zur vierthäufigsten Todesursache entwickelt. Schätzungen zufolge leiden derzeit weltweit ca. 20 Millionen Patienten an Morbus-Alzheimer. Allein in Deutschland wird von 1,2 Millionen Alzheimer-Erkrankten ausgegangen. Mit einer weiter steigenden Anzahl wird infolge des wachsenden Anteils alter und sehr alter Menschen an der Gesamtbevölkerung gerechnet (Peruche & Schulz, 1998).

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

1.1.1 Krankheitsbild

Die Alzheimer-Krankheit ist durch einen schleichenden Verlust von Hirnleistungen gekennzeichnet. Uncharakteristisch z.B. mit Lernschwäche und Kopfschmerzen beginnend, äußert sie sich anfangs vor allem durch eine gestörte Merkfähigkeit. Diese „Vergesslichkeit“ betrifft zunächst jüngere Ereignisse, einschließlich der zeitlichen

und örtlichen Orientierung. Später ist dann auch das Langzeitgedächtnis betroffen (Galton & Hodges, 1999). Im Vordergrund der sich schleichend entwickelnden Demenz stehen des weiteren Störungen der Sprache (zunächst Wortfindungsstörungen), der Kognition (Problemlösungs-, Rechen- und Abstraktionsvermögen) und der räumlichen Orientierung, die zu einer ausgeprägten konstruktiven Apraxie führen (Adams, 1997).
Der Verlauf der Alzheimer-Krankheit ist unaufhaltsam progredient. Die Gedächtnisstörungen weiten sich aus und die Sprache verarmt bei zunehmenden Stereotypien immer mehr. Motorisch zeigen sich in ähnlicher Weise stereotype Bewegungen. Hinzu treten im Verlauf der Erkrankung Verhaltens- und Stimmungsveränderungen. Nach einem Zeitraum von etwa 6 bis 12 Jahren führt die Krankheit in der Regel zum Tod des Patienten, meist bedingt durch Sekundärerkrankungen wie z.B. Lungen-, Harnwegs- oder Dekubitalinfektionen (Müller & Graeber, 1998).

1.1.2 Pathologie der Krankheit

Das klinische Erscheinungsbild der Alzheimer-Krankheit beruht auf einer Degeneration von Nervenzellen. Diese Neurodegeneration führt zu einem progredienten Verlust von Synapsen und Neuronen. Parallel dazu kommt es zur extrazellulären Bildung neuritischer Plaques sowie der intrazellulären Akkumulation abnormer fibrillärer Strukturen.
Beide Veränderungen sind krankheitstypisch, jedoch nicht spezifisch. Sie sind auch bei einer Reihe anderer mit kognitiven Störungen einhergehenden Erkrankungen nachweisbar. Ihr Vorkommen ist bei der Alzheimer-Krankheit jedoch besonders ausgeprägt und zeigt eine typische Verteilung, worauf sich die neuropathologische Diagnose gründet.

1.1.2.1 Amyloid Plaques

Es können zwei Arten von extrazellulären Amyloid-Ablagerungen im Parenchym von menschlichen Gehirnen unterschieden werden: neuritische (senile) und nicht–neuritische (diffuse) Plaques. In den Hirnen älterer Menschen ohne Demenzerscheinungen können sowohl diffuse als auch senile Plaques beobachtet werden (Von Braunmühl, 1937). Eine große Anzahl von neuritischen Plaques wird nur in den Hirnen von Alzheimer-Patienten gefunden. Neuritische Plaques bilden sich im

Zwischenzellularraum und bestehen zu ca. 90 % aus einem 4-kDa-Peptid, das Amyloid-β-Peptid (Aβ) genannt wird (Glenner & Wong, 1994). Kang *et al*. (1987) zeigten, dass Aβ ein proteolytisches Spaltprodukt eines hochmolekularen Vorläuferproteins, des 110 bis 130 kDa Amyloid-precursor-proteins (App), ist.
Neuritische Plaques kommen im wesentlichen in der grauen Hirnsubstanz vor (Katzman, 1986). Sie bestehen im Zentrum aus einem stark verdichteten Kern des Amyloid-Proteins. Die durch Aggregation von Aβ gebildeten Amyloidfibrillen sind von dystroph veränderten Nervenzellfortsätzen und von Gliazellen umgeben. Auch reaktive Astrozyten sowie Mikroglia sind innerhalb oder in näherer Umgebung neuritischer Plaques zu finden. Obwohl Aβ die Hauptkomponente der Amyloid-Plaques ist, sind weitere Moleküle bekannt, die mit diesen Plaques assoziiert sind. Als Beispiele seien hier Ferritin, Acetylcholinesterase, Laminin, Glykosaminoglykane und Apolipoproteine genannt (Strittmatter & Roses, 1995).
Die Ablagerung von Amyloidfibrillen lässt sich meist auch in der Wand von Arteriolen nachweisen. Experimentellen Untersuchungen zufolge können Amyloidfibrillen in ihrem Mikromilieu unter bestimmten Bedingungen zytotoxisch wirken (Yanker *et al*., 1990). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Bildung und Ablagerung dieser Amyloidfibrillen im Hirngewebe zum Untergang von Neuronen beiträgt.
Diffuse Plaques enthalten keinen Amyloid-Kern. Sie werden wesentlich durch immunhistochemische Färbenachweise von Aβ markiert. Die Ultrastruktur der diffusen Plaques unterscheidet sich von der neuritischer Plaques, in sofern, dass nur sehr wenige Amyloid-Fibrillen und wenige oder keine neuritischen Veränderungen vorliegen (Goedert, 1993).

1.1.2.2 Neurofibrilläre *tangles*

Bei den von Alois Alzheimer beschriebenen Neurofibrillenbündeln handelt es sich um die intrazelluläre Akkumulation von Filamenten mit einem Durchmesser von 10 bis 20 nm, die paarweise helikal umeinander verwunden sind (*paired helical filaments*, PHF). Diese insgesamt als neurofibrilläre Degeneration bezeichneten Veränderungen lassen sich im Zellsoma und proximalen Axonbereich als Neurofibrillen nachweisen. Sie lassen sich ebenso in den dystrophen neuritischen Anteilen in der Peripherie von Plaques sowie als disseminierte Ablagerungen im Neuropil finden.

Zwischen dem Ausmaß der bei der Alzheimer-Krankheit auftretenden neurofibrillären Veränderungen und dem Schweregrad der Demenz besteht eine quantitative Beziehung (Arriagada *et al*., 1992). Neurofibrilläre Veränderungen könnten somit eine kausale Bedeutung im Prozess der Neurodegeneration haben.

Hauptbestandteil der *paired helical filaments* ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau. Dieses ist Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts und befindet sich bei der Alzheimer-Krankheit in einem abnorm stark phosphorylierten Zustand (Goedert, 1993). Die physiologische Funktion des Tau-Proteins besteht in einer Stabilisierung der am axonalen Transport beteiligten Mikrotubulistruktur. Die Wechselwirkung zwischen Mikrotubuli und Tau wird durch den Phosphorylierungsgrad vom Tau-Protein reguliert. Infolge der bei der Alzheimer-Krankheit auftretenden hochgradigen Phosphorylierung von Tau kommt es zu einer instabilen Wechselwirkung zwischen Mikrotubuli und Tau-Protein und damit zur Destabilisierung der axonalen Zytoskelettstruktur und zur Beeinträchtigung des axonalen Transportes. Das nicht mehr Mikrotubuli-bindungsfähige Tau wird aus dem axonalen in das somatodendritische Kompartiment rückverlagert und aggregiert zu Neurofibrillen. Durch eine Störung axonaler Transportmechanismen sowie durch die im Zusammenhang mit der Neurofibrillenbildung stehende zunehmende metabolische Beeinträchtigung der Zelle, tragen die Folgen der erhöhten Tau-Phosphorylierung sehr wahrscheinlich mittelbar zum Untergang der Neurone bei.
Nach dem Absterben der Zelle bleiben die Neurofibrillen (*tangles*) im Extrazellularraum weiterhin bestehen und können hier als *ghost tangles* nachgewiesen werden. Das gleichzeitige Vorkommen von intrazellulären und extrazellulären Neurofibrillen weist daraufhin, dass der Prozess der neurofibrillären Degeneration offenbar bis zum Tod der Zelle anhält und dass *paired helical filaments* nur einem sehr geringen Umsatz unterliegen.

1.2 Genetisch bedingte Alzheimerfälle

Im Gegensatz zur sporadischen Alzheimer-Krankheit gibt es auch familiäre Fälle dieser Krankheit mit einem autosomal-dominanten Erbgang. Derartige Fälle wurden bereits vor mehr als 60 Jahren beschrieben. Für einen großen Teil der familiären Alzheimer-Fälle konnten die ursächlich verantwortlichen Gene identifiziert werden.

Dabei handelt es sich im Wesentlichen um das Amyloid-precursor-protein (App) und die Presenilin (PS1 und PS2). Familiäre Alzheimer-Fälle weisen einen frühen Beginn der Erkrankung auf, wenn auch sie unter den Alzheimer-Patienten mit einem Erkrankungsalter unter 60 Jahren nur einen kleinen Anteil ausmachen. Sie repräsentieren daher vermutlich nicht mehr als 1 % aller Alzheimer-Fälle (Hardy, 1997).

1.2.1 Das Amyloid-precursor-protein (App)

Die sich bei der Alzheimer-Krankheit bildenden Amyloidplaques bestehen im Wesentlichen aus dem Amyloid-β-Peptid (Aβ) (Glenner & Wong, 1984). Dieses wurde 1984 erstmals identifiziert. Das Peptid hat eine Länge von 39 bis 42 Aminosäuren und liegt in einer β-Faltblattstruktur vor. Aβ ist das Produkt einer proteolytischen Spaltung des größeren Apps. Dieses Protein ist ein Transmembranprotein, dessen Primärstruktur charakteristische Merkmale eines plasmamembranständigen Glykoproteins aufweist (siehe Abb. 1). Dieses Protein enthält einen großen extrazellulären Bereich aus drei Domänen, gefolgt von einer Transmembranregion und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne (Kang *et al.,* 1987). Die zytoplasmatische Domäne enthält unter anderem die NPXY-Konsensussequenz, wie sie für clathrinvermittelte Endozytose beschrieben wurde (Chen *et al*., 1990). Die Aβ-Domäne (dunkel schattiert in Abb. 1) liegt zu einem Teil in der Transmembrandomäne und zum anderen Teil innerhalb der extrazellulären Domäne. Das App, dessen Funktion noch nicht bekannt ist, wird von drei unterschiedlichen Proteasen, den sogenannten α-, β- und γ-Sekretasen gespalten. Die α-Sekretase schneidet das App innerhalb der Aβ-Sequenz (sekretorischer/nichtamyloidogener Weg) und verhindert dadurch die Bildung des unlöslichen Peptids (Esch *et al*., 1990) (siehe Abb. 1).

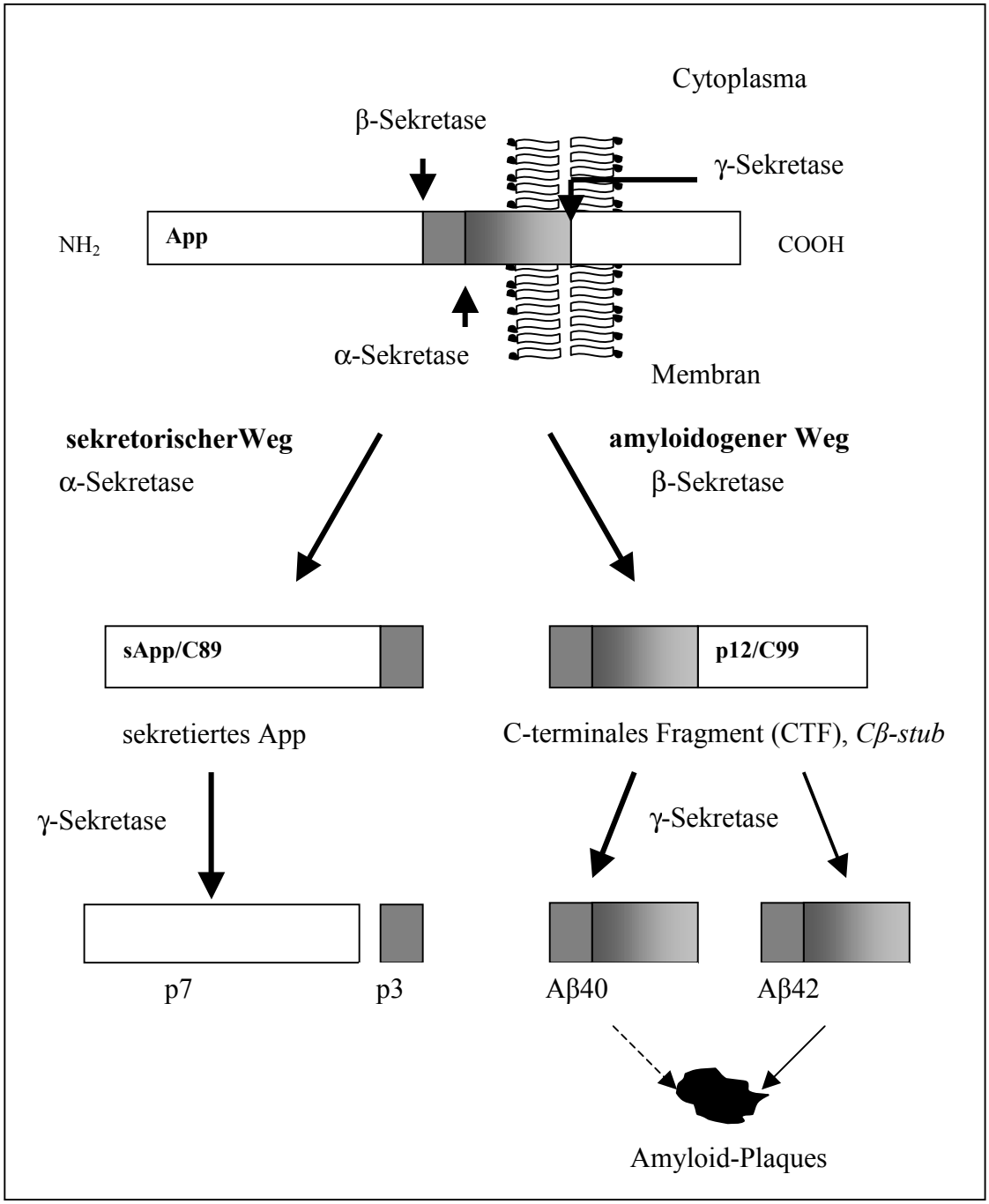


Abb. 1: *Metabolismus des Amyloid-precursor-proteins (App)*

Das Transmembranprotein App wird entweder durch die α-Sekretase unter Sekretion des neuroprotektiven sApp geschnitten oder aber durch die β- und γ-Sekretase unter Sekretion von Aβ.

Auf diese Weise entsteht ein großes N-terminales App-Fragment (sApp), das neuroprotektive Eigenschaften hat (Mattson *et al*., 1993). Eine weitere Spaltung des in der Membran verbleibenden C-terminalen Fragments (CTF) geschieht durch die γ-Sekretase. Dabei entstehen die Spaltprodukte p3 und p7. p7 kann wie das sApp sekretiert werden. Es ist aber auch möglich, dass das gesamte CTF über das

NPXY-Motiv internalisiert und in Lysosomen abgebaut wird (Haass *et al*., 1992). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass ein Teil des App unter Bildung amyloidogener CTF über einen endosomalen/lysomalen Weg prozessiert wird (Golde *et al*., 1992; Haass *et al*., 1992). Schneiden jedoch die β- und γ-Sekretasen das App (amyloidogener Weg), so entsteht das Aβ. Dieses aggregiert außerhalb der Zellen zu unlöslichen Plaques (Haass *et al*., 1992; Seubert *et al*., 1992). Bis auf die β-Sekretase konnte bisher keine der Sekretasen identifiziert werden. Inhibitionsstudien lassen jedoch vermuten, dass die unterschiedlich langen Amyloide durch unterschiedliche γ-Sekretasen gebildet werden (Citron *et al*., 1996). Auch die Funktion der Sekretasen im gesunden Gehirn ist bislang noch nicht genau bekannt. Vassar *et al*. (1999) entdeckten die β-Sekretase. Bei ihr handelt es sich um eine Aspartyl-Protease, die App am NH_2-Terminus der Amyloidpeptid-Sequenz schneidet. Für die α-Sekretase werden einige Mitglieder der ADAM („*a disintegrin and metalloprotease*") Familie wie TACE, MDC9 und ADAM 10 angenommen (Lammich *et al*., 1999).

Innerhalb der letzten Jahre wurden eine Reihe von Mutationen im App-Gen beschrieben, die zur genetisch vererbbaren Alzheimer-Krankheit führen (Haass & Selkoe, 1993; Mullan & Crawford, 1993). Diese Mutationen liegen direkt am N-Terminus oder am C-Terminus der Aβ-Domäne bzw. in unmittelbarer Nachbarschaft zur γ-Sekretase-Schnittstelle (siehe Abb. 1). Die Mutationen im App-Gen und deren Lokalisation in und um die Aβ-Domäne heben deutlich die außerordentliche Rolle von App und speziell von Aβ für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit hervor. Auch bei anderen altersbedingten hirnschädigenden Erkrankungen, wie der Parkinson-Krankheit, Chorea Huntington oder den Prionerkrankungen, wurden ähnliche Proteinablagerungen nachgewiesen (Lansbury, 1997).

1.2.2 Die Presenilne (PS1, PS2)

Während Mutationen im App-Gen relativ selten auftreten, korrelieren die meisten erblichen Alzheimerfälle mit einer Mutation im Presenilin-Gen 1 bzw. 2 (PS1, PS2) (Sherrington *et al*., 1995; Levy-Lahad *et al*., 1995). Defekte in diesen beiden Transmembranproteinen führen zu der aggressivsten Form der Alzheimer-Krankheit, die bereits im Alter von 45 bis 52 Jahren auftritt. Im PS1-Gen konnten bisher mindestens 40 Punktmutationen, im PS2-Gen 2 Mutationen gefunden werden, die mit dem frü-

hen Auftreten der Alzheimer-Erkrankung einhergehen (Haass 1996; 1997). Ein großer Teil der PS1-Mutationen liegt innerhalb der potentiellen Transmembrandomänen. Häufungen von Mutationen treten in den Transmembranregionen 2 und 6 und vor allem innerhalb der hydrophilen Schleife auf. Diese befindet sich zwischen der Transmembrandomäne 6 und 7 des PS1-Proteins (siehe Abb. 2).

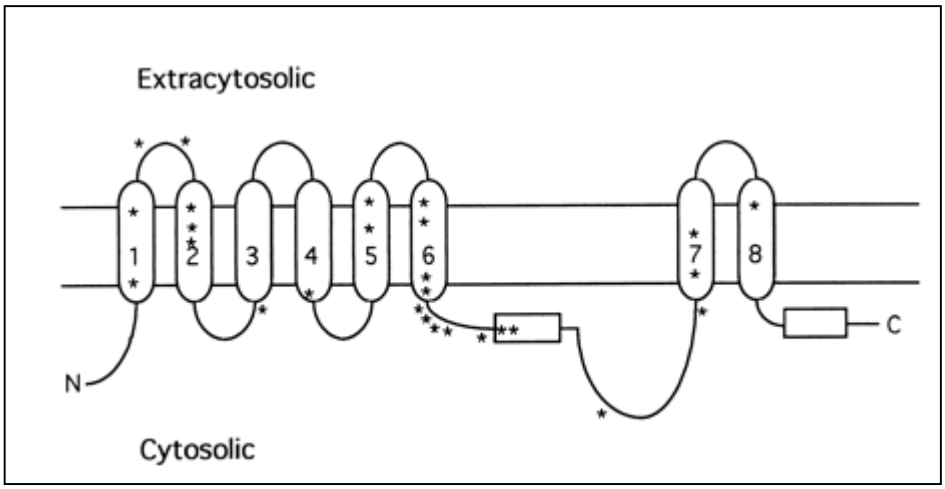


Abb. 2: *Topologie des PS1-Proteins in der Membran des ER*
Gezeigt sind die acht Transmembrandomänen (1 bis 8) und die 2 hydrophilen Regionen (ohne Nummerierung) des PS1, die nicht durch die Membran gehen. Die Sterne geben die Positionen von PS1-Mutationen an, die mit der familiären Alzheimer-Krankheit assoziiert sind. Zwischen der Transmembrandomäne 6 und 7 liegt eine hydrophile Schleife vor.

Erste grundlegende Untersuchungen zur Zellbiologie der PS-Proteine zeigten, dass diese als 45 bis 50 kDa-Proteine in transfizierten Zellen exprimiert werden (Cook *et al*., 1996; Walter *et al*., 1996). PS-Proteine sind vor allem im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und zu einem geringeren Anteil auch im Intermediärkompartment und im frühen cis-Golgi (Walter *et al*., 1996; Kim *et al*., 2000). Ray *et al*. wiesen 1999 geringe Mengen der PS-Proteine auch an der Plasmamembran nach. Nach Cupers *et al.* (2001) werden die PS-Proteine eventuell in Organellen wie ER und cis-Golgi durch Aggregation zurückgehalten. Innerhalb des Golgi-Apparates konnte auch schon eine partielle Kolokalisation von PS-Proteinen und App nachgewiesen werden (Kovacs *et al*., 1996). Die biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften von PS1 und PS2 sind weitgehend identisch (Walter *et al*., 1996). Die Phosphorylierungen von PS1 und PS2 unterscheiden sich jedoch deutlich (Walter *et al*., 1996; 1997).

PS-Proteine konnten bisher nur nach Überexpression in transfizierten Zellen als vollständiges Protein (*full-length* PS/fl-PS) nachgewiesen werden (Haass, 1996). Endogenes *full-length*-PS scheint nur in kaum nachweisbaren Mengen zu existieren, da PS1 und PS2 proteolytisch prozessiert werden. Ein Schnitt innerhalb der hydrophilen Schleife nahe der Transmembrandomäne 6 resultiert in der Bildung eines 30 kDa-N-terminalen Fragments (NTF) und eines 20 kDA-C-terminalen Fragments (CTF) (Tomita *et al*., 1997). Diese Fragmente sind stabil und bilden offensichtlich einen biologisch und pathologisch aktiven Komplex (Steiner *et al*., 1998). Die proteolytische Spaltung scheint ein genau regulierter Prozess zu sein. Unter den angenommenen beteiligten Proteasen befinden sich auch solche aus der Caspase-Familie. Hierbei handelt es sich um Proteine, die am programmierten Zelltod, der Apoptose, beteiligt sind (Martinez *et al*., 2000). Ein Zusammenhang zwischen der apoptotischen Proteolyse der PS-Proteine und der Aβ-Prozessierung konnte jedoch noch nicht gezeigt werden (Brockhaus *et al*., 1998).

Die PS-Gene beeinflussen nicht nur im Falle der vererbten Alzheimer-Krankheit die Bildung von Aβ42. Vielmehr kommt ihnen *in vivo* eine generelle Funktion bei der Aβ-Bildung zu.
Die Entdeckung eines PS-homologen Gens (SEL-12) im Fadenwurm *C.elegans* (Levitan & Greenwald, 1995) gab deutliche Hinweise auf die physiologische Funktion der PS-Proteine. Das SEL-12-Gen scheint eine wichtige Rolle beim Signaltransfer durch Rezeptoren der Notch-Genfamilie zu spielen. Gene der Notch-Familie spielen bei der Zelldifferenzierung eine entscheidende Rolle.
Baumeister *et al*. (1997) konnten zeigen, dass das menschliche PS1-Gen die biologische Funktion von mutantem SEL-12 in Würmern vollständig ersetzen kann. Folglich hat menschliches PS1 bei der Zelldifferenzierung in der Embryogenese eine biologische Funktion. PS1-Gene verloren mit Punktmutationen, die die familiäre Form der Alzheimer-Krankheit hervorrufen, ihre biologische Funktion nahezu vollständig. Sie konnten daher nicht die Funktion von SEL-12 in mutanten Würmern übernehmen. Demzufolge treten PS1-Mutationen an funktionell wichtigen Positionen auf.
PS1 und PS2 sind mit 467 bzw. 448 Aminosäuren (Haass, 1997) nahezu identisch (zu 67 %). Im Laufe der Evolution sind sie hochkonserviert geblieben. Neben *C.elegans* konnten sie in der Taufliege *Drosophila*, im Krallenfrosch *Xenopus*, im

Zebrafisch und in Säugern nachgewiesen werden (Haass & Baumeister, 1998). Bei allen Mutationen, die für die Presenilline bekannt sind, handelt es sich um den Austausch einer Aminosäure. Aufgrund der hochkonservierten Erhaltung dieser Proteine werden deshalb vermutlich funktionelle oder strukturelle Defekte vom Organismus nicht toleriert. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Embryonensterblichkeit von Presenilin-*knock-out*-Mäusen (Xia, 2000).

1.3 Amyloid-Bildung

1.3.1 Beeinflussende Faktoren

Untersuchungen zum pathologischen Mechanismus der Alzheimer-Krankheit bewiesen eine Erhöhung der Produktion von Aβ42 aufgrund von Mutationen im PS1. In ähnlicher Weise konnte dies auch für Mutationen innerhalb des App-Gens festgestellt werden (Scheuner *et al*., 1996; Citron *et al*., 1997). Damit beeinflussen Mutationen in drei verschiedenen Genen (PS1, PS2 und App) denselben pathologischen Prozess, die Aggregation von Aβ. Diese Tatsache unterstützt die zentrale Rolle von Aβ bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit. Ein direkter Zusammenhang zwischen den PS1-Mutationen und der Bildung von Aβ wird auch durch eine erhöhte Anzahl von Amyloid-Plaques in den Gehirnen von Patienten mit PS1-Mutationen unterstützt (Lemere *et al*., 1996). Darüber hinaus zeigen *knock-out*-Mäuse, denen das PS1-Gen fehlt, eine wesentlich geringere Bildung von Aβ (De Strooper *et al*., 1998). Gleichzeitig akkumulieren sie aber den 12-kDa-amyloidogenen Vorläufer (De Strooper *et al*., 1998). Es ist daher möglich, dass PS1 direkt die proteolytische Aktivität der γ-Sekretase erhöht bzw. selbst die γ-Sekretase ist (Haass & Selkoe, 1998).

Weitere Befunde, die diese Hypothese unterstützen, zeigen die PS1- und PS2-*knock-out*-Mäuse, bei denen eine komplette Inaktivierung der γ-Sekretase zu beobachten ist (Zhang *et al*., 2000). Zusätzlich zeigten Seiffert *et al*. (2000), dass einige Verbindungen, die die γ-Sekretase inhibieren spezifisch an PS1 binden.

Da es sehr viele Argumente für eine zentrale Rolle von Aβ in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit gibt (Amyloid-Hypothese), wurden viele Untersuchungen zum Faltungsprozess und zu den Entstehungsbedingungen der senilen Plaques durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben, dass ein Übergang der löslichen in die unlösliche Form mit einer Konformationsänderung von der α-Helix- zur β-Faltblattstruktur

assoziiert ist. Dieser Übergang wird vom carboxyterminalen Ende aus induziert. Folglich aggregieren β-Amyloide, die ein verkürztes C-terminales Ende besitzen, deutlich langsamer als z.B. das lange Aβ42 (Jarett *et al*., 1993). Die Geschwindigkeit der Aggregation ist sowohl abhängig von der Konzentration des Peptids als auch von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung (Barrow *et al*., 1992; Garzon-Rodriguez, 1997). Aluminium-, Zink- und Eisenionen beschleunigen die Aggregation um einen Faktor zwischen 100 und 1000. Zeitweise wurde die Krankheit deshalb auf eine Erhöhung der Aluminiumkonzentration in den Gehirnen der Patienten zurückgeführt (McLachlan *et al*., 1991). Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden (Mantyh *et al*., 1993). Bei einem pH-Wert von 5,5 in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Peptids, ist die Tendenz zur Aggregation am größten. Dagegen liegt der physiologische pH-Wert von Gewebeflüssigkeiten bei etwa 7,4 (Barrow *et al*., 1992). Bei Alzheimer-Patienten konnte weder eine Erniedrigung des pH-Wertes noch eine Veränderung der Elektrolytkonzentration gegenüber gesunden Menschen bisher nachgewiesen werden.
Howlett *et al*. (1995) stellten fest, dass die Konformation des chemisch synthetisierten Peptids variiert und deshalb einige Experimente nicht reproduzierbar waren. Bevor dies bekannt war, wurde überwiegend mit dem chemisch synthetisierten und lyophilisierten Amyloid gearbeitet. Seit diesen Erkenntnissen wird *in vivo* synthetisiertes Aβ verwendet (Döbeli *et al*., 1995).
Monoklonale Antikörper gegen Aβ ermöglichen eine Quantifizierung des Amyloids und den Nachweis von löslichem Aβ in verschiedenen Körperflüssigkeiten. In der zebrebrospinalen Flüssigkeit von Alzheimer-Patienten wurden einige Proteine gefunden, die in wesentlich höheren Konzentrationen auftreten und mit Aβ wechselwirken. Zu diesen Proteinen gehört auch das ApoE. Hierbei handelt es sich um ein Lipoprotein, das auch am Cholesterintransport beteiligt ist. Es tritt in drei verschiedenen Isoformen auf. Während das ApoE3 die am weitesten verbreitete Form ist, erhöht ApoE4 das Risiko, an Morbus-Alzheimer zu erkranken und senkt das Alter des Auftretens der Demenz (LaFerla *et al*., 1997; Jonker, 1997). Im Gegensatz dazu scheint ApoE2 das Risiko an der Alzheimer-Demenz zu erkranken, zu verringern (Corder *et al*., 1994).

Ein anderes Protein, das mit Aβ Komplexe bildet und in hohen Konzentrationen in der zerebrospinalen Flüssigkeit vorkommt, ist Transthyretin (TTR). Da das mit TTR

komplexierte Aβ *in vitro* nicht zu Fibrillen aggregiert, könnte eine Mutation im TTR an der Fibrillenbildung und damit an der Alzheimer-Krankheit beteiligt sein (Schwarzman *et al*., 1994). Wenn Aβ Fibrillen bildet, die neurotoxisch wirken, dann sollte durch Inhibieren der Fibrillenbildung das Fortschreiten der Krankheit gestoppt werden können. Die Pharmaindustrie ist daher sehr an der Entwicklung von Substanzen interessiert, die eine Aggregation des Aβ verhindern bzw. die bereits entstandenen Plaques wieder auflösen können. Risikofaktoren, wie das Down-Syndrom, der ApoE-Phänotyp und die Alterung scheinen auf noch unbekannte Weise die Aβ-Aggregation zu beschleunigen.

1.3.2 Intrazelluläres Aβ

Mit Hilfe eines hochspezifischen ELISA, der die Unterscheidung zwischen Aβ40 und Aβ42 ermöglicht, konnte die Entstehung sowohl von Aβ40 als auch von Aβ42 im ER und deren dortige Akkumulation gezeigt werden (Hartmann *et al*., 1997; Cook *et al*., 1997).

Ende 1997 wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt, dass die App-Prozessierung nicht wie angenommen erst an der Zelloberfläche, sondern bereits intrazellulär erfolgt. Außerdem wurde bewiesen, dass die proteolytische Spaltung des Aβ40 und Aβ42 durch die γ-Sekretasen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle erfolgt. Das ER ist dabei das erste Kompartiment, in dem Aβ42 akkumuliert wird (Hartmann *et al*., 1997). Die Presenilin, die ebenfalls hauptsächlich in den Membranen des ER und des frühen Golgi-Apparates lokalisiert sind, befinden sich somit in einer ausgezeichneten Position für die Kontrolle des Transports und/oder der Prozessierung von App. Nach Untersuchungen von L´Hernault *et al*. (1993) am Fadenwurm *C.elegans* kontrolliert das Presenilin SPE-4 die Sortierung und den Transport von Proteinen zu spezialisierten Organellen. Weiterhin gibt es Hinweise auf eine Bindung von PS1 und PS2 an eine unreife Form von App im ER (Weidemann *et al*., 1997; Xia *et al*., 1997). In anderen Arbeitsgruppen konnten diese Versuche allerdings bisher nicht reproduziert werden (Sisodia & Gallagher 1998).

1.4 Derzeitige und zukünftige Therapiemöglichkeiten

Die biochemische Analyse der Plaques und Neurofibrillen in Alzheimer-Hirnen führte zu Erkenntnissen über die Natur dieser Ablagerungen. Derzeitig richtet sich der Blick auf die frühen, über lange Zeiträume ablaufenden zellulären Prozesse, die lang-

fristig zur Plaque- und Neurofibrillenbildung und schließlich zum Zelltod beitragen (Troncoso *et al*., 1998). Die konventiellen diagnostischen Ansätze stützen sich auf die psychologischen und biologischen Epiphänomene der Erkrankung. Damit kann die Diagnose einer Alzheimer-Erkrankung erst gestellt werden, wenn bereits eindeutige und im allgemeinen irreversible kognitive Defizite und biologische Hirnveränderungen vorliegen (Mori *et al*., 1999). Therapeutische Interventionen können damit erst sehr spät erfolgen. Deshalb und aufgrund der kumulativen Inzidenzschätzungen wäre ein grundsätzlich neuer Ansatz zu erwägen, der nicht auf eine späte kategoriale Diagnose, sondern auf eine frühe Risikoabschätzung für die Entwicklung einer Demenz abzielt.

In künftigen Modellen sind sowohl genetische, soziodemographische, als auch somatische und umweltabhängige Protektions- und Risikofaktoren zu berücksichtigen sowie „frühe“ psychologische und biologische Epiphänomene der Erkrankung.

1.5 Zelluläre Ca^{2+}-Homöostase

Ca^{2+}-Ionen haben eine besondere Bedeutung bei der Regulierung zellulärer Funktionen. In jeder eukaryotischen Zelle gibt es Proteine, die von Ca^{2+} moduliert werden. Ca^{2+} wirkt daher als zytoplasmatischer Botenstoff. Die meisten Ca^{2+}-modulierbaren Proteine sind nicht selbst Enzyme. Durch die mit der Ca^{2+}-Bindung verbundenen Konformationsänderung können sie aber Enzyme aktivieren oder Konformationsänderungen an Strukturproteinen hervorrufen (Cox & Stein, 1981). Wie aus der Abbildung 3 ersichtlich ist, werden Ca^{2+}-Signale in Neuronen von unterschiedlichen Prozessen beeinflusst. Hierzu gehören Ca^{2+}-Einstrom, Entleerung intrazellulärer Speicher, Ca^{2+}-Pufferung, Aufnahme in intrazelluäre Speicher und die Extrusion des Ca^{2+} über die Zellmembran (Neher, 1995). Die freie zytoplasmatische Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) ist in Neuronen sehr niedrig. An der Zellmembran liegt ein großer Ca^{2+}-Gradient vor. Dieser ist auf eine etwa 10.000fach erhöhte extrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration im Gegensatz zum intrazellulären Milieu zurückzuführen.

Durch eine Steigerung der Ca^{2+}-Leitfähigkeiten in der Zellmembran (z.B. durch Glutamat-Rezeptoren) kann es zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ kommen (siehe Abb. 3). Der Ca^{2+}-Einstrom aus dem extrazellulären Raum erfolgt zum einen über spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle, die während einer elektrischen Aktivität und einer damit verbundenen Membrandepolarisation der Neurone geöffnet werden. Zum anderen

erfolgt er über ligandengesteuerte Ionenkänale. Diese können entweder direkt eine Ca^{2+}-Leitfähigkeit aufweisen (ionotrop), die nach der Anbindung eines Neurotransmitters erhöht wird, oder sie sind in der Lage über ein G-Protein-vermitteltes System eine Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern auszulösen (metabotrop). Im Ruhezustand liegt in Neuronen eine $[Ca^{2+}]_i$ von 10^{-7} M vor, die sich nach einem Ca^{2+}-Einstrom aber kurzfristig auf 10^{-5} M erhöhen kann.

Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ wird durch ein sofortiges Anbinden der einströmenden Ca^{2+}-Ionen an negativ geladene Bindungsstellen von zellulären Proteinen und membranständigen Phospholipiden begrenzt. Großen Ca^{2+}-bindenden Proteinen, wie dem Parvalbumin oder Calbindin kommt dabei die Aufgabe zu, einen übermäßigen zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentrationsanstieg zu unterbinden. Sie wirken damit einer unspezifischen Aktivierung zellulärer Proteine entgegen und erfüllen in diesem Sinne eine Schutzfunktion (Baimbridge *et al*., 1992).

Wie in Abbildung 3 zu sehen, stehen zur Abgabe des Ca^{2+} verschiedene Extrusions- und Sequestrations-Mechanismen zur Verfügung. Die Ca^{2+}-Abgabe über die Zellmembran geschieht mittels Na^+/Ca^{2+}-Antiportern oder Ca^{2+}-ATPasen (Fierro *et al*., 1998). Zur Absenkung der $[Ca^{2+}]_i$ können aber auch zelleigene Speicher gefüllt werden. Diese sind vor allem das glatte ER und die Mitochondrien. Sarkoendoplasmatische Ca^{2+} (SERCA)-Pumpen vollziehen die Sequestration in das ER, in den Mitochondrien wird diese Funktion von Ca^{2+}-Uniportern und Na^+/Ca^{2+}-Austauschern erfüllt (Fierro *et al*., 1998).

Dieses zelleigene Ca^{2+}-Reservoir befähigt die Zellen bei Bedarf oder auf einen Reiz hin, durch Abgabe des gebundenen Ca^{2+}, die $[Ca^{2+}]_i$ zu erhöhen. Im ER kann dies über den IP_3-Rezeptor oder eine ryanodinerezeptorabhängige Aktivierung erfolgen (Yamamoto & Kanaide, 1990). Die Auffüllung dieser internen Ca^{2+}-Speicher kann neben SERCA-Pumpen durch einen anderen Mechanismus erfolgen. Dieser wird als *capacitative Ca^{2+}-entry* (CCE) oder als *store-operated Ca^{2+}-entry* (SOC) bezeichnet (Putney, 1997) (siehe Abb. 3).

In diesem Mechanismus aktiviert die Depletion der intrazellulären Ca^{2+}-Speicher durch eine vorangegangene Aktion von IP_3 oder einer Ca^{2+}-induzierten Ca^{2+}-Freisetzung das Öffnen von Plasmamembran-Ca^{2+}-Kanälen. Die genaue Regulation, die zum Öffnen dieser SOC-Kanäle führt, ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Einerseits bestehen Hinweise für einen Konformations-Kopplungsmechanismus, bei dem die Depletion der intrazellulären Ca^{2+}-Speicher eine Konformationsänderung des IP_3-Rezeptors bewirkt. Der Rezeptor kann daraufhin mit Plasmamembran-Ca^{2+}-Kanälen interagieren und diese aktivieren.

Andererseits werden auch noch weitere Regulationswege in Betracht gezogen. So nimmt ein weiterer potentieller Vorgang, der zur Öffnung bzw. Aktivierung der SOC-Kanäle führt, die Generierung eines diffusiblen Ca^{2+}-Einstrom-Faktors im ER an. Dieser diffundiert nach der Entleerung der Speicher zur Plasmamembran und induziert dort die Öffnung der SOC-Kanäle.

Einem weiteren Modell zufolge, hält Ca^{2+} bei aufgefüllten Speichern die SOC-Kanäle an der Plasmamembran in einem inaktivierten Zustand. Nach einer Entleerung der Ca^{2+}-Speicher wird diese Inaktivierung kurzfristig aufgehoben. Es könnte so ein CCE in die Zelle erfolgen (Putney *et al*., 2001).

Allen diesen CCE-Regulationsmechanismen liegt eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zugrunde, die durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zur Bildung von Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglyerin (DAG) führt. IP_3 und DAG können weitere Signalwege aktivieren.

IP_3 bindet an den IP_3-Rezeptor in der Membran des ER und löst damit die Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern aus. DAG aktiviert zusammen mit Membranphospholipiden die Proteinkinase C.

Substanzen die eine Inhibition der PLC bewirken, blockieren einen CCE (Putney *et al*., 2001). Mitglieder der Superfamilie von *transient-receptor-potential*-(TRP)-Proteinen scheinen Kandidaten für die SOCs zu sein, da diese Proteine für einen PLC-abhängigen Ca^{2+}-Einstrom verantwortlich sind (Montell, 2001).

Die verschiedenen Parameter, die auf die Verteilung des Ca^{2+} in der Zelle einwirken, müssen so abgestimmt sein, dass eine Rückverteilung gewährleistet und die zelluläre Ca^{2+}-Homöostase somit erhalten bleibt. Ein vermehrter Ca^{2+}-Einstrom kann über ein „second messenger"-System unter Beteiligung der Proteinkinase C durch eine Phosphorylierung von Ionenkanälen eine zusätzliche Verstärkung erfahren. Letztendlich kann eine dauerhaft erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ zur Aktivierung von apoptotischen Proteasen, Lipasen und Endonucleasen führen, die eine Apoptose von Neuronen hervorrufen. Eine derartig veränderte Ca^{2+}-Homöostase kann für mehrere neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und die Amytrophe Lateralsklerose (ALS) beschrieben werden (Krieger *et al*., 1996; Morrison *et al*., 1998).

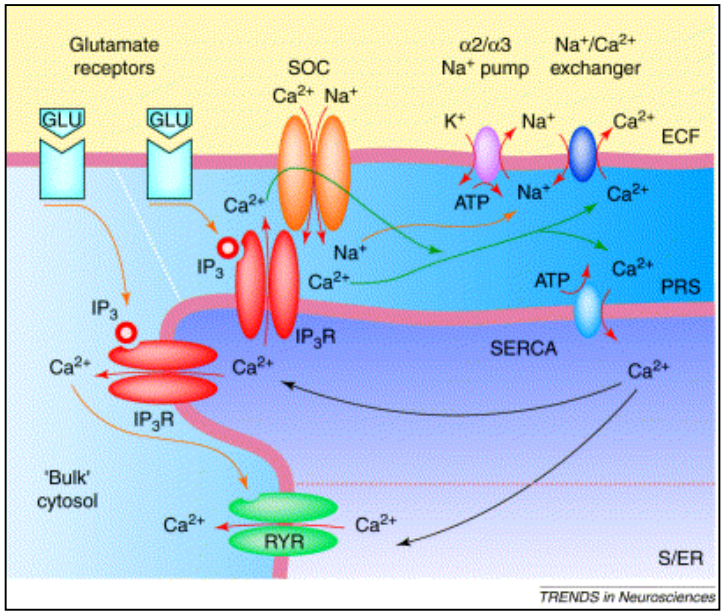


Abb. 3: *Modell für die Regulation der intrazellulären Ca^{2+}-Homöostase*

Gezeigt sind metabotrope Glutamat-Rezeptoren (GLU), die über den IP_3-Signaltransduktionsweg eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER induzieren. Intrazellulär freigesetztes Ca^{2+} kann über Ryanodin-Rezeptoren eine Ca^{2+}-Ausschleusung aus dem ER induzieren. Ein weiterer Weg, der zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt, ist der Eintritt von Ca^{2+} über store-operated Ca^{2+}-Kanäle (SOC). Zu den Wegen, die eine Reduzierung der $[Ca^{2+}]_i$ bewirken, gehören Ca^{2+}-ATPasen an der Membran des ER (SERCA) und Na^+/Ca^{2+}-Austauscher an der Plasmamembran. Na^+-Ionen, die durch derartige Austauscher ins Cytosol gelangen, werden unter ATP-Verbrauch gegen K^+-Ionen nach außen transportiert (Blaustein & Golovina, Trends in Neuroscience, 2001).

1.5.1 Aktivierung von Ca^{2+} durch Glutamat

Der wichtigste erregende Neurotransmitter des zentralen Nervensystems ist Glutamat. Dieser spielt insbesondere im zerebralen Kortex eine bedeutende Rolle und kann zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ führen. Bis zu 70 % aller Synapsen im zerebralen Kortex verwenden Glutamat als Transmitter. Bei vielen grundlegenden physiologischen Hirnfunktionen, sowie bei komplexen integrativen Leistungen wie Schmerzverarbeitung, Motorik, Lernen und Gedächtnis ist Glutamat entscheidend.

Glutamat wirkt auf zwei Klassen von membrangebundenen Rezeptoren: metabotrope und ionotrope Glutamat-Rezeptoren (Abb. 4 und Abb. 5).

Die metabotropen Rezeptoren verändern über G-Proteine verschiedene intrazelluläre Stoffwechselvorgänge wie die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration. Hierbei wird über ein G-Protein die Aktivität des Enzyms Phospholipase C (PLC) erhöht (Abb. 4). Dies

führt zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) (Abb. 4). DAG kann in Gegenwart von Ca^{2+}-Ionen und Lipiden die Sensitivität der Proteinkinase C (PKC) gegenüber Ca^{2+} dramatisch erhöhen. Dieser Komplex von PKC mit DAG, Ca^{2+} und Lipiden ist in der Lage, eine Reihe von Proteinen zu phosphorylieren. IP_3 ist wasserlöslich und fungiert als second messenger. Diffundiert es in das Zytoplasma, kann es an der Membran des ER an den IP_3-Rezeptor binden und damit die Freisetzung von Ca^{2+} aus internen (IP_3-sensitiven) Speichern auslösen. Sowohl DAG als auch IP_3 werden beide sehr schnell abgebaut. Dabei kann IP_3 zu freiem myo-Inositol dephosphoryliert oder aber durch eine spezifische Ca^{2+}-aktivierte Kinase auch zu Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat (IP_4) weiterphosphoryliert werden.

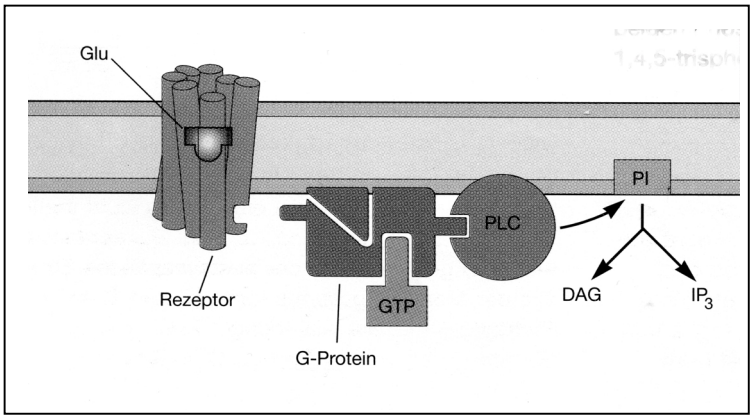


Abb. 4: *Metabotroper Glutamat-Rezeptor*

Glutamat aktiviert eine second-Messenger-Kaskade nachdem es an den metabotropen Rezeptor bindet. Über ein G-Protein wird die Aktivität des Enzyms Phospholipase C (PLC) erhöht. Dies führt zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylgylerol (DAG) (Kandel, 1995).

Die Aktivierung der ionotropen Glutamatrezeptoren ändert die Membranleitfähigkeit für Ionen und damit das Membranpotential. Die ionotropen Rezeptoren werden in zwei Hauptklassen, die α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat AMPA/Kainat- und die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren unterteilt (siehe Abb. 5 und Abb. 6). AMPA/Kainat-Rezeptoren vermitteln wahrscheinlich alle Formen der schnellen glutamatergen Neurotransmission und erlauben den Durchfluss monovalenter Ionen wie Na^+ und K^+. AMPA-Rezeptoren können allerdings auch Ca^{2+}-permeabel sein. Die Ca^{2+}-Permeabilität wird durch die Zusammensetzung der Untereinheiten der Kanäle reguliert. AMPA-Rezeptoren, denen die GluR2-

Untereinheit fehlt, sind neben anderen divalenten Kationen für Ca^{2+} permeabel (siehe Abb. 5) (Pellegrini-Giampietro *et al*., 1997).

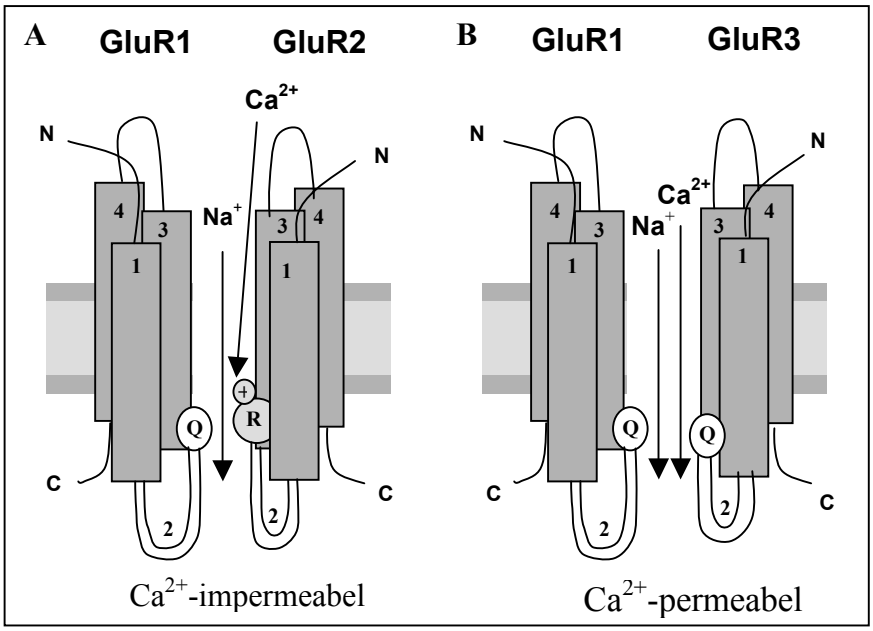


Abb. 5: *Ca^{2+}-Permeabilität von AMPA-Rezeptoren*

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

B: Die AMPA-Kanäle, die sich aus den Untereinheiten GluR1 oder GluR3 zusammensetzen, sind permeabel für Ca^{2+}.

NMDA-Rezeptoren erlauben sowohl den Fluss von ein- und zweiwertigen Ionen, also auch den Durchfluss von Ca^{2+} (siehe Abb. 6). Da mit Glutamat und Glyzin gleichzeitig zwei Agonisten vorhanden sein müssen, um den NMDA-Rezeptor zu aktiven, sind diese Rezeptoren einzigartig unter allen Neurotransmitterrezeptoren.

An der Funktion dieser Rezeptoren sind zusätzlich verschiedene modulierende Bindungsstellen beteiligt, die auf Polyamine, Phosphorylierung, Redoxeinflüsse oder Protonen reagieren. Im Inneren des Ionenkanals des NMDA-Rezeptors liegt eine Mg^{2+}-Bindungsstelle. Unter den Bedingungen des Ruhemembranpotentials wird der Ionenkanal durch physiologische Konzentrationen von Mg^{2+} in einer spannungs- und benutzungsabhängigen Weise blockiert. Mg^{2+} verlässt den Ionenkanal, wenn der Rezeptor durch seine beiden Agonisten aktiviert wird und die Zellmembran depolarisiert ist. Nur unter diesen Bedingungen können Ca^{2+}-Ionen über den NMDA-Rezeptor das Zellinnere erreichen. Im Bereich der Mg^{2+}-Bindungsstelle liegt die so-

genannte Phencyclidin (PCP)-Bindungsstelle. Hier binden nichtkompetitive NMDA-Rezeptoragonisten wie MK-801 oder PCP (Kornhuber & Weller, 1997) (siehe Abb. 6).

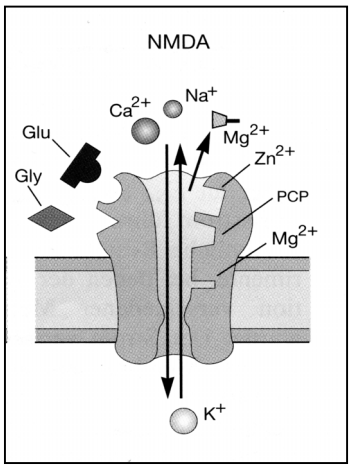


Abb. 6: *Permeabilität NMDA-Rezeptor*

Der NMDA-Rezeptor ist ein unspezifischer Kationenkanal, der permeabel für Ca^{2+}, Na^{+} und K^{+} ist und Bindungsstellen für Glyzin, Zink, Phencyclidin und Mg^{2+} aufweist. Diese bestimmen die Funktion des Kanals in unterschiedlicher Weise (Kandel, 1995).

1.5.2 Glutamat als endogenes Neurotoxin

Glutamat kann unter bestimmten Bedingungen auch neurotoxisch wirken (Kornhuber & Weller, 1997). Unter Ruhebedingungen liegt die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt bei etwa 1 µM. Während physiologischer Glutamatfreisetzung steigt die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt kurzfristig um etwa das 1000fache an. Unter pathologischen Bedingungen, insbesondere Energiemangelbedingungen, steigt die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt leicht an, dies geschieht aber über einen längeren Zeitraum. Gleichzeitig kann bei Energiemangel das Membranpotential nicht aufrechterhalten werden, und der Mg^{2+}-Block wird graduell gemindert. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einem langandauernden Ca^{2+}-Einstrom, gefolgt von einer Aktivierung kataboler Enzyme und schließlich zum Zelltod. Die neurotoxische Wirkung von Glutamatagonisten wird Exzitotoxizität genannt (Kornhuber & Weller, 1997; Olney & Grubareff, 1978). Auch eine milde Depolarisation kann für eine unkontrollierte Aktivierung des NMDA-Rezeptors ausreichen (Beal, 1992). Solche Vorgänge sollen sowohl dem akuten Zelluntergang bei Ischämie als auch dem chronischen Zelluntergang bei Chorea Huntington und der

Parkinson- und Alzheimer-Krankheit zugrunde liegen (Kornhuber und Weller, 1997).

Diese Glutamat-Hypothese der Alzheimer-Krankheit wurde zuerst von Greenamyre *et al*. (1988) aufgestellt und nachfolgend von anderen Autoren bestätigt (Kornhuber *et al*., 1989b; Mattson, 1990).

Viele Befunde sprechen für eine direkte und physiologisch bedeutsame Rolle von Glutamat bei Lernen und Gedächtnis. Die in den Hippokampus ein- und austretenden Fasern sowie die Faserverbindungen innerhalb des Hippokampus benutzen Glutamat als Transmitter. Auch die Dichte an Glutamatrezeptoren ist hier besonders hoch (Kornhuber *et al*., 1989c). In dieser für Lernen und Gedächtnis bedeutsamen Hirnregion treten die ersten Läsionen im Laufe der Krankheit auf (Braak & Braak, 1995).

Nach Untersuchungen von Keller *et al*. (1992) ist die Lernleistung von Ratten von hippokampalen NMDA-Rezeptoren abhängig. Glutamat und dessen Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Langzeitpotenzierung, einem zellulären Modell vom Lernen und Gedächtnis (Bliss & Collingridge, 1993). Mit steigendem Lebensalter tritt eine physiologische Abnahme der Glutamatrezeptoren auf (Kornhuber *et al.*, 1989b). Dies korreliert eventuell mit dem physiologisch auftretenden Gedächtnisverlust im hohen Alter. Viele Untersuchungsergebnisse unterstützen dabei die Annahme einer erhöhten glutamatergen Aktivität bei der Alzheimer-Krankheit. So scheinen β-Amyloid-Proteine die Toxizität von Glutamat zu erhöhen (Mattson *et al.*, 1993).

Mattson *et al*. (1993) sowie Masliah *et al*. (1996) wiesen bei der Alzheimer-Krankheit eine verminderte Funktion von Glutamattransportern nach. Unterfunktionen von Glutamattransportern führen zu einer erhöhten Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt und zu exzitotoxischen neuronalen Schäden, die besonders durch eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ ausgelöst werden.

1.5.3 Ca^{2+}-Veränderungen bei der familiären Alzheimer-Krankheit

Fibroblasten von Alzheimer-Patienten, die eine Mutation im PS1 tragen, zeigen eine veränderte intrazelluläre Ca^{2+}-Homöostase. Die Ca^{2+}-Signalveränderungen in den Fibroblasten von Alzheimer-Patienten sind höchst selektiv und spezifisch für diese Krankheit (Etcheberrigaray *et al*., 1998). Des weiteren verursachen Mutationen im PS2-Gen die gleichen Ca^{2+}-Veränderungen, wie sie bei PS1-Mutationen beobachtet

werden. Somit scheinen diese Ca^{2+}-Veränderungen eine gemeinsame pathologische Bedeutung für PS1-Mutationen zu haben. Einer der bisher nachgewiesenen Effekte der PS1-Mutationen auf Ca^{2+}-Signale ist die Potenzierung der IP_3-vermittelten Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern (Ito *et al*., 1994; Gibson *et al*., 1996; Guo *et al*., 1996; Leissring *et al*., 1999). Die Aufgabe von PS1 in den intrazellulären Ca^{2+}-Signalwegen ist trotz dieser Beobachtung noch nicht genauer definiert. Es wird vermutet, dass die Dysregulation der Ca^{2+}-Homöostase bei PS1-Mutationen eine kausale Rolle in der Pathogenese der genetisch bedingten Alzheimer-Fälle spielt.
Ein wichtiger Hinweis ist der Umstand, dass erhöhte zytosolische Ca^{2+}-Konzentrationen in kultivierten Zellen die Prozessierung von App verändern. Nach Zellkulturversuchen von Querfurth & Selkoe (1994) führt eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ zu einer vermehrten Bildung von Aβ. Somit könnte einer Ca^{2+}-Dysregulation ein wichtiger Einfluss bei einer vermehrten Aβ-Ablagerung zukommen. Mattson *et al*. (1991) konnten zeigen, dass eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ eine Hyperphosphorylierung von Tau bewirken kann.

Bei den Presenilinen wird davon ausgegangen, dass sie eine Ca^{2+}-regulierende Funktion in der Zelle übernehmen. Studien zufolge verursacht ein Ausschalten der biologischen Aktivität der Presenilline einen potenzierten CCE. Dies lässt die Spekulation zu, dass eine der physiologischen Funktionen der Presenilline die Modulation von CCE-Kanälen ist (Yoo *et al*., 2000).
Nach Leissring *et al*. (2000) weisen Fibroblasten von Mäusen, die die PS1-Mutation [M146V] exprimieren, einen verringerten CCE auf. Derartige Untersuchungsergebnisse zeigten sich auch in *Xenopus Oozyten*, die eine PS1-Muation tragen (Leissring *et al*., 2000). Eine Verringerung des CCE kann ein sekundäres Phänomen in den Neuronen von Mäusen mit einer PS1-Mutation sein. Eine Überfüllung von ER-Ca^{2+}-Speichern wie sie in den Neuronen dieser Tiere vorliegt, kann zwangsläufig zur Verringerung des CCE führen.
Die Beobachtung, dass PS1-Mutationen in Neuronen zu einer erhöhten Speicherung von Ca^{2+} im ER führen, kann somit zur Veränderung von zwei Ca^{2+}-Signalwegen führen. Einerseits kommt es zu einer Potenzierung der ER-Ca^{2+}-Freisetzung andererseits zu einer Verringerung des CCE.

1.5.4 Die Rolle von Ca^{2+} in der neuronalen Zellschädigung

Die Mechanismen, die zur neuronalen Zellschädigung führen, können durch unterschiedliche Formen von Stress ausgelöst werden. Dazu gehören unter anderem Ischämie, Hypoglykämie und die Zellalterung. Ca^{2+} kommt eine primäre Rolle in der Entwicklung neuronaler Zellschädigung im Gehirn bei verschiedenen pathologischen Stadien zu. Drei unterschiedliche Kompartimente können in einer Störung der Ca^{2+}-Homöostase involviert sein: das Zytoplasma, die Mitochondrien und das ER.

Die Funktion von Ca^{2+} im Prozess der Apoptose ist sehr komplex und beinhaltet ein Zusammenspiel von vielen Systemen. Dazu gehören das Sphingomyelin-Signal-System, das Redoxsystem, die durch Stress aktivierten Mitglieder der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und Ca^{2+}-Signalwege.

Eine Funktion des Ca^{2+}-Signalweges ist die Kontrolle der Expression apoptotischer Signalkomponenten. Ca^{2+} kann als Antwort auf eine Vielzahl von pathologischen Vorgängen Apoptose induzieren. Derartige Vorgänge werden durch eine Ca^{2+}-vermittelte Expression von Liganden ausgelöst, die wiederum an sogenannte „Zelltod-Rezeptoren“ wie CD95 binden und diese aktivieren. Andererseits kann Ca^{2+} auch direkte toxische Effekte auf die Mitochondrien und das ER haben (Kass & Orreniu, 1999).

Mitochondrien antworten auf ein apoptotisches Ca^{2+}-Signal mit der selektiven Freisetzung von Cytochrom c oder der erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Kass & Orreniuis, 1999; Szalai *et al*., 1999).

Der neuronale Zelltod scheint sowohl mit einem Ansteigen als auch Abfallen der $[Ca^{2+}]_i$ assoziiert zu sein (Paschen, 2000).

Eine dauerhaft erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ kann, wie z.B. im Fall der bereits beschriebenen Exzitotoxizität, zur Aktivierung von Proteasen und Endonukleasen in der Zelle und zur Auslösung von Apoptose führen.

Ein möglicher Mechanismus, der zur neuronalen Zellschädigung durch niedrige $[Ca^{2+}]_i$ führen kann, ist die Störung der ER-Ca^{2+}-Homöostase. Ein Entzug von Serum führt zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität von ER-Ca^{2+}-Pumpen und einer Ausschaltung der Proteinsynthese. Die Synthese von Proteinen wird durch das im ER vorliegende Ca^{2+} kontrolliert. Aufgrund einer erniedrigten Ca^{2+}-Konzentration im ER kann es so zu einer beeinträchtigten Proteinsynthese kommen (Doutheil *et al.,* 1999).

Das ER spielt neben der Funktion als Ca^{2+}-Speicher-Kompartiment auch eine wich-

tige Rolle in der Faltung, dem Prozessieren und der Exkretion von Membran- und sekretorischen Proteinen (Hofer *et al*., 1993). Diese Prozesse sind Ca^{2+}-abhängig (Troadec *et al.,* 1998). Damit ist anzunehmen, dass die im ER vorliegende Menge an Ca^{2+} ein wichtiger Mediator für die neuronale Zellschädigung darstellt (Doutheil *et al*., 1999).

1.6 Zielsetzung

Die Alzheimer-Krankheit ist eine durch das Alter bedingte Erkrankung, die zu einer kognitiven Dysfunktion und zur Degeneration von Neuronen in limbischen und kortikalen Hirnregionen führt. Mutationen im PS1 können einen sehr frühen Beginn der Alzheimer-Erkrankung hervorrufen. Analysen an Fibroblasten von Alzheimer-Patienten mit einer PS1-Mutation deuten darauf hin, dass ein erhöhter Level an oxidativem Stress und eine Störung der zellulären Ca^{2+}-Homöostase einen wesentlichen Einfluss auf die bei der Alzheimer-Krankheit vorliegende synaptische Dysfunktion und den neuronalen Zelltod haben. Ziel dieser Arbeit ist zu klären, wie Mutationen im PS1-Gen die Ca^{2+}-Homöostase in hippokampalen Neuronen von transgenen Mäusen beeinflussen. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Inwieweit ist die Vitalität und die intrazelluläre Ca^{2+}-Homöostase hippokampaler Neurone transgener Mäuse mit der PS1-Muation [A246E] alteriert?

2. Werden Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ bei transgenen Mäusen mit einer PS1-Mutation durch einen vermehrten Einstrom von externem Ca^{2+} oder infolge einer vermehrten Freisetzung von internem Ca^{2+} ausgelöst?

3. Stehen die Alterationen der intrazellulären Ca^{2+}-Homöostase in einem Zusammenhang mit der Expression von App und der Aktivität der γ-Sekretase?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die für die Untersuchungen verwendeten Zellen und Hirnschnitte stammten von transgenen Presenilin- und App-Mauslinien, die auf einem FVB/N Hintergrund generiert wurden. Die FVB/N Mäuse wurden als Kontrollen verwendet.

Die transgenen Presenilin-Mauslinien stammten aus der Arbeitsgruppe von Prof. F. Van Leuven (Zentrum für Humangenetik, Leuven, Belgien; siehe Dewachter *et al*., 2000; Schneider *et al*., 2001). Nach Überführung der Tiere, wurden diese in der zentralen Tierhaltungseinrichtung des Universitätsklinikums Göttingen und des Instituts für Neuropathologie in München unter Standardbedingungen gehalten.

Die App [-/-]-Mäuse stammten von Prof. Dr. Weissmann (Institut für Molekularbiologie, Zürich, siehe Li *et al*., 1996) und wurden in der Tierhaltungseinrichtung des Universitätsklinikums Göttingen und des Instituts für Neuropathologie in München gekreuzt und ebenfalls unter Standardbedingungen gehalten.

In den folgenden Kapitel 2.1.1 bis 2.1.6 werden die Mauslinien der vorliegenden Untersuchungen näher beschrieben:

2.1.1 Transgene Presenilin-Mäuse (PS1 [A246E], PS1 [S182])

In Experimenten wurden Untersuchungen an transgenen PS1-Mäusen durchgeführt, die entweder ein humanes Wildtyp-PS1 [S182] oder ein mutiertes humanes PS1 [A246E] unter der Kontrolle des Neuronen-spezifischen thy-1 Genpromotors exprimieren (Moechars *et al*., 1999) (siehe Abb. 7). Das transgene humane PS1-Protein wird im Hirn dieser Mäuse zum gleichen Grad exprimiert, wie das endogene Maus-PS1-Protein. Western-Blot-Untersuchungen zeigen eine proteolytische Prozessierung des humanen PS1-Transgens in C- und N-terminale Fragmente. Histologisch zeigen die Hirne dieser transgenen PS1-Mäuse auch im fortgeschrittenen Alter von 2 Jahren keine Auffälligkeiten. Bei Lern- und Verhaltenstests (*water maze test*) unterscheiden sich diese transgenen Mäuse nicht gegenüber nichttransgenen Tieren (Schneider *et al*., 2001).

Insgesamt zeigen die transgenen PS1-Mäuse keinen deutlichen Phänotyp oder pathologische Defekte. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Untersuchungen

von Patienten, die eine Mutation im PS1 aufweisen. In den meisten Fällen zeigen sich in den Hirnen dieser Patienten ab einem Alter von 40 Jahren deutliche Plaque-Ablagerungen. Ausschließlich in den Hirnen von Mäusen, die gleichzeitig neben einem transgenen PS1 auch transgenes humanes App exprimieren [Appld/V717I], zeigt sich ein Anstieg der Aβ-Akkumulation.

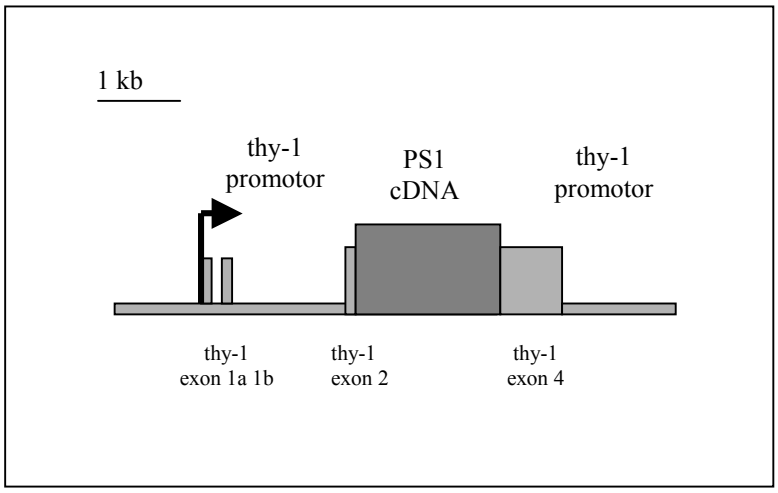


Abb. 7: *Schematische Darstellung des Maus thy-1 Genpromotorkonstrukts*
Mit diesem Konstrukt erfolgte die Generierung von transgenen PS1- Mäusen.

2.1.2 Transgene App-Mäuse (App [V717I]/Appld)

Zur Generierung transgener App-Mäuse wurde die cDNA, die für humanes Wildtyp-App sowie für die London (ld) [V717I]-Mutation kodiert, in einem pTSC-Vektor geklont und unter dem Neuronen-spezifischen Maus thy-1-Gen-promotor exprimiert (Moechars *et al.*, 1999, siehe Abb. 8). Die Mutation [V717I] liegt in der Nähe der γ-Sekretase-Schnittstelle (siehe Abb. 8). Das mutierte App-Protein wird bei diesen Mäusen in großen Mengen im Hippokampus und im parietalen und frontalen Kortex, in geringeren Mengen im olfaktorischen Bulbus und Thalamus und nur in sehr geringen Mengen im Cerebellum exprimiert (Moechars *et al.*, 1999). Messungen verschiedener App-Metabolite im Hirn von gealterten App Mäusen mit der [V717I]-Mutation zeigen die Korrelation zwischen einem erhöhten Aβ42-Level und der Bildung von Amyloid-Plaques (Moechars *et al.*, 1999).

Abb. 8: *Aminosäure-Sequenz des Aβ*
Gezeigt sind die Schnittstellen der 3 Sekretasen (α-, β- und γ -Sektratse) in der Aminosäure-Sequenz des Aβ. Die London-Mutation [V717I] liegt in der Nähe der γ-Sekretase-Schnittstelle.

2.1.3 App-*knock-out*-Mäuse (App [-/-])

In App-*knock-out*-Mäusen (App [-/-]) wurde das App-Gen durch das Deletieren einer 3,8 kb Sequenz inaktiviert (Li *et al*., 1996). Diese Sequenz umfasst den Promotor und das erste Exon. Dieses codiert für das Signalpeptid von App (Izumi *et al*., 1992). Weder die App mRNA noch das Protein ist in diesen Mäusen zu detektieren. Homozygote App [-/-]-Mäuse sind fertil und zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Neuroanatomische Studien der Hirne dieser Tiere zeigen keine Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (Li *et al*., 1996).

2.1.4 Neuronen-spezifische Presenilin-*knock-out*-Mäuse (PS1 [-/-])

Die Inaktivierung des PS1-Gens beeinträchtigt die Embryogenese von Mäusen. Dabei kommt es zu einer gestörten Somatogenese und Neurogenese, die zu einer Fehlbildung des Gehirns und zur späten embryonalen Letalität führt (Shen *et al*., 1997; De Strooper *et al*., 1998; Hartmann *et al*., 1999). Durch die Generierung sogenannter „temporaler *knock-out*-Mäuse“ war es möglich, adulte PS1 [-/-]-Mäuse zu untersuchen. In diesen Mäusen wird das PS1-Gen erst im adulten Tier ausgeschaltet. Ermöglich wird eine solche Strategie durch den Einsatz der Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1, die mit großer Präzision DNA-Rekombinationsereignisse zwischen zwei je 34 bp langen Erkennungssequenzen, den sogenannten `*loxP*-sites`, katalysiert (Sauer & Henderson, 1988). Dabei führt die Rekombination zwischen zwei in gleicher Richtung orientierten *loxP*-Sequenzen zum Verlust des dazwischenliegenden Segments. Dieses System wurde für die zeitlich und gewebespezifisch

kontrollierte Inaktivierung des PS1-Gens in Mäusen eingesetzt, indem das PS1-Gen mit *loxP*-Sequenzen flankiert und die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des gewebespezifischen thy-1-Promotors exprimiert wird. Somit wurden Mäuse generiert, die nur postnatal und speziell in Neuronen kein PS1 exprimieren. Generiert wurden diese Mäuse durch das Kreuzen zweier transgener Mauslinien: (i) Mäuse mit einem markierten PS1-Gen, um die l*oxP*-Stellen einzubringen (PS1-*flox* Mäuse), und (ii) Mäuse, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle eines Maus thy-1-Genpromotors exprimierten. Der thy-1-Genpromotor, der in Abbildung 6 dargestellt ist, ist umfassend beschrieben. Er erzeugt postnatal ausschließlich in Neuronen die Expression des Transgens (Moechars *et al*., 1996; 1999; Spittaels *et al*., 2000; Van Dorpe *et al*., 2000; Tesseur *et al*., 2000). Diese Neuronen-spezifischen PS1 [-/-]-Mäuse waren lebensfähig. Routinemäßige Histologieuntersuchungen der Hirne dieser Mäuse zeigten eine unauffällige Morphologie. Bei den PS1 [-/-]-Mäuse war insgesamt kein offensichtlicher Phänotyp zu erkennen. Dies konnte auch anhand von Verhaltens- und Lern-Tests festgestellt werden (Dewachter *et al*., 2000).

Eine Genotypisierung der Mäuse wurde mittels PCR durchgeführt. Western Blots demonstrierten einen stark herabgesetzten Level des PS1 Proteins in Totalhirnhomogenaten von PS [-/-]-Mäusen. Eine beobachtete niedrige restliche Proteinexpression, ist vermutlich auf die Expression durch Glia- und oder nicht-neuronale Zellen zurückzuführen. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schließen, dass das PS1-Gen nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der normalen neuronalen Architektur und der kognitiven Fähigkeiten im adulten Maushirn ist. Eventuell kann die normale Funktion des PS1 in adulten Neuronen durch PS2 übernommen werden. Allerdings konnten keine erhöhten PS2 mRNA oder Proteinlevel im Hirn von PS1 [-/-]-Mäusen gefunden werden.

2.1.5 Transgene App-Mäuse auf einem PS1 [-/-]-Hintergrund (AppldxPS1[-/-])

Im Rahmen einiger Versuche wurden PS1 [-/-]-Mäuse mit App [V717I] transgenen Mäusen gekreuzt, um so dreifach transgene Mäuse zu generieren. Diese Mäuse sind: homozygot für das markierte PS1-Gen und exprimierten das thy1-Cre-Recombinase-Transgen und das thy1-App [V717I]-Transgen. Auf diese Weise wurde in den sogenannten App[V717I]xPS1[-/-] Mäusen exakt in denselben Neuronen, in denen humanes App [V717I] exprimiert wurde, mit Hilfe der Cre-Rekombinase das PS1-Gen ausgeschaltet. Beides wurde durch denselben Maus thy1-Genpromotor kon-

trolliert. Nachkommen mit dem Genotyp App[V717I]xPS1[-/-] wurden durch 4 unabhängige PCR Reaktionen identifiziert. Diese Tiere wiesen keine Embryonal- und Entwicklungsschäden auf.

2.1.6 Transgene Presenilin Mäuse auf App [-/-]-Hintergrund (App[-/-]xPS1[A246E])

Für weitere Untersuchungen wurden transgene PS1-Mäuse, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren mit App [-/-]-Mäusen gekreuzt. Zur Generierung homozygoter App[-/-]xPS1[A246E]-Mäuse, wurden Kreuz-Paarungen zwischen den heterozygoten Tieren durchgeführt und die Nachkommen durch zwei unabhängige PCR-Reaktionen überprüft. Diese transgenen Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp.

2.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien

Chromosomale DNA aus Mausschwanzbiopsien wurde mit Hilfe des `QIAamp Tissue Kit` (Qiagen GmbH, Hilden) nach der Vorschrift des Herstellers präpariert. Dazu wurde den Mäusen mit einem sterilen Skalpell ca. 0,5 bis 1 cm der Schwanzspitze abgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Um keine gegebenenfalls falsch-positiven Signale in der PCR-Reaktion zu erhalten, durfte bei der Biopsie der Schwanzspitze verschiedener Tiere keine Übertragung von Fremd-DNA in die Eppendorf Reaktionsgefäße erfolgen.
Unter Zugabe von 200 µl Lysispuffer (20 µl Proteinase K in 180 µl Puffer ATL) wurden die Schwanzproben für 12 Stunden bei 55°C in einem Schüttel-Thermoblock (Eppendorf) gegeben. Verbliebene feste Bestandteile wurden anschließend abzentrifugiert (14000 rpm, 5 Minuten bei RT) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Fällung erfolgte durch die Zugabe eines Gemisches aus 200 µl Puffer AL und 200 µl Ethanol und einer anschließenden gründlichen Durchmischung auf einem Vortexer (Scientific Industrie). Dieses Gemisch wurde auf eine in einem 2 ml Auffangröhrchen platzierte DNeasy Minisäule gegeben und für eine Minute bei 8000 rpm und RT zentrifugiert. Die Dneasy Minisäule mit der isolierten DNA wurde in ein neues 2 ml-Gefäß überführt und 2 mal mit je 500 µl Puffer AW1 und AW2 gewaschen (mit anschließender Zentri-

fugatiuon, 1 Minute, 8000 rpm, RT). Danach erfolgte die Elution der DNA durch Zugabe von 200 µl Puffer AE und anschließender Zentrifugation bei 8000 rpm und RT. Die auf diese Weise isolierte chromosomale DNA aus Mausschwanzbiopsien konnte bis zur Genotypisierung mittels PCR-Methode bei 4°C gelagert werden. Alle verwendeten und angeführten Puffer und Reagenzien waren Teil des `QIAamp Tissue Kit`(Qiagen).

2.3 Genotypisierung transgener Mäuse mittels der PCR-Methode

Um DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, werden Oligonucleotidprimer benötigt. Hierbei handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize. Sie synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. All diese DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion als Doppelstränge vor. Um die Synthese zu wiederholen, wird die doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufgeschmolzen. Nach Abkühlen der Mischung werden die Primer dann wieder gebunden. Sobald die richtige Temperatur für die Enzymreaktion erreicht ist, verlängert die DNA-Polymerase die Primer. Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine neue Vermehrungsrunde. Die neusynthesierten DNA-Stränge dienen dabei auch als Matrize. Sie tragen auf diese Weise mit jedem neuen Zyklus zu einem Ansteigen der Konzentration der zu vervielfältigenden Zielsequenz bei. Zur Detektion der transgenen PS1 [A246E]- und PS1 [S182]-Sequenz wurden in der PCR-Reaktion die Primer P27 und P29 in einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt. Der Reaktionsansatz für die PCR-Reaktion ist aus dem Anhang zu entnehmen (A1.1). Die einzelnen Reaktionsansätze wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und in einen Eppendorf-Thermocycler platziert. Das verwendete PCR-Programm ist aus dem Anhang zu entnehmen (A1.2).

Die Kontrolle der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung mit Hilfe von Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,003 % Ethidiumbromid. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte unter UV-Licht (siehe Abb. 9).

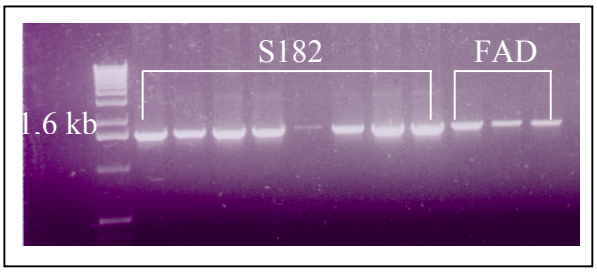


Abb. 9: *Auftrennung der PS1-Amplikons durch Gelelektrophorese*
Anhand der Bandenbildung bei 1,6 kb ließ sich das Vorkommen des Transgens (PS1 Mutation [A246E] und humanes PS1[S182]) bei den Tieren identifizieren.

Um den Genotyp der einzelnen Tiere weiter zu charakterisieren, wurde anschließend mit den PCR-Amplikons ein DdeI-Verdau gemacht. Nur so war eine Unterscheidung zwischen Mäusen, die die Mutation trugen (PS1 [A246E]) und solchen, die nur das Transgen ohne Mutation trugen (PS1 [S182]) möglich (siehe Abb. 10). Hierzu erfolgte zunächst eine Aufreinigung der PCR-Produkte mittels des „QIAquick PCR Purifikation Kit“(Qiagen GmbH, Hilden). Dabei wurden 25 µl PCR-Reaktion zu 125 µl Puffer PB gegeben (1 Volumen PCR Reaktion zu 5 Volumen Puffer PB) und dieses Gemisch dann auf eine QIAquick Spin Säule pipettiert, die sich auf einem 2 ml Sammelgefäß befand. Um die DNA zu binden, wurde die Probe anschließend auf der QIAquick Spin Säule zentrifugiert (1 Minute für 13000 rpm, RT) und der Säulendurchlauf verworfen. Danach wurde die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gestellt. Nach dem Waschen der Säule mit 0,75 ml Puffer PE (1 Minute 13000 rpm; RT) wurde der Säulen-Durchlauf wiederum verworfen. Es folgte eine weitere Zentrifugation (1 Minute für 14000 rpm und RT) und anschließendes Verwerfen des Säulen-Durchlaufs. Um die DNA zu eluieren (Zugabe von 50 µl Aqua bidest., Zentrifugation 1 Minute 13000 rpm, RT) wurde die QIAquick Spin Säule dann in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für den Verdau mit dem Restriktionsenzym Dde I wurde der Verdauungsansatz (15 µl DNA, 2,5 µl Puffer D, 6,5 µl Aqua bidest. und 1 µl Enzym DdeI) bei 37°C für vier Stunden inkubiert. Wie die Abbildung 10 zeigt, erfolgte die Kontrolle des Enzymverdaus durch Auftrennung in 1 %igen Agarosegelen, wobei die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden unter UV-Licht durchgeführt wurde.

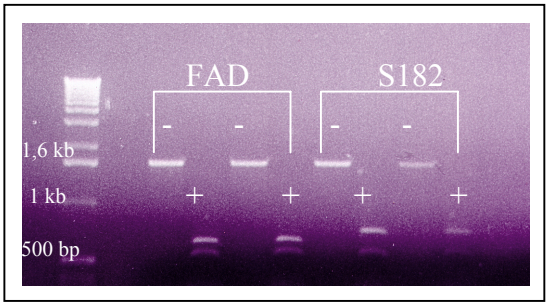


Abb. 10: *Verdau der aufgereinigten PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym DdeI*
Anhand der Größe der beiden Spaltprodukte ließ sich das Vorkommen der Mutation bei den Tieren kontrollieren (- ohne DdeI Verdau, + mit DdeI Verdau). Tiere mit der humanpathogenen PS1-Mutation (FAD) zeigten nach DdeI Verdau ein 520 bp und ein 650 bp großes Fagment. Transgene Tiere mit humanem PS1 (S182) zeigten nach DdeI Verdau ein 520 bp und ein 600 bp großes Fragment. FAD: Tiere mit der humanpathogenen PS1 [A246E]-Mutation, [S182]: transgene Tiere mit humanem PS1.

Zur genetischen Detektion der ausgeschalteten App-Sequenz wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt (siehe Anhang A1.3). Das folgende PCR-Programm ist aus dem Anhang zu entnehmen (A1.4).

Die Kontrolle der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung mit Hilfe von Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,003 % Ethidiumbromid. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte unter UV-Licht (siehe Abb. 11).

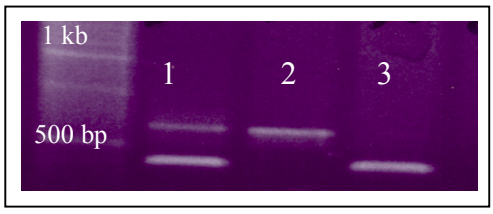


Abb. 11: *Auftrennung der App-Amplikons durch Gelelektrophorese*
Anhand der Bandenbildung ließ sich der Genotyp der untersuchten Tiere identifizieren (Spur 1: App(+/-) heterozygot mit einem Produkte bei 480 bp und bei 600 bp, Spur 2: App(+/+) homozygot mit einem Produkt bei 600 bp, Spur 3: App(-/-) homozygot mit einem Produkt bei 480 bp)

2.4 MTT-Assay

Als Assay für eine durch Glutamat ausgelöste Toxizität (Exzitotoxizität) diente der MTT-Test. Hierbei handelt sich um einen kolorimetrischen nicht-radioaktiven Test. Dieser beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu lila-farbenen Formazankristallen durch zelluläre Dehydrogenasen. Die Absoption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 bis 600 nm bestimmt. In diesem Wellenlängenbereich absorbiert MTT nicht. Dehydrogenasen sind nur in lebenden Zellen aktiv. Aus diesem Grund kann die Umwandlung von MTT als Maß für die Vitalität der Zellen angesehen werden (Mosmann, 1983). Mit Hilfe des MTT-Assays wurde sowohl das Überleben von neuronalen als auch von Glia-Zellen untersucht. Dazu wurden die auf beschichteten Objektgläschen gewachsenen Zellen mit 10 µl MTT (Stammlösung 5 mg/ml in Aqua bidest.) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Beenden der MTT-Reaktion und Auflösen der gebildeten Formazankristalle erfolgte durch eine Zugabe von 200 µl Lösungsmittel (DMSO). Zur Lösung der Kristalle, wurde eine ein- bis zweistündige Inkubation bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgte eine photometrische Messung der Absorption bei 550 nm.

2.5 Herstellung transversaler Hippokampusschnitte

Untersuchungen zur intrazellulären Ca^{2+}-Homöostase wurden auch an hippokampalen CA1 Neuronen vitaler Hippokampusschnitte von verschiedenen transgenen Mauslinien (siehe 2.1) durchgeführt. Die Präparation der Transversalschnitte erfolgte nach dem Protokoll von Ilano *et al.* (1991). Für die Herstellung von Hippokampusschnitten wurden Mäuse im Alter von sechs bis acht Monaten herangezogen. Die chloroformierten Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet, dekapitiert und das Hirn in eisgekühlter Carbogen-begaster (5 % CO_2, 95 % O_2) acsF (artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit) (siehe Anhang A2.5) herauspräpariert. Um ein möglichst niedriges Aktivierungsniveau der Neurone bei der Präparation zu haben, war in der Präparationslösung die Ca^{2+}-Konzentration auf 0,5 mM eingestellt. Bei der anschließenden Durchtrennung der beiden Hemisphären, mussten die Meningen weitgehend von der Hemisphäre, die dann weiter geschnitten werden sollte, entfernt werden. Transversale Schnitte durch die Hemisphäre mit einer Dicke von 150 µm wurden mittels eines Vibratoms (Leica VT 1000E) durchgeführt. Die

den mittels eines Vibratoms (Leica VT 1000E) durchgeführt. Die Hirnschnitte wurden auf ein Nylonnetz in Carbogen-begaste ascF mit 2mM $CaCl_2$ bei 35°C überführt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde konnten die Schnitte in die Messkammer gelegt werden und dort unter dem Mikroskop die CA1 Region eingestellt werden. Die in den Schnitten lokalisierten CA1 Neurone wurden anschließend über die *patch*-Pipette mit Fura-2 beladen (siehe 2.8 und 2.9).

2.6 Enzymatische Dissoziation hippokampaler Neurone

Die Möglichkeit Neurone adulter Mäuse zu untersuchen, erbot sich durch die Dissoziationsmethode von Kay und Wong (1986). Die Mäuse waren bei dieser Art der Präparation in einem Alter von sechs Monaten bis zu einem Jahr. Die chloroformierten Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, dekapitiert und die Hippokampi in eisgekühltem Carbogen-begastem (5 % CO_2, 95 % O_2) PIPES Puffer (siehe Anhang A2.1) herauspräpariert. Bei der Präparation mussten die Meningen wieder weitgehend von den Hippokampi entfernt werden. Auf Teflon-beschichteten Platten wurden frontale Hippokampi-Schnitte mit einer Dicke von 200 µm mittels eines Tissue-Shoppers durchgeführt. Anschließend wurden die Hirnschnitte in die zentrale Kammer einer Plexiglas-Apparatur (siehe Abb. 12) überführt. Diese war mit 10 ml PIPES Puffer (32°C) gefüllt, in dem zuvor 8 mg Trypsin gelöst wurden. Des Weiteren wurden die Schnitte kontinuierlich durch einen Magnetrüher im Boden der Apparatur bewegt und zusätzlich mit Sauerstoff begast (siehe Abb. 12). Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden wurde der PIPES/Trypsin Ringer durch neuen PIPES Ringer ersetzt und auf RT gebracht. Zwei bis drei der Schnitte konnten nun der Kammer entnommen werden und in DMEM (Dulbecco`s minimal essential medium, PAN) mit zwei unterschiedlich groß gezogenen Pipetten trituriert werden. Die sich daraus ergebende Zellsuspension wurde in Locke`s Puffer (siehe Anhang A2.2) überführt, auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und nach Sedimentation mit Fura-2AM beladen.

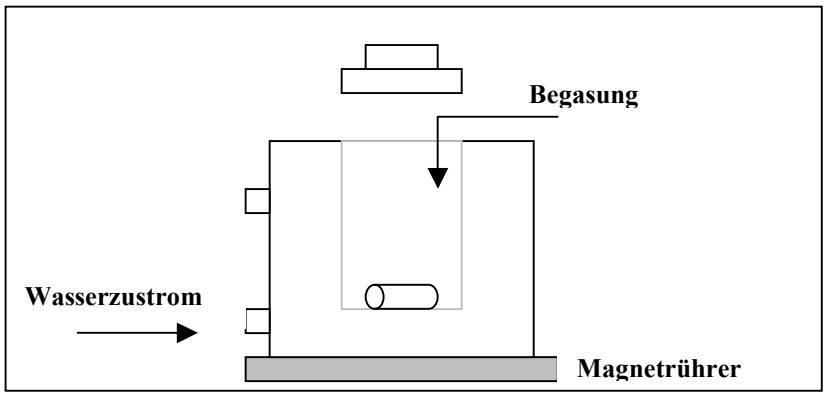


Abb. 12: *Plexiglasapparatur zur Herstellung dissoziierter hippokampaler Neurone (Seitenansicht)*
Schematische Darstellung der Plexiglasapparatur zur Herstellung dissoziierter Hippokampusneurone aus Hirnschnitten. Um die Temperatur in der inneren Kammer zu kontrollieren, ist die äußere Kammer der Apparatur mit einem zirkulierenden Wasserstrom über ein Wasserbad verbunden.

2.7 Hippokampale Langzeitkulturen

Zur Messung der Ca^{2+}-Homöostase wurden neuronale Primärzellkulturen aus den Hippokampi junger Mäuse der Linien FVB/N, PS1 [S182], PS1 [A246E] sowie App [-/-] und App[-/-]xPS1[A246E] herangezogen, die auf einer adhärenten Astrozytenschicht wuchsen. Das Anlegen von derartigen Langzeitkulturen war nötig, da der Neuronen-spezifische thy-1 Promotor erst in einem Zeitraum von zwei bis drei Wochen nach der Geburt der Tiere die Mutation exprimiert.

2.7.1 Vorbereiten der Kulturgefäße

Runde Deckgläschen (Menzel-Gläser, ∅ 13 mm) dienten zur Anzucht eines Astrozytenrasens in 12 Well-Kulturschalen. Vor einem Aussähen der Gliazellen erfolgte eine Reinigung der Deckgläschen für 12 Stunden in 1N HCl auf einem Laborschüttler. Nach dem Spülen der Gläschen mit Aqua bidest. bzw. 70 %igem Ethanol erfolgte die Lagerung in 96 %igen Ethanol. Um den Astrozyten einen optimalen Haftuntergrund zu bieten wurden die abgeflammten Deckgläschen unter der Sterilbank jeweils mit einem Gemisch aus Poly-D-Lysin-Collagen-Essigsäure (im Verhältnis 1:1:3) beschichtet. Derart präparierte Deckgläschen ließen sich bei 4°C über mehrere Wochen lagern.

2.7.2 Herstellung einer adhärenten (*feeder-layer*) Astrozytenschicht

Die Herstellung von Astrozytenzellkulturen erforderte die Hirne von vier einen Tag alten Mäusen. Die Tiere wurden dekapitiert und die beiden Hemisphären in warmer HBSS (Hank`s balanced salt solution) herauspräpariert und vom Hirnstamm und den Meningen befreit. Alle nun folgenden Schritte erfolgten- soweit als möglich - unter sterilen Bedingungen. Die Hemisphären wurden in mit Trypsin versetzter temperierter HBSS (37°C, 4,5 ml HBSS + 0,5 ml Trypsin), 5 Minuten mit einer Pipette trituriert. Die Enzymreaktion konnte mittels Zugabe von DMEM (+ 10 % FCS, +2 mM Glutamin, +1 % Penicilin/Streptomycin, 37°C) gestoppt werden. Die so entstandene Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 min, 1500 rpm, RT), der Überstand abgenommen und das Pellet in DMEM resuspendiert. Eine Lagerung dieser Suspension erfolgte in Kulturflaschen (Nunc) bei 37°C und 10 % CO_2 im Kulturschrank bis die Astrozyten nach 8 Tagen einen adhärenten Rasen gebildet hatten.
Das Übertragen der Astrozyten von den Kulturflaschen auf die runden Deckgläschen erfolgte durch eine maximal 10 minütige Trypsinisierung in den Kulturflaschen bei 37°C. Nach dem Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von DMEM konnte die sich gebildete Zellsuspension aufgenommen und zentrifugiert werden (1000 rpm, 21°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet je nach Zelldichte in der jeweiligen Menge DMEM gelöst ($3x10^3$ Zellen/Kulturfach) und in die einzelnen Kulturfächer pipettiert. Die Astrozyten wuchsen bis zur Bildung eines adhärenten Rasens bei 37°C und 10 % CO_2 auf den Deckgläschen der Zellkulturschalen im Kulturschrank. Nach ein bis zwei Tagen war es möglich die Hippokampusneurone auf diesem Rasen auszusähen.

2.7.3 Herstellung neuronaler Primärzellkulturen

Die Generierung der hippokampalen Kulturen erfolgte nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. C. Rosenmund aus den Hirnen neugeborener Mäuse. Die Tiere wurden dekapitiert und die Hippokampi in eisgekühlter HBSS (Hank`s balanced salt solution, PAN) herauspräpariert. Dabei waren die Meningen zu entfernen, da diese die weitere Dissoziierung der Neurone behinderten.
Alle nun folgenden Schritte erfolgten - soweit als möglich - unter sterilen Bedingungen. Die Hippokampi wurden in steriler, temperierter DMEM-Enzym-Lösung (10 ml DMEM + 2 mg Cystein + 0,1 ml $CaCl_2$ 100 mM+ 0,1 ml EDTA 50 mM+ 20

bis 25 Einheiten Papain/ml) für eine Stunde im Wärmebad inkubiert. Ein Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte durch die Übertragung der Hippokampi für fünf Minuten in eine sterile, temperierte Enzym-Abstopp-Lösung (10 ml 5 % FCS DMEM + 25 mg Albumin + 25 mg Trypsin-Inhibitor) übertragen. Die Triturierung der Hippokampi mit enggezogenen Glaspipetten erfolgte dann in 5 %igem DMEM, ebenso das Aufgeben auf den Astrozytenrasen. Drei bis sechs Stunden nach dem Aussähen der hippokampalen Zellen wurde das DMEM-Medium gegen ein Neurobasal-Medium, das mit B27 (Life Technologies, Inc) angereichert war, ausgetauscht. Nach 19 bis 21 Tagen in Kultur konnten mit den Neuronen Experimente durchgeführt werden. Dazu erfolgte eine Inkubation der Neurone in Locke`s Puffer (siehe Anhang A2.2).

2.8 Versuchsaufbau

Wie in Abbildung 13 gezeigt, setzt sich der Versuchsaufbau aus fünf Komponenten zusammen:

1. eine *patch-clamp*-Einheit zum Einbringen von Farbstoff in Zellen
2. eine optische Detektionseinheit (Olympus BX50WI Mikroskop), die es erlaubt sowohl Zellen in Kultur als auch oberflächennahe Neurone im 150 µm starken Schnitt mit einem 60fach Wasser-Immersions-Objektiv sichtbar zu machen
3. eine im ultravioletten Bereich lichtintensive Anregungseinheit für den jeweiligen Farbstoff mit einem möglichst schnellen Wellenlängenwechsel zwischen 340/380 nm für Messungen mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fura-2 bzw. Fura-2AM (Molecular Probes Europe BV, Leiden NL)
4. ein hochempfindliches Detektionssystem für die Emission des jeweiligen Farbstoffes mit der Option, den jeweiligen Messbereich auswählen zu können um die räumliche Auflösung zu gewährleisten und das Signal/Rauschverhältnis zu optimieren
5. ein Computersystem (Power Macintosh G3 und Pentium III) mit geeigneter Software (s.u.) als Steuereinheit

Die *patch-clamp* Einheit (siehe Abb. 13) umfasste neben der Pipettenhalterung einen EPC-9 Verstärker (HEKA) und wurde ausschließlich zum Einbringen des Farbstoffs Fura-2 in Zellen verwendet. Die Pipettenhalterung war an einem Vorverstärker des EPC-9 befestigt. Dieser konnte mechanisch und mit einer dreidimensionalen Piezo-Steuerung (Physik Instrumente, Waldbronn) bewegt werden. Der Vorverstärker war

mit einer direkten Aufnahme für den Pipettenhalter ausgerüstet, in den die *patch*-Pipetten eingesetzt wurden. Er verfügte außerdem über einen Anschluss für die Badelektrode. Der Operationsverstärker, der den Kompensationsstrom reguliert, ist Teil des Vorverstärkers. Ausgehend vom Vorverstärker wurde das analoge Stromsignal zum *patch-clamp*-Verstärker (EPC-9, HEKA) geleitet. Der EPC-9 wurde über einen Power Macintosh G3 angesteuert. Mit der speziell für *patch-clamp*-Messungen entwickelten Software (Puls 8.50, HEKA) konnte das analog aufgenommene Signal durch den AD-Wandler des EPC-9 digitalisiert dargestellt werden. Ein elektrisch gesteuertes Flüssigkeitsumlaufsystem sorgte für die Durchspülung der Mikroskopkammer mit der jeweiligen Ringerlösung. Bei der Untersuchung von Gewebeschnitten wurden diese unter einem Nylonnetz, das an einem Platin-U befestigt war, am Boden der Kammer fixiert. Somit konnte neben einer Fixierung auch eine optimale Umspülung gewährleistet werden. Der Durchlauf wurde mit zwei Zuläufen und einem Ablauf so eingerichtet, dass in der Messkammer ein möglichst laminarer Fluss der jeweiligen Ringerlösung vorlag. Um Vibrationen, die ein Verrutschen der Messpipette zur Folge hätten, zu vermeiden stand der gesamte Messbereich (Mikroskop, Vorverstärker, Mikromanipulator) auf einem schwingungsisolierten Tisch (Physik Instrumente). Zusätzlich war der Messbereich durch einen Farraday´schen Käfig abgeschirmt, um so übermäßiges elektrisches Rauschen während der Messungen zu verhindern. Die verwendeten Glaspipetten waren aus Borsilikatglas (Innendurchmesser 0,9 mm, Kimax-51, Kimble Products, USA) und wurden mit einem Vertikalpuller (PA-10, E.S.F.) in zwei Zugschritten gefertigt. Für die Untersuchungen an CA1 Neuronen besaßen die Pipetten einen Widerstand von 2 bis 3 MΩ.

Die optische Detektionseinheit bestand aus einem Mikroskop der Firma Olympus (BX50WI) mit einem 20fach und einem 60fach Wasserimmerssionsobjektiv (Olympus UM PlanFl; LUM PlanFl, 60x0,5 w numerische Apertur). Das Mikroskop war mit einer CCD-Kamera (PCO, Deutschland) ausgestattet (TILL Photonics, Martinsried) installiert.

Als Anregungseinheit für den Ca^{2+}-sensitiven Farbstoff Fura-2 wurde ein Monochromator-System (TILL Photonics, Martinsried) benutzt (siehe Abb. 13). Dieses polychromatische Beleuchtungssystem generiert über eine 75 W Xenon Bogenlampe (XBO/ OFR Osram) einzelne Lichtwellen durch Beugung an einem Gitter. Die einzelnen Maxima werden dabei über einen Spiegel in einen Lichtleiter (Durchmesser

1,5 mm) eingekoppelt. Dieses Monochromator-System ermöglicht eine intensive Anregung und den schnellen Tausch von Wellenlängen. Das Anregungslicht wurde mit einem dichroischen Spiegel (Grenzwellenlänge bei 500 nm) auf das Objekt gelenkt. Die reflektierte Fluoreszenz konnte durch den dichroischen Spiegel treten und mit einem entsprechend empfindlichen Detektionssystem aufgenommen werden. Die Detektion der Farbstoffemission erfolgte mit einer CCD-Kamera. Die durchgeführten Messungen umfassten das Soma der zu untersuchenden Zellen. Mit Hilfe der CCD-Kamera, deren Aufnahmen direkt in einen Pentium III Computer eingespeist wurden und der TILL Vision (TILL Photonics, Martinsried) Software, konnten verschiedene Bereiche von Interesse, wie das Soma verschiedener Neurone, ausgewählt und aufgenommen werden. Zeitgleich konnten die Ca^{2+}-Veränderungen in diesen Bereichen gemessen werden. Die Datenauswertung wurde dann im Tabellenkalulationsprogramm Excell (Microsoft) durchgeführt werden. Als weiteres Computersystem wurde ein Power Macintosh G3 verwendet. Dieser Rechner diente als Steuereinheit für die *patch-clamp*-Anlage und wurde parallel als Oszilloskop, als Pulsgenerator und zur Datenaufnahme verwendet. Das Heka EPC-9-Programm wurde als Steuersoftware benutzt (HEKA Elektronik, Lambrecht).

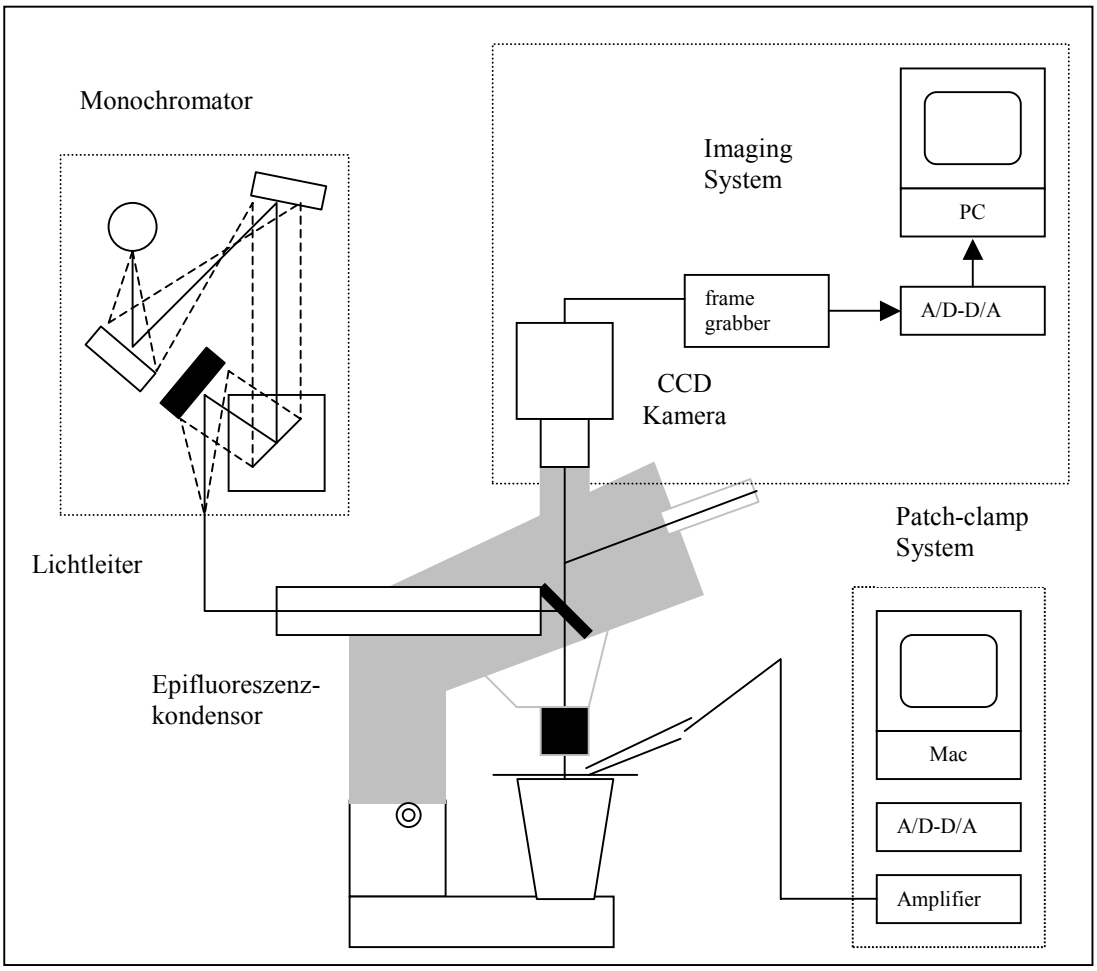


Abb. 13: *Schematische Darstellung der Apparatur zur Calcium-Imaging-Analyse*
Die gestrichelten Bereiche repräsentieren den Standardaufbau für eine *patch-clamp* Apparatur, die mit einem Aufrechtmikroskop und einem Computer-kontrollierten System für die Überwachung und online-Aufnahme von Daten verbunden ist. Fluorometrische Messungen wurden mit einer CCD-Kamera durchgeführt, die mit einem computer-gesteuerten System für die Kontrolle, Wiedergabe und die Speicherung von Daten verbunden ist. Die Anregungseinheit besteht aus einer Xenonlampe und einem Monochromator. Das weiße Licht der Xenonlampe ist mit Hilfe eines toroidalen und parabolischen Spiegels auf ein Beugungsgitter fokussiert und wird durch einen galvanometrischen Scanner gesteuert. Das gebeugte Lichtspektrum ist mit Hilfe eines zweiten parabolischen Spiegels auf den Ausgangsschlitz des Monochromators fokussiert. Von dort wird das Licht mit der entsprechenden Wellenlänge von einem Quarzlichtleiter über den Epifluoreszenzkondensor direkt auf den Strahlenteiler geführt. Simultan erhaltene fluorometrische-und *patch-clamp*-Daten können so online an die entsprechenden Rechner zur Auswertung weitergegeben werden.

2.9 *patch-clamp*-Technik zum Einbringen des Fura-2

Die *patch-clamp* Technik, die 1976 von Neher und Sakmann entwickelt wurde, ermöglicht es, den Strom durch einzelne Ionenkanäle und durch die gesamte Zellmembran zu erfassen. Bei dieser Technik wird eine feine Glasmikropipette mit einem Spitzendurchmesser von etwa einem Mikrometer unter visueller Kontrolle in sehr engen Kontakt mit der Zellmembran gebracht (cell-attached-Konfiguration). Die Pipette ist mit einer artifiziellen Intrazellularflüssigkeit gefüllt und bildet zusammen mit einer chlorierten Silberelektrode die Patchelektrode. Durch das Anlegen eines Unterdrucks zwischen der Verbindung Pipette und Membran ergibt sich eine Abdichtung (seal) mit einem extrem hohen Widerstand zwischen dem Pipetteninneren und dem Außenmedium. Dieser hohe Abdichtungswiderstand verringert das elektrische Rauschen. Gleichzeitig ermöglicht er die Durchführung, mechanischer Manipulationen an der Membran, ohne den hochohmigen Abdichtungswiderstand zu zerstören. Bei den Experimenten wurde mit der *whole-cell*-Konfiguration (Ganzzell-Anordnung) gearbeitete. Diese ermöglicht es, das Membranstück direkt unterhalb der Pipettenöffnung durch ruckartiges Ansaugen herauszureißen, um so einen niederohmigen Zugang zum Zellsoma zu erzeugen. Während dieser Konfiguration tauscht sich das Zytoplasma durch Diffusion innerhalb weniger Minuten mit der Pipettenlösung aus. Es ergibt sich dadurch ein definiertes Ionenverhältnis im Inneren der Zelle, das durch die Wahl der Intrazellularlösung (siehe Anhang A2.3) bestimmt wird. Diese Diffusion der Pipettenlösung wurde genutzt, um definierte CA1 Neurone in einer Schnittpräparation mit Fura-2 zu beladen. Die Pipettenlösung besaß dabei eine Konzentration von 125 µM Fura-2. Die Pipette wurde mit der mit Fura-2 versetzten Intrazellularlösung beladen. Stabile Fura-2 Messungen sind auf diese Weise schon nach 7 Minuten durchführbar.

2.10 Messung der $[Ca^{2+}]_i$

Die $[Ca^{2+}]_i$ in Hippokampusneuronen wurde mikrofluorometrisch unter Verwendung des Ca^{2+}-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 gemessen. Dieser Farbstoff ist strukturell mit den Ca^{2+}-Chelatoren EGTA und BAPTA (siehe Abb. 14) verwandt, aus dem er auch synthetisiert wurde (Grynkiewicz *et al*., 1985, Poenie & Tsien, 1986). Fluorochrome wie Fura-2 fluoreszieren nach Anregung mit energiereichem Licht abhängig vom Bindungszustand des Farbstoffes mit Ca^{2+}. Fura-2 ist besonders gut geeignet, mikrofluorimetrische Ca^{2+}-Messungen durchzuführen, da es eine hohe Bindungsspezifität für Ca^{2+} und eine hohe Quantenausbeute besitzt. Der Messbereich umfasst $[Ca^{2+}]_i$ von 10^{-8} bis 10^{-5} M. $[Ca^{2+}]_i$ jenseits des maximalen Messbereiches sind für Neurone toxisch (Orrenius *et al*., 1989). $[Ca^{2+}]_i$ größer als 40 µM, bei denen Fura-2 saturiert, können mit Farbstoffen, die eine geringere Bindungsaffinität besitzen, z.B. Mag-Fura-2, gemessen werden.

Fura-2 ist aufgrund von fünf Carboxylgruppen stark polar und kann daher die Plasmamembran nicht durchdringen. In dieser Form wurde das Fura-2 mittels einer *patch*-Pipette in die Zelle eingebracht.

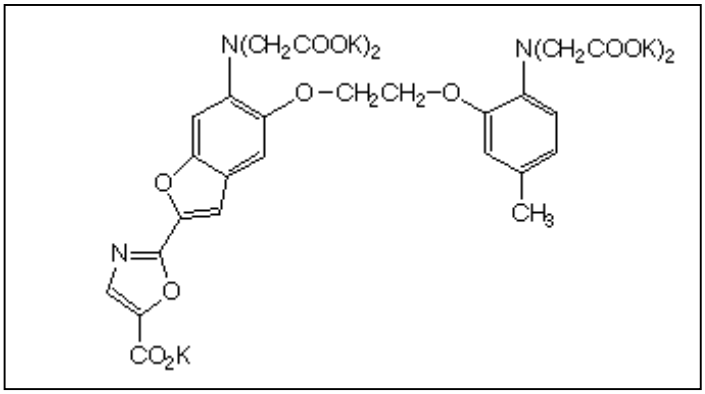


Abb. 14: *Strukturformel von Fura-2*
Das Fura-2 besitzt fünf Carboxylgruppen und ist aus diesem Grund stark polar.

Die Detektion von Ca^{2+}-abhängigen und unabhängigen Signalen erlaubt die ratiometrische Messung der $[Ca^{2+}]_i$. Aus dem Verhältnis zwischen Ca^{2+}-abhängiger und -unabhängiger Wellenlänge kann nach Eichung mit definierten Ca^{2+}-Lösungen die tatsächliche $[Ca^{2+}]_i$ berechnet werden. Wie die Abbildung 15 zeigt, kann sowohl die Ca^{2+}-abhängige Emission bei Anregungswellenlängen von 340 nm als auch bei

380 nm gemessen werden. Der dynamische Bereich ist bei Anregungen mit 340 nm sogar höher (siehe Abb. 15).

Mit der ratiometrischen Meßmethode lassen sich Fluoreszenzänderungen durch veränderliche Indikatorkonzentrationsbeladung und durch „Ausbleichung“ (Zerstörung des Farbstoffes durch eine zu intensive Anregung) kontrollieren.

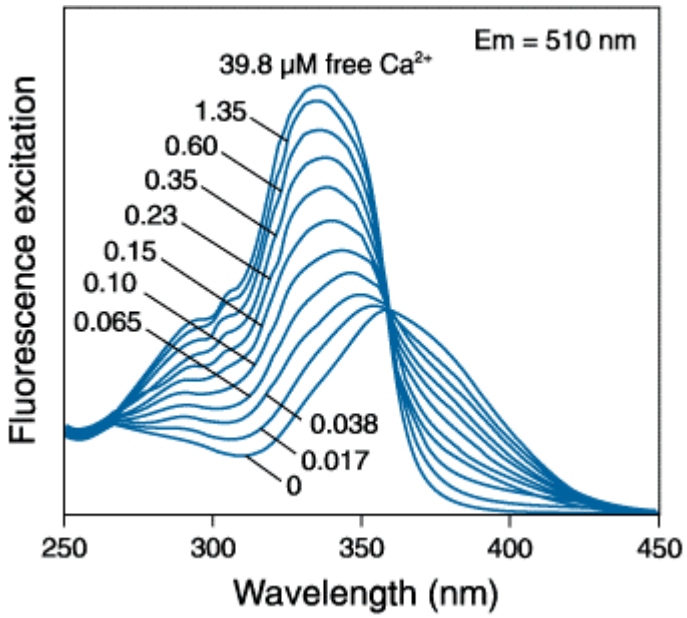


Abb. 15: *Absorptionsmaxima des Fura-2*

Das Messprinzip beruht darauf, dass ein Fura-2-Molekül, wenn es an Ca^{2+} gebunden vorliegt, bei 340 nm ein Absorptionsmaximum besitzt, während es, wenn es kein Ca^{2+}gebunden hat, maximal bei etwa 380 nm absorbiert.

Die $[Ca^{2+}]_i$ kann durch eine *in vitro* oder *in vivo* Kalibration ermittelt werden (nach Grynkiewicz *et al*., 1985; Poenie & Tsien, 1986). Obwohl sie aufwendiger ist, ist die *in vivo* Eichung der *in vitro* Eichung vorzuziehen, da eine Differenz in den spektralen Eigenschaften von Fura-2 in Wasser im Vergleich zum Zytoplasma festzustellen ist. Weiter wirken sich Parameter wie die Temperatur, die Ionenstärke und der pH-Wert des intrazellulären Milieus auf die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes aus.

Zur Kalibration wurden drei Lösungen definierter Ca^{2+}-Konzentration benutzt, um die Kalibrationskonstanten für sehr hohe Ca^{2+}-Konzentrationen (10 mM freies Ca^{2+}), für eine physiologisch relevante Ca^{2+}-Konzentration (450 nM freies Ca^{2+}) und für eine nominell Ca^{2+}-freie Lösung (0 M freies Ca^{2+}, gepuffert mit 1 mM EGTA [Ethylenglycol-bis-(ß-aminoethyl ether) N,N,N´,N´-tetraessigsäure]) zu bestimmen (Almers & Neher, 1985). Molecular Probes (Europa, Leiden NL) bietet weiterhin

einen „Fura-2 Ca^{2+}-imaging-Kalibrations-Kit“ an, das Lösungen unterschiedlicher Ca^{2+}-Konzentrationen umfasst. Zehn Eichlösungen mit freien Ca^{2+}-Konzentrationen von 0 bis 40 µM, mit 50 µM Fura-2 und fluoreszierenden „beads“ vorgemischt und auf den exakten pH-Wert eingestellt, erlauben die schnelle und regelmäßige Überprüfung der optischen Eigenschaften des Messplatzes.
Für die Kalibration wird der Ausschnitt des Messbereiches beibehalten. Die Eichlösungen werden bei 360 und 380 nm angeregt und die Emission wird zwischen 490 und 520 nm gemessen. Die Kalibrationskonstanten R_{min}, R_{max} und Kd werden ermittelt. In unserem Fall ergaben sich Werte von 0,5; 2,5 und 420 nM.
Nach der Formel:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd*(R-R_{min}/R_{max}-R)(F_{380\ max}/F_{380\ min})$$

kann aus dem Ratio die $[Ca^{2+}]_i$ berechnet werden ($F_{380\ max}$ und $F_{380\ min}$ stellen die maximale und die minimale Emission bei Anregung mit 380 nm dar). Die *in vitro*-Eichung wird ohne Präparat auf einem gereinigten, staubfreien Objektträger mit einer definierten Menge der verschiedenen Lösungen durchgeführt. Dabei muss das Objektiv immer den gleichen Abstand zum Objektträger haben und beide müssen für jede neue Lösung gereinigt werden. Die *in vivo* Eichung wird in dem jeweiligen Zellsystem durchgeführt, indem die verschiedenen Lösungen mit der *patch*-Pipette in die Zellen gebracht werden. Zusätzlich zur Messung der Emission mit dem Farbstoff muss eine Hintergrundfluoreszenzkorrektur vorgenommen werden, um die Eigenfluoreszenz der Lösung und der Zellen zu berücksichtigen (Helmchen, 1996). Die Hintergrundfluoreszenz setzt sich aus einem Anteil von Autofluoreszenz endogen vorhandener Stoffe wie z.B. NADH (Eilers *et al*., 1995) und einem Anteil bereits aus der Pipette ausgetretenem Fura-2 zusammen. Die gemessenen Werte müssen mit der Hintergrundfluoreszenz korrigiert werden. Der Kd-Wert (maximaler Saturierungspunkt) des Farbstoffes variiert mit der Ionenstärke der Lösung, dem pH-Wert und der Temperatur der Lösung. Um diese Störfaktoren zu minimieren ist es wichtig, die Lösungen exakt auf die richtige Osmolarität und den richtigen pH-Wert einzustellen (Grynkiewicz *et al*., 1985; Poenie & Tsien, 1986). Zu beachten ist hierbei, dass Ionenverbindungen von EGTA zu einer Ansäuerung der Lösung führen. Eine Änderung des pH-Wertes um 0,05 kann den Kd-Wert um bis zu 20 % verändern (Grynkiewicz *et al*., 1985; Lattanzio & Bartschat, 1991). Auch Temperaturunter-

schiede und die Mg^{2+}-Konzentration in der Lösung wirken sich drastisch auf den Kd-Wert aus (Grynkiewicz *et al*., 1985). In der technischen Beschreibung zum Kalibrations Kid ist die Veränderung des Kd-Wertes von 135 nM in nominell freier Mg^{2+}-Lösung auf 224 nM einer 1 mM konzentrierten Mg^{2+}-Lösung beschrieben (Lattanzio & Bartschat, 1991). Bei einem Vergleich der *in vitro*- mit der *in vivo*-Eichung muss dies berücksichtigt werden. Auch Messplatzparameter wie die Transmission der Objektive, beeinflussen den R_{min}, R_{max} und den Kd-Wert. Die Eichung muss folglich an dem Messplatz mit den original Messbedingungen und in dem zu untersuchenden Messsystem durchgeführt werden. Die regelmäßige Wiederholung stellt sicher, dass keine Veränderungen, wie z.B. eine veränderte Anregung durch eine alternde Xenon Bogenlampe, die Eichparameter beeinflussen.

Neben dem Fura-2 wurde auch dessen AM (Acetoxymethyl)-Ester Form zur Beladung von Zellen verwendet. Werden die gelösten Salze des Farbstoffes mit Bromomethoxyacetat verestert, tragen die Carboxylgruppen der Farbstoffmolküle Acetoxymethylreste und sind damit polar. In dieser Form können sie die Zellmembran passieren. Im Cytosol werden die Esterbindungen dann von cytosolischen Esterasen gespalten. Dabei entsteht Formaldehyd, Acetat und die Säureform des Farbstoffes die nun als Indikator fungiert. Die zu messenden Zellen wurden zur Beladung mit 5 µM Fura-2AM für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit DMEM gewaschen und für die Messungen in entsprechende Ringer überführt.

2.11 Transfektion von Primärzellen

2.11.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Für die Transfektion kultivierter hippokampaler Neurone mit einem C99-GFP-Konstrukt (siehe Anhang A3.) musste zunächst die entsprechende Plasmid cDNA in Bakterien transformiert und auf diese Weise vervielfältigt werden. Dafür wurde eine Vorkultur von E.coli XLblue für 12 Stunden angelegt. Diese Vorkultur wurde 100fach in 500 ml LB-Medium (siehe Anhang A4.) verdünnt und bei 37°C bis zu einer bestimmten Zelldichte kultiviert. Die Zelldichte konnte durch Messung der Absorption bei 600 nm mit 1 mm-Küvetten bestimmt werden und sollte zwischen O.D. 0,6 bis 0,9 im optimalen Bereich liegen. Nach Erreichen dieser Zelldichte folgte für fünf Minuten eine Inkubation der Zellen für 5 Minuten auf Eis. Nach einer an-

schließenden Zentrifugation (2500xg, 5 Minuten, 4°C) konnten die Zellen geerntet und das Zellsediment in 20 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$-Lösung und 1 ml 100 % Glyzerol resuspendiert und für mindestens drei Stunden auf Eis inkubiert werden. Die nun kompetenten Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

2.11.2 Transformation von Bakterien

Nach Auftauen der kompetenten Bakterienzellen (100 µl) auf Eis wurden 1 bis 100 ng DNA zu der Zellsuspension gegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für eine Minute ein Hitzeschock bei 42°C und eine erneute Inkubation für zwei Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium (siehe Anhang A4.) konnten die Bakterien für eine Stunde bei 37°C inkubiert werden. 50 bis 100 µl der Suspension wurden direkt auf LB-Ampicillin-oder Geneticin-Agar (siehe Anhang A4.) ausplattiert und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.11.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die präparative Reinigung von Plasmid-DNA wurde nach dem Protokoll von QIAGEN Endofree-Maxi-Kit (Hilden) durchgeführt. Diese Reinigung basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und nutzt die selektive Bindung von Nukleinsäuren an das QIAGEN-Anionenaustauscherharz.

Die Präparation begann damit, dass 200 ml einer Bakterienkultur in LB-Medium (siehe Anhang A4.) bei 4°C zentrifugiert (10 Minuten, 2500xg) und in 10 ml P1 (siehe Anhang A5.) resuspendiert wurden. Dazu wurden 10 ml P2 (siehe Anhang A5.) gegeben, gemischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml eiskalten P3 (siehe Anhang A5.) wurde wieder sofort vorsichtig gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. In Falcon-Röhrchen wurde die Präparation bei 4°C abzentrifugiert (30 Minuten, 2500xg) und der klare Überstand auf eine mit 10 ml Puffer QBT (siehe Anhang A5.) äquilibrierte QIAGEN-tip 500-Säule überführt. Die Säule wurde danach zweimal mit Puffer QC (siehe Anhang A5.) gewaschen, und die DNA mit 15 ml Puffer QF (siehe Anhang A5.) eluiert. Es folgte eine Fällung der DNA bei RT mit 0,7 Volumen Isopropanol, eine Zentrifugation bei 15000xg (4°C, 30 Minuten), eine Waschung mit 70 % Ethanol und eine erneute Zentrifugation. Die luftgetrocknete DNA konnte in Aqua bidest aufgenommen werden. Um die Konzentration der DNA in wässrigen Lösungen zu bestimmen, musste die Optische

Dichte (O.D.) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm im Photometer mit einer Quarzküvette (Schichtdicke d = 1 cm) bestimmt werden.
Die Konzentration der DNA (Sambrook, 1989) berechnet sich aus der Formel:

$$[\mu g/ml]dsDNA = \frac{50 \text{ x Verdünnung x } O.D._{260nm}}{1000}$$

Der Quotient zwischen O.D. 260 und O.D. 280 sollte in etwa zwischen 1 und 2 betragen (Schichtdicke der Küvette d = 1 cm), um die Proteinkontaminationen der DNA festzustellen.

2.11.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Die Agarose (1,5 % w/v) wurde in TBE-Lösung (siehe Anhang A6.2) suspendiert und aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 70°C musste die Lösung mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1 µg Ethidiumbromid/ml versetzt und in eine geeignete Plexiglasform gegossen werden. Das erstarrte Gel wurde in eine Flachbett-Gel-Apparatur (BioRad) eingesetzt, die DNA-Proben in DNA-Probenpuffer aufgetragen und bei 80 bis 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht anhand des fluoreszierenden, interkalierten Ethidiumbromids detektiert.

2.11.5 Transfektion kultivierter hippokampaler Neurone

Die Transfektion von hippokampalen Neuronen erfolgte nach ein bis zwei Tagen Kultivierung auf einem Astrozytenrasen mittels des QIAGEN Effectene-KITs. Vor der Behandlung mussten die Zellen in 2 ml konditioniertes Neurobasalmedium überführt werden. Für die Transfektion wurde ein Gemisch aus je 100 µl EC Puffer, 1,6 µl Enhancer und 0,5 µg DNA angesetzt. Zuvor musste dieses gevortext und 10 Minuten inkubiert werden. Die im Anschluss zugegebene Menge an Effectene musste für jede verwendete DNA experimentell ermittelt werden. Dabei handelte es sich meist um Mengen von 0,5 bis 2 µl Effectene. Nach der Zugabe des Effectenes erfolgte wiederum ein Mischen und eine Inkubation für 5 Minuten bei RT. Anschließend wurde diese Effectene-Lösung zu den Neuronen ins Medium pipettiert und für 20 bis 30 Stunden mit den Zellen inkubiert.

2.12 Nachweis von Proteinen mittels Western-Blot

2.12.1 Herstellung von Hirnhomogenaten

Der biochemische Nachweis für das Vorliegen von Proteinen in den Gehirnen von Mäusen wurde mit der Western-Transfer-Analyse durchgeführt. Die Entnahme der Maushirne erfolgte in eisgekültem Ringer (PIPES, siehe Anhang A2.1). Nach der Überführung des Hirns in 5 ml eiskalten Lysepuffer (siehe Anhang A6.1) folgte eine Homogenisation in einer Glaspistille (Eppendorf). Alle Arbeitsschritte wurden soweit möglich, auf Eis durchgeführt. Das vollkommen aufgelöste Homogenat wurde daraufhin für 15 Sekunden bei 60% im Sonifizierer mit Ultraschall behandelt. Nach einer zehn minütigen Zentrifugation mit 12000 g konnte der Überstand abgenommen und eine Proteinbestimmung nach Bradford (1976) vorgenommen werden.

2.12.2 Proteinbestimmung mit Bradford-Reagenz

Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 bindet an Proteine und erlaubt die Extinktionsmessung des Protein-Farbstoffkomplexes bei 595 nm. Störende Einflüsse können z.B. durch Salze entstehen.
Die Stammlösung wurde wie aus dem Anhang zu entnehmen erzeugt (siehe Anhang A7.). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer BSA-Eichgerade bekannter Konzentration nach der Formel:

Probe (µg/µl) = Konzentration Wert Gerät / x µl eingesetztes Probevolumen

2.12.3 Proteinfällung

Für die Elektrophorese wurden 10 µg Protein benötigt. Dieses entsprechende Volumen (10 µg Protein) wurde aus der Originalprobe entnommen und mit 0,33 VT 3x Laemmli-Puffer versetzt. Nach der Zugabe des Laemmli-Puffers (siehe Anhang A6.1) erfolgte eine Inkubation der Probe für 10 Minuten bei 99°C im Heißblock. Die noch nicht eingesetzten Lysate konnten ebenfalls mit 0,33 VT 3x Laemmli-Puffer versetzt und nach der Inkubation bei 99°C bei –4°C zur späteren Verwendung gelagert werden.

2.12.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit von Natriumdodcylsulfat (SDS) (Weber & Osborn, 1969). Sie erfolgt als Flachbett-Elektrophorese (Studier, 1973) in einem diskontinuierlichem Puffersystem nach dem Prinzip von Laemmli (Laemmli, 1970). Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mit einer Molmasse von 105 kDa ist ein 10 %iges Trenngel (siehe Anhang A6.3) geeignet. Dieses Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch Kunststoff-Spacer einen Abstand von 1 mm hatten (Aufbau Biorad). Bis zur Polymerisation erfolgte eine Überschichtung des Trenngels mit Isopropanol oder 0,1 % SDS. Nach dem Gießen des Sammelgels (siehe Anhang A6.3) musste ein Probenkamm in das Sammelgel eingeschoben werden. Nach Polymerisation des Sammelgels und Ziehen des Kamms, konnten die denaturierten Proben aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde mit 60 V für ca. 20 Minuten gestartet, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Die weitere Elektrophorese konnte mit 150 V fortgesetzt werden bis die Bromophenolblau-Front das untere Ende der Glasplatten erreichte. Als Molmassenstandards wurde eine vorgefärbte Proteinmischung von Biorad verwendet. Nach Abschluss der Elektrophorese und Entnahme des Gelträgers aus der Elektrophoresekammer konnte das Trenngel vom Sammelgel abgetrennt und für zehn Minuten in Transfer-Puffer I (siehe Anhang A6.4) inkubiert und somit für den Western-Blot vorbereitet werden.

2.12.5 Western-Transfer-Analyse (Western-Blot)

Die in einer analytischen SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (PVDF-Membran, Schleicher & Schuell, Maschenweite 0,45 µm) übertragen. Zuvor wurde diese in 96%igem Ethanol kurz inkubiert. Der Transfer des Gels erfolgte für 100 Minuten in einer Trans-Blot-Apparatur (Biorad) bei 12 mA. Die Platten der Blotting-Apparatur wurden zuvor mit Wasser angefeuchtet.

Um einen Transfer zu ermöglichen, musste die PVDF-Membran nach oben und unten durch jeweils zwei mit Tansferpuffer (siehe Anhang A6.4) befeuchtete Filterpapiere (Gelgröße) isoliert werden. Die freien Bindungsstellen, der aus der Western-Blot-Apparatur entnommenen Membran, wurden für eine Stunde bei RT mit Absätti-

gungspuffer (siehe Anhang A6.4) inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Inkubation der Membran mit dem in Absättigungspuffer verdünnten Antiserum (1:200 bTRP4) für 12 Stunden bei 4°C auf dem Schüttelinkubator (Rocky).
Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran mehrmals mit TBST (siehe Anhang A6.4) gewaschen. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte für 1 Stunde bei RT mit Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern (1:1000 in Absättigungspuffer). Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST wurde die Färbereaktion durchgeführt. Für die Detektion eines Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers musste die zuvor kurz angetrocknete Membran für eine Minute in Chemolumineszenz-Lösung (siehe Anhang A6.4) inkubiert und anschließend in einer Filmkassette zusammen mit einem Röntgenfilm (NEN Life Science) für maximal zehn Minuten exponiert werden. Die Entwicklung des Films erfolgte in spezieller Fotoentwickler- und Fixierungs-Lösung.

2.13 Datenaufnahme und Auswertung

Die Datenaufnahme von Messungen, bei denen eine Farbstoffapplikation über die *patch*-Pipette vorgenommen wurde, erfolgte über das Programm Pulse 8.5 (HEKA). Die Auswertung und Darstellung der aufgenommenen Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excell (Microsoft). Mit Hilfe des EXCEL-Statistik-Unterprogramms wurden die Mittelwerte und Standardfehler (± SEM, engl: standard error of mean) der Messwerte aus den einzelnen Versuchen ermittelt. Auch die Prüfung der Signifikanz der erhobenen Mittelwerte wurde mit diesem Programm durchgeführt. Für die weitere Auswertung wurden die Daten in Prozent auf die jeweiligen Kontrolldaten bezogen. Die Messwerte aus den Kontrollversuchen entsprachen hierbei 100 %. Die aufgenommenen Daten wurden auf diese Weise normiert, um sie untereinander zu vergleichen. Bei zu überprüfenden Messungen mit einer Stichprobenanzahl von $n< 30$ und mit einer Normalverteilung, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Des Weiteren wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Unterschiede zweier Mittelwerte wurden für beide Tests mit $p < 0,05$ als signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

3.1 Vitalität hippokampaler Neurone von transgenen Mäusen mit einer PS1-Mutation

Inwieweit sich der exzitatorische Transmitter Glutamat auf die Viabilität der Neurone von Mäusen mit einer PS1-Mutation auswirkt, wurde im folgenden Experiment untersucht.

Hierzu wurden hippokampale Neurone von Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, mit Neuronen von Mäusen verglichen, die das humane Wildtyp-PS1 [S182] exprimieren. Als Kontrollen dienten hippokampale Neurone von FVB/N-Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] exprimieren. Die Neurone wurden auf beschichteten Objektgläschen gezüchtet. Nach 14 Tagen in Kultur wurden die Zellen für 24 Stunden unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen (10, 50 und 100 µM) ausgesetzt (siehe Abb. 16). Anschließend wurde mittels der Farbreaktion des MTT-Assays photometrisch das Überleben der Neurone analysiert (siehe Abb. 16). Ausgehend von jeweils 100 % Überleben der Neurone ergab sich bei Glutamatkonzentrationen von 10, 50 sowie 100 µM ein prozentual signifikant niedrigeres Überleben von Neuronen, die die PS1-Mutation tragen im Vergleich zu Neuronen, die entweder das humane PS1 [S182] oder das Maus-PS1 [WT] exprimieren. Hippokampusneurone, die entweder das PS1 [WT] oder das PS1 [S182] exprimieren, zeigten mit ansteigender Glutamatkonzentration ein ähnliches Verhältnis neuronaler Überlebenshäufigkeiten zueinander. Damit scheinen hippokampale Neurone von Mäusen mit einer PS1-Mutation eine stärkere Sensitivität auf Glutamat-ausgelöste Exzitotoxizität zu besitzen.

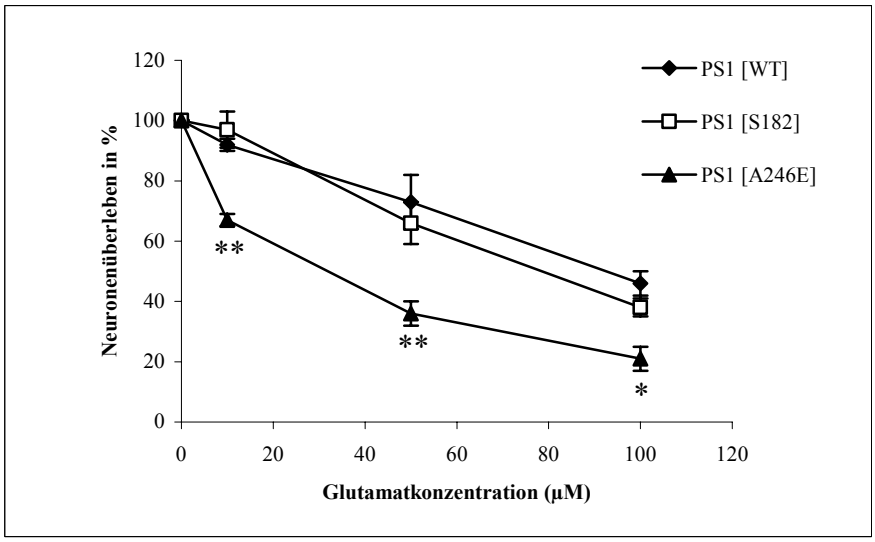


Abb. 16: *Effekt unterschiedlicher Glutamat-Konzentrationen auf das Überleben kultivierter hippokampaler Neurone*

Dargestellt ist die 24 Stunden nach Stimulus ermittelte prozentuale neuronale Überlebenshäufigkeit hippokampaler Neurone (y-Achse) bei Glutamatkonentrationen von 10, 50 und 100 µM (x-Achse). Verglichen wurden die Zellen von Mäusen, die jeweils das PS1 [WT] oder das PS1 [S182] exprimieren, mit Zellen von transgenen Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] tragen. Die Datenpunkte der untersuchten Mauslinien zeigen die gemittelten Werte von jeweils 3 untersuchten Kulturen.

Fehlerbalken = SEM, statistische Signifikanz: ** $p<0,001$; * $p<0,01$

3.2 Ermittlung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Glutamat in Neuronen mit einer PS1-Mutation

3.2.1 Kultivierte hippokampale Neurone

Bei dem folgenden Experiment wurde an kultivierten Neuronen mit der PS1-Mutation [A246E] untersucht, inwieweit es bei diesen Zellen zu einer durch Glutamat ausgelösten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ kommt. Dazu wurden primäre Hippokampusneurone transgener Mäuse angelegt. Diese stammten sowohl von Mäusen, die entweder das humane Wildtyp-PS1 (PS1 [S182]) oder die humanpathogene PS1-Mutation [A246E] exprimieren. Als Kontrolle dienten Kulturen von FVB/N-Mäusen, die das Wildtyp-Maus-PS1 (PS1 [WT]) tragen. Die Neurone wurden auf einem Astrozytenrasen ausgesäht und über einen Zeitraum von 19 bis 21 Tagen in Kultur (DIV) gehalten (siehe Abb. 17).

Die Untersuchung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ in den kultivierten hippokampalen Neuronen zeigte nach 19 Kulturtagen keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen

Mauslinien (siehe Abb. 18 basal 1). Die anschließend ermittelte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach einer Depolarisation mit Kalium-Ringer diente zur Ermittlung der Vitalität der vorliegenden Neurone. Eine derartig hohe extrazelluläre Kalium-Konzentration verringert das Membranpotential der Neurone. Ein darauf folgender Ca^{2+}-Einstrom basiert auf der Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle. Die Applikation von Kalium-Ionen (K^+-Ringer, 50 mM) verursachte ein schnelles Ansteigen der $[Ca^{2+}]_i$ sowohl bei Neuronen, die das PS1 [WT] tragen, als auch bei Neuronen transgener Mäuse. Die Kalium-Depolarisation führte in den Neuronen der Mäuse, die die PS1-Mutation tragen zu einer signifikant verringerten Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zu den Neuronen, die das PS1-[WT] oder PS1 [S182] exprimieren (siehe Abb. 18 K^+ peak). Dagegen zeigte sich in dem durch Kalium-ausgelösten Ca^{2+}-Plateau kein Unterschied zwischen den Neuronen der untersuchten Mauslinien (siehe Abb. 18).

Das Auswaschen der Kalium-Ionen führte in den Hippokampusneuronen aller Linien zu einem Absinken der $[Ca^{2+}]_i$. Hierbei war zu beobachten, dass die $[Ca^{2+}]_i$ der Zellen nicht vollständig auf ihr ursprüngliches Niveau vor der Kalium-Applikation zurückkehrte (siehe Abb. 18 basal 2).

Im Vergleich zu Neuronen, die das humane PS1 [S182] oder das PS1 [WT] exprimieren, induzierte die Zugabe von Glutamat (50 µM, 180 sek) ein signifikant höheres Ansteigen der $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen, die die PS1-Mutation [A246E] tragen. Sowohl die durch Glutamat-ausgelösten maximalen Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ (peak) als auch das anschließende intrazelluläre Ca^{2+}-Plateau war in den Neuronen mit der PS1-Mutation signifikant verändert (siehe Abb. 18).

Somit konnte insgesamt festgestellt werden, dass hippokampale Neurone von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] eine verstärkte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Applikation von Glutamat zeigten.

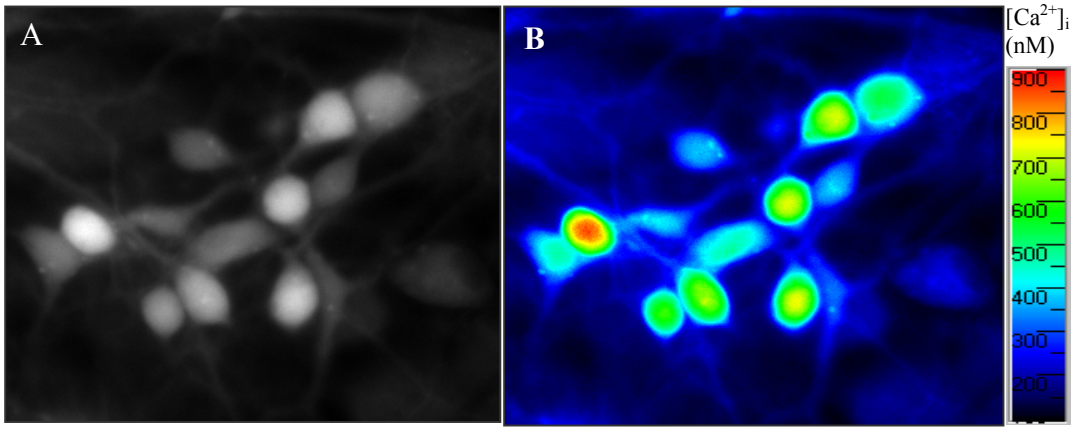


Abb. 17: *Kultivierte Hippokampusneurone nach 19 Tagen in Kultur*

Die Bilder zeigen, die auf Astrozytenrasen kultivierten Hippokampusneurone (19 DIV) mit Fura-2AM-Beladung nach einer Glutamatstimulation (50 µM).

A: Die Abbildung stellt die Fluoreszenzfärbung der Neurone mit Fura-2AM dar.

B: Die Abbildung zeigt die Neurone, in denen die $[Ca^{2+}]_i$ in Pseudofarben dargestellt ist. Der Astrozytenrasen wurde durch die Fura-2AM-Beladung mitgefärbt (auf der rechten Abbildung im Hintergrund zu sehen). Die für die Pseudofarbe entsprechende Ca^{2+}-Konzentration ist durch die Farbskala in nM angegeben.

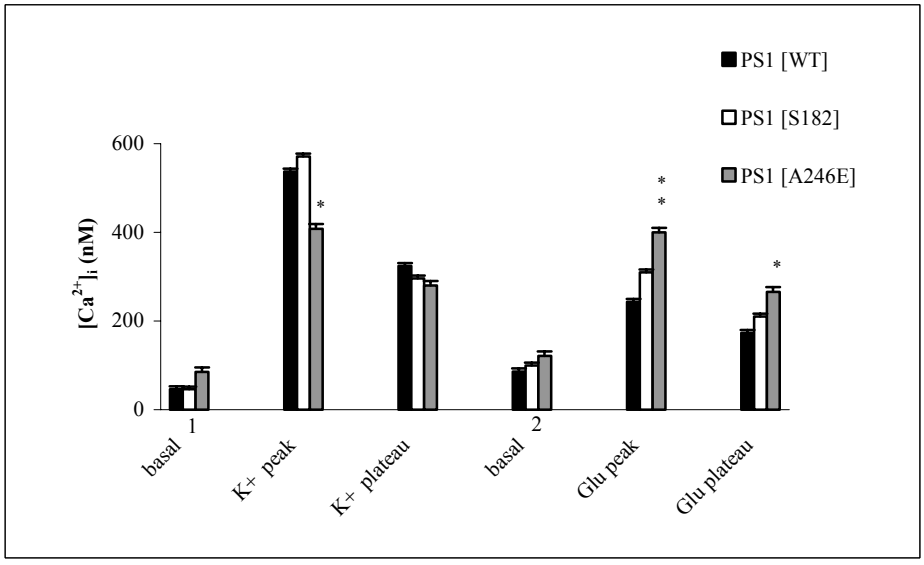


Abb. 18: *Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten hippokampalen Neuronen nach Kalium- und Glutamat-Applikation*

Dargestellt sind die gemittelten Basalwerte der $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach der Kalium-Depolarisation (basal 1 und basal 2) sowie die Mittelwerte der Ca^{2+}-Maxima (peak) und Ca^{2+}-Plateauwerte jeweils nach der Kalium (K^+)- und Glutamat (Glu)-Applikation. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte von 20 bis 30 gemessenen Zellen. Diese Werte wurden an jeweils 4 separaten Zellkulturen der Linien PS1 [WT] (19 DIV), PS1 [S182] (19 DIV) und PS1 [A246E] (19 DIV) gemessen. Fehlerbalken = SEM, statistische Signifikanz: * $p<0,01$; ** $p<0,001$

3.2.2 Dissoziierte hippokampale Neurone

Diese Untersuchung sollte klären, ob sich die in den kultivierten Neuronen mit der PS1-Mutation [A246] gezeigten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ auch in dissoziierten Neuronen adulter Mäuse nachweisen lassen.

Durch die Bearbeitung von hippokampalen Gewebeschnitte mit der enzymatischen Dissoziationstechnik von Kay und Wong (1986) konnten Hippokampusneurone adulter Tiere gewonnen werden. Diese Methode ermöglicht eine relativ schnelle Isolierung von Neuronen bestimmter Hirnregionen. Sowohl die Morphologie als auch die elektrischen Eigenschaften der Zellen bleiben dabei im Wesentlichen erhalten. Somit war es möglich die Neurone adulter Mäuse zu untersuchen, die eine PS1-Mutation [A246E] aufweisen.

Mäuse mit der PS1-Mutation wurden im Alter von 4 Monaten (PS1 [A246E]) und 16 Monaten (*aged* PS1 [A246E]) untersucht. Als Kontrollen dienten FVB/N-Mäuse, die Maus-Wildtyp-PS1 exprimieren und 4 Monate alt waren (PS1 [WT]). Durch das unterschiedliche Alter der transgenen Tiere konnte untersucht werden, inwieweit sich Veränderungen durch die PS1-Mutation [A246E] im adulten Stadium manifestieren.

Ein Überexpremieren der PS1-Mutation in den Gehirnen der transgenen Mäuse führte allerdings nicht zu wesentlichen pathologischen Veränderungen - auch nicht im fortgeschrittenen Alter (16 Monate) der Tiere. Dieser Befund steht im Gegensatz zu PS1-Mutationen, die beim Menschen auftreten. In den Gehirnen von Patienten mit einer Mutation im PS1 lassen sich eine erhöhte Anzahl von Amyloid-Plaques nachweisen. PS1-Mutationen führen bei diesen Patienten bereits frühzeitig zu einem aggressiven Krankheitsverlauf (Schneider *et al*., 2001).

In einer physiologischen Ringer-Lösung (siehe 2.16.1) wurde zunächst die basale $[Ca^{2+}]_i$ der isolierten Neurone ermittelt. Die Neurone, die die PS1-Mutation [A246E] tragen, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zu Neuronen, die das PS1 [WT] exprimieren (siehe Abb. 19 b1 und Abb. 20 basal 1).

Um die Vitalität der dissoziierten Neurone zu untersuchen, wurden diese mit Kalium-Ringer (50 mM, 120 sek) depolarisiert. In dem vorliegenden Experiment lösten die Kalium-Ionen einen diphasischen intrazellulären Ca^{2+}-Anstieg im Soma der Neurone aus. Im Gegensatz zu Neuronen von Mäusen, die das PS1 [WT] exprimieren, zeigte sich in den Neuronen adulter und gealterter Mäuse, die die PS1-Mutation tragen ein signifikant höheres durch Kalium-ausgelöstes

Ca^{2+}-Maximum (peak) und Ca^{2+}-Plateau (plateau) (siehe Abb. 19 p2 und pl3 und Abb. 20 K^+ peak und K^+ plateau).

Die Kaliumchlorid-Lösung wurde anschließend wieder durch die physiologische Ringer-Lösung ersetzt. Die $[Ca^{2+}]_i$ der Neurone kehrte daraufhin wieder annähernd auf ihr ursprüngliches basales Ca^{2+}-Niveau zurück (siehe Abb. 19 b4 und Abb. 20 basal 2). Im Gegensatz zu Neuronen von Mäusen, die das PS1 [WT] tragen, führte die Applikation von Glutamat (50 µM, 180 sek) in den Neuronen transgener Mäuse, die die PS1-Mutation exprimieren, zu einem signifikant höheren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 19 p5, pl6 und Abb. 20). Wie bei der Kalium-Applikation zeigten die Zellen gealterter transgener Mäuse mit der PS1-Mutation nach Applikation von Glutamat einen höheren intrazellulären Ca^{2+}-Anstieg als die entsprechend jüngeren transgenen Mäuse mit der PS1-Mutation.

Im Vergleich zu Neuronen, die das PS1 [WT]-Gen exprimieren, zeigten damit die Neurone mit der PS1-Mutation [A246E] sowohl nach einer Kalium-Depolarisation als auch nach einer Applikation von Glutamat eine signifikant stärkere Änderung ihrer $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 19 und 20). Somit konnte gezeigt werden, dass neben kultivierten Neuronen auch dissoziierte hippokampale Neurone adulter Mäuse, die die PS1-Mutation [A246E] tragen, auf die Zugabe von Glutamat mit einem signifikant stärkeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ reagierten.

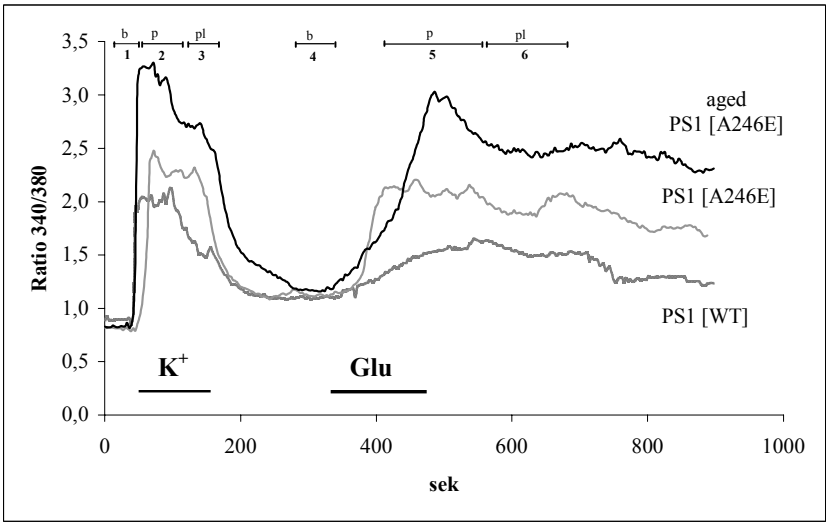


Abb. 19: *Einzelmessungen der $[Ca^{2+}]_i$ in dissoziierten hippokampalen Neurone nach Applikation von Kalium und Glutamat*

Gezeigt sind die Kinetiken der Neurone von Mäusen, die das PS1 [WT] tragen (4 Monate) sowie von 4 bzw. 16 Monate (aged) alten Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren. Es zeigt sich eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Antwort auf eine Kalium (K^+, 50 mM)- und Glutamat (Glu, 50 µM)-Applikation bei den Neuronen transgener Mäuse. In den Bereichen b 1 und b 4 wurde die basale $[Ca^{2+}]_i$, in den Bereichen p 2 und p 5 wurde die durch Kalium-ausgelöste maximale Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und in den Bereichen pl 3 und pl 6 das durch Kalium-ausglöste Plateau der $[Ca^{2+}]_i$ ermittelt.

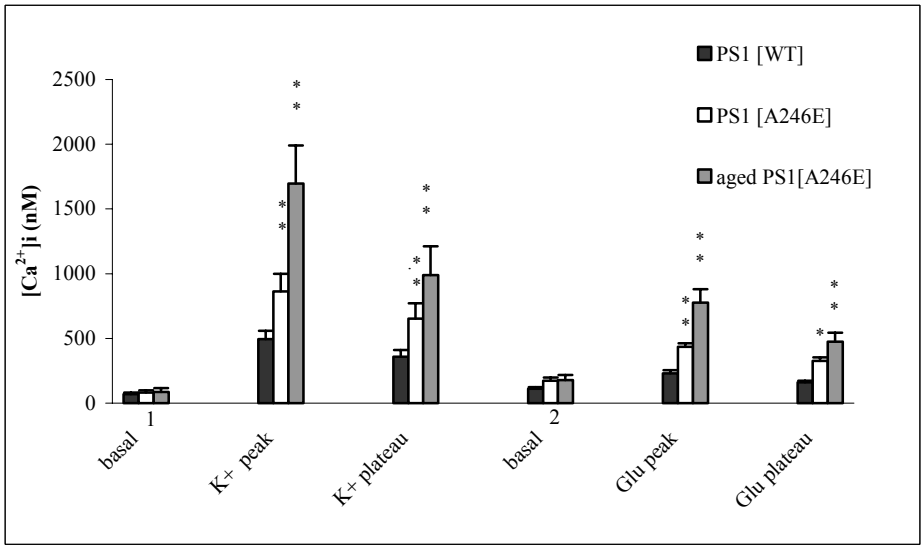


Abb. 20: *Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in dissoziierten Neuronen nach Kalium- und Glutamat-Zugabe*
Dargestellt sind die gemittelten Ca^{2+}-Basalwerte in nM vor und nach der Kalium-Depolarisation (basal 1 und 2) sowie die gemittelten Ca^{2+}-Maxima (peak) und Ca^{2+}-Plateauwerte jeweils nach der Kalium (K^+)- und Glutamat (Glu)-Applikation. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte von 10 bis 15 Zellen, die in jeweils 4 unterschiedlichen Mäusen der Linien PS1 [WT] (4 Monate), PS1 [A246E] (4 Monate) und *aged* PS1 [A246E] (16 Monate) gemessen wurden.
Fehlerbalken = SEM (engl. Standard error of mean); statistische Signifikanz: * $p<0,01$; ** $p<0,001$

3.3 Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren

3.3.1 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Aktivierung des NMDA-Rezeptors

Wie mit den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, scheint die Ca^{2+}-Antwort auf Glutamat in den dissoziierten und kultivierten Neuronen von transgenen Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, verändert zu sein. Die Hippokamusneurone dieser transgenen Tiere zeigten auf die Glutamat-Applikation einen signifikant größeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als entsprechende Neurone von Kontrollmäusen. Eine durch Glutamat ausgelöste Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ kann sowohl über metabotrope als auch ionotrope Rezeptoren reguliert werden.
In diesem Experiment wurde überprüft, ob es in kultivierten Neuronen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, nach einer Aktivierung des NMDA-Rezeptors zu einer signifikant verstärkten Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zu Neuronen von Kontrolltieren kommt. Zur Aktivierung des NMDA-Rezeptors wurden kultivierte hippokampale Neurone von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] (20 DIV) gleichzeitig mit NMDA (70 µM) und Glycin (10 µM) behandelt und mit Kalium-

Ringer (50 mM) depolarisiert. NMDA und Glycin sind die beiden Agonisten des ionotropen Ca^{2+}-gängigen Glutamat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor), die zur Öffnung des Rezeptors führen. Als Kontrollen dienten Neurone von Mäusen, die entweder das PS1 [WT] oder das humane PS1 [S182] exprimieren.

Die gleichzeitige Applikation von NMDA und Glycin führte im Soma der Hippokampusneurone aller 3 Mauslinien zu einer signifikanten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 21). Die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$, die sich in den Neuronen, die die PS1-Mutation tragen zeigte, unterschied sich dabei nicht signifikant von der in den Kontrollneuronen, die das PS1 [WT] oder das PS1 [S182] exprimieren. Dieses Resultat deutet daraufhin, dass die verstärkte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ auf Glutamat in den Neuronen von Mäusen mit einer PS1-Mutation nicht durch einen modulierten Ca^{2+}-Einstrom durch den NMDA-Rezeptor bedingt zu sein scheint.

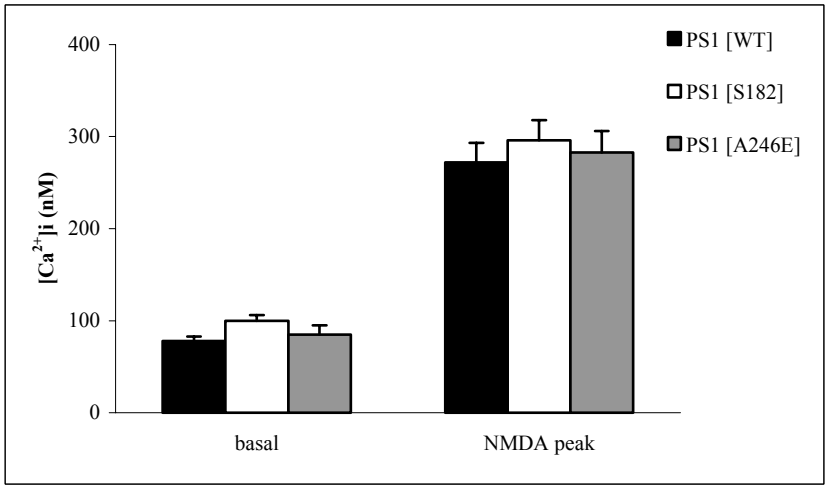


Abb. 21: *Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Neuronen nach Applikation von NMDA und Glycin*
Das Balkendiagramm zeigt den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen nach Zugabe von NMDA (70 µM) und Glycin (10 µM). Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (in nM). Die $[Ca^{2+}]_i$ der Neurone, die die PS1-Mutation [A246E] tragen, zeigt sowohl basal als auch nach der Zugabe von NMDA und Glycin keinen signifikanten Unterschied zu der in Neuronen von Mäusen, die das humane PS1 [S182] oder Maus-PS1 [WT] exprimieren. Die Balken geben die gemittelten Werte von 20 Zellen an. Gemessen wurden diese Werte an 4 untersuchten Kulturen.
Standardabweichung = SEM

3.3.2 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Aktivierung von IP_3

Wie das vorherige Experiment zeigte, scheinen die in den Neuronen mit einer PS1-Mutation vorliegenden Glutamat induzierten Ca^{2+}-Veränderungen nicht über einen externen Ca^{2+}-Einstrom durch NMDA-Rezeptorkanäle bedingt zu sein. Im folgenden Experiment wurde deshalb untersucht, ob es infolge einer Aktivierung der metabotropen IP_3-Rezeptor-Kaskade in Neuronen mit der PS1-Mutation [A246E] im Vergleich zu Kontrollen zu einer signifikant veränderten Freisetzung von Ca^{2+} aus internen ER-Ca^{2+}-Speichern kommt. Um eine intrazelluläre Freisetzung von IP_3 zu erreichen wurden kultivierte hippokampale Neurone (21 DIV) mit Bradykinin (BK) behandelt. BK-Rezeptoren sind mit der G_q (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein)/PLC Signalkaskade verbunden und können so ähnlich wie die metabotrope Glutamat-Rezeptor-Kaskade über ein G-Protein zur Freisetzung von IP_3 führen.
Nach einer Kulturdauer von 21 Tagen erfolgte eine Applikation von BK auf kultivierte Hippokampusneurone von Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren. Als Kontrollen dienten einerseits die kultivierten Neurone von nicht-transgenen Mäusen, die das PS1 [WT] tragen (21 DIV). Anderseits wurden die Neurone von Mäusen, die das human PS1 [S182] exprimieren als Kontrollen eingesetzt (21 DIV). Vor der Applikation des BK wurde die basale $[Ca^{2+}]_i$ im Soma der kultivierten Neurone aller Mauslinien ermittelt. In den Neuronen der drei untersuchten Mauslinien zeigten sich keine Unterschiede in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 22).
Nach der Zugabe von BK kam es in den Zellen aller Linien zu einer raschen Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 22, 23). Die $[Ca^{2+}]_i$ stieg in den Neuronen, die die PS1-Mutation exprimieren im Vergleich zu den Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen, die entweder das Maus-PS1 [WT] oder das humane PS1 [S182] exprimieren, deutlich stärker an (siehe Abb. 22). Durch die Darstellung der $[Ca^{2+}]_i$ (nM) in Pseudofarben wurde deutlich, dass es besonders im Soma der hippokampalen Neurone im Bereich des Zellkerns nach der Zugabe von BK zu einem deutlichen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kam (siehe Abb. 23). Eine genauere Lokalisation der intrazellulären Ca^{2+}-Änderungen war allerdings aufgrund der Kameraauflösung und der Benutzung eines nicht-konfokalen Systems nicht möglich.

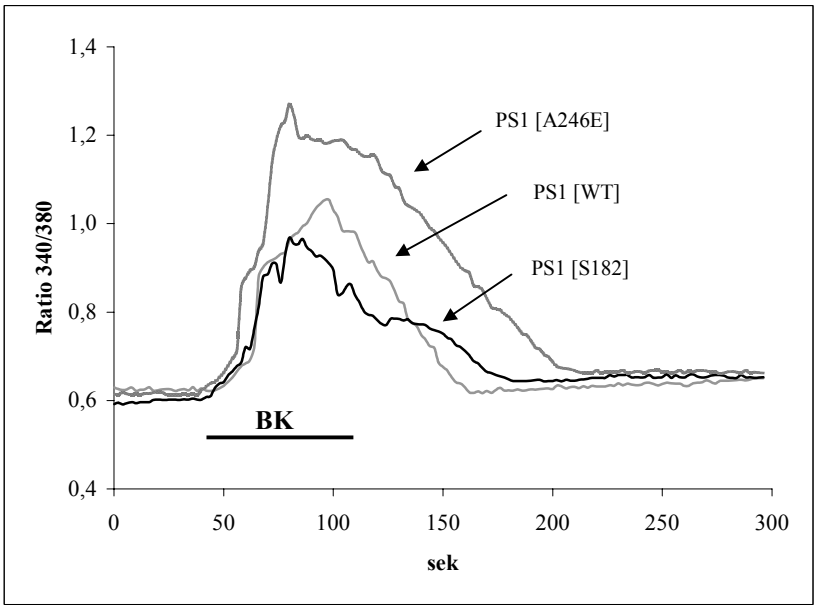


Abb. 22: *Einzelmessungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Bradykinin (BK) in kultivierten Neuronen*

Die Abbildung stellt exemplarische Einzelmessungen der $[Ca^{2+}]_i$ in hippokampalen Neuronen von transgenen Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, dar. Im Vergleich sind die Kinetiken von Neuronen, die das PS1 [WT] tragen oder das humane PS1 [S182] exprimieren, abgebildet. Die Applikation von BK (1 µM; 90 sek) führte zu einer deutlich verstärkten Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in den Zellen, die die PS1-Mutation [A246E] tragen im Vergleich zu den Neuronen, die das PS1 [WT] oder das humane PS1 [S182] exprimieren.

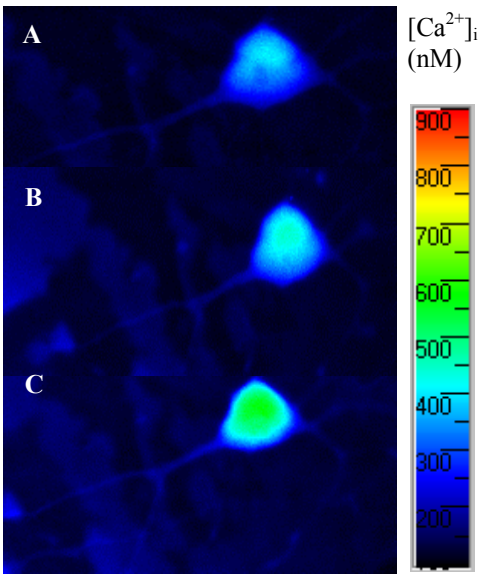


Abb. 23: *Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Bradykinin (BK) in Pseudofarben*

Die Abbildungen A-C zeigen den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ dargestellt in Pseudofarben im Soma eines hippokampalen Neurons nach der Applikation von BK (1 µM).

Die Farbskala gibt die Konzentration der $[Ca^{2+}]_i$ (nM) in Pseudofarben wieder. Der Vergleich der Darstellungen A-C zeigt eine intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration von ca. 350 nM bis hin zu maximal ca. 600 nM. Membran- und dendritische Bereiche scheinen primär keine Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ aufzuweisen.

Die Neurone, die das PS1 [S182] oder das PS1 [WT] exprimieren, zeigten nach der Applikation von BK einen maximalen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf durchschnittlich

300 nM. In den Neuronen der Mäuse, die die PS1-Mutation tragen, war die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ signifikant größer. Sie stieg von 80 nM auf 590 nM an (siehe Abb. 24). Somit zeigten die Neurone von Mäusen mit einer PS1-Mutation nach einer Aktivierung von IP_3 durch BK eine statistisch gesehen größere Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. Diese verstärkte Änderung des internen Ca^{2+}-Milieus ließ sich auf eine vermehrte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER zurückführen.

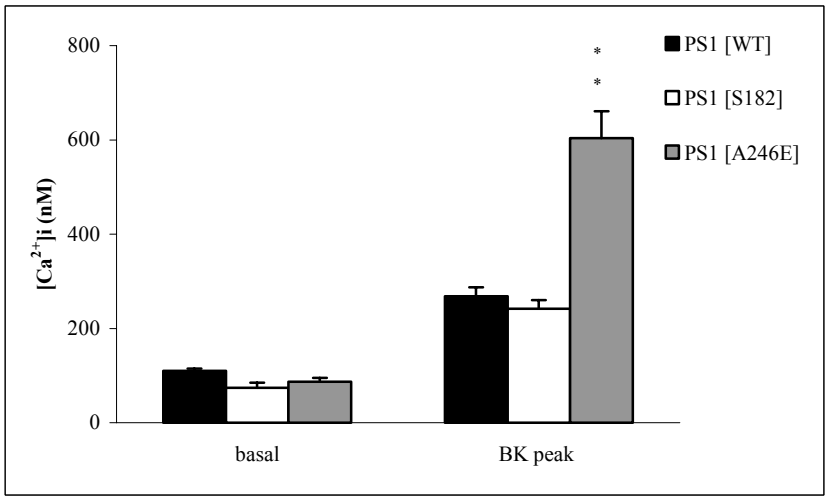


Abb. 24: *Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Neuronen nach Applikation von Bradykinin (BK)*
Das Diagramm zeigt den Anstieg der basalen $[Ca^{2+}]_i$ in Hippokampusneuronen nach Zugabe von BK (1 µM). Die basale $[Ca^{2+}]_i$ lag in den Neuronen der 3 Mauslinien zwischen 80 und 100 nM. Im Vergleich zu den Neuronen von Mäusen, die das PS1 [WT] oder das PS1 [S182] exprimieren, induzierte die BK-Behandlung in den Zellen transgener Mäuse mit einer PS1-Mutation [A246E] eine signifikante Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$. Die Balken zeigen die gemittelten Werte von 20 Zellen. Gemessen wurden diese Werte jeweils an 4 separaten Zellkulturen.
Standardabweichung = SEM, statistische Signifikanz: ** $p<0{,}001$

3.4 Blockierung von ER-Ca^{2+}-ATPasen in kultivierten hippokampalen Neuronen

Die Ca^{2+}-Untersuchungen nach der Applikation von BK haben gezeigt, dass es in den Neuronen mit der PS1-Mutation [A246E] vermutlich infolge einer Aktivierung von IP_3 zu einem signifikant stärkeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zu Kontrollen kam. Da IP_3 zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt, lag die Annahme nahe, dass die Menge an Ca^{2+}, die in Neuronen mit einer PS1-Mutation nach der IP_3-Aktivierung aus dem ER freigesetzt wird, eventuell verändert ist. Eine derartige Mo-

dulation der Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER könnte auf eine erhöhte Speicherung oder Pufferung von Ca^{2+} im ER zurückgeführt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, musste die Menge an Ca^{2+}, die aus dem ER freizusetzen ist, in Neuronen, die eine PS1-Mutation exprimieren analysieren werden. Eine derartige Untersuchung ermöglicht der selektive, irreversible Ca^{2+}-ATPase-Hemmer Thapsigargin (Thg, 1 µM). Thg hat ausschließlich einen Einfluss auf die Ca^{2+}-ATPasen, die in der Membran des ER vorliegen. Durch den Einsatz von Thg kommt es zur irreversiblen Blockierung der ER-Ca^{2+}-ATPasen. Aufgrund des großen Ca^{2+}-Gradienten an der Membran des ER kommt es nach der Blockierung der Ca^{2+}-ATPase zum Ausströmen des Ca^{2+} aus den ER-Ca^{2+}-Speichern. Somit konnte anhand von kultivierten hippokampalen Neuronen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren (20 DIV), die Menge an freisetzbarem intrazellulärem Ca^{2+} untersucht werden.

Wie die Neurone, die das PS1 [S182] exprimieren (20 DIV), dienten die nichttransgenen hippokampalen Neurone, die das PS1 [WT] tragen (20 DIV) als Kontrollen. Die Aufnahme der basalen $[Ca^{2+}]_i$ kultivierter hippokampaler Neurone erfolgte nach einer Kulturdauer von 20 Tagen in einer physiologischem Ringer-Lösung (siehe Anhang A2.2) Die basale $[Ca^{2+}]_i$ der Neurone von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der, die in den Neuronen ermittelt wurde, die das PS1 [WT] oder das PS1 [S182] exprimieren (Abb. 25). Nach der Applikation von Thg (1 µM, 120 sek) zeigten alle untersuchten kultivierten Neurone eine deutliche Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 25 und Abb. 26). Dabei kam es in den Neuronen mit der PS1-Mutation im Vergleich zu den Kontrollen zu einem deutlich stärkeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 25). Die Darstellung des Verlaufs der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ (nM) in Pseudofarben machte deutlich, dass es besonders in zytoplasmatischen Bereichen in der näheren Umgebung des Zellkerns zu den primären und am stärksten ausgeprägten Veränderungen des internen Ca^{2+}-Milieus kam. Von der Plasmamembran hin zu inneren zytoplasmatischen Bereichen schien die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ generell sowohl in den Neuronen mit der PS1-Mutation als auch in den Kontrollen zuzunehmen (siehe Abb. 26 A-E).

Weitere Untersuchungen, in denen parallel Thg und Ca^{2+}-Kanal-Antagonisten appliziert wurden, sollten eine noch präzisere Charakterisierung der Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ ermöglichen. Untersuchungen mit einer gleichzeitigen Applikation mehrerer Toxine führte allerdings zum Absterben der kultivierten Neurone.

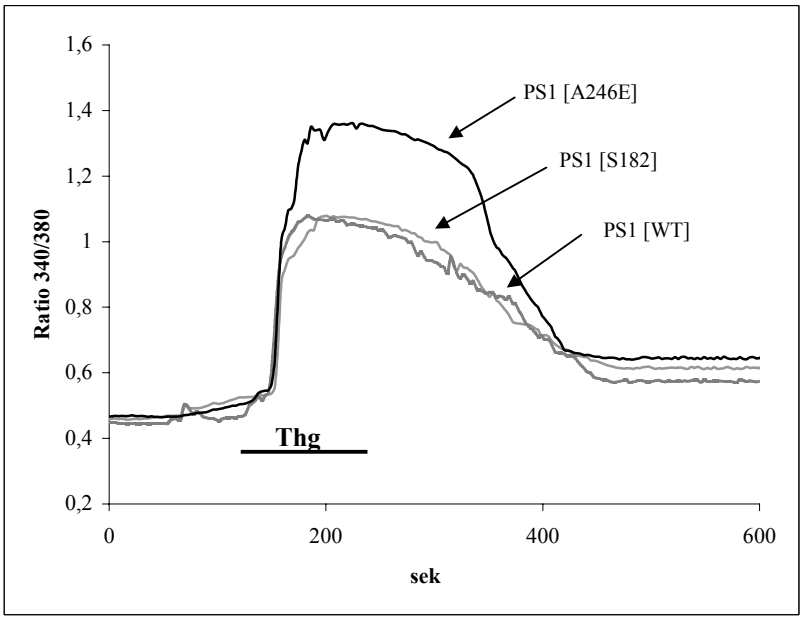


Abb. 25: *Einzelkinetiken der $[Ca^{2+}]_i$ in hippokampalen Neuronen nach Zugabe von Thapsigargin (Thg)*

Die Darstellung zeigt eine exemplarische Einzelmessung an einem Neuron, das die PS1-Mutation [A246E] trägt. Zum Vergleich ist die Kinetik eines Neurons dargestellt, das das Maus-PS1 [WT] trägt und die Kinetik eines Neurons, das das PS1 [S182] exprimiert. Durch die Zugabe von Thg veränderte sich die $[Ca^{2+}]_i$ in allen Neuronen. Diese Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ erreichte in dem Neuron, das die PS1-Mutation exprimiert, ein wesentlich höheres Maximum als in den Kontrollneuronen.

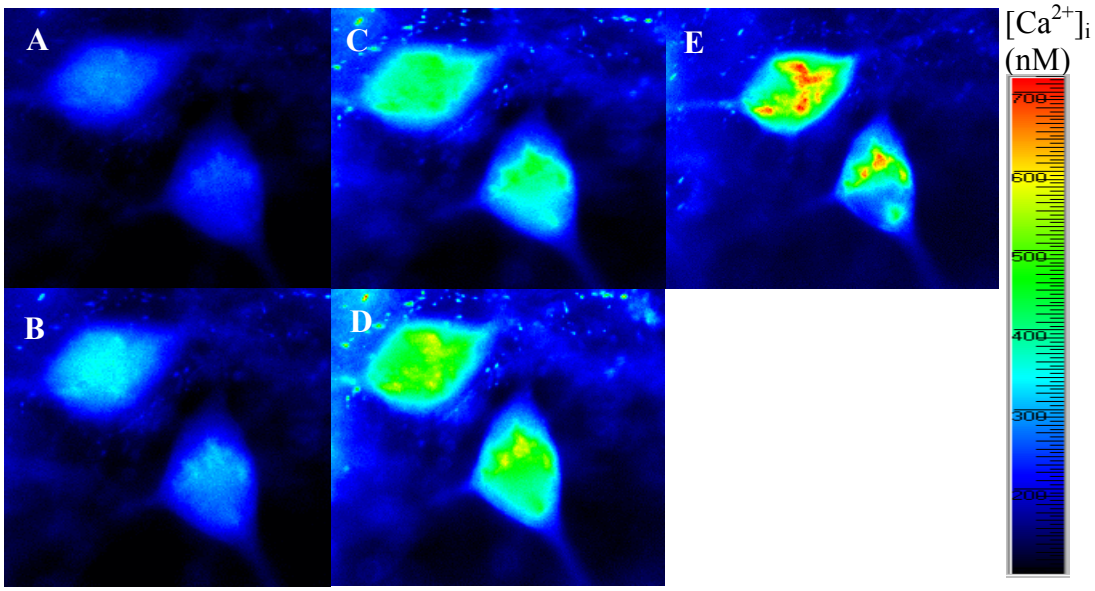


Abb. 26: *Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Thapsigargin (Thg) in Pseudofarben*
Die Abbildungen A-E zeigen den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ dargestellt in Pseudofarben. Nach der Applikation von Thg (1 µM) (von A nach B) kommt es im Soma der hippokampalen Neurone, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Die Farbskala gibt die Konzentration der $[Ca^{2+}]_i$ in nM als Pseudofarbe wieder. Der Vergleich der Abbildungen A-E macht deutlich, dass es besonders in zytoplasmatischen kernnahen Bereichen zu den stärksten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ von ca. basal 200 nM bis hin zu ca. maximal 700 nM nach Applikation von Thg kommt.

Beim Vergleich der Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen den einzelnen Mauslinien, konnte ein signifikant größerer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen der Mäuse, die die PS1-Mutation tragen, festgestellt werden. Die $[Ca^{2+}]_i$ stieg in den Neuronen dieser Mäuse von 80 nM auf 800 nM an. In den Neuronen der Kontrolltiere stieg die $[Ca^{2+}]_i$ von 80 nM auf durchschnittlich 420 nM (siehe Abb. 27). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Thg den signifikant stärksten Effekt auf die Neurone mit einer PS1-Mutation hatte. Zwei denkbare Erklärungen könnten diesen Effekt in den Neuronen mit der PS1-Mutation induziert haben. Einerseits ist es möglich, dass eine größere Menge an Ca^{2+} in ER-Speichern akkumuliert wird. Andererseits ist es möglich, dass eine andere oder empfindlichere Regulation des CCE in diesen Neuronen vorliegt. In diesem Fall würde ein verstärkter Einstrom von externem Ca^{2+} durch CCE-Kanäle zum Anstieg des Ca^{2+} im ER führen.

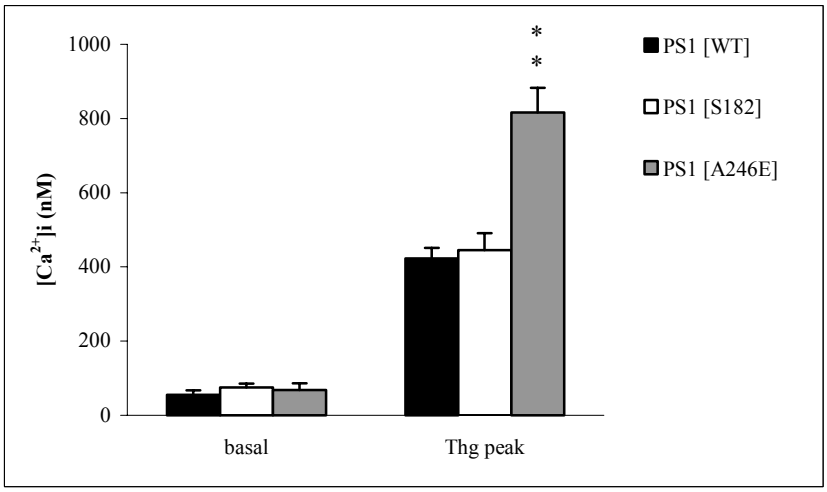


Abb. 27: *Inhibition der endoplasmatischen Ca^{2+}-ATPase in hippokampalen Neuronen durch Thapsigargin (Thg)*

Dargestellt sind die Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in nM in Neuronen der Mauslinien PS1 [WT], PS1 [S182] und PS1 [A246E] nach Applikation von Thg (1 µM, 120 sec). Der durch das Thg ausgelöste Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ war in den Zellen der Mäuse, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, signifikant größer als in der Zellen von Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] oder das humane PS1 [S182] tragen. Die Balken zeigen die gemittelten Werte von 25 Zellen. Gemessen wurden diese Werte jeweils in 3 separaten Zellkulturpräparationen.

Standardabweichung = SEM, statistische Signifikanz: ** $p<0,001$

3.5 Untersuchungen zum Auffüllungsmechanismus der ER-Ca^{2+}-Speicher (kapazitativer Ca^{2+}-Einstrom/CCE)

3.5.1 Einfluss der Expression einer PS1-Mutation auf den CCE

Der Signalweg, der über den IP_3-Rezeptor zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt, steht im engen Zusammenhang mit dem kapazitativen Ca^{2+}-Einstrom (CCE) in die Zelle. Ein derartiger Einstrom von externem Ca^{2+} tritt vor allem nach einer Depletion von Ca^{2+} aus dem ER auf und dient dem Auffüllen von ER-Ca^{2+}-Speichern.

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass hippokampale Neurone mit der PS1-Mutation [A246E] eine verstärkte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER zeigten. In den Neuronen mit der PS1-Mutation [A246E] könnte eine Modulation des CCE für diesen Effekt verantwortlich sein. Ein verstärkter Ca^{2+}-Einstrom infolge des CCE könnte in diesen Neuronen zu der beobachteten signifikant verstärkten Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER geführt haben.

Zum Studium des kapazitativen Ca^{2+}-Einstroms wurden hippokampale Neurone von transgenen Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] untersucht. Parallel dazu erfolgten Untersuchungen sowohl an Neuronen von nicht-transgenen Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] tragen als auch an Neuronen von Mäusen, die das humane PS1 [S182] exprimieren.

Ein kapazitativer Ca^{2+}-Einstrom in kultivierte hippokampale Neurone (19 bis 21 DIV) konnte ausgelöst werden, nachdem die Neurone für 30 Minuten in einer Ca^{2+}-freien Hepes-Ringer-Lösung (siehe Anhang A2.4) mit Cyclopiazonicsäure (CPA, 2 µM) inkubiert wurden. CPA blockiert ähnlich wie Thg die ER-Ca^{2+}-ATPase. Dies führt aufgrund des Ca^{2+}-Gradienten an der Membran des ER zu einem Ausstrom von Ca^{2+} aus diesem Organell. Durch das Inkubieren der Zellen in einer Ca^{2+}-haltigen Hepes-Lösung, wurde ein CCE über SOC-Kanäle vermittelt (siehe Abb. 28 A). Zur genaueren Charakterisierung des CCE bedingten Ca^{2+}-Einstroms wurden parallel Kontrollversuche mit dem CCE-Inhibitor SKF96365 (100 µM, 30 Minuten) durchgeführt (siehe Abb. 29).

Im Vergleich zu dem CCE, der in den Neuronen, die entweder das PS1 [WT]- oder das humane PS1 [S182] exprimieren, gemessen wurde, ergab sich in den Neuronen mit der PS1-Mutation ein signifikant verringerter CEE (Abb. 28 A). Der CCE in hippokampalen Neuronen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] wies gegenüber den Neuronen der Kontrolllinien PS1 [WT]- und PS1 [S182] eine ca. 40 %ige Reduktion auf (siehe Abb. 28 B).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die in den Neuronen mit der PS1-Mutation [A246E] ermittelten signifikant erhöhten Ca^{2+}-Freisetzungen aus dem ER nicht auf einen verstärkten kapazitativen Ca^{2+}-Einstrom zurückzuführen sind. Vielmehr scheint eine verstärkte Akkumulation von Ca^{2+} in den ER-Speichern eine Erniedrigung des CCE in diesen Neuronen zu induzieren.

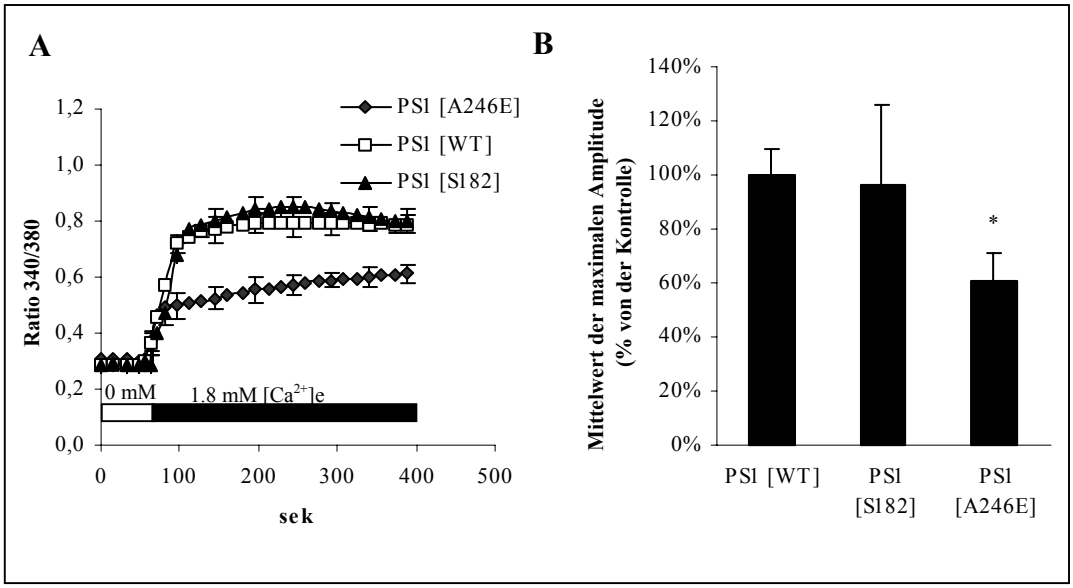


Abb. 28: *Verringerung des kapazitativen Ca^{2+}-Einstroms (CCE) beim Vorliegen einer PS1-Mutation*
A: Die Darstellung zeigt einen Vergleich des CCE, in Neuronen der Mauslinien PS1 [WT], PS1 [S182] und PS1 [A246E]. Es ist eine signifikante Reduktion des CCE aufgrund der Expression der PS1 [A246E]-Mutation zu erkennen. Die Datenpunkte geben die Mittelwerte der maximalen $[Ca^{2+}]_i \pm$ SEM wider. Die Daten wurden in 30 Zellen ermittelt.
B: Das Balkendiagramm zeigt die gemittelten maximalen $[Ca^{2+}]_i$ die aus jeweils 4 separaten CCE-Experimenten stammen. Verglichen werden die Daten der Neurone von PS1[WT]-, PS1[S182]- sowie PS1 [A246E]-Mäusen.
Standardabweichung =SE, statistische Signifikanz: *p<0,005

3.5.2 Einfluss der Expression von App auf den CCE

In folgenden CCE-Messungen wurde untersucht, inwieweit die durch mutiertes PS1-vermittelte Reduktion des CCE von einer App-Expression abhängig ist. Dazu wurde dasselbe CCE-Versuchsprotokoll, wie in versuchsreihe 3.5.1 beschrieben, an kultivierten hippokampalen Neuronen (19 bis 21 DIV) von App [-/-]-Mäusen durchgeführt. Zur Kontrolle dienten Neurone von nicht-transgenen Tieren, die das PS1 [WT] tragen. Parallel wurde wieder der pharmakologische Effekt des CCE-Inhibitors SKF96365 zur Charakterisierung des CCE untersucht (100 µM, 30 Minuten) (siehe 3.5.1).

Im Vergleich zu den Neuronen der nicht-transgenen Mäuse zeigten die CCE-Messungen in den Neuronen der App [-/-]-Mäuse keinen signifikanten Unterschied. Die maximalen Amplituden des gemessenen CCE zeigten in den Neuronen beider Mauslinien eine ähnliche Kinetik (siehe Abb. 29 A). Durch die Applikation von SKF96365 konnte eine ca. 50 %ige Blockierung des CCE in Zellen von nicht-

transgenen Mäusen erreicht werden. Eine vollständige Blockierung des CCE war somit durch SKF96365 nicht möglich (siehe Abb. 29 B).

Wie dieser Versuch zeigte, scheint das Ausschalten der endogenen Maus-App-Expression keinen Einfluss auf den CCE zu haben. Des Weiteren wurde gezeigt, dass mit dem Einsatz eines CCE-Inhibitors der CCE in die Zelle nicht vollständig blockiert werden kann.

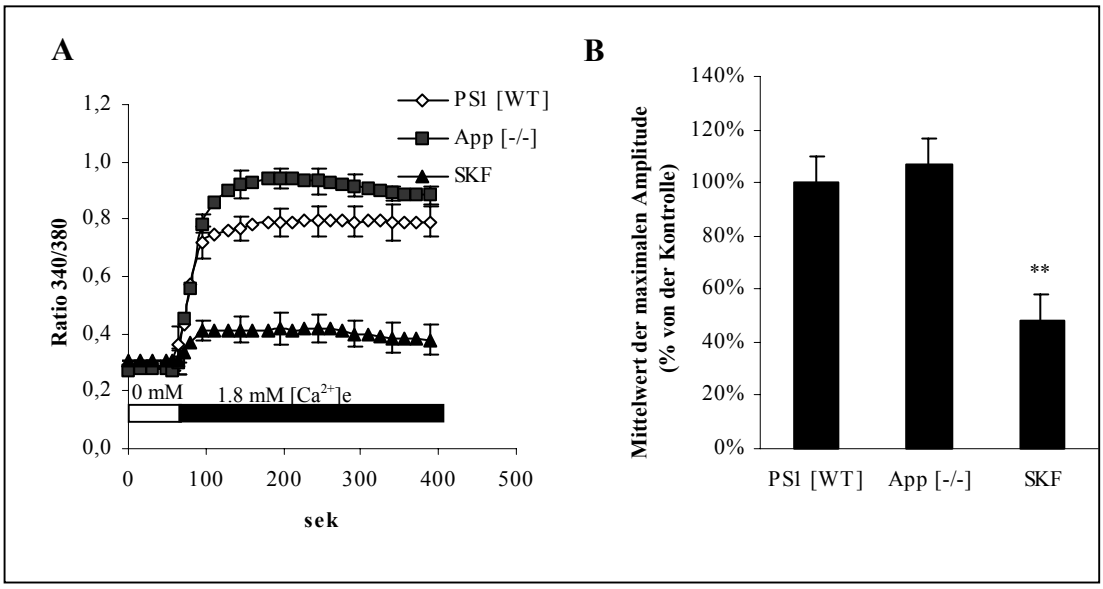


Abb. 29: *Kapazitativer Ca^{2+}-Einstrom (CCE) in kultivierten Neuronen von PS1 [WT]- und App [-/-]-Mäusen*

A: Im Vergleich zu Neuronen von App [-/-]-Mäusen zeigt der CCE in kultivierten hippokampalen Neuronen von Mäusen, die das PS1 [WT] exprimieren, keinen signifikanten Unterschied. Zur Inhibition des CCE wurden Neurone, die das PS1 [WT] exprimieren mit SKF96365 (100 µM, 30 min) behandelt, bevor CCE-Messungen durchgeführt wurden.

B: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der maximalen Amplituden der $[Ca^{2+}]_i$ von 4 unabhängigen CCE-Experimenten. Ermittelt wurden diese Daten in den Neuronen von PS1 [WT]- und App [-/-]-Mäusen. Der CCE in den Neuronen dieser beiden Mauslinien wurden mit dem in nicht-transgenen Neuronen verglichen, wobei dieser durch SKF blockiert wurde. Die Balken geben die Mittelwerte der maximalen Ca^{2+}-Amplituden ± SEM an, widergegeben als %-Angabe im Vergleich zur Kontrolle PS1 [WT]. **p<0,001

3.5.3 Einfluss der PS1-Mutation auf den CCE bei einem App [-/-]-Hintergrund

Im folgenden Experiment wurde untersucht, inwieweit es zu einer Reduktion des CCE kommt, wenn die PS1-Mutation [A246E] auf einem App [-/-]-Hintergrund exprimiert wird. So konnte überprüft werden, ob der Effekt der PS1-Mutation auf den CCE abhängig von einer App-Expression ist.

Hierfür wurde der CCE in Neuronen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren mit dem in Neuronen, die die PS1-Mutation [A246E] auf einem App-defizienten Hintergrund tragen, verglichen. Als Kontrollen dienten Untersuchungen des CCE in nicht-transgenen Neuronen, die das PS1 [WT] tragen.

Im Vergleich zu dem CCE, der in den nicht-transgenen Neuronen ermittelt wurde, zeigten die Hippokampusneurone, die die PS1-Mutation exprimieren einen deutlich reduzierten CCE. Es konnte beobachtete werden, dass diese Reduktion des CCE sowohl in den Neuronen, die die PS1-Mutation auf einem Maus-App- als auch auf einem App-defizienten-Hintergrund tragen, signifikant reduziert war (siehe Abb. 30 A). Im Vergleich zu den Kontrollneuronen zeigte der CCE in den Neuronen, die die PS1-Mutation trugen eine durchschnittlich 40 %ige Reduktion (siehe Abb. 30 B). Zusammenfassend zeigten diese Resultate, dass die Reduktion des CCE in den Neuronen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, nicht von einer Expression des endogenen Maus-App beeinflusst wurde. Somit lassen diese Ergenisse vermuten, dass die Reduktion des CCE vermutlich durch die Mutation im PS1-Gen hervorgerufen werden kann.

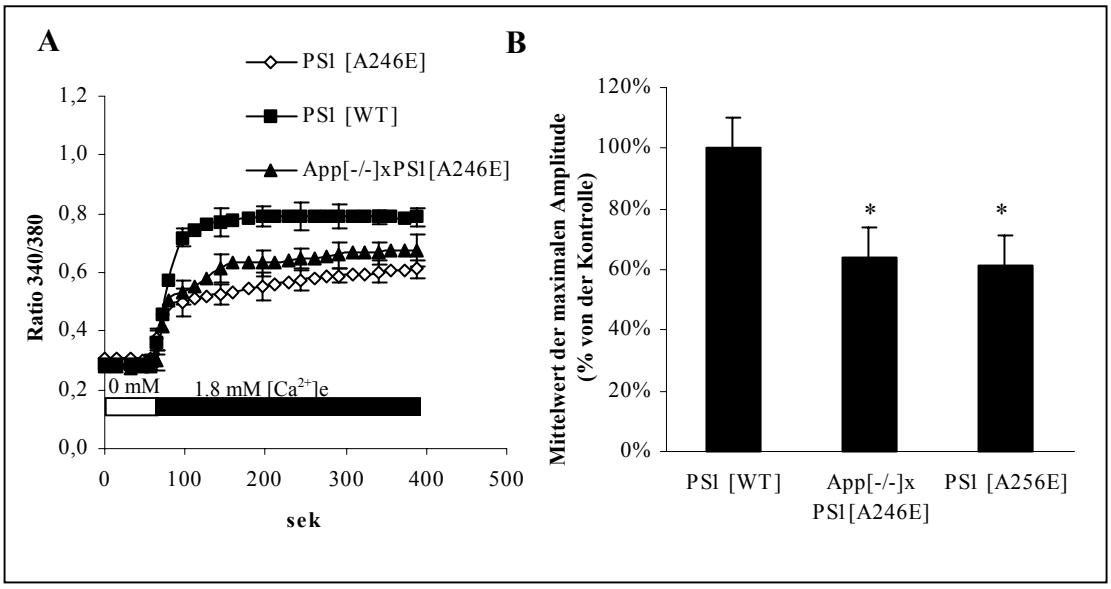


Abb. 30: *Reduktion des CCE durch Expression einer PS1-Mutation auf einem App-knock-out-Hintergrund*

A: Im Vergleich zur CCE-Kinetik der Neurone von PS1 [WT]-Mäusen zeigte sich in den hippokampalen Neuronen, die die PS1-Mutation [A246E] tragen, auch auf einem App-knock-out-Hintergrund eine signifikante Verringerung des CCE.

B: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der maximalen Amplituden der $[Ca^{2+}]_i$ von 4 unabhängigen CCE-Experimenten. Diese wurden in den Neuronen von App[-/-]xPS1[A246E]-Mäusen ermittelt und mit denen in Neuronen der Mauslinien PS1 [A246E] und PS1 [WT] verglichen. Die Balken zeigen die Mittelwerte der maximalen Ca^{2+}-Amplituden ± SEM, widergegeben als % Angaben im Vergleich zur Kontrolle PS1 [WT]. *$p<0,005$

3.6 Ermittlung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Inhibition des CCE durch SKF96365

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Blockierung der CCE-Kanäle zu einer Veränderung der ER-Ca^{2+}-Homöostase führt. Mit dieser Untersuchung sollten Rückschlüsse gemacht werden, ob die veränderte Ca^{2+}-Homöostase, die in Neuronen mit einer PS1-Mutation vorliegt, mit einer Verminderung des CCE in Zusammenhang zu bringen ist. Eine Inhibition des CCE führt zu einer verminderten Auffüllung der ER-Ca^{2+}-Speicher mit Ca^{2+}. SKF96365, das den CCE und zu einem geringeren Grad auch den Ca^{2+}-Strom durch spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle vermindert (Merritt *et al*., 1990), bewirkt mit steigender Konzentration eine erhöhte Bildung von Aβ42 (Yoo *et al*., 2000). Dieser Effekt von SKF96365 auf die Aβ-Bildung erfordert das biologisch aktive Vorhandensein von PS1. Dies konnte anhand der Expression einer biologisch nicht-aktiven PS1-Mutation (PS1 [D257A]) in Zelllinien gezeigt werden.

Somit konnte bereits bewiesen werden, dass eine Inhibition des CCE eine verstärkte Akkumulation von Aβ42 bewirkt (Yoo *et al*., 2000).
Eine Blockierung von CCE-Kanälen wurde mit dem CCE-Inhibitor SKF96365 (100 µM, 30 Minuten) an hippokampalen Neuronen (19 bis 21 DIV) von FVB/N- und App [-/-]-Mäusen durchgeführt. Somit konnte analysiert werden, ob die Expression von endogenem Maus-App einen Einfluss bei der Blockierung von CCE-Kanälen hat. Im Anschluss an die Behandlung mit SKF96365 wurden die Neurone in einer physiologischer Lösung (siehe Anhang A2.2) inkubiert, in der die basale $[Ca^{2+}]_i$ ermittelt wurde. Nach einer anschließenden Applikation von Thg (1 µM, 2 min) konnte festgestellt werden, inwieweit die Blockierung der CCE-Kanäle einen Einfluss auf das Vorliegen von Ca^{2+} im ER hatte. Zur Kontrolle wurden bei diesem Versuch Experimente ohne SKF96365 durchgeführt (siehe Abb. 31).

In der basalen $[Ca^{2+}]_i$ zeigte sich zwischen den Neuronen von FVB/N- und App [-/-]-Mäusen kein Unterschied (siehe Abb. 31). Nach der Applikation von Thg (1 µM, 2 Minuten) wurde die daraus resultierenden Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ aufgenommen. Sowohl in den Neuronen von FVB/N- als auch von App [-/-]-Mäusen konnte ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden. In den hippokampalen Neuronen der FVB/N-Mäuse, die zuvor mit SFK96365 behandelt wurden, konnte im Vergleich zu den Neuronen der App [-/-]-Mäuse, die ebenfalls mit SKF96365 behandelt worden waren, eine signifikant stärkere Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ festgestellt werden (siehe Abb. 31). Ohne eine vorhergehende Behandlung mit dem CCE-Inhibitor wurde kein Unterschied in der durch Thg ausgelösten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zwischen den Neuronen von FVB/N- und App [-/-]-Mäusen festgestellt.
Folglich führte die Blockierung des CCE in Neuronen von FVB/N-Mäusen zu einer erhöhten intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER. Wie der Vergleich der Zellen von FVB/N- und App [-/-]-Mäusen zeigt, hängt diese Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ anscheinend von der endogenen App-Expression ab.
Folglich könnte die Expression von App und eine damit eventuell verbundene Bildung von Aβ eine Rolle in der Verminderung des CCE spielen. Yoo *et al*. (2000) zeigten, dass eine Blockierung des CCE zu einer vermehrten Akkumulation von Aβ42 führt. Aβ42 könnte in den Neuronen der FVB/N-Mäusen zu der beobachteten signifikanten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ geführt haben.

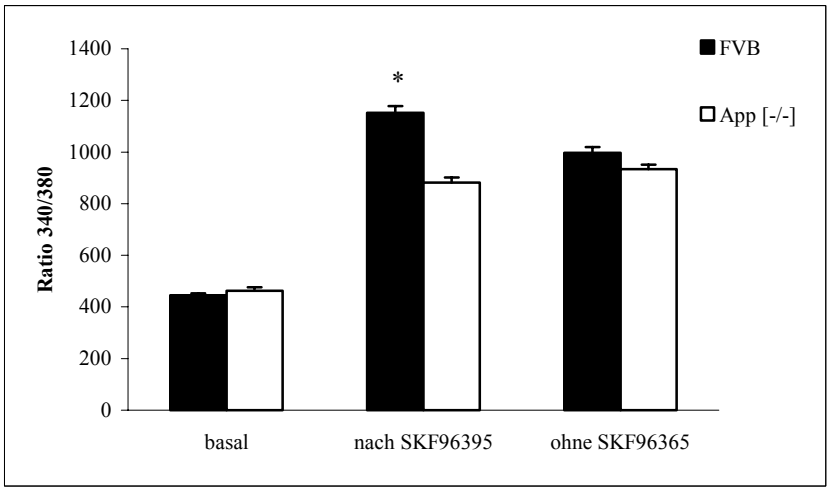


Abb. 31: *Einfluss von SKF96365 auf die durch Thg ausgelösten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Neuronen von FVB/N- und App [-/-]-Mäusen*

Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der maximalen Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe von Thg (1 µM, 2 min) in hippokampalen Neuronen von FVB/N- und App [-/-]-Mäusen. Die Neurone wurden zuvor jeweils mit und ohne den CCE-Inhibitor SKF96365 (100 µM, 1 Stunde) behandelt. Die Hippokampusneurone der FVB/N-Mäuse zeigten nach der Behandlung mit SKF96365 auf Thg eine signifikant größere Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ als die Neurone der App [-/-]-Mäuse. Die Balken geben die gemittelten Werte von 10 bis 15 Zellen an. Diese Daten wurden an 3 separaten Zellkulturen gemessen. Standardabweichung =SEM, statistische Signifikanz: * $p<0,05$

3.7 Proteinexpression von Transient-Rezeptor-Potential-Proteinen

Wie in der Versuchsreihe 3.5.1. untersucht, scheinen die CCE-Kanäle in den Neuronen von transgenen Mäusen mit einer PS1-Mutation im Vergleich zu Neuronen von nicht-transgenen FVB/N-Mäusen einen verringerten Durch- oder Einstrom von Ca^{2+}-Ionen durch CCE-Kanäle ins Zytoplasma aufzuweisen. Aufgrund dieser Beobachtung schloss sich die Untersuchung der Proteinexpressionslevel von Transient-Rezeptor-Potential-Proteinen (TRP-Proteine) an. Die Säuger-TRP-Proteine werden als Ionen-Kanal-Untereinheiten der CCE-Kanäle angenommen. TRP4 formt Ionen-Kanäle, die wesentlich für Ca^{2+} permeabel sind und nach einer Depletion intrazellulärer Ca^{2+}-Speicher aktiviert werden (Philipp *et al*., 2000; Trost *et al*., 2001). TRP4 (CCE1) wird in den Mitralzellen des Olfaktorischen Bulbus, in lateralen zerebellaren Nuclei und in den Pyramidenzellen des Hippokampus exprimiert (Philipp *et al*., 2000, Weil *et al*., 2000).

Für die Expressionsuntersuchungen von TRP4 wurden Hirne von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] untersucht und mit denen von nicht-transgenen

FVB/N-Mäusen verglichen. Des weiteren wurden transgene Mäuse analysiert, die das humane PS1 [S182] exprimieren. Die Analyse der Hirnlysate mittels der Western-Blot-Methode ergab keine wesentlichen Unterschiede in der Expression von TRP4-Proteinen in den untersuchten Mauslinien (siehe Abb. 32).

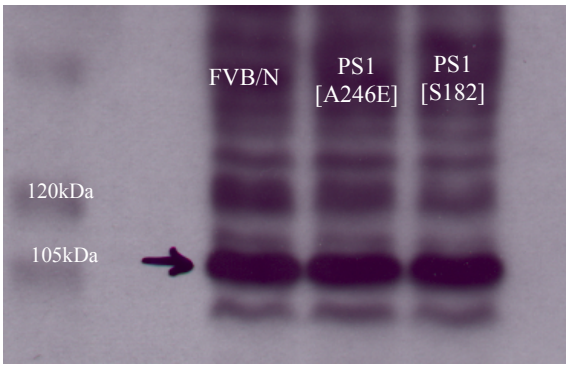


Abb. 32: *Western-Blot-Analyse der TRP4-Protein-Expression in verschiedenen Mauslinien*
Die Abbildung zeigt die Proteinexpressionslevel von TRP4-Proteinen in den Hirnlysaten der Mauslinien FVB/N, PS1 [A246E] und PS1 [S182]. Die Bande für das TRP4 (CCE1) befinden sich bei ca. 105 kDa. Es zeigt sich kein deutlicher Unterschied in der Proteinexpression zwischen den einzelnen Mauslinien. Es wurden pro Probe 10 µg/µl Protein aufgetragen.

Der verminderte CCE in den hippokampalen Neuronen mit der PS1-Mutation [A246E] lässt sich somit nicht auf eine verminderte Proteinexpression von TRP4 zurückführen.

3.8 Veränderung der Ca^{2+}-Homöostase durch C-terminale App-Spaltprodukte

3.8.1 Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ durch C99-Spaltprodukte

Die vorangegangenen Untersuchungen aus 3.3.2 und 3.5.1 haben gezeigt, dass kultivierte hippokampale Neurone, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, eine signifikant verstärkte Ca^{2+}-Freisetzung auf IP_3-vermittelte Signale zeigen. Eine mögliche Folge dieses veränderten Ca^{2+}-Signals könnte die in diesen Neuronen beobachtete Reduktion des CCE sein. Die Ursache der intrazellulären Ca^{2+}-Veränderungen ist somit noch ungeklärt.
In der Versuchsreihe 3.6 wurde nach einer Blockierung von CCE-Kanälen mit SKF96365 anschließend die intrazelluläre ER-Ca^{2+}-Speicherung mit Thg ermittelt. Aus diesem Versuch konnte der Schluss gezogen werden, dass eine Blockierung des CCE in Neuronen, die endogenes Maus-App exprimieren im Vergleich zu App-[-/-]-

Mäusen zu einem verstärkten Anstieg der intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ führt. Untersuchungen von Yoo *et al*. (2000) zeigten nach einer CCE-Blockierung mit SKF96365 in Neuronen eine vermehrte Bildung des App-Spaltprodukts Aβ42.

Diese Befunde führten zu der Hypothese, dass App-Spaltprodukte möglicherweise einen Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+}-Homöostase haben.

Allerdings ist auch ein direkter Einfluss der PS1-Mutation auf die Ca^{2+}-Homöostase nicht auszuschließen.

Ob die Expression des PS1-Gens einen Einfluss auf die Ca^{2+}-Homöostase hat, wurde im folgenden Experiment an dissoziierten Neuronen untersucht. Für diesen Versuch wurden Mäuse generiert, die Neuronen-spezifisch kein PS1-Gen tragen (PS1-*knock-out*-Mäuse; PS1 [-/-]). Untersuchungen von De Strooper *et al*. (1998) lassen vermuten das PS1 entweder selbst die γ-Sekretase oder ein wichtiger Cofaktor dieser ist. Das Ausschalten des PS1-Gens führt zu einer deutlich verringerten Aktivierung der γ-Sekretase. Daraus resultiert eine geringerer Bildung von Aβ und eine gesteigerte Akkumulation C-terminaler App-Spaltprodukte (C99) (Dewachter *et al*., 2001).

Des weiteren wurden die PS1 [-/-]-Mäuse mit transgenen Mäusen gekreuzt, die eine sogenannte London-Mutation im App aufweisen [V717I] (Appld). Mäuse mit der App-London-Mutation zeigen einen typischen Phänotyp, da es bei ihnen im Hirn zur vermehrten Plaques-Bildung durch Aβ42 kommt (Dewachter *et al*., 2001). Die doppeltransgenen Mäuse exprimieren somit ein mutiertes humanes App auf einem PS1 [-/-]-Hintergrund (AppldxPS1[-/-]). Mit der Generierung dieser Mäuse konnte untersucht werden, ob die Expression der App-London-Mutation auf einem PS1-*knock-out*-Hintergrund zu einer Veränderung der Ca^{2+}-Homöostase führt. davon Bei diesen doppeltransgenen Mäusen wird davon ausgegangen, dass es aufgrund des Ausschaltens des PS1-Gens, nicht zur Bildung von Aß in Neuronen kommt.

Bei diesem Experiment wurden die durch Thg ausgelösten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in den dissoziierten hippokampalen Neuronen von AppldxPS1[-/-]-Mäusen (8 Monate) und von PS1 [-/-]-Mäusen (8 Monate) untersucht. Diese Messungen wurden mit denen an Neuronen von nicht-transgenen Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] exprimieren (8 Monate) verglichen (siehe Abb. 33). Mit der Applikation von Thg konnten Rückschlüsse auf die im ER vorliegende Menge an Ca^{2+} gemacht werden.

Die hippokampalen Neurone der untersuchten Mauslinien zeigten in einer physiologischen Lösung (siehe Anhang A2.2) keine Unterschiede in der basalen $[Ca^{2+}]_i$. Nach

der Applikation von Thg (1 µM, 60 sek), änderte sich die basale $[Ca^{2+}]_i$ aller Zellen (siehe Abb. 33 A).

Die Gegenüberstellung der Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen der einzelnen Mauslinien zeigte eine signifikant größeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen der PS1 [-/-]- und AppldxPS1[-/-]-Mäuse im Vergleich zu den Neuronen von Tieren, die das Maus-PS1 [WT] tragen. Weiter konnte beobachtet werden, dass es nach der Applikation von Thg in den Neuronen, die die App-Mutation exprimieren zum signifikant stärksten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ kam (siehe Abb. 33 B). Nach der Beendigung der Applikation von Thg kehrte die $[Ca^{2+}]_i$, nach Erreichen eines Maximums, wieder auf ihr ursprüngliches basales Ca^{2+}-Niveau zurück (siehe Abb. 33 A)

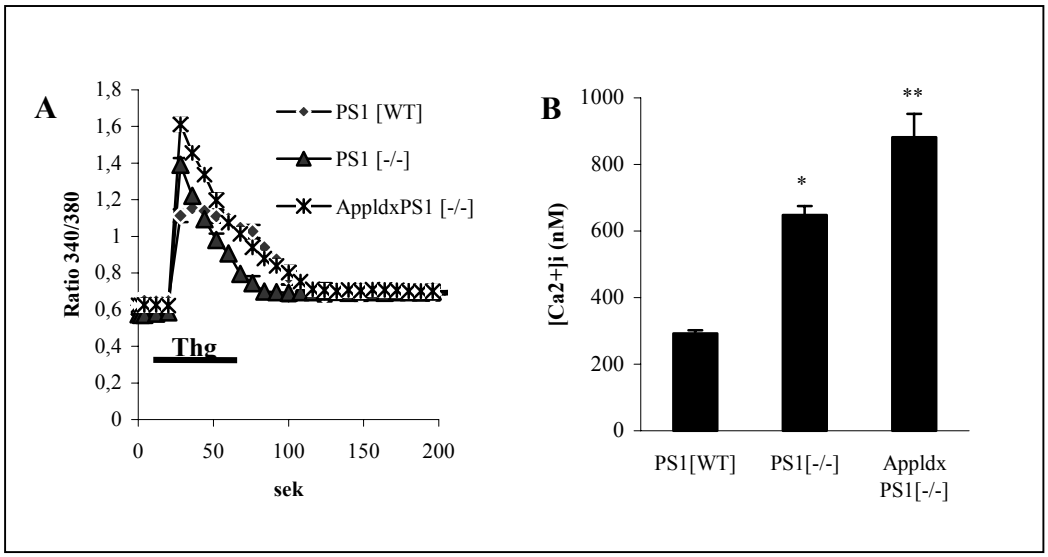


Abb. 33: *Durch Thg ausgelöste Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in dissoziierten Neuronen von PS1 [-/-]- und doppeltransgenen AppldxPS1[-/-]-Mäusen*

A: Die Abbildung zeigt exemplarisch den Kinetikverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Thg (1 µM; 60 sek) in dissoziierten Neuronen von PS1-defizienten Mäusen. Zum Vergleich sind die Ca^{2+}-Kinetiken von Neuronen gezeigt, die die App-Mutation [V717I] auf einem PS1-defizienten Hintergrung exprimieren sowie von nicht-transgenen Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] tragen. Die Daten wurden in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt und repräsentieren die gemittelten aufgenommenen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ von jeweils 30 bis 40 Zellen.

B: Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der maximalen Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ (in nM) in den Neuronen von Mäusen, die das PS1 [WT] tragen. Zum Vergleich sind die Daten der Neurone von PS1-defizienten und doppeltransgenen AppldxPS1[-/-]-Mäusen dargestellt.

Standardabweichung = SEM, stastistische Signifikanz: *p<0,001; **p<0,0005

Dieser Versuch hat deutlich gemacht, dass es in dissoziierten PS1-defizienten Neuronen, die eine verminderte γ-Sekretase-Aktivität aufweisen, zu einer verstärkten durch thg induzierten Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER kommt. Diese Untersuchungen deuten daraufhin, dass die beobachteten Ca^{2+}-Modulationen nicht auf die Bildung von Aβ zurückgeführt werden können, sondern vielmehr durch das direkte Substrat der γ-Sekretase vermutlich induziert werden können.

3.8.2 Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ durch Aβ

Beim folgenden Experiment wurde der Einfluss von Aβ auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten an dissoziierten hippokampalen Neuronen von Mäusen, die die App-London–Mutation [V717I] auf einem Maus-PS1 [WT]-Hintergrund exprimieren (8 Monate). Die Hirne dieser Mäuse zeigen bei einem Alter von 8 Monaten der Mäuse deutliche Amyloid-Ablagerungen (Dewachter *et al*., 2001). In den Neuronen dieser Tiere wurden die Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach einer Applikation von Thg untersucht. Wie auch bei den vorangegangenen Experimenten konnte durch die Applikation von Thg ein Rückschluss auf die im ER vorliegende Ca^{2+}-Menge gemacht werden. Als Kontrollen dienten Ca^{2+}-Messungen an Neuronen von nicht-transgenen Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] tragen (8 Monate). Zum Vergleich wurden hippokampale Neurone von transgenen Mäusen untersucht, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren (8 Monate).

Zunächst konnten keine signifikanten Unterschiede in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen der einzelnen Mauslinien beobachtet werden. Nach Zugabe von Thg (1 µM; 60 sek) kam es in allen Zellen zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Abb. 34 A). Gegenüber Neuronen von nicht-transgenen Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] exprimieren zeigten Neurone, die die London-App-Mutation [V717I] exprimieren, zwar eine schwache, aber nicht signifikante Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. Die dissoziierten Hippokampusneurone von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] zeigten auf die Applikation von Thg im Vergleich zu den Neuronen der beiden anderen Mauslinien eine signifikant verstärkte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ (siehe Abb. 34 B).

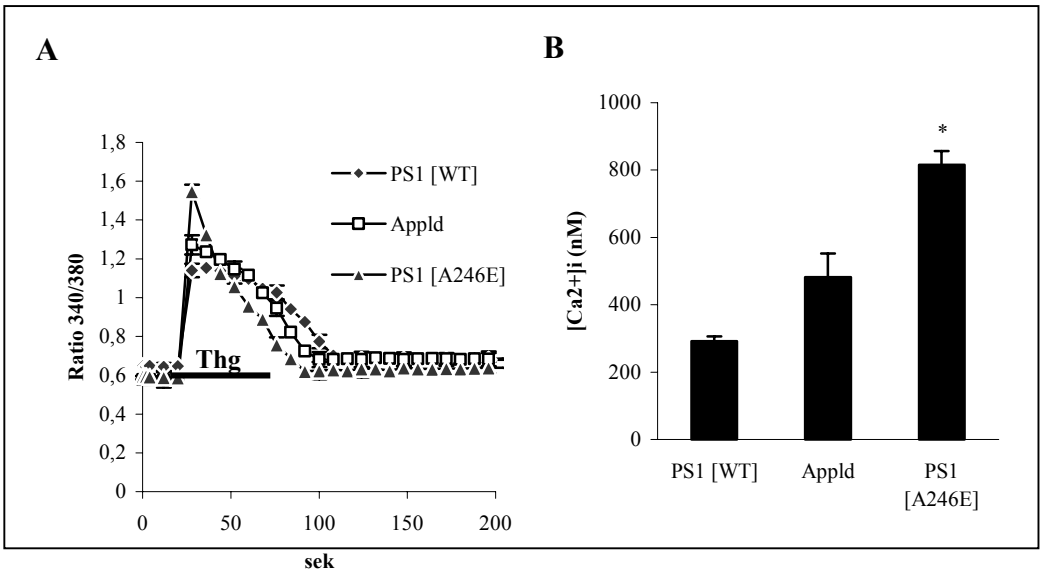


Abb. 34: *Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Applikation von Thg in dissoziierten Neuronen von Appld- und PS1 [A246E]-Mäusen*

A: Die Abbildung zeigt exemplarisch den Kinetikverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Thg (1 µM; 60 sek) in einem dissoziierten Neuron mit einer App-London-Mutation [V717I]. Im Vergleich dazu ist der durch Thg ausgelöste Ca^{2+}-Anstieg in den Neuronen, die das Maus-PS1 [WT] oder die PS1-Mutation [A246E] tragen dargestellt. Die vorliegenden Datenpunkte repräsentieren die aufgenommenen gemittelten $[Ca^{2+}]_i$ von jeweils 30 Zellen. Diese Datenpunkte wurden in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Applikationsdauer von Thg wird durch die Länge des abgebildeten Balken angegeben.

B: Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ (in nM) in den Neuronen der Mauslinien PS1 [WT] und Appld sowie von Neuronen transgener Mäuse mit der PS1-Mutation [A246E]. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ unterschied sich nicht signifikant zwischen den einzelnen untersuchten Mauslinien. Standardabweichung = SEM, statistische Signifikanz:* $p<0,001$

In dissoziierten hippokampale Neuronen adulter Tiere, die die humanpathogene London App-Mutation exprimieren, scheint somit eine verstärkte Akkumulation von Aβ42 keinen Einfluss auf die durch thg ausgelösten Ca^{2+}-Veränderungen zu haben. Im Vergleich zeigt sich in den dissoziierten Neuronen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] eine signifikante Veränderung in der durch thg ausgelösten Ca^{2+}-Veränderung. Diese Untersuchungen lassen vermuten, das Aβ nicht primär zu signifikanten Veränderungen in der Ca^{2+}-Homöostase führt.

3.8.3 Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ durch C99-Spaltprodukte im Gewebeschnitt

Im Folgenden wurden die Ergebnisse aus den Ca^{2+}-Untersuchungen an dissoziierten PS1-defizienten Neuronen und Neuronen mit der App-London-Mutation an Hirngewebeschnitten verifiziert. Neurone im Gewebeschnitten zeigen im Gegensatz zu dissoziierten Neuronen eine bessere physiologische Vitalität, da sich die Zellen in ihrem natürlichen Zellverbund befinden. Des weiteren musste bei dieser Art der Präparation keine Trypsinisierung vorgenommen werden, bei der es auch zu Schädigungen von Rezeptorproteinen kommen kann.
Bei diesem Experiment wurden Applikationen von Thg an vitalen Hippokampusgewebeschnitten (150 µm) durchgeführt. In diesen Gewebeschnitten wurden CA1 Neurone über die *patch*-Pipette mit Fura-2 beladen (siehe Abb. 35).

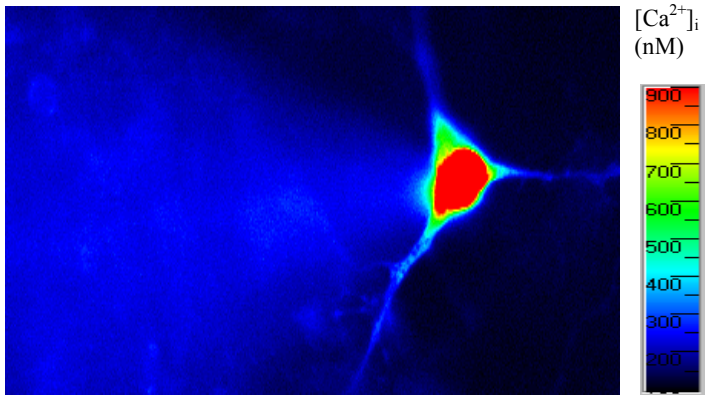


Abb. 35: *Fura-2-geladenes Neuron im transversalen Hippokampusgewebeschnitt nach Stimulation*
Dargestellt ist ein mit dem Ca^{2+}-sensitiven Farbstoff Fura-2 beladenes stimuliertes Neuron im Hippokampusgewebeschnitt (150 µm). Die Farbstoffbeladung erfolgte über die *patch*-Pipette. Die $[Ca^{2+}]_i$ wird durch die Pseudofarbe dargestellt. Die Farbskalierung gibt die $[Ca^{2+}]_i$ in nM wieder.

Nach der Fura-2-Beladung wurden die durch Thg (1 µM; 60 sek) ausgelösten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in diesen CA1 Neuronen untersucht. Neben den CA1 Neuronen von PS1-defizienten Mäusen (8 Monate) wurde die durch Thg induzierten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen analysiert, die die App-London-Mutation [V717I] auf einem PS1-defizienten Hintergrund exprimieren (AppldxPS1[-/-]). Des weiteren wurden Neurone untersucht, die die App-London-Mutation [V717I] auf einem Maus-PS1 [WT]-Hintergrund tragen (Appld, 8 Monate). Zur Kontrolle dienten Neurone nicht-transgener Mäuse, die das Maus-PS1 [WT] tragen (8 Monate).

Die Untersuchung zeigte keine signifikanten Unterschiede in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ der untersuchten CA1 Neurone (siehe Abb. 36 A). Durch die Blockierung der Ca^{2+}-ATPasen mit Thg wurde in den CA1 Neuronen der Mauslinien PS1 [-/-] und AppldxPS1[-/-] eine signifikant größere Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ ausgelöst, als in den Neuronen der Mauslinien PS1 [WT] und Appld (siehe Abb. 36 A). Durch die Applikation von Thg stieg die $[Ca^{2+}]_i$ in den CA1 Neuronen von Mäusen mit der App-London-Mutation auf einem PS1-defizienten Hintergrund kurzfristig auf 800 nM an. Im Gegensatz dazu wurde in Neuronen, die das PS1 [WT] exprimieren nur ein durchschnittlich maximaler Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf 200 nM gemessen (Abb. 36 B). In den Neuronen der AppldxPS1[-/-]-Mauslinie konnte eine signifikant stärkere Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ festgestellt werden, als in den Neuronen der PS1 [-/-]-Mauslinie.

Diese Untersuchungen bestätigen die in den dissoziierten Neuronen von PS1-defizienten Mäusen erhobenen Befunde: Sowohl durch das Ausschalten des PS1-Gens und vor allem durch die Expression der App-London-Mutation auf einem PS1-defizienten Hintergrund kommt es zu signifikanten Veränderungen der ER-Ca^{2+}-Homöostase. Im Gegensatz dazu zeigten Neurone, die die humanpathogene App-London-Mutation exprimieren, keine signifikanten Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_i$ auf die Applikation von Thg. Aufgrund der eingeschränkten Aktivität der γ-Sekretase kommt es in Neuronen, die kein PS1 exprimieren, nicht zur Bildung von Aβ (De Strooper *et al*., 1998). Somit konnte die Akkumulation von Aβ nicht für diese Ca^{2+}-Modulationen verantwortlich sein. Vielmehr kommen C-terminale Spaltprodukte (C99) vom App in Frage, die in den Hirnen dieser Mäuse akkumulieren (Dewachter *et. al*., 2001).

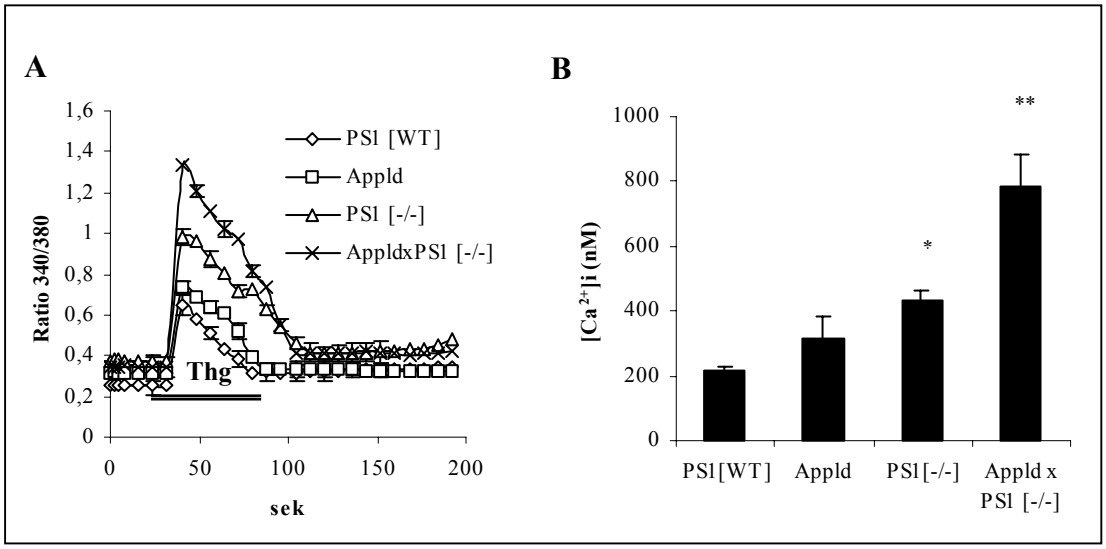


Abb. 36: *Durch Thg ausgelöste Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ in CA1 Neuronen von Hippokampusgewebeschnitten (150 µm) unterschiedlicher transgener Mäuse*

A: Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von Thg auf CA1 Neurone in Hippokampusschnitten der Mauslinien PS1 [-/-], AppldxPS1[-/-] sowie PS1 [WT] und Appld. Die Darstellung zeigt exemplarisch die durch Thg ausgelösten Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$. Die Daten repräsentieren die gemittelten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ von jeweils 10 Zellen. Ermittelt wurden diese Daten an 5 unterschiedlichen Tieren.

B: Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der maximalen Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ (in nM) in den CA1 Neuronen von nicht-transgenen Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] tragen, im Vergleich zu den Daten der Neurone der Mauslinien Appld, PS1 [-/-] sowie AppldxPS1[-/-]. Die basalen $[Ca^{2+}]_i$ unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen untersuchten Mauslinien.

Standardabweichung = SEM, statistische Signifikanz: * $p<0,05$; ** $p<0,001$

3.9 Einfluss der App-Expression auf Ca^{2+}-Modulationen durch PS1-Mutationen

3.9.1 Untersuchung der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen von App-*knock-out*-Mäusen

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die Dysregulation der ER-Ca^{2+}-Homöostase, die in Neuronen mit einer Mutation im PS1 beobachtet wird, primär von einer Expression des App abhängig ist. Innerhalb dieses Versuchs wurden sowohl hippokampale Neurone von App-*knock-out*-Mäusen (App [-/-]) als auch die Neurone von doppeltransgenen Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] auf einem App-defizienten Hintergrund exprimieren (App[-/-]xPS1[A246E]), untersucht. In den hippokampalen Neuronen dieser doppeltransgenen Mäuse wurde die $[Ca^{2+}]_i$ nach der Applikation von des ER-Ca^{2+}-ATPase Hemmers Thg gemessen. Somit konnte die Frage geklärt werden, ob die intrazelluläre Ca^{2+}-Modulation in Neuronen

mit der PS1-Mutation [A246E] durch ein verändertes proteolytisches Prozessieren des App-Proteins bedingt ist.

Für diese Experimente wurden hippokampale Langzeitkulturen (19-21 DIV) von neugeborenen App-defizienten Mäusen angelegt. Des weiteren wurden derartige Kulturen von den Mauslinien App[-/-]xPS1[A246E] und PS1 [A246E] kultiviert. Als Kontrollen dienten hippokampale Kulturen (19-21 DIV) von nicht-transgenen Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] exprimieren.

Zunächst wurde die $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen der App [-/-]-Mäuse und der nicht-transgenen Mäuse verglichen. Die basale $[Ca^{2+}]_i$ war in den Neuronen der nicht-transgenen und der App-defizienten Mäuse annähernd identisch (siehe Abb. 37 A). Nach einer Applikation von Thg (1 µM; 60 sek) wurden die Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in den hippokampalen Kulturen der beiden Mauslinien untersucht. Die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen von App-defizienten Mäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der, die in Neuronen von nicht-transgenen Mäusen ermittelt wurde (siehe Abb. 37 B). Das Ausschalten des App-Gens scheint somit keinen Einfluss auf die durch Thg ausgelöste Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ zu haben. (siehe Abb. 37 A).

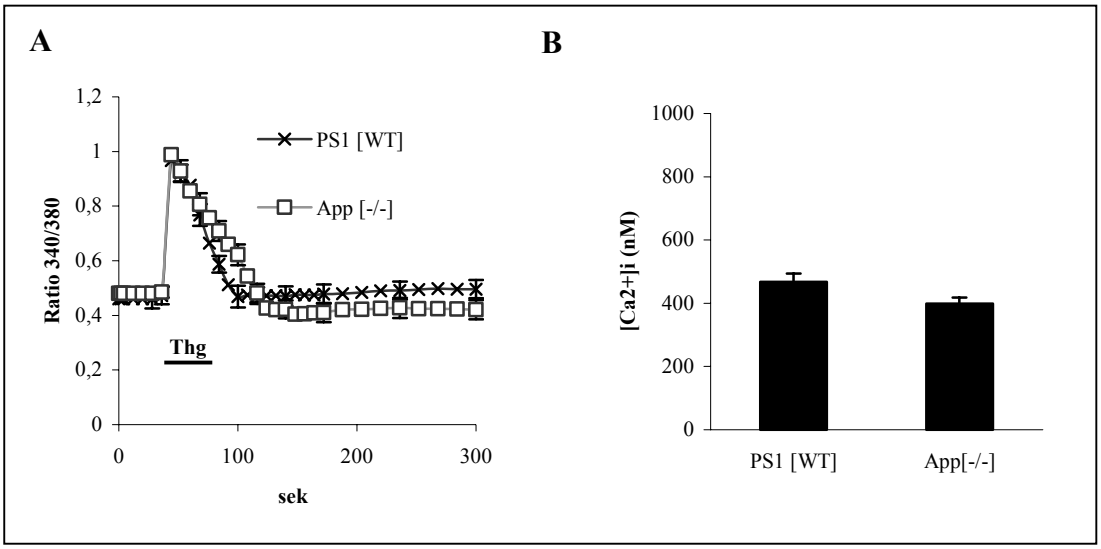


Abb. 37: *Effekt von Thg auf die $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten hippokampalen Neuronen (19-21 DIV) von App [-/-]- und Kontroll-Mäusen*

A: Die Abbildung zeigt exemplarisch die Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach der Applikation von Thg (1 µM) in kultivierten App-defizienten Neuronen (App [-/-]) und in Neuronen von nicht-transgenen Mäusen, die das Maus-PS1 [WT] tragen. Die Datenpunkte geben die Mittelwerte der gemessenen maximalen Fluoreszenzwerte ± SEM in 40 bis 50 Zellen wider.

B: Abgebildet sind die Mittelwerte der aufgenommenen Fura-2AM-Fluoreszenzmaxima, die in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Die Graphen zeigen die Mittelwerte der maximalen Amplituden ± SEM in nM der $[Ca^{2+}]_i$.

3.9.2 Untersuchung der $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen von Mäusen mit einer PS1-Mutation

In der folgenden Untersuchung sollte näher geklärt werden, ob PS1-Mutationen in Neuronen auch auf einem App-defizienten Hintergrund zu Veränderungen in der ER-Ca^{2+}-Homöostase führen. Hierfür wurden hippokampale Neurone mit der PS1-Mutation [A246E] sowie Neurone, die die PS1-Mutation [A246E] auf einem App-defizienten Hintergrund exprimieren mit dem Ca^{2+}-ATPase-Hemmer Thg behandelt. Mit der Applikation von Thg war es möglich, Rückschlüsse auf die im ER vorliegende Menge an Ca^{2+} zu machen.

Diese Untersuchungen zeigten, dass es in den Neuronen von Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] auf einem Maus-App-Hintergrund exprimieren, zu einer deutlich stärkeren Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ kam, als in den Neuronen, die diese PS1-Mutation auf einem App-defizienten Hintergrund tragen (siehe Abb. 38 A). Es

konnte festgestellt werden, dass die $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen, die die PS1-Mutation auf einem Maus-App-Hintergrund exprimieren, auf 800 nM anstieg. Im Gegensatz dazu stieg sie in den Neuronen, die diese PS1-Mutation auf einem App-defizienten Hintergrund tragen, auf durchschnittlich 500 nM. Somit konnte ein signifikant stärkerer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Neuronen beobachtet werden, die neben der PS1-Mutation das endogene Maus-App exprimieren (siehe Abb. 38 B).

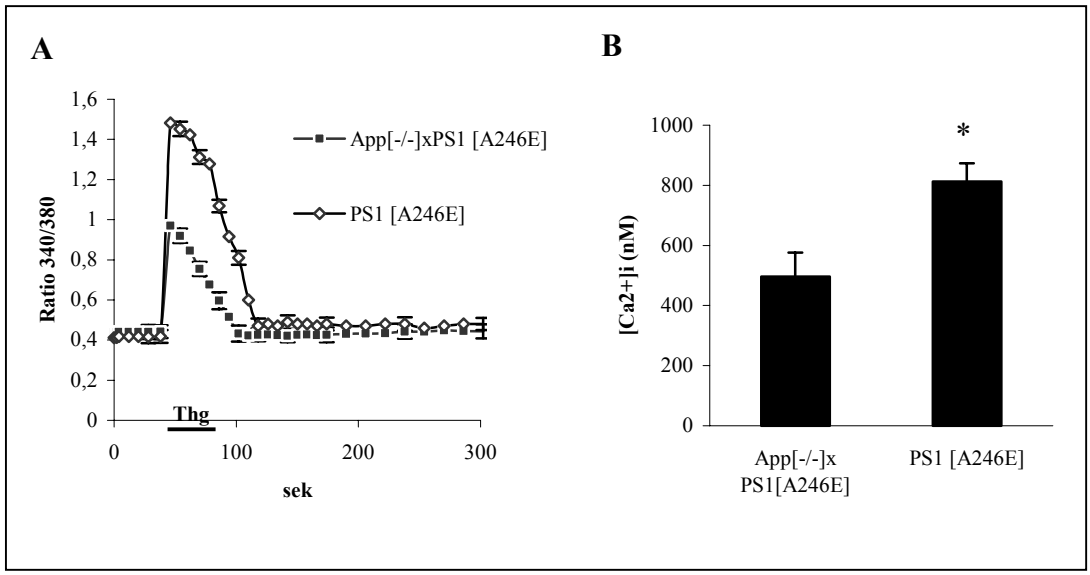


Abb. 38: *Effekt von Thg auf die $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Neuronen (19-21 DIV) von PS1 [A246E]- und App[-/-]xPS1[A246E]-Mäusen*

A: Dargestellt ist der Effekt von Thg (1 µM) auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen der Mauslinien PS1 [A246E] und App[-/-]xPS1[A246E]. Die kontinuierlich aufgenommenen Datenpunkte repräsentieren die Werte von 3 unabhängigen Experimenten ± SEM von jeweils 40 Zellen.

B: Abgebildet sind die Mittelwerte der maximalen Fura-2AM-Fluoreszenzamplituden ± SEM in nM der $[Ca^{2+}]_i$. Ermittelt wurden diese Daten durch 3 separate Versuche.

Standardabweichung = SEM, statistische Signifikanz: *p<0,05, verglichen mit App[-/-]xPS1[A246E]

Diese Ergebnisse zeigten, dass eine App–Expression notwendig ist, um die Veränderungen der Ca^{2+}-Homöostase bei transgenen Mäusen mit einer PS1-Mutation auszulösen. Somit kommt das vermehrt durch die PS1-Mutation entstandenen Spaltprodukte von App, das Aβ, als möglicher Modulator der Ca^{2+}-Homöostase in Frage (siehe Abb. 39). Neben Aβ scheinen aber vor allem C-terminale Spaltprodukte des App wie die C99-Spaltproduklte, Veränderungen in der $[Ca^{2+}]_i$, auszulösen. Besonders bei einem gleichzeitigen Vorliegen der App-London-Mutation und C-terminaler Spaltprodukte kommt es zu signifikant von Kontrollen abweichenden Ca^{2+}-

Veränderungen auf die Applikation von Thg. Die Expression der App-London-Mutation allein, führt allerdings nicht zu signifikanten Veränderungen in der ER-Ca^{2+}-Homöostase (siehe Abb. 39).

	PS1 [A246E]	App [-/-]	App[-/-] X PS1[A246E]	Appld	PS1 [-/-]	Appld X PS1[A246E]
Thg	↑	=	=	~↑	↑	↑↑
[Aβ]	↑	0	0	↑↑	↓	~↑
[C99]	=	0	0	↑	↑↑	↑↑↑

Abb. 39: *Zusammenfassung der Untersuchungen der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten und dissoziierten hippokampalen Neuronen verschiedener transgener PS1- und App-Mauslinien*

Die durch die Applikation von Thg beobachteten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ sind durch die entsprechenden Symbole dargestellt. [Aβ] und [C99] geben die jeweiligen Level von Amyloid-Plaques oder C99-Fragmenten an, die in den Hirnen der jeweiligen Mauslinien gefunden wurden (Moechars *et al*., 1999; Dewachter *et al*., 2000; Schneider *et al*., 2001).
Folgende Symbole stehen für die Veränderungen: = unverändert, 0 nicht vorhanden, ↑ erhöht, ↓ erniedrigt, mit der Zahl der Pfeile steigt der sich gezeigte Effekt, ~↑ tendenziell, aber nicht signifikant erhöht

3.10 Transfektion von hippokampalen Neuronen mit einem C99-GFP-Fusions-Protein

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war es zu klären, ob die Akkumulation von App-Spaltprodukten oder aber Mutationen in den Presenilinen zu signifikant veränderten intrazellulären Ca^{2+}-Signalen in Neuronen führen. Aus den vorangegangenen Experimenten (3.9) zeichnete sich ab, dass Spaltprodukte des App vermutlich für diese Ca^{2+}-Modulationen verantwortlich sind.
Die in PS1-defizienten Neuronen nach einer Applikation von Thg vorliegende Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ konnte allerdings nicht auf eine vermehrte Aβ-Akkumulation zurückgeführt werden. In diesen Neuronen kommt es vielmehr zu einer Akkumulation von C99-Spaltprodukten (Dewachter *et al*., 2001). Diese Spaltprodukte sind das direkte Substrat der γ-Sekretase und stellen einen Vorläufer des Aβ dar. Inwieweit diese C99-Spaltprodukte direkt für eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ verantwortlich sind,

wurde im Folgenden mit der Transfektion von Neuronen mit einem C99-GFP (*green-fluoreszenz-protein*)-Fusions-Protein untersucht.

Dieses C99-GFP-Fusions-Protein kann bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm eine Fluoreszenz emittieren (siehe Abb. 40). Aufgrund der Fluoreszenzemission konnte eine Unterscheidung zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen vorgenommen werden.

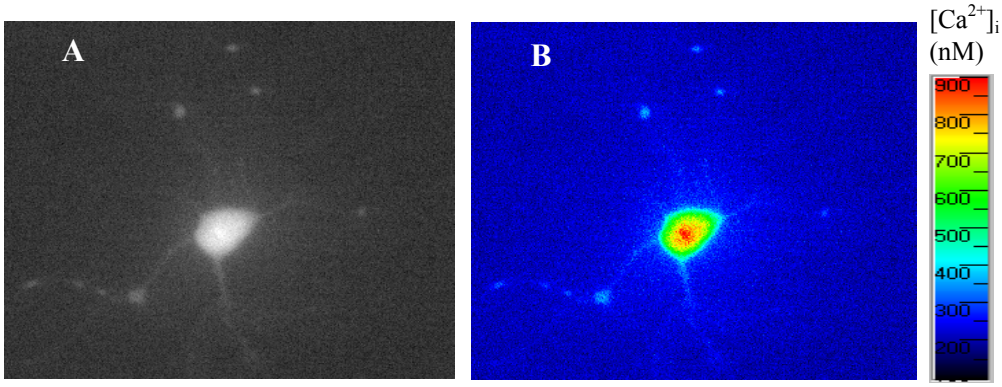


Abb. 40: *C99-GFP-transfiziertes kultiviertes hippokampales Neuron (4 DIV)*

A: Die Abbildung zeigt ein mit dem C99-GFP-Fusions-Protein transfiziertes kultiviertes hippokampales Neuron mit der GFP-Fluoreszenz-Intensität (ca. 40 Stunden nach Transfektion).

B: Die Abbildung zeigt das gleiche hippokampale Neuron mit Fura 2AM-Beladung nach Applikation von Bradykinin (1 µM). Die Fura-2AM-Fluoreszenzintensität ist in Pseudofarben dargestellt und gibt die $[Ca^{2+}]_i$ wieder.

Mit Hilfe der Effectene-Transfektions-Methode (QUIAGEN, Hilden) wurden hippokampale Neurone von FVB/N-Mäusen ein bis zwei Tage nach der Präparation mit dem C99-GFP-Fusions-Protein transfiziert. Als Kontrollen dienten nicht-transfizierte Neurone in derselben Zellkulturpräparation. 20 bis 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Neurone in physiologische Lösung (siehe Anhang A2.2) überführt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm angeregt. Nach dem Vorliegen einer GFP-Fluoreszenz in den Neuronen wurde die $[Ca^{2+}]_i$ in diesen Neuronen untersucht.

Nach einer Aufnahme der basalen $[Ca^{2+}]_i$ in einer physiologischen Lösung (siehe Anhang A2.2) erfolgte eine Applikation von BK (1 µM, 2 Minuten) auf die transfizierten und nicht-transfizierte Neurone. Somit konnte die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ als Antwort auf die Bildung von IP_3 untersucht werden.

Die Effektene-Transfektion war nur kurz nach der Präparation der Neurone erfolgreich. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten wurden bei diesem Versuch die Neurone deshalb nur 3 bis 4 Tage in Kultur gehalten. Beim Vergleich der

basalen $[Ca^{2+}]_i$ von transfizierten und nicht-transfizierten Neuronen zeigten sich bei einigen Präparationen Schwankungen in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ der transfizierten Neurone. Insgesamt konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der basalen $[Ca^{2+}]_i$ festgestellt werden (siehe Abb. 41). Die anschließende Applikation von BK führte sowohl in den transfizierten, als auch in den nicht-transfizierten Neuronen zu einer Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. Hierbei zeigten die mit dem C99-GFP-Fusion-Protein transfizierten Neurone einen signifikant höheren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als die Kontrollneurone (siehe Abb. 41). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das C99-GFP-Fusions-Protein einen Einfluss auf die durch BK ausgelöste Ca^{2+}-Veränderung in den neuronen hatte. Dabei ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass es durch eventuelle Einflusse der Transfektionsmethode zu Veränderungen im zytoplasmatischen Ca^{2+}-Haushalt gekommen ist.

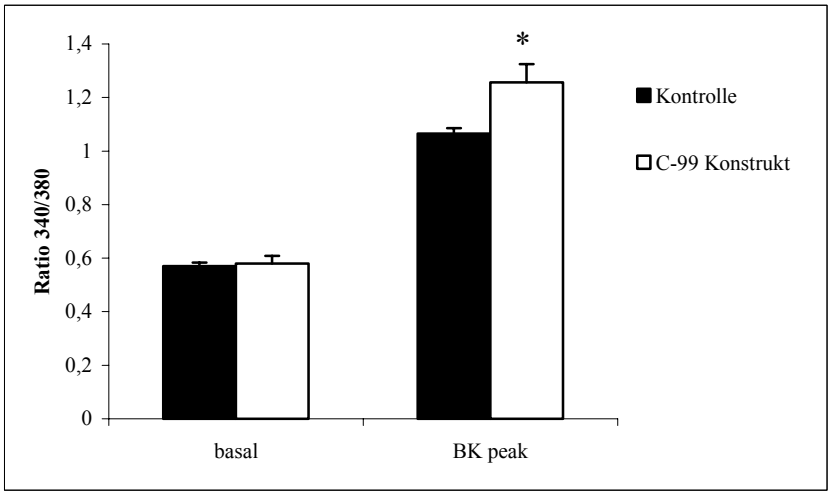


Abb. 41: *Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in C99-GFP-transfizierten hippokampalen Neuronen (3-4 DIV) nach Applikation von BK*

Abgebildet sind die Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$, die durch die Applikation des BK (1 µM, 2 Minuten) in transfizierten und nicht-transfizierten-Neuronen von FVB/N-Mäusen ausgelöst wurden. Die Transfektion der kultivierten Neurone (3 bis 4 DIV) erfolgte mit dem C99-GFP-Fusions-Protein. Die Balken geben die Mittelwerte der maximalen Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ von 10 Zellen wider. Gemessen wurden diese Daten an 2 separaten Zellkulturpräparationen.

Standardabweichung = SEM, statistische Signifikanz: *$p<0,03$

4 Diskussion

Dysregulation der zellulären Ca^{2+}-Homöostase bei der Alzheimer-Krankheit

Neurodegeneration und Zelltod wird bei der Alzheimer-Krankheit durch sehr spezifische Mechanismen ausgelöst. Dazu zählen die genetischen Risikofaktoren und die Akkumulation von neurotoxischen Amyloid-Molekülen. Die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit geben Grund zur Spekulation, dass die primären und initialen Defekte der Krankheit im sensitiven Ca^{2+}-Signaltransduktionssystem geschehen. In Neuronen von Mäusen, die eine PS1-Mutation tragen, wurden signifikante Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ gefunden. Verantwortlich für diese Veränderungen scheinen primär App-Spaltprodukte zu sein. Neben einer erhöhten Akkumulation von Ca^{2+} im ER wurden in den Neuronen dieser Tiere ein verringerter CCE festgestellt. Die Modulation des CCE scheint primär durch die Mutation im PS1 ausgelöst zu werden. Die in dieser Arbeit festgestellten intrazellulären Ca^{2+}-Dysregulationen sind allerdings weder der initiale Grund noch die einzige Ursache der Alzheimer-Krankheit.

4.1 Vitalität hippokampaler Neurone von transgenen Mäusen mit einer PS1-Mutation

Erste Untersuchungen an hippokampalen Neuronen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] zeigten nach der Inkubation in unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen eine signifikant niedrigere Überlebensrate als Neurone von Kontrolltieren (siehe 3.1). Neurone von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] scheinen folglich eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat aufzuweisen. Die Mutation im PS1, die mit einer humanen neurodegenerativen Erkrankung verbunden ist, scheint die Anfälligkeit der Neurone auf exzitotoxische Nekrose zu erhöhen.

Eine Überaktivierung von Glutamatrezeptoren in Neuronen kann Apoptose induzieren. Bei diesem Vorgang kommt es zu einem verstärkten Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle. Eine derartig erhöhte Glutamat-induzierte Ca^{2+}-Änderung in der Zelle kann zu einer Exzitotoxizität führen. Nach Studien von Greenamyre & Young (1989) spielt Exzitotoxizität eine wichtige Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung. Sie zeigten, dass Neurone, die bei der Alzheimer-Krankheit selektiv besonders betroffen sind (z.B.

hippokampale Pyramidenzellen), einen auffällig hohen Level an Glutamat-Rezeptoren exprimieren. Nach Mattson (1990) kann eine Überaktivierung von Glutamatrezeptoren in kultivierten Neuronen von adulten Ratten zu Veränderungen des Cytoskeletts führen. Diese ähneln denen der neurofibrillären *tangles* (Mattson, 1990). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von Aβ die neuronale Anfälligkeit für Exzitotoxizität erhöht (Koh *et al*., 1990).

Als Gründe für die Erhöhung der neuronalen Anfälligkeit für Exzitotoxizität bei Neuronen mit einer Mutation im PS1-Gen sind zwei Vorgänge beschrieben. Einerseits kann eine gesteigerte Bildung von neurotoxischem Aβ die Exzitotoxizität erhöhen (Scheuner *et al*., 1996). Andererseits kann hierfür aber auch eine abnehmende Produktion der neuroprotektiven sekretierten Form des App verantwortlich sein. Infolge dieser Vorgänge könnte es in den Neuronen transgener Mäuse mit einer Mutation im PS1 zu einer Veränderung in der Ca^{2+}-Homöostase kommen (Mattson, 1993). Allerdings läßt sich in den Hirnen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] keine verstärkte Akkumulation von Aβ finden.
Die schädigende Wirkung der PS1-Mutation besteht somit vermutlich mehr in der Sensitisierung von Neuronen auf allgemeine altersbedingte Veränderungen im Hirn. Zu diesen Veränderungen gehören reduzierte Energie-Verfügbarkeit und erhöhter oxidativer Stress, verbunden mit Veränderungen der zellulären Ca^{2+}-Homöostase. Diese Konditionen sind auch dafür bekannt, einen exzitotoxischen neuronalen Zelltod zu fördern (Choi, 1996).

4.2 Einfluss von Kalium und Glutamat auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen mit einer PS1-Mutation

Im Gegensatz zu den dissoziierten Neuronen von 4 Monate alten Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] zeigten die dissoziierten Neurone von 16/*aged* Monate alten Mäusen mit dieser PS1-Mutation einen signifikant größeren Kalium-induzierte Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Untersuchungen an kultivierten hippokampalen Neuronen (3.2.1 und 3.2.2). Bei den kultivierten Neuronen mit der PS1-Mutation zeigte sich eine signifikant erniedrigte Kalium-induzierte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$. Diese divergenten Beobachtungen könnten ihre Ursache in den unterschiedlichen Kultur- und Präparationsbedingungen haben, da die kultivierten

Neurone im Gegensatz zu den dissoziierten Neuronen nach einer Trypsinbehandlung, die Plasmamembranproteine beeinträchtigt, für 19-21 Tage auf einen Astrozytenrasen kultiviert wurden. Innerhalb dieser Zeitraums sind nicht nur plasmamembranständige Proteine wieder neugeneriert, sondern es kommt unter Kulturbedingungen allgemein zu einem anderen Expressionslevel an Rezeptoren (Müller *et al*., 1998).

Auch eine Beeinflussung der kultivierten hippokampalen Neurone durch den Astrozytenrasen kann nicht ausgeschlossen werden. Aktivierte Gliazellen im Astrozytenrasen könnten durch Sekretion immunmodulatorischer Substanzen die hippokampalen Neurone beeinflußt haben. Des weiteren ist auch bekannt, dass Astrozyten Kaliumionen puffern können und somit die Kalium-induzierten Ca^{2+}-Antworten der kultivierten Neurone möglicherweise beeinflusst haben (Vesce *et al*., 1999). Allerdings sind derartige Co-Kulturen wiederum näher an den physiologisch vorliegenden Konditionen, wie sie im Hirn vorliegen.

Auch das Alter der Tiere hat bei der Untersuchung eine Rolle gespielt. Kirischuk *et al.* (1992) fanden im Zytoplasma dissoziierter Neurone älterer Mäuse (30 Monate) ebenfalls eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zu Neuronen von 7 Monate alten Mäusen. Dieser altersbedingte Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} kann auf Veränderungen der Kontrollmechanismen für die Extrusion von Ca^{2+} aus dem Zytoplasma zurückgeführt werden. Als Beispiel sei eine abnehmende Effektivität von Ca^{2+}-Pumpen in der zellulären Membran genannt.

Die Applikation von Glutamat führte sowohl in den kultivierten als auch in den dissoziierten hippokampalen Neuronen, die die PS1-Mutation [A246E] tragen, zu einem signifikant stärkeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als in Neuronen von nicht-transgenen Mäusen (3.2.1 und 3.2.2).

Mattson *et al*. (1993) machten derartige Beobachtungen auch an kortikalen Neuronen, die die PS1-Mutation [M146V] exprimieren. Es ist damit möglich, dass Neurone, die eine PS1-Mutation exprimieren, eine erhöhte Sensitivität auf exzitotoxische Schädigungen zeigen. Störungen der $[Ca^{2+}]_i$ scheinen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit zu spielen. Untersuchungen an Hirngewebe von Alzheimer-Patienten geben auch Hinweise auf eine erhöhte Aktivität von Ca^{2+}-abhängigen Proteasen (Nixon *et al*., 1994). Des Weiteren konnte eine generell erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen mit neurofibrillären *tangles* festgestellt werden (Murray

et al., 1992). Ein weiterer Hinweis, dass Neurone von Alzheimer-Patienten aufgrund einer hohen $[Ca^{2+}]_i$ zugrunde gehen, ist die Beobachtung, dass sich in degradierenden Neuronen von diesen Patienten erhöhte Level der Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II nachweisen lassen. Diese Kinase ist direkt mit den *paired helical filaments* assoziiert (Xiao *et al*., 1996). Experimentelle Studien sprechen somit für eine Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen einer veränderten Ca^{2+}-Homöostase und einer neuronalen Dysfunktion, die zum Zelltod führt.

Sowohl Guo *et al*. (1999) als auch Mattson *et al*. (2000) demonstrierten, dass eine gestörte Ca^{2+}-Homöostase dem Zelltod in Neuronen, die eine PS1-Mutation exprimieren, vorausgeht. Folglich könnten intrazelluläre Ca^{2+}-Chelatoren und eine Überexpression von Ca^{2+}-bindenen Proteinen Neurone mit einer PS1-Mutation vor dem Zelltod schützen (Wolozin *et al*., 1996; Guo *et al*., 1998).
Folge einer erhöhten $[Ca^{2+}]_i$ ist die Aktivierung von Caspasen, wie z.B. der Prostate-Apoptose-response-4 (PAR-4) (siehe Abb. 42). Caspasen sind evolutionär konservierte Cystein-Proteasen, die eine zentrale Rolle in der Apoptose von vielen Zelltypen spielen (Chan & Mattson, 1999). Einige Caspasen werden in der Anfangsphase der Apoptose durch Ca^{2+} aktiviert. Ein wichtiges Beispiel ist die Aktivierung der Caspase-8 in Neuronen als Antwort auf die Ligation von „Zelltod-Rezeptoren". Dazu gehören Fas und der p75 Neurotrophin-Rezeptor (Raoul *et al*., 2000). Caspasen werden besonders in der Initiations-Phase der Apoptose aktiviert. Sie können Effektor-Caspasen wie die Caspase-3 direkt aktivieren. Aber auch eine indirekte Aktivierung ist möglich. Dies kann über mitochondriale Veränderungen geschehen, bei denen es zu einem verstärkten Ca^{2+}-Einstrom in die Mitochondrien kommt. Dadurch wiederum entsteht oxidativer Stress und die Permiabilitäts-transitions-Pore öffnet sich in der Membran der Mitochondrien. Austretendes Cytochrom c bildet Komplexe mit dem Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) und Caspasen, wie z.B. der Caspase-9 (siehe Abb. 42). Diese Caspase aktiviert die Caspase-3, wodurch die Degradationsphase der Apoptose eingeleitet wird. Hierbei werden eine Vielzahl von Caspasen und anderen Enzymsubstraten gespalten (Mattson, 2000). Diese Vorgänge führen zu charakteristischen Veränderungen der Plasmamembran, wie z.B. zur Präsentation von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche. Dieser Vorgang ist ein Signal zur Stimulierung der Zellphagozytose durch Macrophagen/Mikroglia.

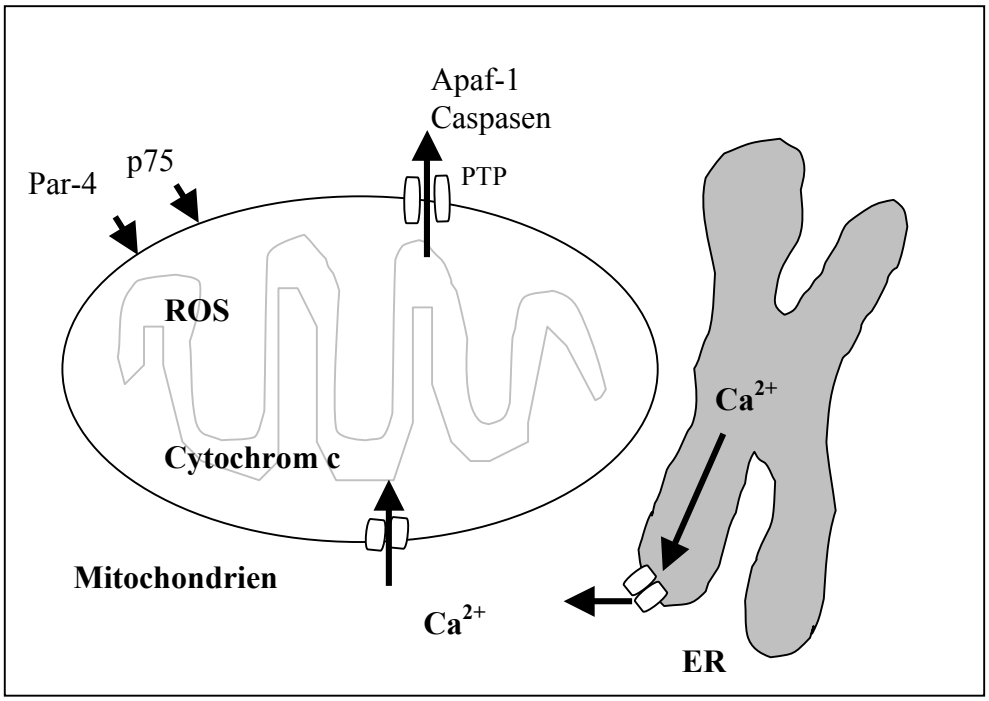


Abb. 42: *Auslösung apoptotischer Stimuli durch eine erhöhte $[Ca^{2+}]_i$*

Eine Überaktivierung von Glutamat-Rezeptoren kann zu einem erhöhten Einstrom von Ca^{2+} führen. Die verstärkte Freisetzungen von Ca^{2+} aus dem ER kann apoptotische Kaskaden aktivieren, die neben Par-4 auch p75 in ihrer Aktivität beeinflussen. Diese Faktoren können einen verstärkten Einstrom von Ca^{2+}, oxidativen Stress (ROS) und das Öffnen der Permiabilitäts-Transitions-Pore (PTP) in den Mitochondrien bewirken. Darauf bildet freigesetztes Cytochrom c Komplexe mit dem Apoptose-Protease-Aktivierenden-Faktor (Apaf-1), wodurch weitere Caspasen aktiviert werden, die den Zelltod einleiten.

4.3 Aktivierung des NMDA-Rezeptors und der metabotropen Glutamat-Rezeptor-Signalkaskade

Die Untersuchungen der $[Ca^{2+}]_i$ nach einer Aktivierung von NMDA-Rezeptoren in den hippokampalen Neuronen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] zeigte keine Auffälligkeiten (siehe 3.3.1). Von den drei Klassen der Glutamat-regulierten Kanäle, scheint primär eine Überaktivierung des NMDA-Rezeptors für eine Auslösung eines exzitotoxischen Zelltods in einer Vielzahl von Neuronentypen verantwortlich zu sein (Meldrum & Garthwaite, 1990). In den Untersuchungen unterschieden sich die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach der Aktivierung der NMDA-Rezeptoren in den Neuronen mit der PS1-Mutation nicht von der anderer Kontrollneurone (siehe 3.3.1). Der nach der Glutamat-Applikation beobachtete hohe Anstieg der

$[Ca^{2+}]_i$ scheint somit nicht durch eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors bedingt zu sein.

An Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und einer damit einhergehenden Neurodegeneration können auch direkt Ca^{2+}-permeable AMPA Rezeptor-Kanäle beteiligt sein. Dies wurde bereits für Krankheiten wie die Ischämie und die Amyotrophe Lateral Sklerose gezeigt (Weiss & Sensi, 2000). Über den Level der vorliegenden Expression von AMPA Rezeptoren in der frühen postnatalen Entwicklung gibt es allerdings divergente Befunde. Diese beschreiben einerseits, dass AMPA Rezeptoren nur zu einem sehr geringen Grad in der frühen postnatalen Entwicklung exprimiert werden (Franciosi, 2001). Andererseits zeigten Untersuchungen von König *et al*. (2001) eine Expression von funktionellen Ca^{2+}-permeablen AMPA Rezeptor-Kanälen in der frühen embryonalen Entwicklung. Eine Untersuchung sowohl der AMPA Rezeptor-Expression an kultivierten Neuronen mit der PS1-Mutation als auch eine Beteilung dieser Rezeptor-Kanäle an einem Ca^{2+}-Einstrom wäre deshalb im Zusammenhang mit dieser Arbeit noch interessant.

Im Vergleich zu den Kontrollneuronen war die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in den hippokampalen Neuronen mit der PS1-Mutation nach Applikation von BK signifikant größer (siehe 3.3.2). Dieses Experiment lies die Annahme zu, dass es bei den Neuronen der transgenen Mäuse, die die PS1-Mutation exprimieren, zu einer potenzierten Ca^{2+}-Freisetzung über den IP_3-Rezeptor aus dem ER kommen kann. Guo *et al*. (1996) konnten ähnliche Beobachtungen machen. Bei ihnen zeigten PC12 Zellen, die die PS1-Mutation [L286V] exprimieren, signifikant höhere zelluläre Ca^{2+}-Änderungen auf IP_3-Rezeptor-Agonisten wie BK und Carbachol als entsprechende Kontrollzellen.

In calcium-imaging und elektrophysiologischen Studien von Leissring *et al*. (1999) wiesen PC12-Zellen, die eine PS1-Mutation exprimieren, eine verstärkte Füllung von ER-Ca^{2+}-Speichern auf. Dies führt zu einer verstärkten Ca^{2+}-Antwort auf eine Vielzahl von Stimuli, die eine Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER fördern.

Die Mäuse mit der PS1-Mutation [A246E] zeigten trotz der in hippokampalen Neuronen festgestellten signifikant veränderten Ca^{2+}-Freisetzung auf IP_3-Rezeptor-Agonisten keinen Phänotyp. Eine Erklärung hierfür wäre, dass diese Ca^{2+}-Veränderungen vielleicht erst über einen längeren Zeitraum zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+}-Konzentration führen. So werden Veränderungen der basa-

len $[Ca^{2+}]_i$ in Fibroblasten von Patienten mit einer PS1-Mutation auch erst nach Ausbruch der Krankheit festgestellt.

4.4 Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER mit Thapsigargin (Thg) in hippokampalen Neuronen mit einer PS1-Mutation

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass die Behandlung kultivierter Hippokampusneurone von Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] exprimieren, mit dem ER-Ca^{2+}-ATPase-Hemmer Thg zu einer signifikant größeren Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führte als in den Neuronen der Kontrolltiere. Ähnliche Befunde mit Thg machten Mattson *et al*. (1998) an PC12-Zellen, die unterschiedliche PS1-Mutationen exprimierten.

Aus den experimentellen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Presenilline eine Rolle in der neuronalen ER-Ca^{2+}-Signaltransduktion spielen. Aufgrund ihrer Lokalisation in der Membran des ER wäre es denkbar, dass eine direkte funktionelle Interaktion zwischen den Presenilinen und Ca^{2+}-Transport regulierenden ER-Membranproteinen wie z.B. dem IP_3-Rezeptor oder der ER-Ca^{2+}-ATPase vorliegt. Allerdings könnten die Presenilline auch selbst als eine Art ER-Ca^{2+}-ATPase einen Transport von Ca^{2+} in das ER regulieren, der durch die Mutation eine Veränderung erfährt.

Leissring *et al*. (2002) gehen davon aus, dass für die intrazellulären Veränderungen der ER-Ca^{2+}-Homöostase in Fibroblasten von Mäusen mit einer PS1-Mutation intrazelluläre Fragmente von App sogenannte App intracellular domains (AICD) verantwortlich sind. Sowohl das Ausschalten des PS1-Gens bzw. die pharmakologische Inhibition der γ-Sekreatse-Aktivität als auch das Ausschalten des App-Gens führten zu einer Verringerung von Phosphoinositid-vermittelten Ca^{2+}-Signale. Derartige Beobachtungen konnten allerdings bisher nur in Fibroblasten gemacht werden.

Die in den neuronalen Zellen von Mäusen mit einer PS1-Mutation durch Thg induzierten erhöhten intrazellulären Ca^{2+}-Änderungen, könnten auf eine erhöhte Akkumulation von Ca^{2+} im ER hinweisen. Derartige Erhöhungen der ER-$[Ca^{2+}]_i$ könnten über einen längeren Zeitraum durch eine Vielzahl von Mechanismen oxidativen Stress induzieren. Eine vermehrte Bildung von oxidativem Stress kann über verschiedene Mechanismen zur Neurodegeneration führen. Dazu gehört die Aktivierung

der Stickstoff-Oxid-Synthase. Diese generiert Stickstoffmonoxid, das wiederum mit Superoxid-Anion-Radikalen interagiert (siehe Abb. 43). Durch diese Interaktion kommt es zur Bildung von Peroxynitrit und zu Schädigungen von Mitochondrien-Funktionen. In den Mitochondrien kommt es wiederum zu einer erhöhten Superoxid-produktion.

Unter diesen Bedingungen geschieht auch die Aktivierung von enzymatischen Oxygenasen. Eine gestörte Ca^{2+}-Homöostase und oxidativer Stress können eventuell synergistisch oder auch additiv mit mitochondrialen DNA-Schäden und einem beeinträchtigten Energie-Metabolismus zusammenwirken. Dadurch wird der Untergang von Neuronen induziert (Mattson *et al*., 1997).

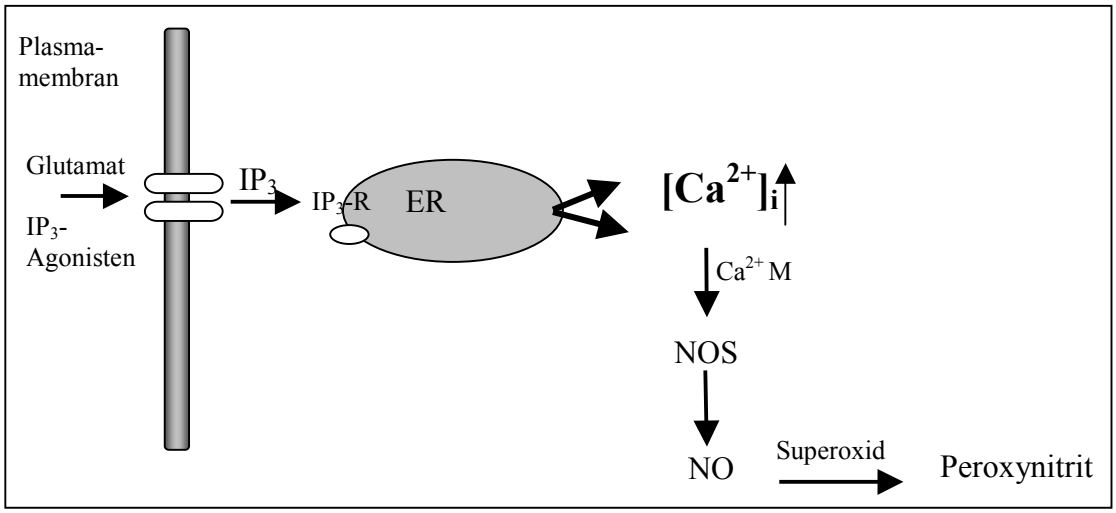


Abb. 43: *Mechanismen, die zu oxidativem Stress in Neuronen mit einer PS1-Mutation führen können*
Verstärkte Freisetzungen von Ca^{2+}, ausgelöst durch Glutamat oder andere IP_3-Agonisten, fördern die Entstehung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies. Ca^{2+} bindet dabei Calmodulin und aktiviert dadurch die Stickstoffoxid-Synthase (NOS). In der Folge bildet sich Stickstoffmonoxid ($NO^{\bullet}$). Dieses interagiert mit $O_2^{\bullet-}$, wodurch es zur Produktion von Peroxynitrit kommt. Peroxynitrit in der Lage Proteine zu zerstören.

4.5 Veränderung des CCE in kultivierten Neuronen mit einer PS1-Mutation

Untersuchungen des kapazitativen Ca^{2+}-Einstroms (CCE) an kultivierten Neuronen mit der PS1-Mutation [A246E] zeigten, dass in diesen Neuronen im Vergleich zu Kontrollneuronen eine statistisch signifikante Reduktion des CCEs vorliegt (siehe 3.5.1). Eine ähnliche Reduktion des CCE zeigten die hippokampalen Neurone von

doppeltransgenen Mäusen die die PS1-Mutation auf einem App-defizienten Hintergrund exprimieren.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass in den Neuronen von transgenen Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] ein reduzierter neuronaler CCE ermittelt wurde, der unabhängig von einer Expression des Maus-App war.

Yoo *et al.* (2000) konnte an kortikalen Neuronen von PS1 [-/-]-Mäusen eine signifikante Erhöhung des CCE nachweisen. Daneben bewies diese Arbeitsgruppe durch das Einfügen einer biologisch-inaktiven PS1-Mutation [D257A] in SY5Y-Zellinien, dass biologisch aktives PS1 für eine Modulation des CCE Voraussetzung ist. Diese Ergebnisse würden zusammen mit den hier vorliegenden Daten für eine *gain-of-function*-Theorie von mutiertem PS1 für die Regulierung des CCE sprechen. Es bleibt weiterhin zu untersuchen, inwieweit der reduzierte CCE, der bei PS1-Maus-Mutanten zu beobachten ist, ein stromaufwärts- oder stromabwärtsgerichtetes Ereignis von Ca^{2+}-Veränderungen im ER ist.

Yoo *et al*. (2000) gehen davon aus, dass der reduzierte CCE in Neuronen von Mäusen mit einer PS1-Mutation ein stromaufwärtsgerichtetes Ereignis der ER-Ca^{2+}-veränderungen in diesen Neuronen ist. Diese Hypothese basiert auf Untersuchungen an CHO Zellen, die stabil humanes App überexprimieren und auf die Blockierung von CCE-Kanälen mit SKF96365 eine erhöhte Akkumulation von Aβ42 zeigten. Das vermehrt durch die Blockierung der CCE-Kanäle akkumulierte Aβ42 kommt als Kandidat für die Auslösung von Ca^{2+}-Veränderungen in Zellen in Frage (Yoo *et al*., 2000).

Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit können keinen genauen Rückschluss darauf geben, ob der reduzierte CCE in Neuronen von Mäusen mit einer PS1-Mutation ein stromaufwärts- oder ein stromabwärtsgerichtetes Ereignis der ER-Ca^{2+}-Veränderungen in diesen Neuronen ist.

Die nach einer Applikation von Thg ermittelten Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ machten allerdings deutlich, dass die Neurone der FVB/N-Mäuse nach einer Behandlung mit SKF96365 einen signifikant größeren Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ aufwiesen, als die Neurone der App [-/-]-Mäuse. Ohne eine vorherige Behandlung mit SKF96365 zeigten sich zwischen den Neuronen dieser beiden Mauslinien hingegen nach der Applikation von Thg keine Unterschiede in den ermittelten intrazellulären Ca^{2+}-Änderungen (siehe 3.6). Diese Untersuchungen deuten daraufhin, dass es ausschließlich zu Verände-

rungen der durch Thg induzierten Ca^{2+}-Antwort nach einer Behandlung der Neurone mit SKF96365 bei einer vorliegenden App-Expression kam.
Diese veränderte Ca^{2+}-Antwort könnte durch vermehrt gebildetes Aβ42 induziert worden sein. Allerdings konnte der Level an Aβ42 in den neuronalen Kulturen nicht bestimmt werden.

Eine mögliche Funktion für die Presenilinе in der Modulation des CCE kann in der Regulierung oder einer direkt vermittelten Spaltung von Proteinen liegen, die den CCE vermitteln. Bei diesen Proteinen könnte es sich um die TRP-Proteine handeln.
Ein weiterer Punkt, der eine mögliche Interaktion zwischen PS1 und TRP-Proteinen plausibel macht, ist die Beobachtung, dass PS1 proteolytische Prozesse von App und Notch an oder in der Nähe der Plasmamembran zu regulieren scheint. Damit können Regulationsprozesse, die sich an der Plasmamembran abspielen, durchaus von Presenilinen gesteuert werden.
Aufgrund des verminderten CCE in hippokampalen Neuronen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] wurde die Expression des TRP4-Proteins in Hirnen von Kontrollmäusen und Mäusen mit einer PS1-Mutation untersucht. Die Immunoblot-Analyse des TRP4-Proteins zeigte allerdings keine Unterschiede im Expressionslevel in den Hirnen von Kontrollmäusen im Vergleich zu den Hirnen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E].
Für den Signalmechanismus der zur Aktivierung des CCE führt, werden eine Vielzahl von Faktoren angenommen: (i) langsam-aktivierende Pertussis-Toxin-sensitive G-Proteine (Berven *et al*., 1994); (ii) kleine GTP-bindende Proteine mit geringem Molekulargewicht (Bird & Putney *et al*., 1993); (iii) cGMP (Bahnson *et al*., 1993); (iv) IP_3 (Dong *et al*., 1995); (v) Tyrosinphosphorylierung (Dong *et al*., 1995); (vi) Aktivierung von zellulären Phosphatasen (Dong *et al*., 1995); (vii) Arachidonsäure (Shuttleworth, 1996); (viii) Bildung diffusibler Messenger von unbekannter Identität (Dong *et al*., 1995). Bisherige Daten sprechen dafür, dass mehr als ein Mechanismus für die Regulation der CCE-Kanäle verantwortlich ist (Birnbaumer *et al*., 1996).
Auch wird angenommen, dass ein einziger CCE-Kanal unter der Kontrolle von zwei Aktivierungsmechanismen steht (Birnbaumer *et al*., 1996). Ein einziger veränderter Aktivierungsmechanismus des CCE in den Neuronen von transgenen Mäusen mit einer PS1-Mutation könnte zu einem verminderten Ca^{2+}-Einstrom durch diese

Kanäle führen. Diese Veränderung wäre aber auf dem Proteinlevel nicht nachweisbar. Ausschließlich pharmakologische Analysen der einzelnen Aktivierungswege des CCE in Neuronen von Mäusen mit einer PS1-Mutation könnten Aufschluss über einen veränderten Mechanismus erbringen. Eine andere Nachweismethode, die eventuell Aufschluss über einen modulierten Mechanismus in der CCE-Steuerung bringen könnte, wäre die Untersuchung der TRP4-Pyrosinphosphorylierung.

4.6 Zum Einfluss C-terminaler App-Spaltprodukte auf Ca^{2+}-Homöostase

Die Bildung von Aβ ist in den Neuronen von PS1 [-/-]-Mäusen deutlich reduziert. Gleichzeitig kommt es in diesen Neuronen zu einer starken Akkumulation von C-terminalen App-Spaltprodukten den C99-Fragmenten (De Strooper *et al*., 1998; Dewachter *et al*., 2001) (siehe Abb. 43). De Strooper *et al*. (1998) zogen daraus die Schlüsse, dass die Preseniline entweder selbst die γ-Sekretase sind oder aber einen wichtigen Co-Faktor dieser Sekretase darstellen. Die Untersuchung von Neuronen-spezifischen PS1-defizienten Mäusen (Dewachter *et al*., 2001) und doppeltransgenen Mäusen mit der App [V717I]-Mutation auf einem PS1-defizienten Hintergrund zeigte, dass es in den Neuronen dieser Tiere nach der Applikation von Thg zu signifikanten Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+}-Homöostase kam. Aus diesen Beobachtungen ließ sich vermuten, dass eine größere Menge an Ca^{2+} im ER in den Neuronen dieser transgenen Mäuse vorliegt (siehe 3.8.1). Neurone von Mäusen, die ausschließlich die London-Mutation App [V171I] trugen, zeigten im Vergleich zu den Neuronen nicht-transgener Mäuse auf die Applikation von Thg zwar eine tendenziell, aber nicht signifikant größere Änderung der $[Ca^{2+}]_i$.

Eine humane App-Mutation im Genom von Mäusen scheint somit in den Neuronen dieser Tiere nicht zu signifikanten zellulären Veränderungen in der ER-Ca^{2+}-Homöostase zu führen.

Das Ausschalten des PS1-Gens kann hingegen in hippokampalen Neuronen zu einer durch Thg induzierten signifikant erhöhten Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ führen. Diese Ca^{2+}-Veränderung kann durch die gleichzeitige Expression der App [V717I]-Mutation noch verstärkt werden. In diesem Fall kommt es dann zu einer ähnlich verstärkten durch Thg induzierten Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ wie dies bei Neuronen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] beobachtet wurde (siehe 3.8.1). Aus diesen Versuchen können sich folgende Schlüsse ziehen lassen:

Das PS1 scheint eine wichtige Funktion in der Regulation der ER-Ca^{2+}-Homöostase zu spielen. PS1-Mutationen sowie das Ausschalten des PS1-Gens könnten zu einem *loss-of-function* des PS1-Proteins in der ER-Ca^{2+}-Regulation führen.

Untersuchungen an dissoziierten hippokampalen Neuronen, die das humane App auf einem Wildtyp- oder PS1-defizienten Hintergrund exprimieren weisen allerdings auf die entscheidende Rolle der C-terminalen Fragmente von App hin (Moechars *et al*., 1999).. Wie von Dewachter *et al*. (2001) gezeigt werden konnte, inhibiert eine PS1-Defizienz äußerst effizient die γ-Sekretase-Prozessierung von App. Dies wird durch eine 4fache Abnahme der β-Amyloidprotein-Level und einen starken Anstieg der C99-Fragmente deutlich (siehe Abb. 44).

Da Thg signifikant die $[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen ändert, die mutiertes App auf einem PS1-defizienten Hintergrund expremieren, ist dies ein Hinweis für den Einfluss von C99-Fragmenten auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase. Eventuell könnte die Veränderung in der ER-Ca^{2+}-Dynamik wesentlich durch diese C99-Fragmente vermittelt werden.

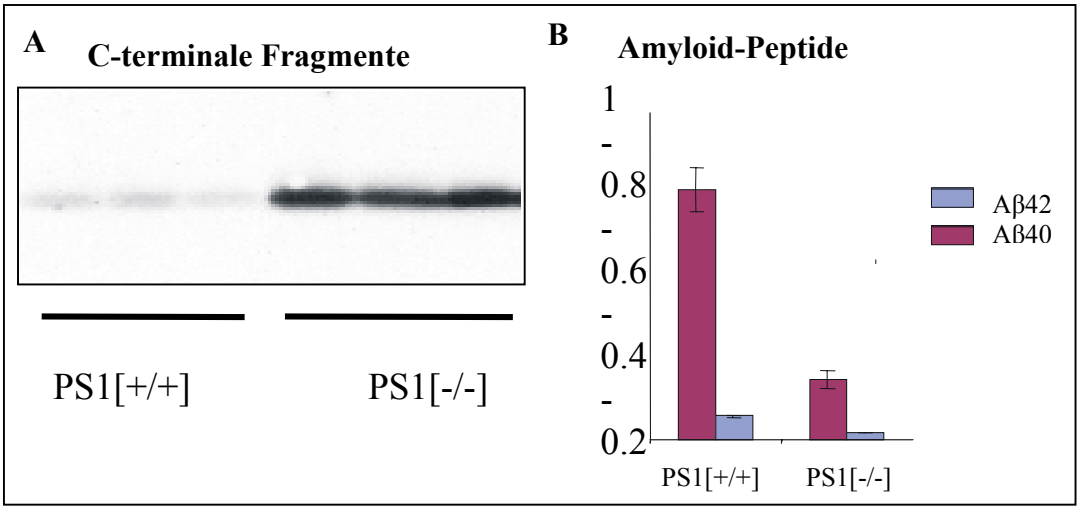


Abb. 44: *Akkumulation von C-terminalen Fragmenten (C99) und von Aβ40/42 in Hirnen von PS1 [-/-]-Mäusen*.

A: Gezeigt ist die Detektion von C-terminalen Fragmenten in den Hirnen von PS1 [-/-]- und PS1 [+/+]-Mäusen im Western-Blot. Hierbei zeigt sich in den Hirnen von PS1 [-/-]-Mäusen ein eindeutig stärkerer Nachweis C-terminaler Fragmente.

B: Dargestellt ist das ermittelte Aβ40/42-Verhältnis in den Hirnen von PS1 [-/-]- und PS1 [+/+]-Mäusen. In den Hirnen der PS1-defizienten Mäusen wird eine wesentlich geringere Menge von Aβ40 als auch Aβ42 gebildet (siehe Dewachter *et al*., 2001)

Im Gegensatz zu den untersuchten dissoziierten hippokampalen Neuronen, zeigen Hirnschnittpräparationen eine bessere physiologische Beschaffenheit. Einerseits liegt dies an dem noch bestehenden Verbund zwischen den einzelnen Zellen. Andererseits mussten die Gewebeschnitte nicht einer Trypsinbehandlung ausgesetzt werden, die häufig zur Schädigung von plasmamembranständigen Proteinen führt. Außerdem weisen dissoziierte Neurone adulter Mäuse generell leicht erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ auf. In CA1 Neuronen zeigte die Untersuchung der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ nach einer Applikation von Thg, dass ein Ausschalten des PS1-Gens signifikant die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ auf Thg beeinflusst. Die in den CA1 Neuronen der PS1 [-/-]-Mäuse erhöhte zelluläre Ca^{2+}-Antwort auf Thg wurde weiter durch das zusätzliche Einfügen des mutierten humanen App-Transgens [V717I] in das Genom der Mäuse verstärkt. Derartige Befunde konnten auch an den dissoziierten Neuronen dieser transgenen Mäuse gemacht werden.

Die erhobenen Daten lassen damit den Schluss zu, dass PS1 die ER-Ca^{2+}-Ionen-Dynamik vermutlich nur indirekt und zwar über die Spaltung von App vermittelt. Die Daten der PS1 [-/-]-Mäuse demonstrieren einen möglichen Einfluss von App-C99-Spaltprodukten auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase. Mit dieser Annahme würde ein indirekter Einfluss von PS1 auf die zelluläre Ca^{2+}-Homöostase vorliegen. Nach dieser Hypothese kann ein verändertes Prozessieren von App, ausgelöst durch ein mutiertes oder ausgeschaltetes PS1, eine gesteigerte Produktion von Aβ42 bzw. C99-Fragmenten bewirken. Über die Akkumulation eines dieser beiden Spaltprodukte können die Änderungen im Ca^{2+}-Haushalt ausgelöst werden. Damit ist das PS1 nur sekundär an diesem Prozess beteiligt (siehe Abb. 45)

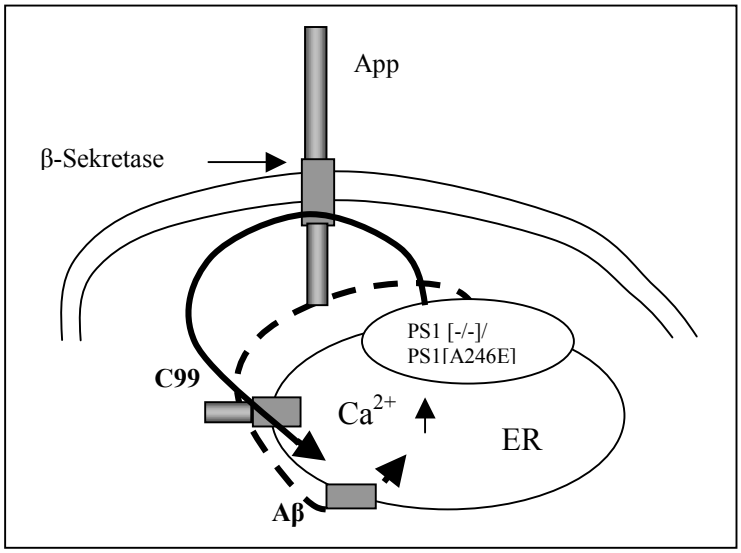


Abb. 45: *Einfluss von App-Spaltprodukten auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase*

Eine veränderte γ-Sekretase Spaltung des App kann sowohl durch das Ausschalten des PS1-Gens als auch durch eine Mutation im PS1 hervorgerufen werden. Die dabei entstehenden Spaltprodukte des App-Aβ und die C99-Fragmente haben einen Einfluss auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase.

Mattson *et al*. (1997) konnten für Aβ eine Assoziation mit Plasmamembranen feststellen. An Membranen scheint Aβ oxidativen Stress, der sich in Form von Membranlipid-Oxidation äußert, zu induzieren. Lipid-Oxidation beeinträchtigt wiederum die Funktion von Membran-Transportern wie Ionen-getriebenen ATPasen (Na^+/K^+-ATPasen und Ca^{2+}-ATPasen). Aber auch Glukose-Transporter und Glutamat-Transporter werden durch diesen Prozess beeinträchtigt (Blanc *et al*., 1998, siehe Abb. 46).

Die langzeitigen Effekte von Aβ werden durch ein Aldehyd-Produkt der Lipid-Peroxidation ausgelöst. Dieses Aldeyhyd (4-Hydroxy-2,3-neoenal) modifiziert Transporter-Proteine und beeinträchtigt deren Funktion.

Diese Effekte von Aβ an der Plasmamembran fördern eine Membrandepolarisation, einen Energie-(ATP)-Entzug und eine Überaktivierung von Glutamat-Rezeptoren. Aufgrund dieser schädigenden Einflüsse reagieren Neurone empfindlicher auf Exzitotoxizität.

Eine durch Mutationen im PS1 gleichzeitig verringerte Produktion von sApp könnte zusätzlich zu einer Störung der zellulären Ca^{2+}-Homöostase beitragen. sApp scheint Signalwege zu aktivieren, die zu einer Hyperphosphorylierung der

Plasmamembran führen. Dies könnte über die Aktivierung von cGMP und der cGMP-abhängigen Proteinkinase geschehen (Mattson *et al*., 1997, siehe Abb. 46).
Zusätzlich zu der Funktion von Aβ und sApp auf die neuronale Ca^{2+}-Homöostase, scheinen diese beiden App-Spaltprodukte auch die Genexpression beeinflussen. Inwieweit dies auch für das C99 zutrifft ist noch ungeklärt. Aβ kann eine Aktivierung der Expression von proapoptotischen Genen induzieren. Dazu gehören Mitglieder der Familie des proapoptotischen Bcl-2 sowie Gene, die für das Tumor-Supressor Protein p53 kodieren (Pike *et al*., 1999; Culmsee *et al*., 2001). Im Gegensatz dazu kann sApp die Aktivierung des Überlebens-fördernden-Transkriptionsfaktors NF-κB induzieren (Barger *et al*., 1996, siehe Abb. 46).

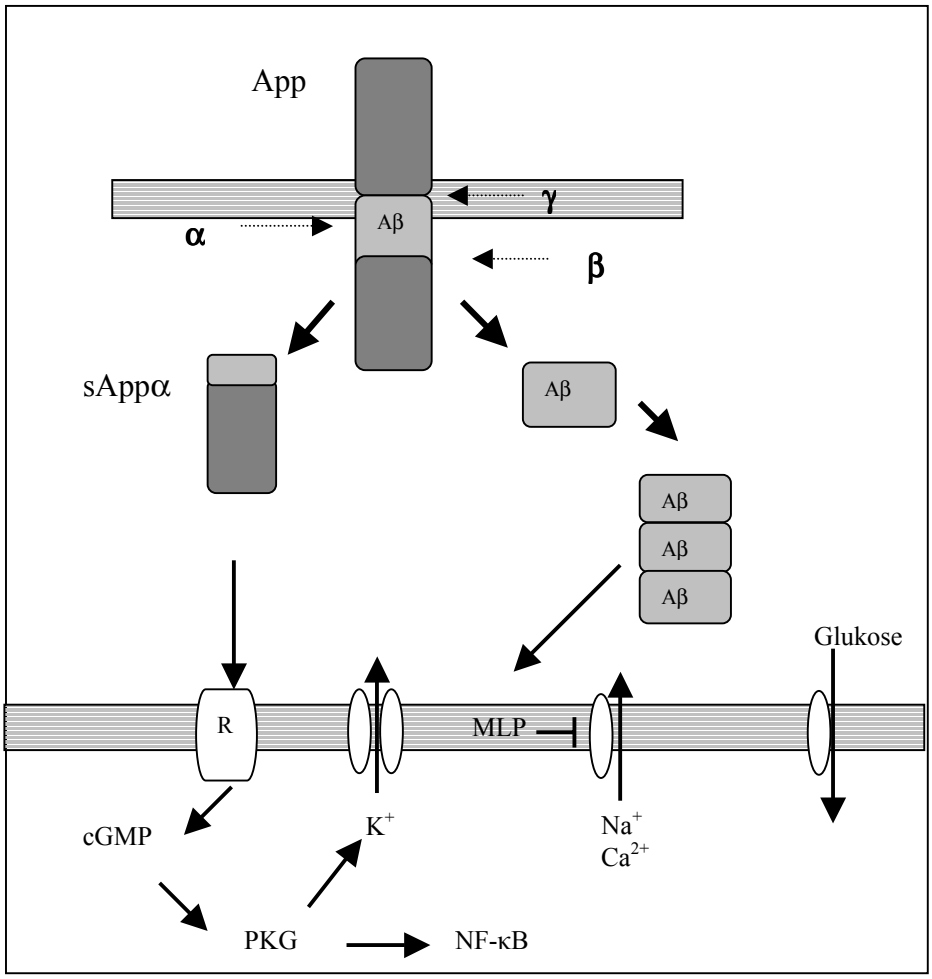


Abb. 46: *App-Spaltprodukte aktivieren unterschiedliche Mechanismen in der Zelle*
App kann auf zwei Wegen proteolytisch prozessiert werden. Eine Spaltung des App innerhalb der Aβ-Sequenz durch die α-Sekretase (α) führt zur Freisetzung einer sekretierten Form des App (sAppα) von der Zelloberfläche. Sekretiertes Appα aktiviert einem möglichen Rezeptor (R), der mit der Bildung von cyclischem-GMP und der Aktivíerung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) verbunden ist. PKG kann das Öffnen von K^+-Kanälen und damit eine Membranhyperpolarisation fördern. Des Weiteren kann PKG auch den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren. Eine App-Prozessierung durch die β-Sekreatse (β) und die γ-Sekreatse (γ) führt zur Bildung von Aβ, dass unter besonderen Bedingungen (hohe Konzentration, oxidierende Umgebung) zur Selbstaggregation neigt. Unter diesen Bedingungen induziert Aβ Membranlipidperoxidation (MLP), die zur Beeinträchtigung der Funktion von membranständigen Ionen-getriebenen ATPasen/Na^+ und Ca^{2+}-Pumpen und Glukosetransportern führt (Mattson *et al*., 1997).

Die Aktivierung von NF-κB in Neuronen kann zur Stabilisierung der Ca^{2+}-Homöostase führen. Dies geschieht durch die Modulation der Expression von Genen, die für das Ca^{2+}-bindende Proteine Calbindin, Glutamat-Rezeptoruntereinheiten und anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder kodieren (Mattson & Camandola 2001).

Bcl-2 hat zwei wesentliche intrazelluläre Lokalisationen in den Mitochondrien und im ER. Die Funktion des Bcl-2 im ER ist bisher noch nicht vollständig erfasst. Dennoch gibt es viele Argumente, die dafür sprechen, dass Bcl-2 die ER-Ionen-Homöostase beeinflussen kann: (i) Bcl-2 kann als Ionen-Kanal in artifiziellen Bilayern fungieren (Schendel *et al*., 1997). (ii) Veränderungen der ER-Ca^{2+}-Homöostase wurden durch Bcl-2 in unterschiedlichsten Studien gezeigt. Foyouzi-Youssefi *et al*. (2000) zufolge kann Bcl-2 die freie Ca^{2+}-Konzentration innerhalb des ER-Lumen reduzieren. Analysen der Kinetik von Ca^{2+}-Speicher-Depletionen nach Applikation von Thg scheinen deutlich zu machen, dass Bcl-2 die $[Ca^{2+}]_i$ innerhalb des ER-Lumen durch eine Erhöhung der Ca^{2+}-Permeabilität an der ER-Membran erniedrigt. Folglich wäre die Funktion des Bcl-2 in der Membran des ER ähnlich der eines Ionenkanals.

4.7 Einfluss der App-Expression auf Ca^{2+}-Modulationen durch PS1-Mutationen

Untersuchungen mit Thg an Neuronen von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] und an doppeltransgenen Mäusen, die die PS1-Mutation [A246E] auf einem App-defizienten Hintergrund exprimieren, zeigten deutlich den Einfluß von App und dessen Spaltprodukten auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase.

Untersuchungen durch Leissring *et al*. (1999) zeigten hingegen, dass PS1-Mutationen auch in Zelltypen, die kein App exprimieren, zu einer erhöhten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führen. Leissring *et al*. nehmen deshalb an, dass Mutationen im PS1-Gen zu einer erhöhten intrazelluläre Ca^{2+}-Freisetzung führen. Die gestörte Ca^{2+}-Homöostase induziert ein verändertes Prozessieren von App, was zur Akkumulation von Aβ führt. Damit wäre die veränderte intrazelluläre Ca^{2+}-Homöostase der Auslöser für die Akkumulation von Aβ (Mattson, 2000).

Aus den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen wird allerdings deutlich, dass es ausschließlich nur bei einer Expression von endogenen App zu Ca^{2+}-Veränderungen durch mutiertes PS1 kommt. Offenkundig scheint also endogenes Maus-App selbst und/oder seine proteolytischen Spaltprodukte eine wichtige Rolle bei dem Effekt von humanen PS1-Mutationen auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase zu spielen. Damit scheinen

PS1-Mutationen vermutlich über eine veränderte App-Prozessierung ER-Ca^{2+}-Signale zu beeinflussen.

Um zu überprüfen, inwieweit C99-Fragmente einen direkten Einfluss auf die ER-Ca^{2+}-Homöostase haben, wurden Transfektionen von hippokamaplen Neuronen nicht-transgener Mäuse mit einem C99-GFP-Fusions-Protein durchgeführt.

Auf die Applikation des IP_3-Rezeptor-Agonisten BK zeigte sich in den hippokampalen Neuronen, die mit dem C99-GFP-Fusions-Protein transfiziert waren, im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen ein signifikant größerer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$.

Diese stärkere zelluläre Ca^{2+}-Antwort der transfizierten Zellen auf BK gibt Hinweise darauf, dass die Transfektion mit dem C99-GFP-Fusions-Protein eine potenzierte Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER in diesen Neuronen hervor gerufen hat. Diese Befunde unterstützen die Ca^{2+}-Untersuchungen an dissoziierten Neuronen von PS1-[-/-]-Mäusen, in denen vermutlich auch die C-terminalen Spaltprodukte des App zu Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+}-Homöostase führten.

Auch Kim *et al*. (2000) konnten beobachten, dass C-terminale App-Spaltprodukte mit einer Länge von 105 Aminosäuren einen Einfluss auf die Ca^{2+}-Homöostase von PC12 Zellen haben. Durch welchen Mechanismus C-terminale Fragmente die Ca^{2+}-Homöostase beeinflussen ist noch unbekannt. Es wäre aber möglich zu spekulieren, dass C-terminale App-Fragmente in der Lage sind, Kanäle in Membranen auszubilden oder Membranen zu permeabilisieren. Dafür sprechen Untersuchungen von Fraser *et al*. (1996), die zeigen konnten, dass ein C-terminales App-Fragment mit einer Länge von 105 Aminosäuren einen starken nichtselektiven Einwärtsstrom in *Xenopus* Oozyten induzieren kann.

4.8 Klinische Aspekte und Ausblick

Neurodegeneration und Zelltod wird im Rahmen der Alzheimer-Krankheit durch sehr spezifische Mechanismen ausgelöst. Dazu zählen die genetischen Risikofaktoren, die Akkumulation von neurotoxischen Amyloid-Molekülen und vermutlich auch deren C-terminale Vorläufer (siehe Abb. 47).

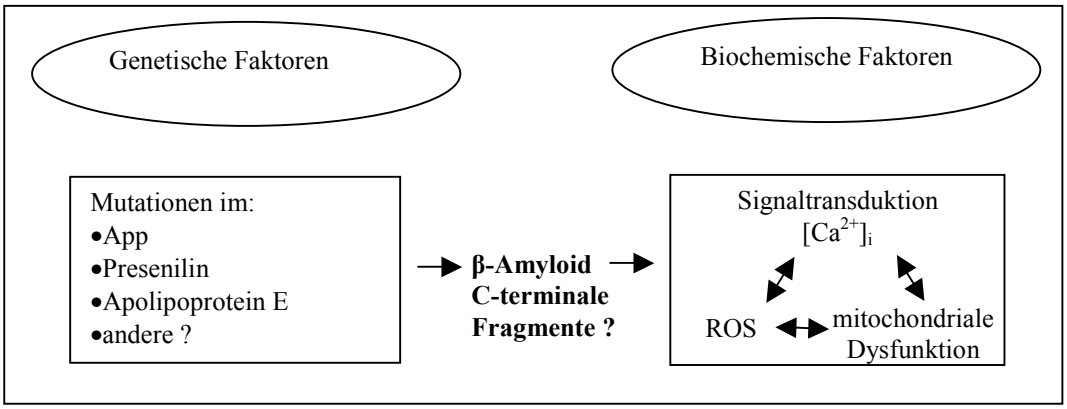


Abb. 47: *Beeinflussung der β-Amyloid-Konzentration*
Schematische Darstellung, wie verschiedene biochemische Reaktionskaskaden die Bildung von App-Spaltprodukten anstoßen. Diese können zum nekrotischen bzw. apoptotischen Absterben von Nervenzellen führen.

Die Alzheimer-Krankheit ist eine Funktionsstörung der Kognition. Eine Vielzahl von zellulären Defekten scheinen in den Krankheitsprozess involviert zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit angestellten Untersuchungen geben Grund zur Spekulation, dass die primären und initialen Defekte der Krankheit im sensitiven Ca^{2+}-Signaltransduktionssystem geschehen oder Faktoren betreffen, die für diese relevant sind. Von den möglichen Signalsystemen (Ca^{2+}, cAMP, cGMP, NO), die in die Kognition involviert zu sein scheinen, sind Ca^{2+}-regulierte Signalwege von äußerster Wichtigkeit. Sie üben einen zentralen Faktor in der Gehirnfunktion aus.
Ein Anstieg der basalen $[Ca^{2+}]_i$ scheint vermutlich aber erst im fortgeschrittenen Stadium der Alzheimer-Krankheit vorzuliegen.
Es gibt zur Zeit keine Heilungsmöglichkeiten für Patienten, die an der Alzheimer-Krankheit leiden, jedoch ermöglicht ein frühzeitiges Erkennen der Krankheit, den Patienten gut zu betreuen.
Medikamentöse Behandlungen wie z. B. mit dem Ca^{2+}-Antagonist Nimodipin können tatsächlich auch eine Verbesserung der Verfassung von Alzheimer-Patienten im fortgeschrittenen Krankheitstadium bewirken (Müller *et al*., 1995). Eine derartige Therapie mit Ca^{2+}-Antagonisten ist allerdings nur in einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit sinnvoll. Es ist deshalb notwendig unterschiedliche Behandlungsstrategien zu entwickeln, die den Verlauf der Krankheit beeinflussen können, aber auch der Behandlung fortgeschrittener Stadien dienen.

5 Zusammenfassung

Mutationen im Presenilin 1 (PS1) führen zur autosomal-dominant vererbten Alzheimer-Krankheit. Diese Mutationen erhöhen im Hirn der Patienten die Amyloid-Peptid-Produktion und führen in neuronalen Zellen von Mäusen, die eine PS1-Mutation tragen, zu einer verstärkten Ca^{2+}-Freisetzung aus dem ER. Des Weiteren zeigt sich in Neuronen von transgenen Mäusen, die eine PS1-Mutation exprimieren, eine Reduktion des kapazitativen Ca^{2+}-Einstroms (CCE).

Um die direkte Rolle der PS1-Mutation [A246E] in der Veränderung der Ca^{2+}-Homöostase zu definieren, wurden transgene Mäuse generiert, die die PS1-Mutation [A246E] auf einem App-defizienten-Hintergrund exprimieren (App[-/-]xPS1[A246E]). Mit der Untersuchung dieser Mäuse konnte eine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die PS1-Mutation oder App-Spaltprodukte eine Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ hervorrufen. Analysen der Neurone von App-defizienten Mäusen zeigten sowohl einen normalen CCE als auch eine unauffällige durch Thg ausgelöste Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$). Dagegen zeigten Neurone von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] einen reduzierten CCE wie auch die Neurone der App-defizienten Mäuse mit einer PS1-Mutation (App[-/-]xPS1[A246E]). Der CCE ist daher weder vom App noch von dessen Spaltprodukten abhängig. Vielmehr scheint PS1 in die Regulation des CCE involviert zu sein.

Neurone von Mäusen mit der PS1-Mutation [A246E] wiesen nach der Applikation von Thg eine erhöhte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ auf. Bei Neuronen der doppeltransgenen Mäuse, die die PS1-Mutation auf einem App [-/-]-Hintergrund exprimieren, wurde diese Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ nicht beobachtet. Damit scheint die Expression von App essentiell für die durch PS1-Muationen hervorgerufenen Ca^{2+}-Veränderungen zu sein. App und dessen Spaltprodukte kommen somit primär in Frage, die intrazelluläre Ca^{2+}-Veränderung hervorzurufen.

Des Weiteren wurden Neurone von transgenen Mäusen mit einer konditionalen neuronalen PS1-Defizienz (PS1 [-/-]) untersucht und mit Mäusen, die die App-Mutation [V717I] tragen, gekreuzt (AppldxPS1[A246E]). In diesen doppeltransgenen Mäusen verhinderte die neuronale Defizienz im PS1 eine Amyloid-Plaque-Bildung. Aller-

dings führte dies gleichzeitig zur einer verstärkten Akkumulation von C-terminalen Fragmenten (CTF, C-99) (Dewachter *et al*., 2001).

In Neuronen von PS1-defizienten Mäusen wurde nach der Zugabe von Thg eine erhöhte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ festgestellt. Dieser Effekt war in den Zellen von doppeltransgenen Mäusen (AppldxPS1[A246E]) sogar noch verstärkt.

Diese Befunde zeigen, dass es in Neuronen sowohl infolge einer PS1-Mutation als auch bei einer PS1-Defizienz zu Veränderungen in der Ca^{2+}-Dynamik kommt.

App und dessen Spaltprodukte scheinen nicht in die Regulation des CCE involviert zu sein. Vielmehr spielen sie in den Vorgängen der ER-Ca^{2+}-Speicherung eine wichtige Rolle. Wie Beobachtungen an unterschiedlichen Mauslinien-Kombinationen zeigten, korreliert die mit Thg ausgelöste erhöhte Depletion der ER-Ca^{2+}-Speicher sowohl mit der verstärkten Akkumulation von Amyloid-Peptiden als auch von C99-Fragmenten.

Inwieweit C99-Fragmente direkt zu einer erhöhten IP_3-vermittelten Ca^{2+}-Freisetzung führen, wurde anhand von hippokampalen Neuronen untersucht, die mit einem C99-GFP-Fusions-Protein transfiziert wurden. Im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollneuronen zeigten transfizierte Neurone auf die Applikation von Bradykinin (BK) eine signifikant erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Antwort.

Damit scheinen neben den Amyloid-Peptiden auch C-99-Fragmente pathogene Eigenschaften bei der Alzheimer-Krankheit zu besitzen (Dewachter *et al*., 2001).

6. Literaturverzeichnis

Adams CB (1997). Trigeminal neuralgia: pathogenesis and treatment. *Br J Neurosurg*. **11**(6):493-5.

Arriagada R, Rutqvist LE, Kramar A, Johansson H (1992). Competing risks determining event-free survival in early breast cancer. *Br J Cancer* **66**(5):951-7.

Bahnson TD, Pandol SJ & Dionne VE (1993). Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca2+ entry in pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem*. **268**:10808-10812

Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH (1992). Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci*. **15**(8):303-8.

Barger SW, Mattson MP (1996). Participation of gene expression in the protection against amyloid beta-peptide toxicity by the beta-amyloid precursor protein. *Ann N* Y *Acad Sci*. **17**(777):303-9.

Barrow CJ, Yasuda A, Kenny PT, Zagorski MG (1992). Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J Mol Biol*. **225**(4):1075-93.

Baumeister R, Leimer U, Zweckbronner I, Jakubek C, Grunberg J, Haass C (1997). Human presenilin-1, but not familial Alzheimer's disease (FAD) mutants, facilitate Caenorhabditis elegans Notch signalling independently of proteolytic processing. *Genes Funct*. **1**(2):149-59.

Beal MF (1992). Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB J.* **6**(15):3338-44.

Berven LA, Hughes BP & Barritt GJ (1994). A slowly ADP-ribosylated pertussis-toxin-sensitive GTP-binding regulatory protein is required for vasopressin-stimulated Ca2+ inflow in hepatocytes. *Biochem. J.* **299**:399-407

Bird GS & Putney JW (1993). Inhibition of thapsigargin-induced calcium entry by microinjected guanine nucleotide analogues. Evidence for the involvement of a small G-protein in capacitative calcium entry. *J. Biol. Chem*. **268**:21486-21488

Birnbaumer L, Zhu X, Jiang M, Boulay G, Peyton M, Vannier B, Brown D, Platano D, Sadeghi H, Stefani E,Birnbaumer M (1996). The molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(26):15195-202.

Birnboim HC. & Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res*. **7**:1513-19

Blanc EM, Keller JN, Fernandez S, Mattson MP (1998). 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia*. **22**(2):149-60.

Blaustein MP, Golovina VA (2001). Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores.*Trends Neurosci*. **24**(10):602-8.

Bliss TV, Collingridge GL (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. **361**(6407):31-9.

Braak H, Braak E (1995). Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging*. **16**(3):271-8;

Brockhaus M, Grunberg J, Rohrig S, Loetscher H, Wittenburg N, Baumeister R, Jacobsen H, Haass C (1998). Caspase-mediated cleavage is not required for the activity of presenilins in amyloidogenesis and NOTCH signaling. *Neuroreport*. **11**(7):1481-6.

Chan SL, Mattson MP (1999). Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res*. **58**(1):167-90.

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

Choi DW (1996). Calcium: still center stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trens Neurosci*, **18**:58-60

Citron M, Diehl TS, Gordon G, Biere AL, Seubert P, Selkoe DJ (1996). Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(23):13170-5.

Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med.* **3**(1):67-72.

Cook D, Sung J, Golde T (1996). Expression and analysis of presenilin1 in a human neuronal system: Localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**: 9223-9228

Cook D, Forman M, Sung J (1997). Alzheimer`s Aß (1-42) is generated in the endoplasmic reticulum/ intermediate compartment of NT2N cells. *Nature Medicine.* **3**: 1021-1023

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmader KE (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* **7**(2):180-4.

Cox JA, Stein EA. (1981). Characterization of a new sarcoplasmic calcium-binding protein with magnesium-induced cooperativity in the binding of calcium. *Biochem.* **20**(19):5430-6.

Culmsee C, Monnig J, Kemp BE, Mattson MP (2001). AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *J Mol Neurosci*. **17**(1):45-58.

Cupers P, Bentahir M, Craessaerts K, Orlans I, Vanderstichele H, Saftig P, De Strooper B, Annaert W (2001). The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol*. **154**(4):731-40.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. **391**(6665):387-90.

Dewachter I, van Dorpe J, Spittaels K, Tesseur I, Van Den Haute C, Moechars D, Van Leuven F (2000). Modeling Alzheimer's disease in transgenic mice: effect of age and of presenilin1 on amyloid biochemistry and pathology in APP/London mice. *Exp Gerontol*. **35**(6-7):831-41.

Dewachter I, Moechars D, van Dorpe J, Tesseur I, Van den Haute C, Spittaels K, Van Leuven F (2001). Modelling Alzheimer's disease in multiple transgenic mice. *Biochem Soc Symp*. **67**:203-10.

Döbeli H, Draeger N, Huber G, Jakob P, Schmidt D, Seilheimer B, Stuber D, Wipf B, Zulauf M (1995). A biotechnological method provides access to aggregation competent monomeric Alzheimer's 1-42 residue amyloid peptide. *Biotechnology* **13**(9):988-93.

Dong Y, Kunze D, Vaca L & Schilling WP. AM (1995). Ultrastructural cytochemistry of human gastric cancer: electron microscopic observations of five organellae marker enzymes. *J. Physiol*. **269**: 1332-39

Doutheil J, Treiman M, Oschlies U, Paschen W (1999). Recovery of neuronal protein synthesis after irreversible inhibition of the endoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium*. **25**(6):419-28.

Eilers J, Callewaert G, Armstrong C, Konnerth A (1995). Calcium signaling in a narrow somatic submembrane shell during synaptic activity in cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**(22):10272-6.

Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*. **248**(4959):1122-4.

Etcheberrigaray R, Hirashima N, Nee L, Prince J, Govoni S, Racchi M, Tanzi RE, Alkon DL (1998). Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families. *Neurobiol Dis.* **5**(1):37-45.

Fierro L, DiPolo R, Llano I (1998). Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices. *J Physiol*. **510**:499-512.

Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N, Krause KH (2000). Bcl-2 decreases the free Ca2+ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**(11):5723-8.

Franciosi S (2001). AMPA receptors: potential implications in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. **58**(7):921-30.

Fraser SP, Suh Yh, Chong Yh und Djamgoz MB (1996). Membrane currents induced in Xenopus oocytes by the C-terminal fragment of the β-amyloid precursor protein. *J. Neurochem*. **66**:2034-40

Galton CJ, Hodges JR (1999). The spectrum of dementia and its treatment. *J R Coll Physicians Lond*. **33**(3):234-9.

Garzon-Rodriguez W, Sepulveda-Becerra M, Milton S, Glabe CG (1997). Soluble amyloid Abeta-(1-40) exists as a stable dimer at low concentrations. *J Biol Chem*. **272**(34):21037-44.

Gibson GE, Zhang H, Toral-Barza L, Szolosi S, Tofel-Grehl B (1996). Calcium stores in cultured fibroblasts and their changes with Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. **1316**(2):71-7.

Glenner GG, Wong CW (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. **122**(3):1131-5.

Goedert M (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. **16**(11):460-5.

Golde TE, Estus S, Younkin LH , Selkoe DJ und Younkin SG (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* **255**:728-730

Greenamyre JT, Maragos WF, Albin RL, Penney JB, Young AB (1988). Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer`s disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* **12**:421-430

Greenamyre JT & Young AB (1989). Excitatory amino acids and Alzheimer`s disease. *Neurobiol. Aging*. **10**: 593-602

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. **260**(6):3440-50.

Guo Q, Furukawa K, Sopher BL, Pham DG, Xie J, Robinson N, Martin GM, Mattson MP (1996). Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid beta-peptide. *Neuroreport*. **8**(1):379-83.

Guo Q, Fu W, Xie J, Luo H, Sells SF, Geddes JW, Bondada V, Rangnekar VM, Mattson MP (1998). Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. *Nat Med*. **4**(8):957-62.

Guo Q, Sebastian L, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP (1999). Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J Neurochem*. **72**(3):1019-29.

Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*. **357**(6378):500-3.

Haass C, Selkoe DJ (1993). Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*. **75**(6):1039-42.

Haass C (1996). Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurol*. **9**(4):254-9.

Haass C (1997). Presenilins: genes for life and death. *Neuron*. **18**(5):687-90.
Haass C, Selkoe DJ (1998). Alzheimer's disease. A technical KO of amyloid-beta peptide. *Nature*. **391**(6665):339-40.

Haass C, Baumeister R (1998). What do we learn from a few familial Alzheimer's disease cases? *J Neural Transm Suppl*. **54**:137-45.

Hardy J (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer´s disease.
Trends Neurosci. **20**: 154-159

Hartmann T, Bieger SC, Bruhl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides.
Nat Med. **3**(9):1016-20.

Hartmann U, Kruggel F (1999). Transient Analysis of the Biomechanics of the Human Head with a High-Resolution 3D Finite Element Model. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*. **2**(1):49-64.

Helmchen, F (1996). Ca^{2+}-Dynamik bei Aktionspotentialen in Nervenendigungen und Dendriten des Zentralnervensystems. Dissertation an der Universität Göttingen

Hofer AM, Machen TE (1993). Technique for in situ measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator mag-fura-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90**(7):2598-602.

Howlett DR, Jennings KH, Lee DC, Clark MS, Brown F, Wetzel R, Wood SJ, Camilleri P, Roberts GW (1995). Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodeg*. **4**(1):23-32.

Ilano AL, Spinelli A, Gurley KE, Strober S, Hall BM (1991). Induction of unresponsiveness to organ allografts. A comparison of different immunosuppressive protocols in DA and WF strains of rats. *Transplantation*. **51**(4):905-9

Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL (1994). Internal Ca2+ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**(2):534-8.

Izumi R, Yamada T, Yoshikai S, Sasaki H, Hattori M, Sakaki Y (1992). Positive and negative regulatory elements for the expression of the Alzheimer's disease amyloid precursor-encoding gene in mouse. *Gene*. **112**(2):189-95.

Jarett JT, Berger EP & Landsburry Pt (1993). The Carboxy-Terminus of the amyloid-ß protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of alzheimer´s disease. *Biochem*. **32**, 4693-4697

Jonker C (1997). Dementia. Outlook on current developments.
Tijdschr Gerontol Geriatr. **28**(4):163-71.

Kandel ER, Schwartz JH, Jesell TH. Neurowissenschaften. Eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag 1995

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A (1987). The precursor of Alzheimer`s disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**: 733-736

Kass GE, Orrenius S (1999). Calcium signaling and cytotoxicity.
Environ Health Perspect. **1**:25-35.

Katzman R (1986). Differential diagnosis of dementing illnesses.
Neurol Clin. **4**(2):329-40.

Kay AR, Wong RK (1986). Isolation of neurons suitable for patch-clamping from adult mammalian central nervous systems. *J Neurosci Methods*. **16**(3):227-38.

Keller EA, Borghese CM, Carrer HF, Ramirez OA (1992). The learning capacity of high or low performance rats is related to the hippocampus NMDA receptors.
Brain Res. **576**(1):162-4.

Kim SH, Lah JJ, Thinakaran G, Levey A, Sisodia SS (2000). Subcellular localization of presenilins: association with a unique membrane pool in cultured cells.
Neurobiol Dis. **7**(2):99-117.

Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, Rah JC, Jeong SJ, Suh YH (2000). Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity.
FASEB J. **14**(11):1508-17.

Kirischuk S, Pronchuk N, Verkhratsky A (1992). Measurements of intracellular calcium in sensory neurons of adult and old rats. *Neurosci*. **50**(4):947-51.

Koh J, Yang LL, Cotman CW (1990). ß-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res*. **533**:315-320

König N, Poluch S, Estabel J, Durand M, Drian MJ und Exbrayat JM (2001). Synaptic and non-synaptic AMPA receptors permeable to calcium. *Jpn J Pharmacol*. **86**(1):1-17.

Kornhuber J, Mack-Burkhardt F, Riederer P (1989). Regional distribution of [3H]MK-801 binding sites in the human brain. *Brain Res*. **489**(2):397-9.(b)

Kornhuber J, Mack-Burkhardt F, Konradi C, Fritze J, Riederer P (1989).Effect of antemortem and postmortem factors on [3H]MK-801 binding in the human brain: transient elevation during early childhood. *Life Sci.* **45**(8):745-9.(c)

Kornhuber J, Weller M (1997). Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy.
Biol Psychiatry. **41**(2):135-44.

Kovacs DM, Fausett HJ, Page KJ, Kim TW, Moir RD, Merriam DE, Hollister RD, Hallmark OG, Mancini R, Felsenstein KM, Hyman BT, Tanzi RE, Wasco W (1996). Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med*. **2**(2):224-9.

Kraepelin E. Klinische Psychiatrie. Psychiatrie Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte, **Vol 2**. Johann Ambrosius Barth, Leizig 1910

Krieger C, Lanius RA, Pelech SL, Shaw CA (1996). Amyotrophic lateral sclerosis: the involvement of intracellular Ca2+ and protein kinase C.
Trends Pharmacol Sci. **17**(3):114-20.

LaFerla FM, Troncoso JC, Strickland DK, Kawas CH, Jay G (1997). Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apoE uptake and intracellular Abeta stabilization. *J Clin Invest*. **100**(2):310-20.

Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(7):3922-7.

Lansbury PT Jr. (1997). Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol*. **1**(2):260-7.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685

Lattanzio FA Jr, Bartschat DK (1991). The effect of pH on rate constants, ion selectivity and thermodynamic properties of fluorescent calcium and magnesium indicators. *Biochem Biophys Res Commun*. **177**(1):184-91.

Le Blanc AC, Xue R und Gambetti PJ (1996). Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J Neurochem*. **66:**2300-2310

Leissring MA, Parker I, LaFerla FM (1999). Presenilin-2 mutations modulate amplitude and kinetics of inositol 1, 4,5-trisphosphate-mediated calcium signals. *J Biol Chem*. **274**(46):32535-8.

Leissring MA, Akbari Y, Fanger CM, Cahalan MD, Mattson MP, LaFerla FM (2000).Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice. *J Cell Biol.* **149**(4):793-8.

Leissring MA, Murphy MP, Mead TR, Akbari Y, Sugarman MC, Jannatipour M, Anliker B, Muller U, Saftig P, De Strooper B, Wolfe MS, Golde TE, LaFerle FM (2002). A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**(7):4697-4702

Lemere CA, Lopera F, Kosik KS, Lendon CL, Ossa J, Saido TC, Yamaguchi H, Ruiz A, Martinez A, Madrigal L, Hincapie L, Arango JC, Anthony DC, Koo EH, Goate AM, Selkoe DJ, Arango JC (1996). The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat Med.* **2**(10):1146-50.

Levitan D, Greenwald I (1995). Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a Caenorhabditis elegans S182 Alzheimer's disease gene. *Nature.* **377**(6547):351-4.

Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg A (1995) familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science*. **269**(5226):970-3.

L'Hernault SW, Benian GM, Emmons RB (1993). Genetic and molecular characterization of the Caenorhabditis elegans spermatogenesis-defective gene spe-17. *Genetics*. **134**(3):769-80.

Li ZW, Stark G, Gotz J, Rulicke T, Gschwind M, Huber G, Muller U, Weissmann C (1996). Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**(12):6158-62.

Lorenzo A, Yankner BA (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**(25):12243-7.

Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, DeMaster E, Allen CJ, Stimson ER, Maggio JE (1993). Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J Neurochem*. **61**(3):1171-4.

Martinez M, Fernandez-Vivancos E, Frank A, De la Fuente M und Hernanz A (2000). Increased cerebrospinal fluid fas (Apo-1) levels in Alzheimer's disease. Relationship with IL-6 concentrations. *Brain Res* **869**(1-2):216-9.

Masliah E, Alford M, DeTeresa R, Mallory M, Hansen L (1996). Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **40**(5):759-66.

Mattson MP (1990). Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tanfles are elicited by glutamate and calcium influx in cultured hippokampal neurons. *Neuron*. **4**:105-114

Mattson MP, Engle MG, Rychlik B (1991). Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons. *Mol Chem Neuropathol*. **15**(2):117-42.

Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE (1993). beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca2+ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. **16**(10):409-14.

Mattson MP, GoodmanY, Luo H, Fu W, Furukawa KJ (1997). Aktivation of NF-κB protects hippokampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of Mn-SOD and supression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *Neurosci Res*. **49**: 681-697

Mattson MP, Guo Q, Furukawa K, Pedersen WA (1998). Presenilins, the Endoplasmic Reticulum, and Neuronal Apoptosis in Alzheimer`s Disease. *J. Neurochem*. **70**(1): 1-14.

Mattson MP (2000). Existing data suggest that Alzheimer's disease is preventable. *Ann N Y Acad Sci*. **924**:153-9.

Mattson MP, Camandola S (2001). NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest*. **107**(3):247-54.

McLachlan DR, Kruck TP, Lukiw WJ, Krishnan SS (1991). Would decreased aluminum ingestion reduce the incidence of Alzheimer's disease? *CMAJ*. **145**(7):793-804.

Meldrum B, Garthwaite J (1990). Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegeneratative disease. *Trensds Neurosci*. **11**:379-387

Moechars D, Lorent K, De Strooper B, Dewachter I, Van Leuven F (1996). Expression in brain of amyloid precursor protein mutated in the alpha-secretase site

causes disturbed behavior, neuronal degeneration and premature death in transgenic mice. *EMBO J*. **15**(6):1265-74

Moechars D, Lorent K, Van Leuven F (1999). Premature death in transgenic mice that overexpress a mutant amyloid precursor protein is preceded by severe neurodegeneration and apoptosis. *Neurosci.* **91**(3):819-30.

Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F (1999). Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem*. **274**(10):6483-92.

Montell C (2001). An end in sight to a long TRP. *Neuron*. **30**(1):3-5.

Mori E, Ikeda M, Hirono N, Kitagaki H, Imamura T, Shimomura T (1999). Amygdalar volume and emotional memory in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.* **156**(2):216-22.

Morrison BM, Hof PR, Morrison JH (1998). Determinants of neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* **44**(1):32-44.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **65**(1-2):55-63.

Mullan M, Crawford F (1993). Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. **16**(10):398-403.

Müller HJ, Graeber MB (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. **248**(3):111-22.

Müller WE, Mutschler E, Riederer P (1995). Nonkompetetive NMDA receptor antagonists with fast open-channel blocking kinetics and strong voltage-dependency

as potential therapeutic agents for Alzheimer´s dementia. *Pharmacopsychiat*. **28**: 113-124

Murray FE, Landsberg JP, Williams RJ, Esiri MM und Watt F (1992). Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using proton-induced X-ray analysis. *Ciba Found Symp*. **169**:201-10

Nägerl UV & Mody I (1998). Calcium-dependent anactivation of high-threshol calcium currents in human dentate gyrus granule cells. *J. Physiol*. **509**: 39-45

Neher E (1995). The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacology*. **34**(11):1423-42.

Nixon RA, Saito KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, Mohan PS, Shea TB und Beermann M (1994). Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. **747**:77-91.

Olney JW, de Gubareff T (1978). Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea. *Nature*. **271**(5645):557-9.

Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P (1989). Role of Ca2+ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci*. **10**(7):281-5.

Paschen W (2000). Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment is involved? *Brain Res Bull*. **53**(4):409-13.

Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Benett MV und Zukin RS (1997). The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci.* **20**(10):464-70.

Peruche B & Schulz M (1998). Donepezil, neues Mittel gegen Morbus Alzheimer *PZ* **143**:756-760

Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG. & Cotman CW (1991). Aggregation-related toxicity of synthetic ß-Amyloid Protein in Hippocampal Cultures. *Eur.J.Pharmacol.* **207**:367-368

Poenie M, Tsien R (1986). Fura-2: a powerful new tool for measuring and imaging [Ca2+]i in single cells. *Prog Clin Biol Res*. **210**:53-6.

Putney JW Jr (1997). Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium*. **21**(3):257-61.

Putney JW Jr, Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, Bird GS (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci*. **114**(12):2223-9.

Querfurth HW, Selkoe DJ (1994). Calcium ionophore increases amyloid beta peptide production by cultured cells. *Biochemistry*. **33**(15):4550-61.

Raoul C, Pettmann B, Henderson CE (2000). Active killing of neurons during development and following stress: a role for p75(NTR) and Fas? *Curr Opin Neurobiol*. **10**(1):111-7.

Ray WJ, Yao M, Nowotny P, Mumm J, Zhang W, Wu JY, Kopan R, Goate AM (1999).Evidence for a physical interaction between presenilin and Notch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**(6):3263-8.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual Auflage Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989

Sauer B und Henderson N (1988). The cyclization of linear DNA in Escherichia coli by site-specific recombination. *Gene*. **70**(2):331-41.

Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(10):5113-8.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. **2**(8):864-70.

Schneider I, Reverse D, Dewachter I, Ris L, Caluwaerts N, Kuiperi C, Gilis M, Geerts H, Kretzschmar H, Godaux E, Moechars D, Van Leuven F, Herms J (2001). Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation. *J Biol Chem*. **276**(15):11539-44.

Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, Bhasin R, Silverman J, Weisgraber KH, Coyle PK (1994). Transthyretin sequesters *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**(18):8368-72.

Seiffert D, Bradley JD, Rominger CM, Rominger DH, Yang F, Meredith JE Jr, Wang Q, Roach AH, Thompson LA, Spitz SM, Higaki JN, Prakash SR, Combs AP, Copeland RA, Arneric SP, Hartig PR, Robertson DW, Cordell B, Stern AM, Olson RE, Zaczek R (2000). Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *J Biol Chem*. **275**(44):34086-91.

Selkoe DJ (1993). Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease.*Trends Neurosci*. **16**(10):403-9.

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C (1992). Protein Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*. **359**(6393):325-7.

Shen X, Chen J, Meng J, Xiang Q, Wang X, Tong B (1997).Observation of changes of cardiovascular function during 2.5h HDT (-15 degrees) with sphygmogram method. *Space Med Med Eng*. **10**(3):201-5.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. **375**(6534):754-60.

Sisodia SS, Gallagher M (1998). A role for the beta-amyloid precursor protein in memory? *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**(21):12074-6.

Shuttleworth TJ (1996). Arachidonic acid activates the noncapacitative entry of Ca2+ during [Ca2+]i oscillations. *J. Biol. Chem*. **271**:21720-21725

Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Boon T, Van Lint J, Vandenheede J, Moechars D, Loos R, Van Leuven F (2000). Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem*. **275**(52):41340-9.

Steiner H, Capell A, Pesold B, Citron M, Kloetzel PM, Selkoe DJ, Romig H, Mendla K, Haass C (1998). Expression of Alzheimer's disease-associated presenilin-1 is controlled by proteolytic degradation and complex formation. *J Biol Chem*. **273**(48):32322-31.

Strittmatter WJ, Roses AD (1995). Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**(11):4725-7.

Studier FW (1973). Arachidonic acid activates the noncapacitative entry of Ca2+ during [Ca2+]i oscillations. *J. Mol. Biol*. **79**:237

Szalai G, Krishnamurthy R, Hajnoczky G (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J*. **18**(22):6349-61.

Tesseur I, Van Dorpe J, Bruynseels K, Bronfman F, Sciot R, Van Lommel A, Van Leuven F (2000). Prominent axonopathy and disruption of axonal transport in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 in neurons of brain and spinal cord. *Am J Pathol*. **157**(5):1495-510.

Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhiro S, Capell A, Walter J, Grunberg J, Haass C, Iwatsubo T (1997). The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(5):2025-30.

Troadec JD, Thirion S, Laugier JP, Nicaise G (1998). Calcium-induced calcium increase in secretory vesicles of permeabilized rat neurohypophysial nerve terminals. *Biol Cell*. **90**(4):339-47.

Troncoso P, Kahan BD (1998). Preclinical evaluation of a new immunosuppressive agent, FTY720. *Clin Biochem.* **31**(5):369-73.

Von Braunmühl. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Schulz W (Hrsg). Berlin-Springer-Verlag 1937: 337-539

Van Dorpe J, Smeijers L, Dewachter I, Nuyens D, Spittaels K, Van Den Haute C, Mercken M, Moechars D, Laenen I, Kuiperi C, Bruynseels K, Tesseur I, Loos R, Vanderstichele H, Checler F, Sciot R, Van Leuven F (2000). Prominent cerebral amyloid angiopathy in transgenic mice overexpressing the london mutant of human APP in neurons. *Am J Pathol*. **157**(4):1283-98.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. **286**(5440):735-41.

Vesce S, Bezzi P und Volterra A (1999). The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cell Mol Life Sci*. **56**(11-12):991-1000.

Walter J, Capell A, Grunberg J, Pesold B, Schindzielorz A, Prior R, Podlisny MB, Fraser P, Hyslop PS, Selkoe DJ, Haass C (1996). The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic Reticulum. *Mol Med*. **2**(6):673-91.

Walter J, Grunberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, Mendla K, George-Hyslop PS, Multhaup G, Selkoe DJ, Haass C (1997). Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**(10):5349-54.

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

Weidemann A, Paliga K, Dürrwang U, Czech C, Evin G, Masters C, Beyreuther K (1997). Formation of stable complexes between two Alzheimer´s disease gene products: Presenilin-2 and ß-amyloid precursor protein. *Nature Med*. **3**:328-332

Weiss JH und Sensi SL (2000). Ca2+-Zn2+ permeable AMPA or kainate receptors: possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends Neurosci*. **23**(8):365-71.

Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, Ganjei JK, Lacana E, Sunderland T, Zhao B, Kusiak JW, Wasco W, D'Adamio L (1996). Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation. *Science*. **274**(5293):1710-3.

Xia W, Zhang J, Perez R, Koo E, Selkoe D (1997) Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer´s Disease. *Proc. Acad. Sci USA* **94**: 8208-8214

Xia W (2000). Role of presenilin in gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Exp Gerontol*. **35**(4):453-60.

Xiao J, Perry G, Troncoso J und Monteiro MJ (1996). alpha-calcium-calmodulin-dependent kinase II is associated with paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. **55**(9):954-63.

Yamamoto H, Kanaide H (1990). Release of intracellularly stored Ca2+ by inositol 1,4,5-trisphosphate--an overview. *Gen Pharmacol*. **21**(4):387-93.

Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science*. **250**(4978):279-82.

Yoo AS, Cheng I, Chung S, Grenfell TZ, Lee H, Pack-Chung E, Handler M, Shen J, Xia W, Tesco G, Saunders AJ, Ding K, Frosch MP, Tanzi RE, Kim TW (2000). Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron*. **27**(3):561-72.

Zhang Z, Nadeau P, Song W, Donoviel D Yuan M, Bernstein A und Yanker Ba (2000). Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol*. **2**(7):463-5.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Disease
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AM	Acetoxymethylester
AMPA	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
App	Amyloid-precursor-protein
ApoE4	Apolipoprotein 4
Aß	Amyloid-ß-Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
C99	C-terminales Spaltprodukt von App
Ca^{2+}	Kalzium
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CCE	kapazitativer Ca^{2+} Einstrom
CTF	C-terminale Fragmente
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
EGTA	Ethylenglycol-bis-ß-aminoethyl- ether N,N,N`, N´-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	Familiar Alzheimer Disease
FIAU	2`-deoxy, 2`-fluoro-ß-δ-arabinofuranosyl-5-iodouracil
Glu	Glutamat
HBSS	Hank`s balanced salt solution
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP_4	Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat
IP_3R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
K^+	Kalium
Mg^{2+}	Magnesium
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

Na^+	Natrium
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid
NFT	neurofibrilläre tangles
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTF	N-terminales Fragment
PCP	Phencyclidin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP_2	Phophatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI	Phosphinositid
PLC	Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PS1	Presenilin-1
PS2	Presenilin-2
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RYR	Ryanodin-Rezeptor
sApp	sekretiertes Amyloid-precursor-protein
SERCA	Sarko-endoplasmatische-Ca^{2+}-Pumpen
SOC	store-operated-Ca^{2+}-entry
TTR	Transthyretin
TRP	transient receptor potential
UV	ultraviolettes Licht
ZNS	zentrales Nervensystem

Anhang

A1. Genotypisierung transgener Mäuse mittels der PCR-Methode

A1.1 PS1-PCR-Ansatz:

Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Analyse einer DNA-Probe:

10x Reaktionspuffer	5,0	µl
dNTPs (10nM)	10,0	µl
P27 Primer (10 pmol/µl)	5,0	µl
P29 Primer (10 pmol/µl)	5,0	µl
Taq polymerase	0,25	µl
H_2O bidest	32,76	µl
DNA (200 ng/µl)	1,0	µl

A1.2 PS1-PCR-Programm:

96°C 2´
96°C 1´
56°C 1´ } 30x
72°C 1´
72°C 10´

A1.3 App-PCR-Ansatz:

Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Analyse einer DNA-Probe:

10x Reaktionspuffer	5,0	µl
dNTPs (10nM)	0,5	µl
App-1 Primer (10 µmol/µl)	5,0	µl
App-2 Primer (10 µmol/µl)	5,0	µl
App-3 Primer (10 µmol/µl)	5,0	µl
Taq polymerase	0,5	µl
H_2O bidest	33,0	µl
DNA (200 ng/µl)	5,0	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	3,0	µl

A1.4 App-PCR-Program:

95°C	4′		
95°C	1′	}	35x
52°C	1′		
72°C	1′		

A2. Ringerlösungen

A2.1 Ringer zur Dissoziation hippokampaler Neurone

PIPES

Chemikalie	Konzentration (mM)
NaCl	120
KCl	5
$CaCl_2$	1
$MgCl_2$	1
PIPES	20
Glukose	25

pH 7,0 mit NaOH eingestellt

A2.2 Ringer zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ in hippokampalen Neuronen

Locke`s Puffer

Chemikalie	Konzentration (mM)
NaCl	154
KCl	5,6
$CaCl_2$	2,3
$MgCl_2$	1
$NaHCO_3$	3,6
Glukose	5
Hepes	5

pH 7,2 mit NaOH eingestellt

A2.3 Intrazellular-/Extrazellularlösung zur Beladung von Hippokampusneuronen im Schnittpräparat

Extrazellular-/Badlösung (acsF)

Chemikalie	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	2,5
NaH_2PO_4	1,25
$NaHCO_3$	26
$CaCl_2$	2
$MgCl_2$	1
Glukose	25
pH 7,2 mit NaOH eingestellt	

Intrazellular-/Pipettenlösung

Chemikalie	Konzentration (mM)
CsCl	145
HEPES	10
EGTA	10
$CaCl_2$	1
$MgCl_2$	2
Na_2-ATP	4
Na_2-GTP	0,4
pH 7,3 mit CsOH eingestellt	

A2.4 Ringer zur Messung von CCE-Strömen

HBSS

Chemikalie	Konzentration (mM)	
NaCl	145	
KCl	2,5	
$MgCl_2$	1	
HEPES	20	
Glukose	10	
$CaCl_2$	1,8	Bei Verwendung von Ca^{2+}-freiem Ringer wird Ca^{2+} ersetzt durch EGTA
EGTA	50 µM	
BSA	1%	

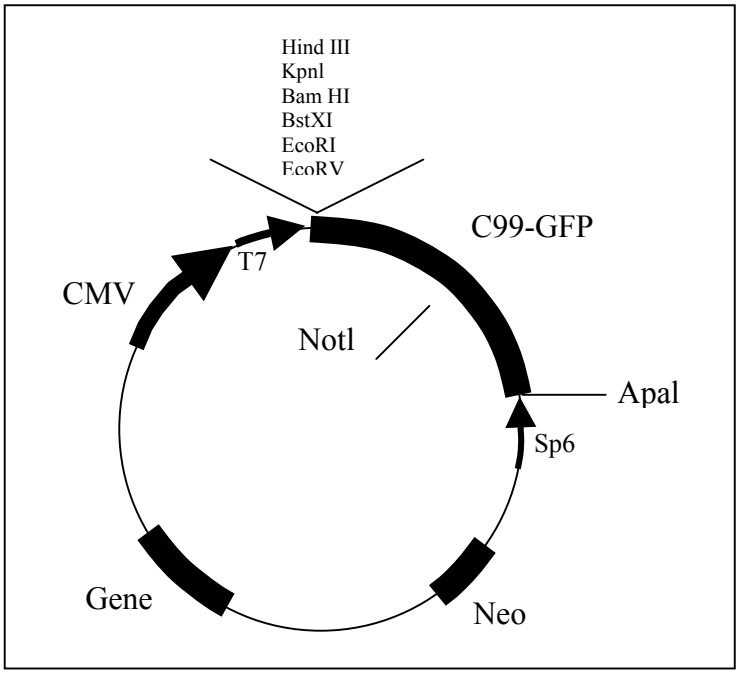
pH 7,3 mit NaOH eingestellt

A2.5 artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (acsfF)

Chemikalie	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	2,5
NaH_2PO_4	1,25
$NaHCO_3$	26
$CaCl_2$	0,5
$MgCl_2$	1
Glukose	25

pH 7,2 mit NaOH eingestellt

A3. Plasmid



Darstellung des Plasmids pcDNA3/C99-GFP mit einem Gewicht von 8,3 kb

A4. Bakterienmedien:

LB-Medium:	10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, ad 1000 ml Bidest
LB-Amp-Medium:	100 µg Ampicillin/ml in LB-Medium
LB-Geneticin-Agar:	1,5 % w/v Agar in LB-Medium aufkochen und nach Abkühlen der Agar-Lösung auf ca. 40°C werden 200 µg/ml Geneticin hinzugegeben.
LB-Geneticin-Medium:	200 µg Geneticin/ml in LB-Medium

A5. Lösungen für Präparation von Plasmid-DNA:

Puffer P1:	100 µg RNase A/ml, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA
Puffer P2:	200 mM NaOH, 1 % w/v SDS
Puffer P3:	3 M Na-Acetat, pH 5,5
Puffer QBT :	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15 % v/v Ethanol, 0,15 % v/v, Triton-X-100
Puffer QC:	1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH7,0, 15 % v/v Ethanol
Puffer QF:	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 15 % v/v Ethanol
TE-Lsg:	100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA

A6. Lösungen für Western-Blot-Analyse

A6.1 Lösungen für Proteinextraktion

Lyse-Puffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl, 1 % v/v Triton-x-100, 1 % v/v NP-40, 1/25 Volumen 25 fach Protease-Inhibitor-Mix
EDTA-TrisHCl:	75 mM TrisHCl; 1,5 mM EDTA, pH 7,5
$NaHSO_3$ + Pefablock:	60 mM $NaHSO_3$, 6 mM Pefablock (im Verhältnis 1:1)
PMSF:	30 mM (in Isopropanol)
3xLaemmli-Puffer:	3 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,4 Glyzerol, 1,2 ml 2-Mercaptoethanol, 1,2 ml 1% Bromophenolblau (in Aqua dest.), 480 mg SDS, 0,2 ml Aqua dest.

A6.2 Lösungen für Elektrophoretische Auftrennung

TBE Lösung:	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg Ethidiumbromid/ml in Bidest
DNA-Probenpuffer:	2,5 M Harnstoff, 0,25 M EDTA, 25 % w/v Saccharose, 5 % w/v SDS, 0,1 % w/v Bromphenolblau, pH 8,0

A6.3 Lösungen für SDS-Gelelektrophorese

Acrylamidlösung:	30 % w/v Acrylamid, 0,8 % w/v N, N-Methylbisacrylamid
Laufpuffer:	20 mM Tris-HCl, 150 mM Glyzin, 0,08 % w/v SDS;
10 % Trenngel:	7,5 ml Acrylamidlösung, 5,6 ml 2 M Tris-HCl, pH 8,8, 16,6 ml Aqua bidest., 150 µl 20 % w/v SDS, 100 µl 15 % w/v APS, 10 µl TEMED
5 % Sammelgel:	1,7 ml Acrylamidlösung, 1,3 ml ! M Tris-HCL, pH 6,8, 7 ml Aqua bidest., 50 µl 20 % w/v SDS, 50 µl 15 % w/v APS, 5 µl TEMED

A6.4 Lösungen für Western-Blot

Transferpuffer:	150 mM Glyzin, 20 mM Tris, 20 %v/v Methanol
TBST-Lösung:	10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0,05 % v/v Tween
Absättigungspuffer:	1 % Milchpulver in TBST
Färbepuffer:	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM $CaCl_2$
NBT-Stock:	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid 50 mg in 1 ml DMF (Dimethylformamid)
BCIP-Stock:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat Toluidin 50 mg in 1 ml 100 %DMF

A7. Proteinbestimmung mit Bradford-Reagenz

Die Stammlösung wurde folgendermaßen erzeugt : 100 mg Coomassie-Brilliantblau G250 werden in 50 ml Ethanol (50 %) gelöst. Nach Zugabe von 100 ml Phosphorsäure (85 %) wird Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt. Für die Proteinbestimmung im Hirnlysat wurde 1 Volumen Stammlösung mit 4 Volumen Aqua dest. und 1 µl Lysat gemischt.

Danksagung

Die in der vorliegenden Arbeit angestellten Experimente wurden im Rahmen eines EU-Projektes am Klinikum Großhadern im Institut für Neuropathologie unter der Betreuung von Prof. Dr. H.A. Kretzschmar durchgeführt. Innerhalb des Projektes wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. F. Van Leuven gearbeitet (Zentrum für Humangenetik, Leuven in Belgien).

Mein Dank gilt Prof. Dr. Jochen Herms für die Betreuung meiner Arbeit, insbesondere auch für die freundschaftliche Unterstützung. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes möchte ich mich bei Prof. Dr. H.A. Kretzschmar bedanken.

Prof. Christiane Richter-Landsberg und PD Dr. Ulrike Janssen-Bienhold danke ich für die externe Betreuung und Durchsicht sowie Beurteilung meiner Dissertation.

Stefan Korte gilt mein besonderer Dank für seine immer gewährte Hilfsbereitschaft, freundschaftliche Zusammenarbeit sowie die zahlreichen Gespräche über Wissenschaft und Lebensphilosophie.

Für die nette Zusammenarbeit und schöne Arbeitsatmosphäre im Labor bedanke ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern unserer Abteilung, die mir durch ihre Aufmunterung und Hilfsbereitschaft zur Seite gestanden haben bedanken.

Zum Schluss bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Wolfgang und Doris Schneider und meinem Lebensgefährten Karsten Lohmar, die mich während meiner gesamten Doktorarbeit in jeder Hinsicht unterstützt und aufgemuntert haben.

Lebenslauf

Name:	Schneider	
Vorname:	Ilka, Barbara	
Geburtsdatum:	22.10.1973	
Geburtsort:	Bremen	
Famienstand:	ledig	
Schulbildung:	1980 - 1984	Grundschule Barrien bei Syke
	1984 - 1986	Orientierungsstufe Syke
	1985 - 1993	Gymnasium Syke mit Abschluss Abitur
Studium:	1993 - 1999	Studium der Biologie in Oldenburg an der Carl-von-Ossietzky-Universität mit Abschluß als Diplom-Biologin
Anstellung:	1999 - 2002	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Neuropathologie bei Prof. Dr. Kretzschmar

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den 13.04.2002
Ilka Schneider