

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. A. Hasilik

in Zusammenarbeit mit dem

Max-Planck-Institut für Hirnforschung Frankfurt/M.
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H. Betz
Neurochemische Abteilung

Transgene Tiermodelle
zum Verständnis der physiologischen Funktionen
von Proteinen der β -Amyloid-Vorläuferprotein-Genfamilie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sabine Heber

aus Erlabrunn/Erzgebirge

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 18.03.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rudolf Arnold

Referent: Prof. Dr. Jan Koolman

Korreferent: Prof. Dr. Heinrich Betz

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	7
1.1. DIE ALZHEIMERSCHE KRANKHEIT UND DAS β -AMYLOID-VORLÄUFERPROTEIN APP	7
1.1.1. <i>Das klinische Bild der Alzheimerschen Krankheit</i>	7
1.1.2. <i>Zellbiologie des Amyloid-Vorläuferproteins</i>	9
1.1.3. <i>Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese</i>	13
1.2. DIE PROTEINE DER APP-GENFAMILIE UND IHRE EIGENSCHAFTEN	16
1.2.1. <i>Die Proteine der APP-Genfamilie</i>	16
1.2.2. <i>Funktionen der Proteine der APP-Genfamilie</i>	17
1.3. TRANSGENE MAUSMODELLE.....	25
1.3.1. <i>Transgene Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung</i>	25
1.3.2. <i>Mausmodelle der Alzheimerschen Krankheit</i>	26
1.3.3. <i>APP-Knock-out-Mäuse</i>	27
1.3.4. <i>APLP1-Knock-out-Mäuse</i>	28
1.3.5. <i>APLP2-Knock-out-Mäuse</i>	28
1.3.6. <i>APP/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäuse</i>	29
1.4. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	30
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1. MATERIAL.....	32
2.1.1. <i>Chemikalien</i>	32
2.1.2. <i>Puffer</i>	32
2.1.3. <i>Versuchstiere</i>	33
2.1.4. <i>Oligonukleotide</i>	33
2.2. METHODEN	34
2.2.1. <i>Genotypisierung von Mäusen</i>	34
2.2.1.1. <i>Präparation genomischer Maus-DNS aus Schwanzbiopsien</i>	34
2.2.1.2. <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	35
2.2.1.3. <i>Elektrophorese von DNS-Fragmenten</i>	37

2.2.2.	<i>Generierung von Mäusen mit kombinierten Gendefekten von APP/APLP-Proteinen</i>	38
2.2.2.1.	Verpaarungen zur Erzeugung von Doppel-Knock-out-Mäusen.....	38
2.2.2.2.	Verpaarungen zur Erzeugung von Tripel-Knock-out-Mäusen.....	39
2.2.2.3.	Rückkreuzung von Mäusen auf 129SvEv genetischen Hintergrund.....	39
2.2.3.	<i>Primäre neuronale Kulturen aus Mausgewebe.....</i>	40
2.2.3.1.	Massenzellkulturen von Neuronen des Kortex	40
2.2.3.2.	Kultivierung von einzelnen Neuronen des Hippocampus in Kokultur mit Astrozyten	42
2.2.3.3.	Präparation, Kultivierung und Lagerung von Maus-Astrozyten.....	42
2.2.4.	<i>Analyse der Überlebensrate primärer Neuronen und Nachweis der Empfindlichkeit gegenüber exogener Substanzen</i>	44
2.2.4.1.	Zellzählung zur Bestimmung der spontanen Überlebensrate.....	44
2.2.4.2.	MTT-Assay nach Glutamatbehandlung	44
2.2.4.3.	MTS-Assay nach β -Amyloid-Behandlung.....	45
2.2.5.	<i>Immunhistochemie.....</i>	47
2.2.5.1.	Fixierung von Mausembryos.....	47
2.2.5.2.	Paraffinschnitte.....	47
2.2.5.3.	Gefrierschnitte	50
2.2.5.4.	Dissoziierte Zellen.....	51
2.2.6.	<i>Histologie</i>	52
2.2.6.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	52
2.2.6.2.	Nissl-Färbung	52
2.2.6.3.	Versilberung nach Gomori	53
2.2.7.	<i>Elektronenmikroskopie.....</i>	54
2.2.7.1.	Ultradünnschnitte	54
2.2.7.2.	Negativkontrastierung von β -Amyloid-Peptid.....	55
3.	ERGEBNISSE	56
3.1.	CHARAKTERISIERUNG VON APP/APLP-DOPPEL-KNOCK-OUT-MÄUSEN	56
3.1.1.	<i>Überlebensraten von Mäusen mit kombinierten Gendefekten im APP und den APLPs</i>	56
3.1.1.1.	APP/APLP1-Doppel-Knock-out-Mäuse	56
3.1.1.2.	APP/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäuse	57
3.1.1.3.	APLP1/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäuse.....	58

3.1.2.	<i>Analyse der letalen APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäuse</i>	62
3.1.2.1.	Makroskopische und histologische Befunde.....	62
3.1.2.2.	Expression und Clustering von Neurotransmitterrezeptoren in Rückenmarksschnitten	64
3.1.2.3.	Expression und Clustering von Neurotransmitterrezeptoren in primären Neuronenkulturen des Hippocampus.....	66
3.1.2.4.	Ultrastrukturelle Analyse des Hirnstamms	69
3.2.	ÜBERLEBENSRATE PRIMÄRER KORTIKALER NEURONEN VON APP/APLP -KNOCK-OUT-MÄUSEN.....	70
3.2.1.	<i>Spontane Überlebensrate in vitro</i>	70
3.2.2.	<i>Empfindlichkeit gegenüber Glutamat</i>	72
3.2.3.	<i>Empfindlichkeit gegenüber β-Amyloid</i>	74
3.3.	GENERIERUNG VON APP/APLP-TRIPEL-KNOCK-OUT-MÄUSEN	76
3.3.1.	<i>Reduzierte Überlebensraten von APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäusen</i>	76
3.3.2.	<i>Generierung von APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen durch verschiedene Verpaarungen</i>	78
3.4.	FEHLBILDUNGEN BEI APP/APLP-DEFIZIENTEN MÄUSEN	83
3.4.1.	<i>Exenzephalie-Phänotyp</i>	83
3.4.2.	<i>Lissenzephalie Typ 2 bei APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen</i>	87
4.	DISKUSSION	94
4.1.	APP/APLP-DOPPEL-KNOCK-OUT-MÄUSE SIND POSTNATAL LETAL	94
4.2.	LETALE APP/APLP-DOPPEL-KNOCK-OUT-MÄUSE SIND MORPHOLOGISCH UNAUFFÄLLIG.....	96
4.2.1.	<i>Makroskopische und histologische Analysen der letalen APP/APLP- Knock-out-Mäuse zeigen normale Organentwicklung</i>	96
4.2.2.	<i>Die Expression und Aggregation von Neurotransmitter-Rezeptoren bei letalen APP/APLP-Knock-out-Mäusen ist nicht beeinträchtigt</i>	97
4.2.3.	<i>Die Ultrastruktur der Synapsen in letalen APP/APLP-Knock-out-Mäusen ist normal</i>	98
4.3.	NEURONEN DER APP/APLP-KNOCK-OUT-MÄUSE SIND NICHT ÜBEREMPFLINDLICH GEGENÜBER GLUTAMAT ODER β -AMYLOID	99
4.4.	APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-} SIND POSTNATAL LETAL	102
4.5.	APP/APLP-PROTEINE SIND FÜR DIE FRÜHE EMBRYONALENTWICKLUNG NICHT ESSENTIELL	102

4.6.	FEHLENDE APP/APLP-PROTEINE VERURSACHEN EMBRYONALE MISSBILDUNGEN.	102
4.7.	APP IST WICHTIG FÜR DIE REGULATION NEURONALER MIGRATION: ROLLE ALS LIGAND ODER REZEPTOR ?.....	107
5.	ZUSAMMENFASSUNG	109
6.	LITERATURVERZEICHNIS	111
7.	ANHANG	129
	ABKÜRZUNGEN	129
	LEBENS LAUF	130
	AKADEMISCHE LEHRER.....	131
	DANKSAGUNG	133
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	134

1. EINLEITUNG

1.1. Die Alzheimersche Krankheit und das β-Amyloid-Vorläuferprotein APP

1.1.1. Das klinische Bild der Alzheimerschen Krankheit

Die Alzheimersche Krankheit (Alzheimer's disease, AD) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung des Zentralnervensystems und die häufigste Ursache altersbedingster (seniler) Demenz (De: ohne, mens: Geist, Verstand). Nach Schätzungen leiden etwa 900.000 Menschen in Deutschland an einer Demenz, davon etwa 650.000 an der Alzheimerschen Krankheit (etwa 72 % aller Demenzerkrankungen). Jährlich treten etwa 120.000 neue AD-Fälle auf. Durch die enge Korrelation zwischen Alter und Erkrankungsrate sind zwei Drittel des Krankheitsbestandes und 60 % der Neuerkrankungen über 80-Jährige. Infolge ihrer, im Vergleich mit den Männern höheren, Lebenserwartung entfallen auf Frauen 70 % der Erkrankungen. Bei Altersgleichheit gibt es jedoch keine geschlechtsbezogenen Unterschiede im Erkrankungsrisiko (Bickel, 2000).

Im Gehirn von AD Patienten findet man eine Schädigung von Nervenzellen in der Großhirnrinde sowie im Bereich des limbischen Systems. Besonders die regelmäßig betroffene Hippocampusregion, die für die Gedächtnisleistung des Gehirns verantwortlich ist, bedingt einen Großteil der auftretenden Symptome: Störungen des Kurzzeitgedächtnisses und der Merkfähigkeit, Nachlassen der kognitiven Leistungsfähigkeit sowie in fortgeschrittenen Stadien Störungen der zeitlichen und räumlichen Orientierung, Verlust kommunikativer Fähigkeiten, Inkontinenz und emotionale Störungen. AD-Patienten sind zunehmend in der Bewältigung alltäglicher Anforderungen beeinträchtigt, was bis zur vollständigen Pflegebedürftigkeit führt. (Bickel, 2000).

Die meisten Fälle von AD (90 bis 95 %) treten bei höherem Alter sporadisch auf. Daneben wurden durch genetische Analysen familiärer Formen von AD (FAD) Gene mit autosomal dominantem Erbgang identifiziert, in denen Mutationen zum frühen Auftreten von AD, d. h. vor dem 65. Lebensjahr, führen („präsenile Demenz“). In den Genen für Präsenilin 1 (PS1) auf Chromosom 14, Präsenilin 2 (PS2) auf Chromosom 1 (Übersichtsartikel: Hardy et al., 1998) und im Amyloid-Vorläuferprotein (*amyloid precursor protein*, APP) auf Chromosom 21 (Goate et al., 1991) wurden Mutationen, die präsenile Demenz auslösen, gefunden. Down's Syndrome, welches durch eine Trisomie von Chromosom 21 verursacht

wird, führt ebenfalls zu früher Demenz und AD-ähnlicher Histopathologie (Lemere et al., 1996). Die Gesamtzahl der präsenilen Alzheimer-Erkrankungen in Deutschland wird auf etwas weniger als 10.000 geschätzt (1,5 % aller AD-Fälle). Neben den kausal mit FAD assoziierten Genen wurde eine Reihe von Suszeptibilitätsgenen beschrieben, die in bestimmten allelischen Varianten mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, an AD zu erkranken, assoziiert sind. Die Anwesenheit des $\epsilon 4$ -Allels des Apolipoproteins E beispielsweise führt mit einer 3 - 4fach erhöhten Wahrscheinlichkeit zu AD (Schmechel et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). Auch durch eine polymorphe Variante des α -Makroglobulin wird der Zeitpunkt des Auftretens von AD verkürzt. (Blacker et al., 1998).

Eine Korrelation zwischen den klinischen Symptomen und besonderen, mikroskopisch nachweisbaren Läsionen im Gehirn von dementen Patienten wurde erstmalig 1907 von Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907). Die neuropathologischen Veränderungen bei AD sind durch das gleichzeitige Auftreten zweier charakteristischer Läsionen gekennzeichnet: extrazelluläre amyloide Ablagerungen (*neuritic plaques*) und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (*tangles*) (Abbildung 1). Eine 1984 von Glenner und Wong (1984) durchgeführte biochemische Analyse der neuritischen Plaques führte zur Identifikation des Peptids $\beta A4$ (β -Amyloid, A β ; Peptid mit β -Faltblattstruktur und 4 kD Molekulargewicht), welches ein Spaltprodukt des APP ist. β -Amyloid wurde als Hauptkomponente der Plaques identifiziert und besteht aus 39 bis 42 Aminosäuren. Die Hauptkomponente der neurofibrillären Bündel ist eine hyperphosphorylierte Form des normalerweise mit Mikrotubuli assoziierten Proteins tau (Grundke-Iqbal et al., 1986). In nicht phosphorylierter Form bindet tau an Tubulin und begünstigt die Polymerisation zu Mikrotubuli. Die Hyperphosphorylierung von tau geht mit einem Zusammenbruch des Mikrotubuli-Zytoskeletts in den Nervenzellausläufern einher. Damit verbunden ist eine Störung intrazellulärer Transportsprozesse, was letztlich zur Änderung der Gestalt und dem Absterben der Zelle führt. In vitro-Studien zeigten, dass in Anwesenheit von hohen Konzentrationen von Glykosaminoglykanen rekombinantes, lösliches tau in Filamente umgewandelt werden kann. Diese Filamente liegen als Knäuel paarweise umeinander gewundener Fasern (*paired helical filaments*, PHF) oder als Einzelstränge vor (Goedert et al., 1996). Auch in dystrophen Neuriten, die die Amyloid-Plaques umgeben, erfolgt eine abnormale Akkumulation intrazytoplasmatischer tau-Filamente (Price und Sisodia, 1998). Abnormale tau-Filamente sind jedoch auch in anderen Krankheiten (sogenannten Tauopathien) zu beobachten, in denen die AD-typischen Plaques nicht vorkommen. Mutationen des tau-Gens sind nach derzeitigem Stand der Forschung nicht genetisch mit AD gekoppelt, sondern verursachen Frontal-temporale Demenz

mit Parkinsonismus gekoppelt mit Chromosom 17 (FTDP-17; Hutton et al., 1998; Übersichtsartikel: Goedert et al., 1998).

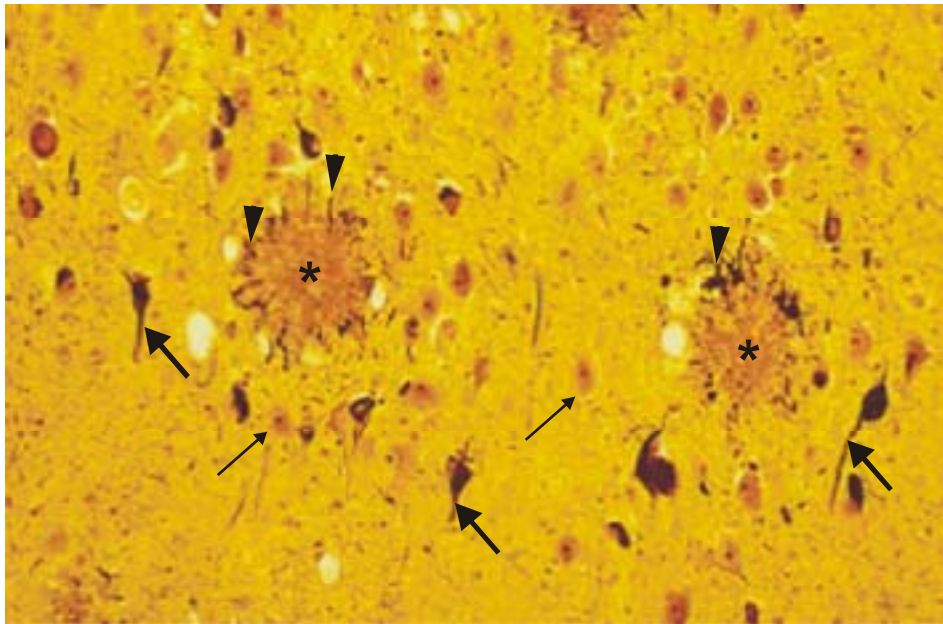


Abbildung 1: Neuropathologische Veränderungen im Gehirn eines Patienten mit Alzheimerscher Krankheit

In diesem Schnitt durch die Amygdala eines Alzheimer Patienten sind durch modifizierte Bielschowsky-Silberfärbung die klassischen neuropathologischen Veränderungen der Erkrankung, neuritische Plaques und neurofibrilläre Bündel, dargestellt. Die beiden Plaques (*) bestehen aus kompakten extrazellulären Ablagerungen von β -Amyloid. Sie sind umgeben von silber-positiven dystrophischen Neuriten (Pfeilspitzen), welche Axone und Dendriten umfassen. Einige der großen Pyramidalneuronen enthalten neurofibrilläre Bündel (dicke Pfeile), die als stark gefärbte Bereiche im perinuklearen Zytoplasma erkennbar sind. Daneben sieht man Pyramidalneuronen (dünne Pfeile) ohne pathologische Veränderungen. (modifiziert nach Selkoe, 1999)

1.1.2. Zellbiologie des Amyloid-Vorläuferproteins

APP ist ein integrales Membranprotein, das eine große N-terminale extrazelluläre Domäne (Ektodomäne), eine singuläre Transmembranregion und einen kurzen intrazellulären Bereich besitzt (siehe Abbildung 2, Seite 11). APP wird durch ein aus 19 Exons bestehendes Gen kodiert, welches sich beim Menschen über einen Bereich von 400 kb erstreckt (Lamb et al., 1993). Durch alternatives mRNA-Spleißen der Exons 7, 8 und 15 und verschiedene posttranslationale Modifikationen werden eine Reihe von Isoformen gebildet, die bei elektrophoretischer Auftrennung einem Satz von Polypeptidbanden einer Größe von 110 bis 140 kD Molekulargewicht entsprechen. Vorwiegend werden die APP-Spleißformen mit 770

oder 751 Aminosäuren überall im Körper exprimiert. APP₇₇₀ und APP₇₅₁ unterscheiden sich durch Exon 8. In Neuronen wird neben diesen beiden Spleißformen überwiegend eine dritte, bestehend aus 695 Aminosäuren gebildet, welche in nichtneuronalen Zellen kaum produziert wird (Haass et al., 1991). Der Unterschied zwischen dem längeren APP₇₅₁ und der kürzeren Form APP₆₉₅ besteht in einem Motiv aus 56 Aminosäuren, das homolog ist zu einer Protease-inhibitor-domäne des Kunitz-Typs (KPI) und durch Exon 7 kodiert wird. Für die KPI-Domäne wurde in vitro eine Funktion bei der Blutkoagulation gezeigt, wobei der Faktor XI inhibiert wird (Smith et al., 1990). Durch Spleißen von Exon 15 entsteht eine Anheftungsstelle für Chondroitin-Sulfat-Glykosaminoglykane (Pangalos et al., 1995), was auf eine Funktion bei der Zelladhäsion hindeutet. Wichtige Bereiche der Ektodomäne des APP sind neben der KPI-Domäne eine saure Domäne, ein Cystein-reicher Abschnitt und das Signalpeptid am N-Terminus (Abbildung 2).

Das APP-Protein gelangt während der Translation in das endoplasmatische Retikulum und über die Golgivesikel zur Membran. Auf diesem konstitutiv sekretorischen Weg wird es durch N- und O-Glycosylierung (Weidemann et al., 1989), Sulphorylierung (Suzuki et al., 1994) und Phosphorylierung (Hung und Selkoe, 1994) modifiziert. Das reife APP wird auf zwei alternativen Wegen proteolytisch prozessiert. Die α -Sekretase (bezeichnet als „ADAM 10“, Lammich et al., 1999; „MDC9 oder Meltrin γ “, Koike et al., 1999) spaltet APP innerhalb der β -Amyloid-Region, wobei es zur Sekretion der löslichen Ektodomäne (sAPP $_{\alpha}$) in das Vesikellumen oder in den extrazellulären Raum kommt (Abbildung 2). Alternativ dazu kann APP durch β - und γ -Sekretasespaltung prozessiert werden, was unter anderem zur Bildung des β -Amyloidpeptids führt. Dabei erfolgt in einem ersten Schritt eine Prozessierung durch die β -Sekretase (Sinha et al., 1999; „*beta-site APP-cleaving enzyme*“, BACE, Vassar et al., 1999; auch als „Asp 2“ bezeichnet, Hussain et al., 1999; Yan et al., 1999), welche APP innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus der A β -Region, 12 Aminosäuren vor der Transmembranregion, spaltet. Dadurch wird analog zur α -Sekretase-Spaltung lösliches sAPP $_{\beta}$ sezerniert. In einem zweiten Schritt generiert die γ -Sekretase-Spaltung den C-Terminus des β -Amyloid-Peptids. Durch Transfektionsexperimente und Studien mit PS1/PS2-Doppel-Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Präseniline eine essentielle Komponente der γ -Sekretase darstellen und möglicherweise selbst als Protease wirken (Moore et al., 2000; Herreman et al., 2000). Die weitere Charakterisierung der in den letzten beiden Jahren identifizierten Sekretasen wird letztendlich klären, in welchem Kompartiment diese

Prozessierungen, vor allem die ungewöhnliche γ -Sekretase-Spaltung innerhalb der Zellmembran, stattfinden. (Übersichtsartikel: De Strooper und Annaert, 2000)

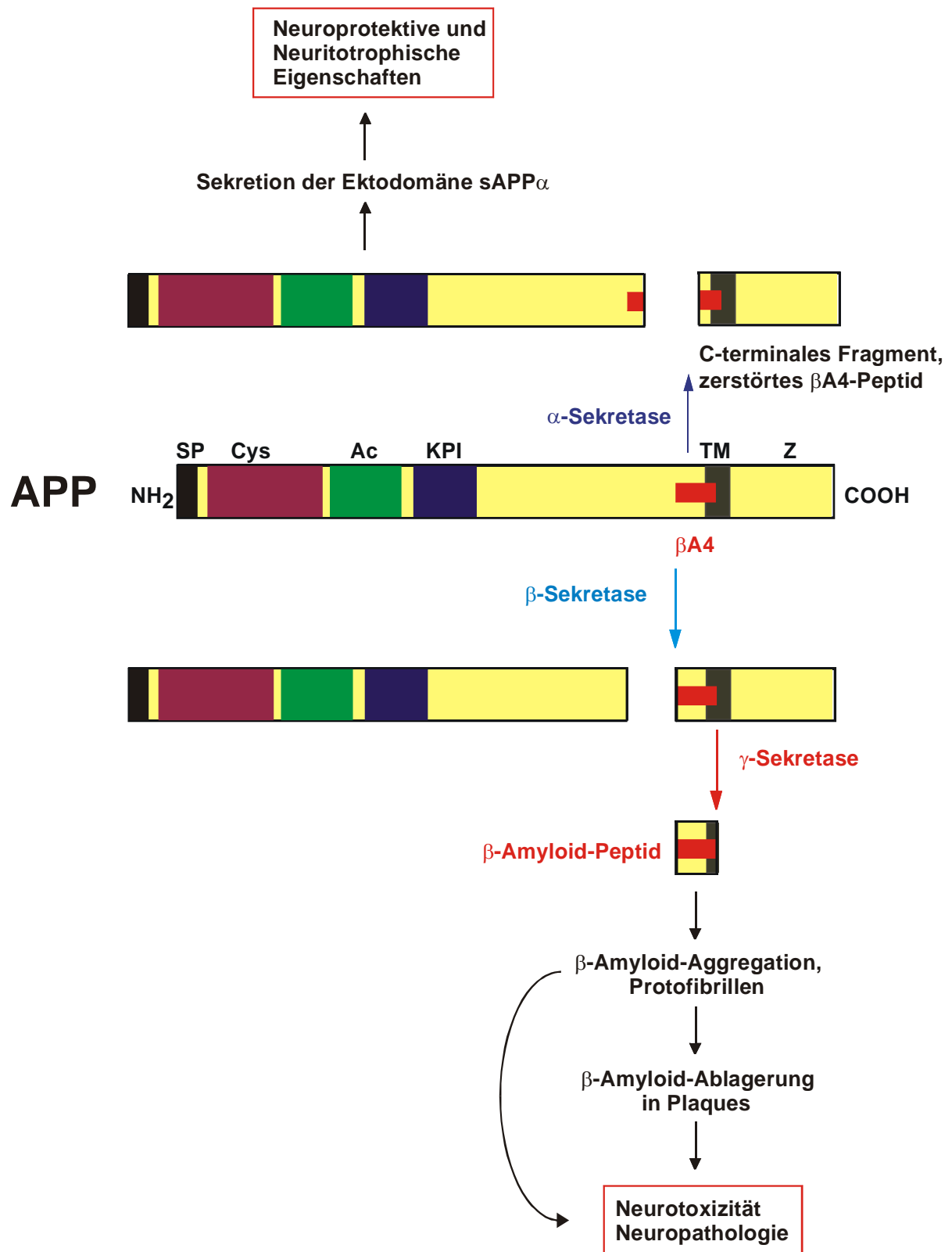


Abbildung 2: Struktur von APP und Prozessierung durch Sekretasen

Das Membranprotein APP besitzt eine große extrazelluläre Domäne am N-Terminus (NH₂), eine singuläre Transmembranregion (TM) und einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt (Z) am C-Terminus (COOH). Wichtige funktionelle Bereiche der Ektodomäne, welche den N-terminalen Abschnitt des Proteins bis zu den Sekretasespaltstellen umfasst, sind die KPI-Domäne (KPI), eine saure Domäne (Ac), eine cysteinreiche Region (Cys) und das Signalpeptid (SP) am N-Terminus. Die α -Sekretase spaltet innerhalb des β -Amyloid-Peptids (β A4). Dabei wird die Ektodomäne sAPP _{α} freigesetzt, welche neuroprotektive und neuritotrophische Eigenschaften besitzt. Durch β - und γ -Sekretase-Spaltung wird das β -Amyloid-Peptid generiert, das sich nach Aggregation in den β -Amyloid-Plaques ablagert, neurotoxisch wirkt und dadurch neuropathologische Veränderungen im Gehirn verursacht.

Die durch Prozessierung von APP gebildeten Spaltprodukte haben verschiedene physiologische und pathologische Eigenschaften (Abbildung 2). Für beide löslichen Ektodomänen wurden neuroprotektive und neuritotrophische Eigenschaften *in vitro* beschrieben (Mattson et al., 1993; Mattson, 1994). Das β -Amyloid wird ebenfalls sekretiert und bildet unter bestimmten Bedingungen unlösliche, fibrilläre Aggregate („Amyloid-Plaques“) mit neurotoxischen Eigenschaften. Extrazelluläre Aggregate des β -Amyloid-Peptid (Protofibrillen, diffuse und reife Plaques) werden derzeit von einer Vielzahl von Forschern als Ursache der Alzheimer-Pathologie angesehen (siehe Amyloid-Kaskaden-Hypothese im Kapitel 1.1.3., Seite 13)

Mit familiären Formen von AD gekoppelte Mutationen des APP-Gens sind selten und wurden bisher nur in etwa 20 Familien identifiziert, in denen die Alzheimersche Krankheit im Alter von 45 bis 65 Jahren auftrat (Selkoe, 1996). Bei allen bisher identifizierten Mutationen handelt es sich um Missense-Mutationen, die innerhalb des β -Amyloid-Peptids selbst oder in unmittelbarer Nähe der Sekretase-Spaltstellen liegen (Abbildung 3) und die Prozessierung von APP beeinflussen. Während die N-terminale Doppelmutation zur Erhöhung der Gesamtmenge von sekretiertem A β führt, beeinflussen die C-terminalen Mutationen die γ -Sekretasespaltung, wodurch es zu einer Erhöhung des relativen Anteils von A β ₄₂ kommt (Selkoe, 2001). Auch die FAD-assoziierten Missense-Mutationen in PS1 und PS2 führen zu einer veränderten Prozessierung des APP mit selektiv erhöhter A β ₄₂-Produktion (Selkoe, 1998).

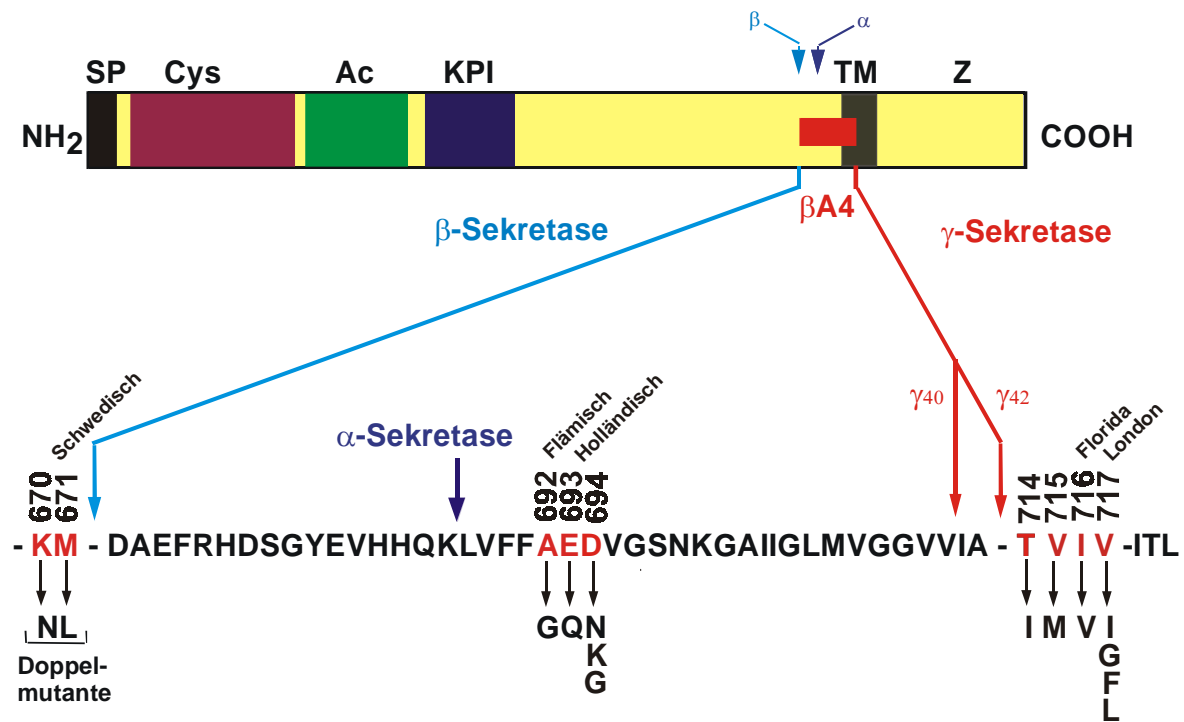


Abbildung 3: Mutationen des APP

Die Abbildung zeigt die Mutationen von APP, die mit familiären Formen von AD gekoppelt sind. Im oberen Bildbereich ist des APP-Protein mit seinen Domänen gezeigt: die Ektodomäne am N-Terminus (NH₂) mit KPI-Domäne (KPI), saurer Domäne (Ac), cysteinreicher Region (Cys) und Signalpeptid (SP); die singuläre Transmembranregion (TM) sowie der zytoplasmatischer Abschnitt (Z) am C-Terminus (COOH). Die Spaltstellen der Sekretasen sind durch Pfeile markiert. Durch β - und γ -Sekretase-Spaltung wird das β -Amyloid-Peptid (β A4) gebildet, welches 40 oder 42 Aminosäuren umfasst. Die α -Sekretase spaltet innerhalb der β A4-Region und verhindert somit die Bildung von β -Amyloid. Im unteren Bildbereich ist die Aminosäuresequenz des β -Amyloid-Peptid dargestellt. Rot markiert sind die Aminosäuren, für die Missense-Mutationen gefunden wurden, welche zu vererbaren familiären Formen von AD führen (modifiziert nach Selkoe, 2001).

1.1.3. Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Anormale Prozessierung von APP und erhöhte Produktion von β -Amyloid spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese vererbbarer AD-Formen, welchen Mutationen im APP-Gen oder in den beiden Präsenilinen zugrunde liegen. Sporadische und vererbare Formen von AD zeigen die gleichen pathologischen Läsionen und den gleichen klinischen Phänotyp. Daraus läßt sich schließen, dass eine veränderte APP-Prozessierung in beiden Fällen eine zentrale Rolle spielt.

Als Modell für die Entstehung der Alzheimerschen Krankheit wird derzeit von einer Vielzahl von Forschern die Amyloid-Kaskaden-Hypothese vertreten (Abbildung 4, Seite 15).

Danach wird die Ablagerung von β -Amyloid als zentrales Ereignis und Ursache für die Neurodegeneration bei AD angesehen. Im Rahmen dieser Hypothese wird die Entstehung der AD-typischen Plaques durch erhöhte Konzentration von fibrillärem $A\beta_{42}$ im Vergleich zu löslichem $A\beta_{40}$ begünstigt. Im Gegensatz zu $A\beta_{40}$ zeigt das hydrophobere $A\beta_{42}$ in vitro eine verstärkte Tendenz zur Präzipitatbildung (Jarrett et al., 1993). Die längere Form ($A\beta_{42}$) wird bereits in früheren Stadien von AD in den sogenannten „diffusen Plaques“ gefunden (Yamaguchi et al., 1989). Derzeit wird angenommen, dass die reifen, neuropathogenen neuritischen Plaques durch zunehmende Einlagerung von $A\beta_{40}$, sowie fibrillärem $A\beta_{42}$, in diffuse Plaques entstehen (Selkoe, 1999; Selkoe, 2001). Ob neben $A\beta$ -Ablagerungen in Plaques auch lösliche, niedermolekulare Aggregate von $A\beta$ zur Neurotoxizität beitragen, ist derzeit noch umstritten. Dafür spricht, dass auch die Vorstufen von Amyloidfibrillen, sogenannte Oligomere und Protofibrillen, neurotoxisch wirken (Übersichtsartikel: Klein et al., 2001). Wenn lösliches ($A\beta$)_n neurotoxisch wirkt, könnten bereits die diffusen Plaques zu Neurodegeneration führen. Möglicherweise ist das Ausmaß von AD davon abhängig, wie viele diffuse Plaques gebildet und in neuritische Plaques umgewandelt werden.

Derzeit ist noch nicht bewiesen, ob die pathologischen Veränderungen im Gehirn von AD-Patienten primär auf die Amyloid-Plaques zurückzuführen sind. Möglicherweise wird die Demenz auch durch andere pathologische Kaskaden hervorgerufen. Insbesondere ist der molekulare Zusammenhang zwischen der Bildung von Amyloid-Plaques und den ebenso neuropathogenen, neurofibrillären Bündeln bisher noch nicht verstanden. Einige Forscher sind deshalb der Ansicht, dass im Gegensatz zur Amyloid-Kaskaden-Hypothese, Veränderungen im Zellstoffwechsel, insbesondere die Hyperphosphorylierung des tau-Proteins, die Ursache der pathologischen Veränderungen in den Neuronen sind. Weitere Gegenargumente zur Amyloid-Kaskaden-Hypothese sind: (1) nur teilweise Korrelation zwischen der Anzahl neuritischer Plaques und dem Ausmaß der Demenz, (2) Nachweis von Amyloidablagerungen fern der Bereiche des Neuronenverlustes, (3) Auftreten von Plaques, im Allgemeinen vor allem diffuser Plaques, bei älteren gesunden Menschen.

Missense Mutationen in APP, PS1 und PS2-Genen**veränderte APP-Prozessierung****erhöhte Produktion von $A\beta_{42}$** **Ablagerung von $A\beta_{42}$ in diffusen Plaques****Einlagerung von $A\beta_{40}$ in diffuse $A\beta_{42}$ Plaques****Bildung neuritischer Amyloid-Plaques****Schädigung und Verlust von Nervenzellen****DEMENZ**

Abbildung 4: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Beschrieben ist die hypothetische Abfolge pathologischer Schritte, die bei der Alzheimerschen Erkrankung zu Demenz führen. (modifiziert nach Selkoe, 2001)

1.2. Die Proteine der APP-Genfamilie und ihre Eigenschaften

1.2.1. Die Proteine der APP-Genfamilie

APP ist evolutionär hoch konserviert. Die APP-Genfamilie umfasst derzeit 16 Proteine verschiedener Spezies (Übersichtsartikel: Coulson et al., 2000).

Nach der Klonierung von humanem APP wurden als weitere Mitglieder der Genfamilie die homologen, humanen Proteine APLP1 und APLP2 (*amyloid precursor-like proteins*) beschrieben (Kang et al., 1987; Paliga et al., 1997; Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1993). Auch in der Maus wurden APP, APLP1 und APLP2 charakterisiert (Yamada et al., 1987; De Strooper et al., 1991; Wasco et al., 1992; Slunt et al., 1994). In Invertebraten wurde jeweils ein homologes Gen identifiziert, z.B. APPL in *Drosophila melanogaster* (Rosen et al., 1989) und APL-1 in *Caenorhabditis elegans* (Daigle und Li, 1993).

Die APLPs zeigen eine dem APP ähnliche Topologie. Drei Domänen (cysteinreiche Region, saure Domäne und zytoplasmatischer Abschnitt) sind zu 40 bis 70 % mit APP identisch (Abbildung 5). Hingegen zeigt der extrazelluläre Bereich, der sich an die Membran anschließt und teilweise die β -Amyloid-Sequenz enthält, keine Homologie. Interessanterweise fehlt den APLPs die β A4-Region.

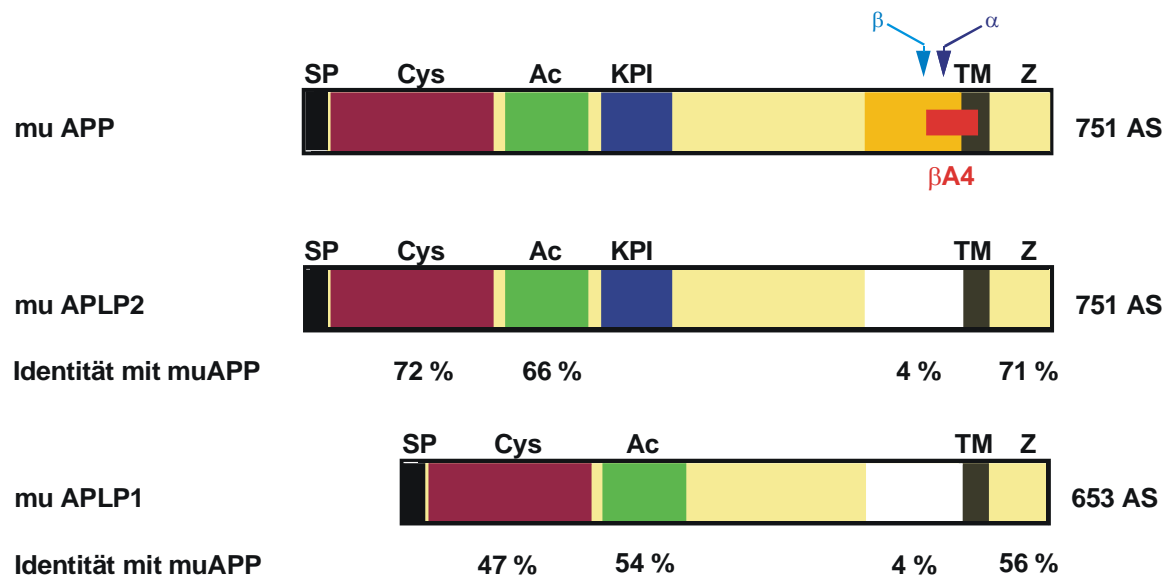


Abbildung 5: APP-Genfamilie der Maus

Dargestellt sind die drei Mitglieder der murinen (mu) APP-Genfamilie. Folgende Domänen sind bezeichnet: Signalpeptid (SP) am N-Terminus, cysteinreiche Region (Cys), saure Domäne (Ac), KPI-Domäne (KPI), Transmembranregion (TM) und zytoplasmatischer Abschnitt (Z) am C-Terminus. Von APP und APLP2 ist die

Isoform mit 751 Aminosäuren (AS) gezeigt, die das Exon 8 nicht enthält. APLP1 besitzt in keiner Spleißvariante eine Isoform mit KPI-Domäne und umfasst 653 Aminosäuren. Auffällig ist, dass die APLPs keine β A4-Region (rot) aufweisen und dass die Region, die sich an die Membran anschließt (weiß), fast keine Identität zur gleichen Region des APP (gelb) besitzt. Hingegen sind cysteinreiche, saure und zytoplasmatische Domäne zu 40 bis 70 % identisch (% Identität mit muAPP). Die Sekretion der Ektodomänen erfolgt bei den APLPs wie beim APP durch α -Sekretasespaltung an der durch den Pfeil markierten Stelle.

Beide APLPs werden wie APP durch α -Sekretasen proteolytisch prozessiert, wobei die Ektodomänen sAPLP1 (Paliga et al., 1997) und sAPLP2 (Nitsch et al., 1996) sezerniert werden. Alternatives Spleißen und posttranslationale Modifizierungen wurden ebenfalls bei den APLPs nachgewiesen (Lyckman et al., 1998).

APLP2 wird sowohl während der Entwicklung als auch in adulten Mäusen ubiquitär, in einem mit APP weitgehend überlappenden Muster, exprimiert. Im Gegensatz dazu wird APLP1 ausschließlich im Nervensystem gefunden (Lorent et al., 1995).

1.2.2. Funktionen der Proteine der APP-Genfamilie

Auf die Funktionen von APP wurde bisher vorwiegend aus in vitro-Experimenten geschlossen (Übersichtsartikel: Mattson, 1997). Meist haben die Ansätze ein Verständnis der durch β -Amyloid hervorgerufenen zytotoxischen Mechanismen, die als Ursache von AD angesehen werden, zum Ziel. Über die physiologischen Funktionen von APP und der möglichen Beeinflussung pathologischer Prozesse durch das Fehlen von APP und APLPs ist jedoch bisher kaum etwas bekannt.

Schutzfunktionen von APP, insbesondere der löslichen APP-Ektodomäne

Eine Schutzfunktion der löslichen, sezernierten Ektodomäne von APP (sAPP) wurde aus Experimenten abgeleitet, in denen der Einfluß von exogen zugegebenem sAPP₆₉₅ und sAPP₇₅₁ an primären Hippocampusneuronen der Ratte untersucht wurde (Mattson et al., 1993). Die Zugabe von sAPP führte bei Hypoglykämie oder Behandlung mit neurotoxisch wirksamem Glutamat zu deutlich höheren Überlebensraten. Weiterhin wurde in kultivierten hippocampalen Neuronen durch die Zugabe von exogenem sAPP₆₉₅ eine Aktivierung von Kaliumkanälen hervorgerufen, die mit Hyperpolarisation und Unterdrückung von Aktionspotentialen einherging (Furukawa et al., 1996). Durch diesen Mechanismus könnte sezerniertes sAPP₆₉₅ in vivo vor neuronaler Übererregbarkeit und dadurch hervorgerufenen

Zellsterben schützen. In APP-Knock-out-Mäusen konnte hingegen nicht beobachtet werden, dass Gewebeschädigung infolge neuronaler Hyperstimulation durch den Glutamatagonisten Kainat auftritt. Nach intraperitonealer Injektion von Kainat wurde bei den APP-Knock-out-Mäusen allerdings eine erhöhte Anfälligkeit für Krämpfe festgestellt (Steinbach et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von APP die Wildtyp-Mäuse vor Krämpfen schützt. In einem anderen transgenen Mausmodell, in dem die Expression des HIV-1 Hüllproteins gp120 Neurodegeneration hervorruft, wurde gezeigt, dass bei gleichzeitiger geringer Überexpression von APP₇₅₁, jedoch nicht von sAPP₆₉₅, der Neuronen- und Synapsenverlust, sowie Gliosen, reduziert werden (Mucke et al., 1995). Daraus wurde auf eine neuroprotektive Funktion von APP₇₅₁ in vivo geschlossen. Eine Schutzfunktion von APP gegenüber zytotoxischen Agenzien konnte ebenfalls in vitro an einer APP-defizienten Neuroblastomazelllinie (B103) gezeigt werden. Nach Transfektion von APP in B103-Zellen war deren Überlebensrate in Gegenwart von Glutamat oder β -Amyloid deutlich erhöht (Schubert und Behl, 1993).

Diese Befunde lassen vermuten, dass eine verringerte Menge von APP, insbesondere von sAPP, zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Exzitotoxinen führt und somit zu neuropathologischen Prozessen beiträgt.

APP ist in Synapsen lokalisiert

Auch aus der Analyse der subzellulären Lokalisation von APP könnte auf mögliche Funktionen geschlossen werden. Für humanes APP₆₉₅, welches über ein Semliki forest-Virus-Expressionsystem in kultivierten Hippocampusneuronen der Ratte exprimiert wurde, konnte der Weg von APP innerhalb der Zelle durch Immunfluoreszenzfärbung eines an APP angehängten myc-Epitopes nachvollzogen werden (Simons et al., 1995). Nach anfänglich ausschließlicher Markierung des Zellkörpers wurde eine zusätzliche Markierung zunächst in den Axonen, später auch in den Dendriten nachgewiesen. Dies wurde auch in Gegenwart von Proteinsyntheseinhibitoren beobachtet. Folglich wird APP zunächst in die Axone transportiert und gelangt später durch Transzytose in die Dendriten. Dabei könnte APP als transzytotischer Rezeptor der intrazellulären Kommunikation zwischen Präsynapsen und Postsynapsen dienen sowie eine Rolle bei der Differenzierung der Nervenzellen spielen. Bei in vivo-Experimenten an Hamstern wurden neusynthetisierte Proteine in Ganglionzellen der Retina radioaktiv markiert und die axonal ins Gehirn transportierten Proteine durch 2D-Gelelektrophorese analysiert. Darunter konnten auch verschiedene Isoformen von APP im Western Blot

detektiert werden (Moya et al., 1994). Demnach wird APP auch in vivo an die Endigungen auswachsender Neuriten transportiert.

Analysen verschiedener Entwicklungsstadien zeigten außerdem eine Hochregulation von APP zum Zeitpunkt des Auswachsens der Axone und der Synaptogenese, was auf eine Funktion von APP bei diesen Prozessen hindeutet. In immunhistochemischen Analysen in Mäusen wurde eine Korrelation des Beginns der APP-Expression im Gehirn und Rückenmark und der neuronalen Differenzierung gefunden (Salbaum und Ruddle, 1994). Eine andere Gruppe zeigte durch Northern Blot-Analysen und in situ-Hybridisierungen von Mäusen verschiedener Entwicklungsstadien einen zunehmenden Anstieg der mRNA-Menge von APP, sowie von APLP2, zwischen E10 und P1, insbesondere auch im Nervensystem (Lorent et al., 1995). Hingegen wurde APLP1 ausschließlich im Nervensystem detektiert, wobei eine Hochregulation an E13 bis E15 und anschließend gleichbleibend hohe Expression bis P1 beobachtet wurde. Die starke APLP1-Expression in diesen Entwicklungsstadien deutet auf eine Funktion von APLP1 in der Entwicklung des Nervensystems hin. In einer anderen Studie wurden APP und APLP1 in Zellfraktionen aus Rattengehirnen mittels Western Blot detektiert. Dabei war APP in der Fraktion synaptischer Membranen angereichert, APLP1 dagegen in der Fraktion mit Proteinen postsynaptischer Dichten, wobei auch hier die Expression in den ersten postnatalen Wochen anstieg (Kim et al., 1995). Daraus wurde abgeleitet, dass APP und APLP1 in verschiedenen Kompartimenten an Synapsen lokalisiert sind, und dass speziell APLP1 eine Funktion während der Synaptogenese hat. Eine andere Studie zeigte ebenfalls den Nachweis von APP mittels Western Blot in Gehirnhomogenaten sowie durch Immunfluoreszenz zusätzlich eine teilweise Kolo-kalisation von APP mit Synaptophysin in Gewebeschnitten (Schubert et al., 1991). Weiterhin wurde durch eine immunelektronenmikroskopische Analyse APP in vesikulären Strukturen der Präsynapse detektiert sowie verteilt über den Zellkörper. Dies bestätigte erneut, dass APP axonal transportiert wird. Die Lokalisation von APP an den Synapsen deutet darauf hin, dass hier APP, oder auch die APLPs, funktionell bedeutsam sind.

APP hat Eigenschaften von Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren

Die strukturellen Eigenschaften des APP lassen verschiedene Funktionen vermuten: Einerseits könnte APP als membranständiges Protein als Rezeptor fungieren. Andererseits könnte die sekretierte Ektodomäne des APP als Ligand an andere Rezeptoren binden. Die Analyse der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von APP₆₉₅ (Aminosäuren 28 bis 123) ergab

strukturelle Ähnlichkeiten mit Cystein-reichen Wachstumsfaktoren, wie z. B. *nerve growth factor* (Rossjohn et al., 1999).

Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl membranständiges APP als auch sAPP als Wachstumsfaktor wirken und das Auswachsen von Neuriten begünstigen könnten. In Experimenten an PC12-Zellen (Milward et al., 1992) und primären Hippocampusneuronen der Ratte (Qiu et al., 1995) wurde dies tatsächlich beobachtet. Für sAPP₇₅₁ wurde ein trophischer Effekt auf Dendriten gezeigt (Mattson, 1994). Eine Unterdrückung der APP-Expression durch antisense-Oligonukleotide führte in primären kortikalen Neuronen zur Inhibition des Auswachsens von Neuriten (Allinquant et al., 1995) und unterstützt damit die Annahme, dass APP neuritotrophisch wirksam ist.

Die Suche nach Liganden, die mit der Ektodomäne von APP interagieren und zu einer spezifischen Signaltransduktion führen, war bisher aus unbekannten Gründen nicht sehr erfolgreich. Jedoch wurden funktionelle Subdomänen des N-Terminus gefunden und charakterisiert: Peptide mit einer RERMS-Sequenz, die von sAPP₆₉₅ abgeleitet war, zeigten wachstumsfördernde Eigenschaften speziell an A-1-Fibroblasten (Ninomiya et al., 1993). Zwei heparinbindende Domänen von APP interagieren mit Heparansulfat-Proteoglykanen und könnten somit eine Interaktion mit der extrazellulären Matrix vermitteln und dadurch an der Regulation des neuronalen Auswachsens beteiligt sein (Small et al., 1994; Multhaup et al., 1994). Charakterisiert sind außerdem eine Zink(II)-Bindungsstelle, die hauptsächlich eine strukturelle Rolle spielt (Bush et al., 1993), und eine Kupfer(II)-Bindungsstelle (Multhaup et al., 1996). Die von APP katalysierte Reduktion von Kupfer (II) zu Kupfer (I) verursacht innerhalb der Zelle oxidativen Streß. Die Untersuchungen neuronaler Kulturen ergab, dass Wildtyp-Neuronen empfindlicher gegenüber Kupfer (II)-induzierter Neurotoxizität waren als APP-Knock-out-Neuronen (White et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass Veränderungen im Kupfer-Stoffwechsel und eine zunehmende Interaktion von Kupfer (II) mit APP in vivo zu Zytotoxizität führen könnte.

Kürzlich wurden durch Interaktionsstudien weitere N-terminale Bindungspartner identifiziert, deren physiologische Relevanz jedoch noch unklar ist: Hämoxygenase (Takahashi et al., 2000), Kinesin-I (Kamal et al., 2000), *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) (Kounnas et al., 1995; Rebeck et al., 2001) und Fibulin-1 (Ohsawa et al., 2001).

Über Interaktionspartner des kurzen zytoplasmatischen C-Terminus des APP ist wesentlich mehr bekannt (Übersichtsartikel: De Strooper and Annaert, 2000). Falls APP als Rezeptor

fungiert, könnten diese Moleküle für die intrazelluläre Signaltransduktion wichtig sein, um die zelluläre Antwort auszulösen. Es wurden mehrere Adaptorproteine beschrieben, die mit Tyrosin-reichen Motiven der zytoplasmatischen Domäne von APP interagieren und verschiedene Prozesse innerhalb der Zelle beeinflussen (Abbildung 6, Seite 23):

Das Protein **Fe65** ist ein typisches zytoplasmatisches Adaptorprotein, das über eine *phosphotyrosine-interaction domain* (PID) mit der NPXY-Sequenz des APP interagiert (Borg et al., 1996; Russo et al., 1998). Eine zweite PID von Fe65 bindet den Transkriptionsfaktor LSF (Zambrano et al., 1998). Die Komplexbildung von LSF mit Fe65 und APP könnte demnach die Genregulation beeinflussen. Als weiterer Bindepartner der zweiten PID von Fe65 wurde kürzlich die Histon-Azetyltransferase Tip60 identifiziert (Cao und Sudhof, 2001). In Transfektionsexperimenten an Zelllinien wurde nach Überexpression von APP-Fusionsproteinen, welche DNS-bindende Domänen enthielten, eine Aktivierung der Transkription durch den APP-Fe65-Tip60-Komplex beobachtet. Falls dieser Komplex auch in vivo an der Regulation der Transkription beteiligt ist, müsste er allerdings ein zusätzliches DNS-bindendes Protein enthalten, welches jedoch bisher noch nicht identifiziert wurde.

Außerdem kann Fe65 über ein WW-Motiv an Mena (*mammalian homologue of Drosophila enabled*) binden (Ermekova et al., 1997; Ermekova et al., 1998). Mena ist stark angereichert in fokalen Zellkontaktstellen (*focal adhesion complexes*) und in Bereichen mit vermehrter Reorganisation von Aktin, wie z.B. in Lamellipodien oder in Filopodien an der Spitze auswachsender Axone (Lanier et al., 1999; Rottner et al., 1999). Eine Komplexbildung von APP, Fe65 und Mena in Lamellipodien wurde kürzlich durch Kollokalisations- und Immunpräzipitationsstudien in H4-Neurogliomazellen gezeigt (Sabo et al., 2001). Über diesen APP-Fe65-Mena-Komplex könnte eine Signalkette zum Zytoskelett gebildet und die Aktin-Reorganisation beeinflusst werden.

Der Faktor **X11** (Borg et al., 1996) bindet ebenfalls über eine PID kompetitiv an dasselbe NPXY-Motiv im APP und vermittelt auch Interaktionen zu weiteren Partnern. Einer dieser Partner ist das Protein Munc18, welches an der Exozytose synaptischer Vesikel beteiligt ist. X11 wird deshalb auch als Mint-1 (*Munc18-interacting protein 1*) bezeichnet (McLoughlin et al., 1999). Außerdem ist eine Komplexbildung von X11 mit weiteren Proteinen, z. B. CASK und Neurexin (Butz et al., 1998), beschrieben, die an der präsynaptischen Membran erfolgt und Zelladhäsion vermittelt.

Die Überexpression von Fe65 führt zu einer erhöhten Menge an membranständigem APP, welches zu erhöhten Mengen von A β und sAPP prozessiert wird (Sabo et al., 1999). Im Gegensatz dazu reduziert X11 die APP-Prozessierung und Bildung von A β (Borg et al.,

1998). Dies deutet darauf hin, dass die Balance beider Proteine für die Regulation des Stoffwechsel von APP und der Bildung von β -Amyloid sowie für die Vermittlung von Interaktionen zu anderen Proteinen von Bedeutung ist.

Dieses Gleichgewicht könnte möglicherweise zusätzlich beeinflusst werden durch **mDab1** (*mammalian homologue of Disabled*), welches ebenfalls über eine PID an das gleiche NPXY-Motiv von APP (Trommsdorff et al., 1998), sowie der APLPs, bindet (Homayouni et al., 1999). In phosphoryliertem Zustand binden an diese PID weitere intrazelluläre Kinasen (z. B. Abl, Fyn, Src), wodurch möglicherweise eine Verbindung von APP mit weiteren Phosphorylierungs-abhängigen Signalkaskaden hergestellt werden könnte. Interessanterweise zeigen mDab1-Knock-out-Mäuse eine Phänotyp, der einen Defekt der kortikalen Schichtung aufweist („*reeler mouse*“; Howell et al., 1997). Das Protein mDab 1 wurde als intrazelluläre Komponente des Reelin-Signaltransduktionsweges identifiziert, durch den unter anderem die neuronale Migration koordiniert wird. Mutationen aller beteiligten Moleküle, welche das Signal des Liganden Reelin weiterleiten, führen zu neuronalen Migrationsdefekten (Übersichtsartikel: Walsh, 2000). Die intrazelluläre Bindung von mDab1 an APP und APLPs lässt eine ähnliche Signaltransduktionskaskade und eine Rolle von APP und APLPs bei der Ausbildung der neuronalen Schichten im Kortex vermuten.

Weiterhin fungiert das Motiv NPXY im zytoplasmatischem Abschnitt von APP als Internalisierungssignal, das von **Clathrin** gebunden wird. Tatsächlich wurde APP in isolierten *clathrin-coated* Vesikeln aus PC12-Zellen identifiziert (Nordstedt et al., 1993). Durch die Internalisierung wird möglicherweise die Menge an membranständigem APP reguliert, oder sie dient der Aufnahme von derzeit noch unbekanntem Liganden und weiterer intrazellulärer Prozessierung.

Darüber hinaus wurden weitere Interaktionspartner des C-Terminus von APP beschrieben, welche nicht an das NPXY-Motiv binden. Für die Interaktion von APP mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein **PAT1** (*protein interacting with the APP tail 1*; Zheng et al., 1998) war der erste Tyrosinrest nach der Membranregion von APP notwendig, welcher auch entscheidend für den basolateralen Transport von APP in epithelialen Madin-Darby canine kidney (MDCK)-Zellen war (De Strooper et al., 1995). Demnach ist anzunehmen, dass die Assoziation von PAT1 mit APP die Bindung an Mikrotubuli sowie den intrazellulären Transport von APP beeinflusst.

Eine weitere Interaktion von APP mit dem GTP-bindenden Protein **G₀** (Nishimoto et al., 1993) lässt eine Beteiligung von APP an weiteren Signaltransduktionskaskaden vermuten.

In Zellkulturen wurde gezeigt, dass APP mit FAD-Mutationen das G₀-Protein aktivieren und Apoptose induziert kann (Giambarella et al., 1997; Yamatsuji et al., 1996).

Als weiterer Bindepartnern des C-terminalen Bereichs von APP wurde **APP-BP1** (*APP binding protein 1*) gefunden (Chow et al., 1996). Es wurde jedoch bisher keine funktionelle Analyse dieser Interaktion durchgeführt.

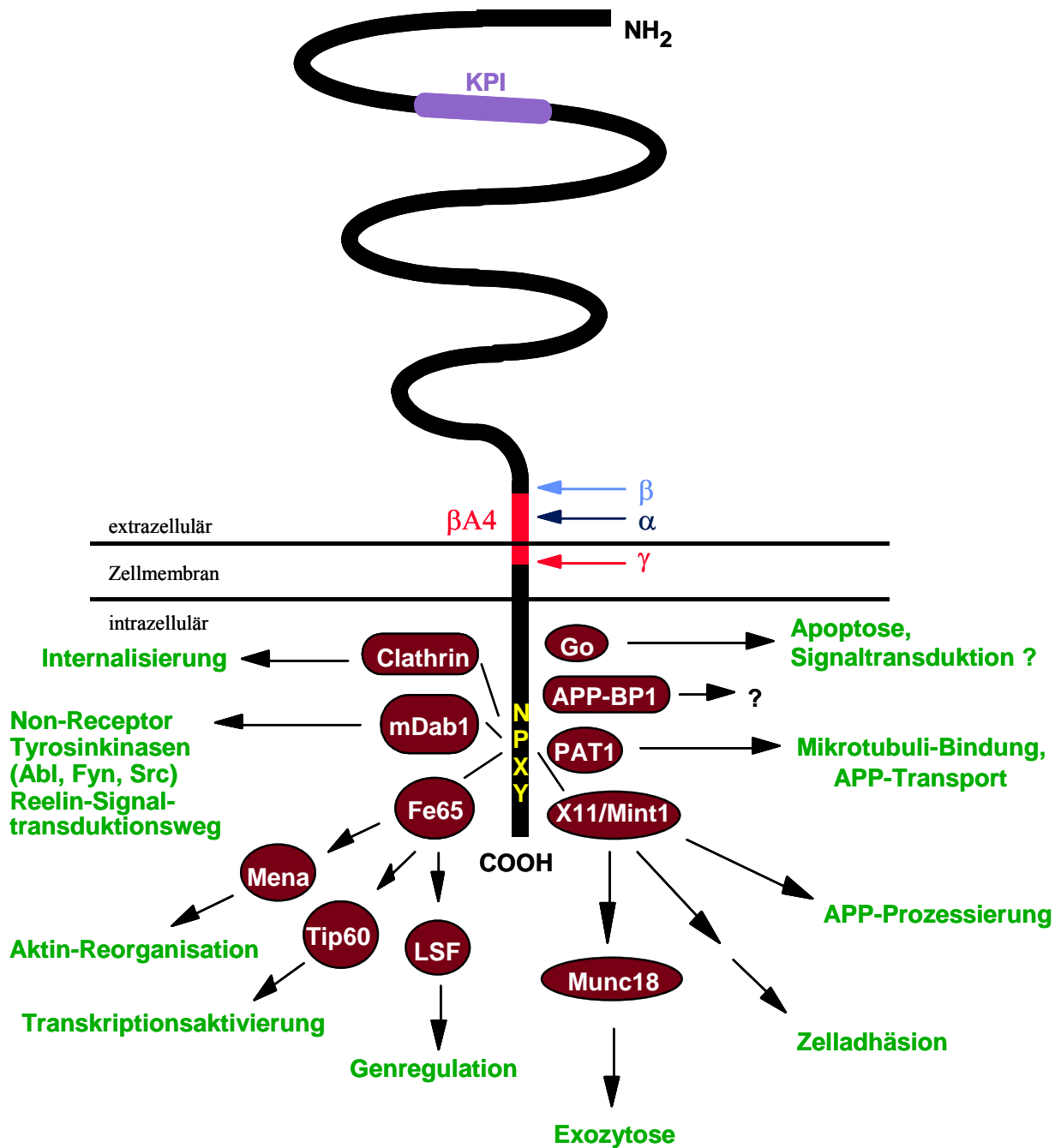


Abbildung 6: Bindepartner des intrazellulären C-Terminus von APP

Die Abbildung zeigt das in der Zellmembran verankerte APP, welches extrazellulär die KPI-Domäne und intrazellulär die Aminosäuresequenz NPXY aufweist. Die Schnittstellen der Sekretasen sind ebenfalls markiert (α , β , γ). Die hier dargestellten und im Text näher beschriebenen Bindepartner des C-Terminus von APP binden an das NPXY-Motiv (durch Striche markiert) oder an andere Abschnitte. Pfeile verweisen auf die zellulären Signaltransduktionswege, die durch die entsprechenden Komplexe, z.T. mit weiteren Interaktionspartnern, beeinflusst werden könnten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Reihe von Molekülen beschrieben wurden, die mit dem C-Terminus von APP interagieren. Es wurde jedoch bisher kein Ligand charakterisiert, der mit typischer Sättigungskinetik an den N-Terminus von APP bindet und ein spezifisches intrazelluläres Signal auslöst. Deshalb bleibt eine mögliche Rezeptorfunktion von APP weiterhin hypothetisch.

APP ist ein Adhäsionsprotein

Für in vitro-Experimente wurde rekombinant hergestelltes, sezerniertes APP₇₅₁ und APP₆₉₅ aufgereinigt und für die Beschichtung von Kulturschalen verwendet. Beide Isoformen von APP stimulierten die Adhäsion von PC-12-Zellen, die sich auf diesem Substrat 10fach besser anhefteten als auf Laminin (Schubert et al., 1989). Auch die Expression von membranständigem APP in APP-defizienten B103-Zellen führte zu einer vermehrten Anheftung der Zellen auf Kollagen IV-Substrat (Schubert und Behl, 1993). Dies bestätigt eine Rolle von APP, insbesondere seiner Ektodomäne, bei der Zelladhäsion.

Funktionen von APLP2

Speziell für APLP2 wurde gefunden, dass die Chondroitinsulfat-Glykosaminoglykan-modifizierte Form in sensorischen Neuronen des olfaktorischen Epithels, welche auch im adulten Nervensystem ständig regeneriert werden, angereichert ist. Dies läßt auf eine mögliche Funktion von APLP2 bei der Migration und Differenzierung dieser Neuronen schließen (Thinakaran et al., 1995). Eine verstärkte Expression von APLP2 trat außerdem bei der Heilung von mechanisch verletztem Korneaepithel an den Wundrändern auf. Da die epitheliale Zellmigration genau an diesen Stellen auftritt, deutet dies ebenfalls darauf hin, dass APLP2 für Migration und Zell-Matrix-Interaktionen von Bedeutung sein könnte (Guo et al., 1998).

Funktionen von APLP1

Für APLP1 wurden bisher noch keine weiteren funktionellen Untersuchungen durchgeführt.

1.3. Transgene Mausmodelle

1.3.1. Transgene Tiermodelle in der biomedizinischen Forschung

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung neuer Medikamente ist ein Verständnis der pathologischen Veränderungen, welche ein bestimmtes Krankheitsbild hervorrufen. Eine gezielte Beeinflussung dieser Vorgänge ist jedoch nur möglich, wenn auch die normalen, physiologischen Funktionen der beteiligten Moleküle verstanden sind und daraus die pathologischen Mechanismen abgeleitet werden können, die zu Fehlfunktionen führen.

Für viele Erbkrankheiten des Menschen wurden durch die Erzeugung genetisch manipulierter Tiere experimentelle Systeme gefunden, durch die Pathogenesemechanismen charakterisiert und neue Therapien getestet werden können.

Genetisch manipulierte Tiere besitzen ein permanent verändertes Genom und werden als transgene Tiere oder Knock-out-Tiere bezeichnet (Übersichtsartikel: Müller, 1999; Ge, 1999). Bei transgenen Tieren wird das Genom durch Einbringen von zusätzlichen Genkopien in den Embryo verändert. Transgene Mäuse werden durch Injektion rekombinanter DNS in den Vorkern einer befruchteten Eizelle hergestellt. Nach der Injektion integriert diese DNS stabil, an zufälliger Stelle, im Genom. Im Gegensatz zu transgenen Mäusen, die über zusätzliche Genkopien verfügen, werden bei Knock-out-Mäusen endogene Gene gezielt inaktiviert (Nullmutation). Hierzu wird das Genom embryonaler Stammzellen *in vitro* durch homologe Rekombination verändert; es wird beispielsweise die kodierende Region des Zielgens an spezifischer Stelle durch Einbringen eines Resistenzgens unterbrochen. Anschließend werden diese Stammzellen in Blastozysten injiziert, die nach Reimplantation in scheinträchtige Weibchen chimäre Mäuse hervorbringen. Wenn auch die Keimzellen der chimären Mäuse das veränderte Gen tragen, wird es heterozygot an die Folgegeneration weitergegeben. Homozygote Knock-out-Mäuse, in denen beide Allele des Zielgens deletiert sind, werden durch Kreuzung heterozygoter Mäuse generiert. Die Analyse des Phänotyps (z. B. der Fehlfunktionen) von Knock-out-Mäusen ermöglichen Rückschlüsse auf die normale Funktion des ausgeschalteten Gens.

Allgemein wird der Begriff „transgene Maus“ als Sammelbegriff im Sinne von „genetisch verändert“ oft auch für Knock-out-Mäuse verwendet.

1.3.2. Mausmodelle der Alzheimerschen Krankheit

Bisher wurde eine Vielzahl von Mausmodellen entwickelt mit dem Ziel, die Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit nachzuvollziehen, um damit die Ätiologie klären zu können und Medikamente zu testen (Übersichtsartikel: Sturchler-Pierrat und Sommer, 1999).

Das erste erfolgreiche transgene AD-Modell war 1995 die PD-APP-Maus (Games et al., 1995). Unter Kontrolle des *platelet-derived growth factor* (PDGF)- β -Promotors wurde ein humanes APP-Minigen mit der V717F -Mutation überexprimiert. Dies führte nach sieben Monaten zu extrazellulären β -Amyloid-Ablagerungen, dystrophischen Neuriten, Gliosen und Synapsenverlust. Diese pathologischen Veränderungen traten verstärkt mit zunehmendem Alter auf. Jedoch wurden keine neurofibrillären Bündel beobachtet.

Eine andere transgene Mauslinie (Tg2576), welche humanes APP₆₉₅ mit der schwedischen Doppelmutation unter der Kontrolle des Hamster-Prion-Protein-Promotors überexprimiert (Hsiao, 1998), entwickelt Amyloid-Plaques nach einem Jahr. Zudem wurden bei diesen Mäusen altersabhängige Lerndefizite beobachtet (Chen et al., 2000).

Es gibt bis jetzt jedoch nur eine Mauslinie (APP23), die sowohl Amyloid-Plaques als auch hyperphosphoryliertes tau-Protein, ähnlich der pathologischen Veränderungen bei AD, bildet (Sturchler-Pierrat and Sommer, 1999). Bei dieser transgenen Maus wird APP₇₅₁ mit der schwedischen Doppelmutation K670N / M671L unter der Kontrolle des murinen Thy-1 - Promotors überexprimiert. APP23-Mäuse entwickeln nach sechs Monaten erste β -Amyloid-Ablagerungen. Erstmals konnte bei diesen Mäusen auch eine altersabhängige Hyperphosphorylierung des tau-Proteins, jedoch keine voll ausgebildeten *tangles* (neurofibrilläre Bündel) nachgewiesen werden.

Demnach führen sämtliche Mausmodelle mit Überexpression von APP mit FAD-assozierten Mutationen zur Ausbildung reifer, neuritischer Plaques. Zudem wird die Plaque-Pathologie durch andere genetisch mit AD gekoppelte Proteine moduliert. Durch zusätzliche Überexpression von Präsenilinen mit FAD-assozierten Mutationen kann der Zeitraum bis zum Auftreten der ersten Plaques verkürzt werden (Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998).

Diese Mausmodelle erwiesen sich als sehr nützlich, um die pathologischen Mechanismen bei der Entstehung von AD nachzuvollziehen und ermöglichten erste Tests neuer Therapieansätze. Derzeit liegen bereits vielversprechende Ergebnisse von Studien vor, in denen die Auswirkungen einer Immunisierung mit dem A β ₄₂-Peptid getestet wurden. In PD-APP-

Mäusen konnte durch eine frühe Immunisierung mit dem A β ₄₂-Peptid im Alter von 6 Wochen das Auftreten des AD-ähnlichen Phänotyps (β -Amyloid-Plaques, dystrophische Neuriten, Astrogliose, Defizite in Lerntests) verhindert werden (Morgan et al., 2000). Wurde erst nach Ausbildung der Plaques im Alter von 11 Monaten mit A β ₄₂ immunisiert, führte dies zum Stop der Progression und zur Reduktion der bestehenden AD-ähnlichen Pathologie (Schenk et al., 1999). Weiterhin wurde in PD-APP-Mäusen gezeigt, dass auch intraperitoneal verabreichte A β -Antikörper die Entstehung von Plaques verhindern bzw. rückgängig machen können, wobei diese Antikörper durch die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen und die Plaques mit Hilfe von Mikrogliazellen aufgelöst werden (Bard et al., 2000). Kürzlich zeigten Studien zudem, dass durch A β ₄₂-Immunisierung nicht nur die Plaque-Pathologie reduziert werden konnte, sondern auch Verbesserungen in kognitiven Tests erreicht wurden (Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000).

1.3.3. APP-Knock-out-Mäuse

Im Gegensatz zu den Mausmodellen mit Überexpression von APP wird mit Hilfe von APP/APLP-Knock-out-Mausmodellen angestrebt, die physiologischen Funktionen dieser Proteine *in vivo* zu analysieren.

Erste Ansätze zur Erzeugung von APP-defizienten Mäusen führten zunächst zur Generation von sogenannten APP $\Delta\Delta$ -Mäusen. Durch homologe Rekombination wurde in Exon 2 eine Neomycin-Kassette eingeführt und die kodierende Region unterbrochen. Infolge von abnormalem Speißen („*Exonskipping*“: Fusion von Exon 1 und 3) des veränderten APP-Gens exprimieren diese Mäuse noch ca. 5 % einer modifizierten Form von APP (APP Δ), welche eine Deletion von Exon 2 aufweist (Müller et al., 1994). Homozygote APP $\Delta\Delta$ -Mäuse sind 15 bis 20 % leichter als Wildtyp-Mäuse, zeigen eine Reduktion der Muskelzugkraft sowie geringere Lokomotoraktivität und schwere Beeinträchtigungen ihres Erkundungsverhaltens und räumlichen Lernvermögens. Neurologische Tests der APP $\Delta\Delta$ -Mäusen ergaben Defizite in der postnatalen sensomotorischen Entwicklung. Besonders ausgeprägte Retardationen (erhöhte Empfindlichkeit gegenüber taktilen Reizen, verstärkte akustische Schreckreaktion) zeigten sich während der zweiten bis vierten Woche nach der Geburt (Tremml et al., 1998). Zheng und Mitarbeiter generierten 1995 die erste vollständig APP-defiziente Maus (APP $^{-/-}$), indem sie durch homologe Rekombination einen Teil des Promotors sowie das erste Exon des APP-Gens deletierten (Zheng et al., 1995). Diese APP $^{-/-}$ -Mäuse sind lebensfähig und fertil

und besitzen einen zu APP^{ΔΔ}-Mäusen sehr ähnlichen Phänotyp. Im Gegensatz zu APP^{ΔΔ}-Mäusen wiesen 4 von 6 analysierten APP^{-/-}-Mäusen im Alter von 14 Wochen eine reaktive Astroglieose auf.

Unabhängig davon wurde eine weitere APP^{-/-}-Mauslinie hergestellt, bei der durch cre/lox-vermittelte Rekombination ein 200 kb großer, die Exons 2 bis 17 umfassender Abschnitt des APP-Gens deletiert wurde (Li et al., 1996). Bei diesen APP^{-/-}-Mäusen wurden dieselben relativ milden phänotypischen Auffälligkeiten wie bei den von Zheng et al. generierten APP^{-/-}-Mäusen gefunden, das Auftreten von Astroglieose wurde jedoch nicht beobachtet.

Als einzige morphologische Veränderung wurde bei APP^{ΔΔ}-Mäusen, sowie bei APP^{-/-}-Mäusen (Li et al., 1996), eine Agenesie des Balkens beobachtet (Müller et al., 1996). Dieser Phänotyp ist jedoch abhängig vom genetischen Hintergrund des Mausstamms und tritt mit hoher Penetranz nur bei APP^{-/-}-Mäusen mit dem genetischen Hintergrund der 129-Mausstämme auf (Magara et al., 1999).

Weiterhin wurde für APP^{ΔΔ}- und APP^{-/-}-Mäuse eine Hypersensitivität gegenüber Krämpfen beschrieben, die durch intraperitoneale Kainatinjektion induziert wurden (Steinbach et al., 1998). Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen war bei den Knock-out-Mäusen die Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten Krämpfe auf die Hälfte verkürzt, die Krämpfe waren schwerer und mit einer erhöhten akuten Sterblichkeit verbunden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit der von Li et al. generierten APP^{-/-}-Mauslinie durchgeführt.

1.3.4. APLP1-Knock-out-Mäuse

APLP1-defiziente Mäuse (APLP1^{-/-}) wurden durch eine genomische Deletion von 8 kb generiert, welche die Promotorregion und etwa die Hälfte der kodierenden Region des APLP1-Gens umfasst (Heber et al., 2000). APLP1^{-/-}-Mäuse sind lebensfähig und fertil und zeigen mit Ausnahme einer Gewichtsreduktion von 10 % keine phänotypischen Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen.

1.3.5. APLP2-Knock-out-Mäuse

Bisher wurden zwei APLP2-defiziente (APLP2^{-/-}) Mauslinien mit sehr unterschiedlichen Auswirkungen auf den Phänotyp beschrieben:

Zuerst berichteten von Koch und Mitarbeiter von APLP2^{-/-}-Mäusen, bei denen der Promotor und das erste Exon des APLP2-Gens deletiert wurden und keinerlei APLP2-Proteinexpression nachgewiesen werden konnte (von Koch et al., 1997). Diese Mäuse wurden mit normaler Häufigkeit, Größe und Gewicht geboren. Es konnten keine Reduktion der Lebensdauer oder Beeinträchtigungen der Fertilität und des Lernverhaltens festgestellt werden.

Eine zweite, von Rassoulzadegan und Mitarbeitern (1998) generierte, APLP2^{-/-}-Mauslinie zeigte im Gegensatz dazu embryonale Letalität im Blastozystenstadium.

Beide APLP2^{-/-}-Mauslinien unterscheiden sich fundamental in der gewählten *Gentargeting*-Strategie. Während bei von Koch et al. die APLP2-Expression bereits auf der Ebene der Transkriptionsinitiation (durch Deletion des Promotors) unterbrochen wurde, wurde bei der letalen APLP2^{-/-}-Mauslinie eine 11,35 kb große, intragene genomische Deletion eingeführt, die Exon 7 bis 14 des APLP2-Gens umfasst. Da Promotorbereich und Exon 1 bis 6 intakt sind, wäre es denkbar, dass von diesem Genlokus weiterhin ein verkürztes APLP2-Protein exprimiert werden könnte, das transdominante Eigenschaften besitzt und zur Letalität führt. Leider fehlen in der Arbeit von Rassoulzadegan et al. Northern- oder Westernblots, die eine eventuell vorhandene residuale APLP2-Expression aufzeigen könnten. Außerdem ist wegen der Größe des deletierten Bereichs im APLP2-Gen auch nicht auszuschließen, dass der beobachtete Defekt durch die Zerstörung unbekannter regulatorischer Elemente der Introns hervorgerufen wird.

Ähnliche Konstrukt-abhängige Diskrepanzen des Phänotyps von Knock-out-Mauslinien wurden auch bei anderen Genen, beispielsweise des *prion protein* (PrP)-Genlokus, beobachtet (Bueler et al., 1992; Li et al., 2000).

1.3.6. APP/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäuse

Durch Kreuzung der APP^{-/-}- (Zheng et al., 1995) und APLP2^{-/-}-Mäuse (von Koch et al., 1997) erzeugte Doppelmutanten zeigten im Gegensatz zu dem relativ unauffälligen Phänotyp der Einfach-Knock-out Mäuse eine stark erhöhte Sterblichkeit innerhalb der ersten postnatalen Woche. Lediglich etwa 20 % dieser Mäuse waren lebensfähig. Bei diesen Mäusen wurden eine Gewichtsreduktion von 20 bis 30 % sowie Bewegungs- und Balancedefizite und verminderte Fortpflanzungsraten beobachtet (von Koch et al., 1997).

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die physiologischen Funktionen der Proteine der APP-Genfamilie besser zu verstehen. Dazu sollten Knock-out-Mäuse mit kombinierten Gendefekten generiert werden. Die Charakterisierung dieser Mäuse sollte Hinweise auf die zellulären Wirkungsmechanismen dieser Proteine geben.

Zunächst sollten alle drei möglichen APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäuse (APP^{-/-} APLP1^{-/-}; APP^{-/-}APLP2^{-/-}; APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}) generiert und die Frage beantwortet werden, ob die unerwartet geringfügigen phänotypischen Auffälligkeiten der Einfach-Knock-out-Mäuse auf eine funktionelle Komplementation innerhalb der APP-Genfamilie zurückzuführen sind. Dafür sollte eine umfassende anatomische und histologische Analyse der APP/APLP - Doppel-Knock-out-Mäuse im Hinblick auf folgende Fragen durchgeführt werden: Führt der Verlust der APP/APLP-Proteine zu Veränderungen der neuronalen Migration und möglicherweise zu einer Umstrukturierung der charakteristischen Schichten im Gehirn ? Ist eine veränderte Synapsendichte und / oder vermehrter neuronaler Zelltod zu beobachten ?

Weiterhin sollten Untersuchungen an primären neuronalen Kulturen der Einfach- und Doppel-Knock-out-Mäuse zusätzliche Hinweise auf mögliche Funktionen von APP und APLPs für die neuronale Differenzierung und Synaptogenese ergeben. Hierzu sollten geeignete in vitro-Systeme etabliert werden.

Im Einzelnen sollten an primären Hippocampuskulturen mit geringer Zelldichte das Auswachsen von Neuriten und die Synapsenbildung untersucht werden. Durch immun-histochemische Färbungen wurde eine Darstellung von präsynaptischen Strukturen (Synaptophysin) und charakteristischer exzitatorischer (Glutamat- und NMDA-) Rezeptoren und inhibitorischer (Glycin- und GABA-) Rezeptoren der Postsynapse angestrebt. Durch konfokale Kolkalisierungsanalysen sollte die normale Aggregation von Rezeptoren („Clustering“) an den Nervenendigungen geprüft werden. Diese immunhistochemischen Rezeptorfärbungen sollten ebenfalls an Gewebeschnitten des Rückenmarks durchgeführt werden.

Ausgehend von in vitro-Untersuchungen zu neuroprotektiven Funktionen der APP-Genfamilienmitglieder sollte die Frage beantwortet werden, ob der Funktionsverlust der APP/APLP-Proteine mit reduzierten Überlebensraten der Neuronen in vitro, insbesondere mit

einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber zytotoxischen Agenzien (Glutamat, β -Amyloid), einhergeht. Dazu sollten primäre Kortexkulturen mit hoher Zelldichte der Doppel-Knock-out-Mäuse mit Wildtyp- und Einfach-Knock-out-Kulturen verglichen werden.

Des Weiteren sollten Tripel-Knock-out-Mäuse generiert werden, um eine Kompensation durch das dritte Mitglied der Genfamilie auszuschliessen. Eine Analyse dieser Tripel-Mutanten, in denen sämtliche APP/APLP-Proteine ausgeschaltet werden, sollte letztlich auf die in vivo-Funktion der Proteine der APP-Genfamilie schließen lassen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: AppliChem, Darmstadt; GibcoBRL, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Taufkirchen und Roth, Karlsruhe. In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (pro analysis) verwendet. Wasser zur Herstellung von Lösungen wurde mit dem Milli-Q-Water-System (Millipore, Eschborn) gereinigt.

2.1.2. Puffer

PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7,2

- für Immunfärbungen	137 mM NaCl	8 g / l
	2,7 mM KCl	0,2 g / l
	8 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,44 g / l
	1,47 mM KH ₂ PO ₄	0,2 g / l
- für die Zellkultur	154 mM NaCl	9 g / l
	40 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	7,18 g / l
	5 mM KH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,68 g / l
Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4	Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	21,71 g / l
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,62 g / l
TAE 50x (Stocklösung)	2 M Tris	242 g / l
	50 mM EDTA	100 ml (0.5 M, pH 8) / l
	Eisessig	57,1 ml / l
TE, pH 8	10 mM Tris	500 µl (1M) / 50 ml
	1 mM EDTA	100 µl (0.5 M, pH 8) / 50 ml

Zur Sterilisierung wurden die Lösungen 40 Minuten bei 120 °C autoklaviert.

2.1.3. Versuchstiere

Als Kontrollmäuse wurden Wildtyp-Mäuse der Linien 129SvEv und C57BL/6 von Charles River (Sulzfeld) und RCC Biotechnology (Füllinsdorf, CH) bezogen und von diesen eine eigene Zucht unterhalten. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit einem Lichtzyklus von 12 Stunden, wobei die Tiere ständigen Zugang zu Futter (ssniff[®] R/M-H, keimfrei; ssniff, Soest) und Wasser hatten.

Folgende Einfach-Knock-out-Mäuse (Tabelle 1) wurden aus den angegebenen Labors erhalten und für die weitere Züchtung eingesetzt:

Stamm	genetischer Hintergrund	Herkunft	Referenz
APP ^{-/-}	C57BL/6 x 129Ola	Universität Zürich, CH	Li et al., 1996
APLP1 ^{-/-}	C57BL/6 x 129SvEv	Universität Zürich, CH	Heber et al., 2000
APLP2 ^{-/-}	C57BL/6 x 129SvEv	John Hopkins Universität Baltimore, USA	von Koch et al., 1997

Tabelle 1: Einfach-Knock-out-Mäuse und ihre Herkunft

2.1.4. Oligonukleotide

Zur Genotypisierung der Knock-out-Mäuse wurden die in Tabelle 2 angegebenen Primer für die PCR verwendet, welche über die Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen wurden. Die lyophilisierte DNS wurde in TE aufgenommen, sodass die Konzentration der Primer-Stocklösungen 100 µM betrug.

Primer	Sequenz	Referenz
UM44	5'-GAGACGAGG ACGCTCAGTCCTAGGG-3'	Heber et al., 2000
UM43	5'-AGAAATTAATGCTAGGAGTCATTAC-3'	Heber et al., 2000
UM42	5'-ATCACCTGGTTCTAATCAGAGGCC-3'	Heber et al., 2000
P3 hygro	5'-CGAGATCAGCAGCCTCTGTTCCACA-3'	Li et al., 1996
P5	5'-TGCTCCTGAAGTCCACAATTCACAGTCC-3'	Li et al., 1996
P6	5'-CGAGACTAGTGAGACGTGCTACTTCCATTT-3'	Li et al., 1996
UM31	5'-ACTTTGGCT GAACTGAGTGTACACC-3'	Heber et al., 2000
UM30	5'-GCTTTCTGCCTTCATGCCTATCTCTAG-3'	Heber et al., 2000
P4 neo	5'-ATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGA-3'	Heber et al., 2000
APLP2-1	5'-GCCAAGCTTGAGTCGGTGTATCCGTGCT-3'	von Koch et al., 1997
APLP2-2	5'-GCGACCGGAGGAGACGCAGATCGGGAGCTCGCC-3'	von Koch et al., 1997
APLP2-3	5'-CCATTGCTCAGCGGTGCTG-3'	von Koch et al., 1997

Tabelle 2: Sequenzen der PCR-Primer zur Genotypisierung von APP/APLP-Knock-out-Mäusen

2.2. Methoden

2.2.1. Genotypisierung von Mäusen

2.2.1.1. Präparation genomischer Maus-DNS aus Schwanzbiopsien

Zur Bestimmung des Genotyp einer Maus wurde dieser eine Gewebeprobe entnommen und die daraus isolierte DNS analysiert. Dazu wurde von 4 bis 8 Wochen alten Mäusen 2 bis 5 mm, von Mausembryonen oder neugeborenen Mäusen 1 bis 2 mm, Schwanzspitze

abgeschnitten. Das Gewebe wurde in 50 bis 200 μ l Gitschier-Lysispuffer (Bueler et al., 1992) 5 Stunden bis über Nacht bei 57 °C auf einem Schüttler oder im Wärmeschrank lysiert. Nach ausreichender Lyse zerfällt das Gewebe beim Schütteln oder Vortexen des Eppendorfgefäßes. Die Proben wurden dann 20 Minuten bei 95 °C inaktiviert und 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Für die weitere Analyse wurden der Überstand der Lysate 1 + 5 bis 1 + 10 mit H₂O verdünnt.

10x Gitschierpuffer	166 mM Ammoniumsulfat	5 ml (1,66 M) / 50 ml
	670 mM Tris / HCl pH 8,8	33,5 ml (1 M) / 50 ml
	67 mM MgCl ₂	3,35 ml (1 M) / 50 ml
	50 mM β -Mercaptoethanol	175 μ l / 50 ml
	67 μ M EDTA	6,7 μ l (0,5 M) / 50 ml
Gitschier-Lysispuffer	1x Gitschierpuffer	5 ml (10x) / 50 ml
	1,7 μ M SDS	50 μ l (20 %) / 50 ml in H ₂ O
	100 μ g / ml Proteinase K (Sigma)	jeweils frisch zugeben

2.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein sehr schnelles Verfahren zur Amplifizierung gewünschter DNS-Fragmente. Zur Genotypisierung von APP/APLP-Knock-out-Mäusen wurden die Primer so gewählt, dass beim Vorliegen von Wildtyp-DNS oder mutierter DNS Genfragmente verschiedener Größe amplifiziert werden (Tabelle 3). Für die Detektion von Wildtyp-DNS („wt-Allel“) bindet dabei ein Primer innerhalb der deletierten Genregion und für Detektion mutierter DNS („neo-Allel“) bindet ein anderer Primer im veränderten DNS-Bereich. Durch die Bandenstruktur wurde festgestellt, ob die Mäuse für das untersuchte Gen Wildtyp-homozygot, heterozygot oder Knock-out-homozygot waren.

Allel	Primerpaar	Bandengröße (bp)
APP wt	UM42 / UM44	ca. 660
APP wt	UM43 / UM44	ca. 700
APP neo	UM42 / P3 hygro	ca. 410
APP neo	UM43 / P3 hygro	ca. 450
APP neo	P5 / P6	ca. 600
APLP1 wt	UM31 / UM30	ca. 600
APLP1 neo	P4 neo / UM30	ca. 450
APLP2 wt	APLP2-1 / APLP2-2	ca. 400
APLP2 neo	APLP2-3 / APLP2-2	ca. 350

Tabelle 3: Größen der mittels PCR amplifizierten DNS-Fragmente für die verschiedenen Primerpaare

Durch Kombination von Primern können mit einem PCR-Ansatz die Banden für wt-Allel und neo-Allel gleichzeitig nachgewiesen werden (Tabelle 4).

Gen zur Analyse	Primergemisch
APP	UM42 oder UM43 + UM44 + P3 hygro UM42 oder UM43 + UM44 + P5 + P6
APLP1	UM31 + UM30 + P4 neo
APLP2	APLP2-1 + APLP2-2 + APLP2-3

Tabelle 4: Primerkombinationen für Analyse von APP/APLPs

Der Standard-PCR-Ansatz erhielt die nachfolgend beschriebenen Komponenten. Alle Komponenten außer dem Lysat wurden in einer Menge entsprechend der Anzahl zu untersuchender Proben vor Zugabe zum Lysat gemischt. Dabei wurde die Taq-Polymerase (5 U / μ l; GibcoBRL) zuletzt zugegeben. Das dNTP-Gemisch (25 mM) wurde durch Mischen der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM; Hybaid, Heidelberg) zu gleichen Teilen hergestellt.

<u>Standard-PCR-Ansatz (25 µl)</u>	<u>Endkonzentration</u>
4,0 µl Lysat	
14,7 µl H ₂ O	
2,5 µl 10x Gitschierpuffer	1x
2,5 µl DMSO	10 %
1,0 µl dNTP-Gemisch (25 mM)	1 mM
0,1 µl BSA (20 mg / ml)	2 µg
0,03 µl Primer (100 µM)	0,12 µmol / l
0,2 µl Taq-Polymerase (5 U / µl)	1 U

Die PCR wurde in einem Thermocycler (GeneAmp[®] 9700, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) mit den in Tabelle 5 angegebenen Parametern durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	45 s	38
Primerbindung	55 °C	45 s	
Polymerisation	65 °C	2 min	
Polymerisation	65 °C	7 min	1

Tabelle 5: Parameter einer Standard-PCR

2.2.1.3. Elektrophorese von DNS-Fragmenten

Nukleinsäurefragmente unterschiedlicher Größe können im Agarosegel voneinander getrennt werden (Sambrook, 1989). Dabei bestimmt der Vernetzungsgrad der Agarose den Trennbereich. Um kleinere Fragmente zu trennen, wird ein höherprozentiges Gel benötigt. Bei Agarose-Konzentrationen zwischen 1,2 und 2 % (w/v) werden lineare DNS-Fragmente von 0,1 bis 6 kb getrennt. In Anwesenheit des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid kann die DNS im Gel unter UV-Licht direkt nachgewiesen werden.

Agarose wurde in Konzentrationen von 1,2 bis 2 % in 1x TAE-Puffer suspendiert und durch Kochen im Mikrowellenherd gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren auf ca. 60 °C abgekühlt, 0,5 µg / ml Ethidiumbromid zugesetzt und in vorbereitete Gelträger gegossen, die nach dem

Erstarren in Flachbett-Gelapparaturen überführt wurden. Die DNS-Proben der PCR-Ansätze (25 µl) wurden mit 2 µl DNS-Ladepuffer versetzt, 8 µl in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 130 V bis 170 V in 1x TAE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wandert die bei neutralem pH-Wert negativ geladenen DNS in Richtung der Anode. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Bandenstruktur auf den Gelen mittels Geldokumentationssystem (Gel Doc 2000 mit Quantify One Software, Biorad, München) ausgewertet.

DNS-Ladepuffer	30 % (v/v) Glycerol	3 ml (100 %) / 10 ml
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau	25 mg / 10 ml
	0,25 % (w/v) Xylenxyanol	25 mg / 10 ml
		in TE, pH 8

2.2.2. Generierung von Mäusen mit kombinierten Gendefekten von APP/APLP-Proteinen

2.2.2.1. Verpaarungen zur Erzeugung von Doppel-Knock-out-Mäusen

Doppel-Knock-out-Mäuse, in denen zwei der drei Proteine der APP/APLP-Genfamilie nicht mehr exprimiert werden, wurden durch drei aufeinanderfolgende Verpaarungen generiert. Die bereits beschriebenen Einfach-Knock-out-Mäuse (vgl. Tabelle 1, Seite 33) wurden miteinander verpaart (z. B. $APP^{-/-} \times APLP1^{-/-}$). Die dabei erhaltenen Mäuse, die für beide Allele heterozygot sind, wurden erneut mit den Einfach-Knock-out-Mäusen rückgekreuzt (z.B. $APP^{+/-} APLP1^{+/-} \times APLP1^{-/-}$), wobei dann 25 % der Nachkommen Knock-out-homozygot und für das andere Gen heterozygot sind (z. B. $APP^{+/-} APLP1^{-/-}$). Diese Tiere werden anschließend miteinander verpaart ($APP^{+/-} APLP1^{-/-} \times APP^{+/-} APLP1^{-/-}$), sodass in der folgenden Generation Doppel-Knock-out-Mäuse erhalten werden (25 % $APP^{-/-} APLP1^{-/-}$, 50 % $APP^{+/-} APLP1^{-/-}$, 25 % $APP^{+/+} APLP1^{-/-}$). Zur Erzeugung von APLP1/APLP2- und APP/APLP2-Doppelmutanten wurden die entsprechenden Mäuse analog verpaart. Die nachfolgende Tabelle 6 zeigt eine Zusammenfassung.

Genotyp	APP / APLP1	APLP1 / APLP2	APP / APLP2
I. Verpaarung	$APP^{-/-} \times APLP1^{-/-}$	$APLP1^{-/-} \times APLP2^{-/-}$	$APP^{-/-} \times APLP2^{-/-}$
II. Rückkreuzung mit	$APLP1^{-/-}$	$APLP2^{-/-}$	$APLP2^{-/-}$
III. Verpaarung für Doppel-Knock-out-Mäuse	$\begin{pmatrix} APP^{+/-} \\ APLP1^{-/-} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} APP^{+/-} \\ APLP1^{-/-} \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} APLP1^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} APLP1^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} APP^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} APP^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{pmatrix}$

Tabelle 6: Verpaarungen zur Erzeugung von APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäusen

Für terminierte Verpaarungen wurden die Mäuse nachmittags zusammengesetzt und am nächsten Morgen geprüft, ob bei den Weibchen nach erfolgreicher Verpaarung ein Vaginalpfropf (*plug*) gebildet wurde. Der Zeitpunkt der Detektion eines positiven *plugs* wurde als embryonaler Tag 0,5 (E0,5) gerechnet.

2.2.2.2. Verpaarungen zur Erzeugung von Tripel-Knock-out-Mäusen

Die Generierung von Mäusen, die alle drei bekannten Gene der APP/APLP-Genfamilie nicht mehr exprimieren, erfolgte in mehreren weiteren Kreuzungsschritten. Durch die Verpaarung von $APP^{+/-} APLP2^{-/-}$ -Mäusen mit $APP^{+/-} APLP1^{-/-}$ -Mäusen wurden $APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{+/-}$ -Mäuse erzeugt. Diese wurden dann mit $APP^{-/-} APLP1^{-/-}$ -Mäusen verpaart, wobei bei 25 % der Nachkommen der Genotyp $APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-}$ erwartet wurde. Werden $APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-}$ -Mäuse miteinander verpaart, so liegt theoretisch die Wahrscheinlichkeit, Tripel-Knock-out-Mäuse zu erhalten, bei 25 %. Weitere mögliche Verpaarungen und deren tatsächlich erhaltenen Nachkommen werden im Kapitel 3.3.2. (siehe Seite 78) beschrieben.

2.2.2.3. Rückkreuzung von Mäusen auf 129SvEv genetischen Hintergrund

Zusätzlich zu den APLP1/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäusen mit gemischtem C57BL/6 x 129SvEv genetischen Hintergrund wurden $APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}$ -Mäuse mit größtenteils

129SvEv-Hintergrund generiert. Dazu wurden APLP2^{-/-}-Mäuse drei Generationen mit 129SvEv-Wildtyp-Mäusen zurückgekreuzt, indem die erzeugten APLP2^{+/-}-Mäuse jeweils weiter mit 129SvEv-Wildtyp-Mäusen verpaart wurden. Die Nachkommen der dritten Rückkreuzung mit dem Genotyp APLP2^{+/-} auf 129SvEv-Hintergrund wurden miteinander verpaart und dabei wie theoretisch erwartet 25 % Nachkommen mit dem Genotyp APLP2^{-/-} erhalten. Die APLP2-Knock-out-Mäuse wurden mit APLP1-Knock-out-Mäusen, die auf isogenem 129SvEv-Hintergrund generiert wurden (Heber et al., 2000), verpaart. Die erhaltenen APLP1^{+/-} APLP2^{+/-}-Nachkommen wurden erneut mit APLP2^{-/-}-Mäusen mit größtenteils 129SvEv-Hintergrund rückgekreuzt, wobei 25 % der Nachkommen den Genotyp APLP1^{+/-} APLP2^{-/-} hatten.

2.2.3. Primäre neuronale Kulturen aus Mausgewebe

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer Sterilbank (NuAire Laminar Flow, Zapf Instruments, Sarstedt) durchgeführt. Arbeitsflächen wurden mit 70 % Ethanol gereinigt. Als Verbrauchsmaterialien wurden hitzesterilisierte Glasgeräte und -gefäße und steril erworbene Plastikmaterialien verwendet.

Kulturen primärer Mausneuronen wurden analog der von Banker und Goslin (1998) beschriebenen Methode mit geringfügigen Modifikationen angelegt. Für die Analyse der Neuronen von perinatal letalen Knock-out-Mäusen war es notwendig, embryonales Gewebe für die Kulturen zu verwenden. Die gewünschten APP/APLP-Genotypen wurden nach den zuvor beschriebenen Kreuzungsschemata (vgl. Kapitel 2.2.2.1., Seite 38) erzeugt. Von jedem präparierten Embryo wurde eine Gewebeprobe zur Genotypisierung mittels PCR genommen. Als Kontrollmäuse wurden jeweils Embryos aus Verpaarungen von C57BL6- und 129SvEv-Mäusen parallel untersucht.

2.2.3.1. Massenzellkulturen von Neuronen des Kortex

Die Kortexe von E14,5 Mausembryos wurden nacheinander präpariert und in HBSS/Hepes gesammelt. Nach Zugabe von Trypsin (Endkonzentration 0,05 %) wurde das Gewebe 8 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinlösung wurde abgesaugt und mit 15 ml HBSS/Hepes gewaschen. Die Kortexe wurden in NB/B27-Medium mit 5 ml Glaspipetten trituriert und nach Absitzen der Gewebeteile der Überstand mit den suspendierten Neuronen

abgenommen. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 130.000 Zellen pro Vertiefung in 500 µl NB/B27-Medium in Plastik Kulturschalen mit 24 Vertiefungen ausplattiert (entspricht ca. 73.000 Zellen pro cm²). Die Kulturschalen wurden vor der Neuronenpräparation mit Poly-L-Lysin (10 µg / ml) 2 Stunden bis über Nacht beschichtet, zweimal mit Wasser gewaschen und trockengesaut. Neben der Verwendung des serumfreien NB/B27-Mediums wurde zusätzlich Ara-C (Endkonzentration 3 µM) gelöst in 250 µl NB/B27 an DIV 3 zugegeben, um die Proliferation von Gliazellen zu verhindern. Die Neuronen wurden bei 37 °C in 5 % CO₂ ohne Mediumwechsel kultiviert.

Neurobasalmedium mit B27 Supplement (NB/B27; serumfrei; GibcoBRL)

B27 Supplement (Gibco, Bestellnr. 17504-044)	1 ml (50 x) / 50 ml NB
2 mM l -Glutamin	0,125 ml (200 mM) / 50 ml NB
50 U / ml Penizillin	0,5 ml (5000 Einheiten) / 50 ml NB
50 µg / ml Streptomycin	0,5 ml (5000 µg / ml) / 50 ml NB

Trypsin-Stocklösung (2,5 %; GibcoBRL)

HBSS (*Hank's balanced salt solution*; Ca²⁺ - und Mg²⁺ -frei; GibcoBRL)

HBSS / Hepes (GibcoBRL)	10 mM Hepes pH 7,2	1 ml (1M) / 100 ml HBSS
-------------------------	--------------------	-------------------------

Poly-L-Lysin-Stocklösung	1 mg / ml Poly-L-Lysin (Sigma) in 0,1 M Boratpuffer pH 8,5
--------------------------	---

Ara-C (Cytosin-β-D-Arabinofuranosid)-Stocklösung

300 µM Ara-C (Sigma) in H₂O

Die Stocklösungen wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2. Kultivierung von einzelnen Neuronen des Hippocampus in Kokultur mit Astrozyten

Da eine Kultivierung von Neuronen in geringer Dichte nur in Anwesenheit von Gliazellen möglich ist, wurden Kokulturen angelegt, in denen die beiden Zelltypen nicht vermischt wurden. Dazu wurden als Vorbereitung für die Neuronenpräparation konfluente Astrozytenkulturen (siehe Kapitel 2.2.3.3.) in Plastikkulturschalen mit 24 Vertiefungen angelegt.

Die Hippocampi von E17,5 Mausembryos wurden wie in Kapitel 2.2.3.1. beschrieben präpariert. Die Neuronen wurden mit einer Zelldichte von 50.000 bis 60.000 Zellen pro Vertiefung (entspricht ca. 30.000 Zellen pro cm^2) in 500 μl NB/B27-Medium auf Poly-L-Lysin-beschichtete (1 mg / ml über Nacht) Glasplättchen mit Paraffindots in Plastikkulturschalen mit 24 Vertiefungen ausplattiert. Die Glasplättchen (\varnothing 14 mm) mit den angehefteten Neuronen wurden 2 bis 4 Stunden nach dem Plattieren in die Astrozytenkulturen mit über Nacht konditioniertem NB/B27-Medium (1 ml) transferiert. Dabei wurden die Glasplättchen so in den Vertiefungen positioniert, dass die Neuronen den Astrozyten zugewandt, jedoch ohne direkten Kontakt, kultiviert werden. Durch die Paraffindots wird ein geringer Abstand zwischen Neuronen und Astrozyten ermöglicht und so ein Vermischen beider Zelltypen verhindert. Durch Zugabe von Ara C (Endkonzentration 3 μM , vgl. Kapitel 2.2.3.1.) gelöst in 10 μl NB/B27 Medium an DIV3 wurde eine weitere Proliferation der Astrozyten inhibiert. Einmal pro Woche wurde ein Drittel des Mediums durch frisches NB/B27-Medium ersetzt.

2.2.3.3. Präparation, Kultivierung und Lagerung von Maus-Astrozyten

Astrozyten wurden aus Gehirnen von P0/P1-Mäusen gewonnen. Es wurden die Kortexe von 3 bis 5 Tieren präpariert und in HBSS/Hepes (vgl. Kapitel 2.2.3.1.) in einer Schale (\varnothing 6 cm) kleingeschnitten. Das Gewebe wurde in eine Glasflasche transferiert und zu einem Volumen von 12 ml 1,5 ml DNase (10 mg / ml) und 1,5 ml Trypsin (2,5 %) zugegeben. Unter Rühren wurde das Gewebe 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit 15 ml Gliamedium die Reaktion gestoppt. Nach Absitzen der Gewebeteile wurde die Zellsuspension des Überstandes durch ein 100 μm Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und in 20 ml Gliamedium resuspendiert. Es wurden 4 bis 6 x 10^6 Zellen pro T175-Flasche in 10 ml Gliamedium plattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium vollständig gewechselt, danach wurde es alle 3 bis 4 Tage erneuert. Nach 8 bis

12 Tagen wurden konfluente Kulturen erhalten, die entweder für Kokulturen verwendet oder eingefroren wurden.

Zum Einfrieren wurde das Medium der konfluenten Astrozytenkulturen abgesaugt und mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde 5 ml Trypsin (0,05 %) zugegeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach kräftigem Aufklopfen der Flasche wurde das Trypsin durch Zugabe von 5 ml Gliamedium inaktiviert. Die Zellen wurden mit einer 10 ml Glaspipette trituriert und die Zellsuspension 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in auf Eis gekühltem Einfriermedium resuspendiert und in 1 ml Aliquots (5 pro T175) in einem Einfriergefäß (Merck) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen von Astrozyten wurde 5 ml Gliamedium pro Aliquot gefrorener Zellen vorgelegt, welche im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und dann sofort überführt wurden. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 rpm wurde das Zellpellet in Gliamedium resuspendiert. Die Astrozyten wurden auf die 1,5 fache Fläche plattiert, auf der sie zuvor konfluent gewachsen waren.

Gliamedium	0,6 % (w/v) Glucose	10 ml (30 %) / 500 ml
	2 mM Glutamin	5 ml (200 mM) / 500 ml
	50 U / ml Penizillin	5 ml (5000 Einheiten) / 500 ml
	50 µg /ml Streptomycin	5 ml (5000 µg / ml) / 500ml
	10 % (v/v) Pferdeserum	50 ml / 500 ml
	in MEM (<i>Minimal essential medium</i> , GibcoBRL)	
DNase (Sigma)	10 mg / ml	in PBS
Trypsin (GibcoBRL)	0,05 %	
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO in Gliamedium (s.o.)	1 ml / 10 ml

2.2.4. Analyse der Überlebensrate primärer Neuronen und Nachweis der Empfindlichkeit gegenüber exogener Substanzen

2.2.4.1. Zellzählung zur Bestimmung der spontanen Überlebensrate

Zur Bestimmung der spontanen Überlebensrate von primären Neuronen in Kultur wurden die Zellen auf Glasplättchen mit markierten Feldern (Celloclate[®]; Eppendorf, Hamburg) plattiert. Lebende Neuronen wurden nach morphologischen Kriterien (ausgewachsenen Neuriten, Integrität der Zellmembran, Zellkern und Zellkörper nicht kondensiert) identifiziert und in gleichen Feldern an DIV 1 und DIV 7 gezählt. Dabei wurden für jede Probe 6 Felder (350 x 350 µm) mit insgesamt etwa 240 bis 360 Neuronen (ca. 40-60 Neuronen pro Feld) berücksichtigt. Die Zellzählung wurde für 2 bis 3 Proben von Neuronen der verschiedenen Genotypen durchgeführt. Es wurde der prozentuale Anteil der bis DIV 7 überlebenden Neuronen relativ zu den an DIV 1 vorhandenen Zellen (100 %) bestimmt. Als Ergebnis wurden die Mittelwerte der 6 Felder ± Standardabweichung angegeben.

2.2.4.2. MTT-Assay nach Glutamatbehandlung

In Kultur differenzierte kortikale Neuronen wurden an DIV 15 mit Glutamat behandelt. Die Zellen wurden von individuellen Embryos (E14) präpariert wie in Kapitel 2.2.3.1. (siehe Seite 40) beschrieben, wobei 8 bis 12 Proben parallel prozessiert wurden. Für 2 Proben wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer (Merck) bestimmt und alle Proben in einer Dichte von 73.000 Zellen pro cm² entsprechend dem Durchschnittswerte dieser beiden Proben plattiert. Um die kleinen Unterschiede in der Plattierungsdichte zwischen den einzelnen Proben zu korrigieren, wurde die Überlebensrate von Glutamat-behandelten Proben als relativer Wert im Vergleich zu unbehandelten Proben (100 %) des gleichen Embryos angegeben.

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve wurden die Neuronen mit verschiedenen Glutamatkonzentrationen (10, 25, 50, 100 µM) für 24 Stunden inkubiert. Außerdem wurde eine Inkubation mit 50 µM Glutamat für 1 Stunde und 3 Stunden durchgeführt. Das Glutamat wurde jeweils in 250 µl Neurobasalmedium mit B27 Supplement (siehe Kapitel 2.2.3.1., Seite 40) zugegeben. Alle Experimente wurden im Triplikat durchgeführt.

Die Überlebensrate der Neuronen wurde mit dem MTT-Assay bestimmt. Die gelbe MTT-Substratlösung wurde mit einer Endkonzentration von 0,5 mg / ml direkt in das Kultur-

medium gegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. In lebenden Zellen wird das MTT durch mitochondriale Enzyme zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Der präzipitierte Farbstoff wurde in DMSO (250 µl pro Vertiefung) gelöst und die Absorption (OD) bei 540 nm sowie der Referenzwellenlänge 690 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Titertek Multiskan[®] MCC/340, Bartolomey, Rheinbach) bestimmt. Die Absorptionmessung erfolgte jeweils direkt im Anschluß an die Inkubation mit Glutamat. Der Wert $OD_{\Delta 540-690\text{nm}}$ ist ein Maß für den Anteil der lebenden Zellen in Kultur (Mosmann, 1983).

Glutamat-Stocklösung 100 mM Glutamat (Sigma) in PBS

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid)-Stocklösung

5 mg / ml MTT (Sigma) in PBS

Lagerung bei -20 °C

2.2.4.3. MTS-Assay nach β -Amyloid-Behandlung

Der Einfluss von fibrillärem β -Amyloid auf die Überlebensrate primärer kortikaler Neuronen wurden mit einer von Lorenzo und Mitarbeitern (2000) beschriebenen Methode untersucht. Die Kortexe wurden aus E16,5 Mausembryos entnommen und nach vollständigem Entfernen der Hirnhaut in HBSS/Hepes (siehe Kapitel 2.2.3.1., Seite 40) gesammelt. Nach Zugabe von Trypsin (Endkonzentration 0,25 %) wurde das Gewebe 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 Volumen PR-Medium inaktiviert. Das Gewebe wurde mit 5 ml Glaspipetten trituriert und nach Absitzen die homogene Zellsuspension des Überstandes in ein neues Röhrchen überführt. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 800 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in PR-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Neuronen mit einer Zelldichte von 18.000 Zellen in 100 µl PR-Medium pro Vertiefung in Plastik Kulturschalen mit 96 Vertiefungen ausplattiert (entspricht 50.000 Zellen pro cm^2). Die Kulturschalen wurden zuvor mit Poly-L-Lysin (1 mg / ml, siehe Kapitel 2.2.3.1., Seite 40) über Nacht beschichtet, zweimal mit Wasser gewaschen und trockengesaugt. Nach 24 Stunden wurde das PR-Medium durch 40 µl N2-Medium ersetzt.

Die Neuronen wurden nach 48 Stunden in Kultur mit fibrillärem β -Amyloid behandelt. Die β -Amyloid-Stocklösung wurde 1:5 in N2-Medium verdünnt und davon 10 µL in jede

Vertiefung gegeben, sodass die A β -Endkonzentration 20 μ M betrug. Zu Kontrollzellen ohne A β -Behandlung wurden 10 μ L N2-Medium gegeben.

Nach weiteren 72 Stunden wurde die Überlebensrate der Neuronen mit dem MTS-Assay bestimmt. Dazu wurden in jede Vertiefung 10 μ l MTS-Lösung zugegeben. Nach 2,5 Stunden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde die Absorption des von den lebenden Zellen zu einem löslichen Farbstoff umgesetzten MTS-Substrates bei 490 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Titertek Multiskan[®] MCC/340, Bartolomey, Rheinbach) gemessen. Als Negativkontrolle dienten die Messwerte aus Vertiefungen, in denen die Zellen durch Zugabe von 10 μ L 1% Triton in N2-Medium getötet wurden.

PR-Medium	2 mM Glutamin	1 ml (200 mM) / 100 ml
	100 U / ml Penizillin	2 ml (5000 Einheiten) / 100 ml
	100 μ g /ml Streptomycin	2 ml (5000 μ g / ml) / 100ml
	1 mM MEM Natriumpyruvat	1 mL (100 mM) / 100 mL
	10 % (v/v) Fötales Kälberserum	10 ml / 100 ml
	in DMEM (D ulbecco´s M odified E agles M edium, GibcoBRL)	
N2-Medium	N2-Supplement (Gibco, Bestellnr. 17502-014)	0,5 ml (100 x) / 50 ml
	2 mM Glutamin	0,5 ml (200 mM) / 50 ml
	100 U / ml Penizillin	1 ml (5000 Einheiten) / 50 ml
	100 μ g /ml Streptomycin	1 ml (5000 μ g / ml) / 50ml
	in DMEM (D ulbecco´s M odified E agles M edium, GibcoBRL)	

MTS-Lösung (*CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*;

Promega, Mannheim; Bestellnummer G3582)

β -Amyloid-Stocklösung	0,5 M β -Amyloid (BACHEM, H-1368) in H ₂ O
	- 1 mg β -Amyloid lösen in 444 μ l H ₂ O + 7 μ l 0,1 % NH ₃
	- zur Bildung von A β -Fibrillen 3 Tage bei 37 °C inkubieren
	- Lagerung bei -20 °C

2.2.5. Immunhistochemie

2.2.5.1. Fixierung von Mausembryos

Für histologische Untersuchungen wurden Mausembryos aus geopferten Müttern entnommen oder die Nachkommen kurz nach der Geburt getötet und anschließend durch Einlegen in 4 % (w/v) Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Embryos der Stadien E12,5 bis E14,5 wurden direkt in 4 % PFA eingelegt. Ab dem Stadium E16,5 wurden Körper und Kopf, von dem die Haut entfernt wurde, getrennt fixiert, sodass das Fixanz besser eindringen kann. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C.

Paraformaldehyd (PFA)	4 % (w/v)	4 g PFA in 100 ml PBS
	in PBS	lösen bei 55 °C,
	pH 7,5	1 M NaOH zutropfen

- Lösung ist maximal 1 Woche verwendbar (Lagerung bei 4 °C)
- Lagerung bei -20° C ist möglich, auch als Stocklösung (20 % PFA in 5 x PBS)
- kein mehrmaliges Auftauen und Einfrieren

2.2.5.2. Paraffinschnitte

Zur Einbettung in Paraffin wurde das Gewebe in 4 % PFA in PBS fixiert. Paraffinschnitte (2 μ m dick) wurden mit einem Mikrotom (Micron Laborgeräte, Walldorf) angefertigt.

Um morphologische Anomalien festzustellen, wurde die Histologie aller Organsysteme einschließlich des Gehirns nach Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (siehe Kapitel 2.2.6.1., Seite 52) untersucht. Neuronen wurden durch Nissl-Färbung (siehe Kapitel 2.2.6.2., Seite 52) dargestellt.

Die Immunhistochemie erfolgte nach einer zuvor beschriebenen Methode (Steinbach et al., 1998), die als sensitiver Nachweis von Kainat-induzierten Läsionen im Gehirn optimiert wurde. Die Paraffinschnitte wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur mit verschiedenen Erst-Antikörpern (siehe Tabelle 7) inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde ein spezifischer Zweit-Antikörper durch 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur an den Erst-Antikörper gebunden. Die Detektion erfolgte mit dem Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-Komplex (APAAP, Maus, Dako, Hamburg) 1:40 verdünnt in PBS, durch den nach 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur das Substrat Astranenfuchsin (Aldrich, Taufkirchen) zu einem roten Präzipitat umgesetzt wurde. Alternativ wurden Biotin-gekoppelte Zweit-Antikörper mit einem Avidin-Biotin-Enzymkomplex (Dako, Hamburg) nachgewiesen. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
anti-Mikrotubuli-assoziiertes Protein II (MAP II; Boehringer, Mannheim; 1284959)	1:400	Kaninchen-anti-Maus IgG (Dako, Hamburg; Z0259)	1:50
anti-Synaptophysin (Dako, Hamburg; A0010)	1:50	Kaninchen-anti-Maus IgG (Dako, Hamburg; Z0259)	1:50
anti-Saures Gliafaserprotein (glial fibrillary acid protein, GFAP; Dako, Hamburg; M0761)	1:50	Kaninchen-anti-Maus IgG (Dako, Hamburg; Z0259)	1:50
anti- β III-Tubulin (Promega, Mannheim; G7121)	1:2000	Kaninchen-anti-Maus IgG (Dako, Hamburg; Z0259)	1:50
anti-Reelin (Clone G10; de Bergcyck et al., 1997)	1:200	Kaninchen-anti-Maus IgG (Dako, Hamburg; Z0259)	1:50
anti-Laminin (Sigma, Taufkirchen; L9393)	1:25	Esel-anti-Kaninchen IgG, Biotin (Amersham, Freiburg; RPM1004)	1:50
anti-Chondroitinsulfate (Clone CS-56; Sigma, Taufkirchen; C8035)	1:50	Kaninchen-anti-Maus IgG (Dako, Hamburg; Z0259)	1:50

Tabelle 7: Für Paraffinschnitte verwendete Erst- und Zweit-Antikörper

Neben den Antikörperbezeichnungen wurden die Bezugsfirmen und Bestellnummern angegeben.

Weiterhin wurden apoptotische Zellen mittels TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated UTP-X nick end labeling*) nachgewiesen. Für TUNEL-Tests wurden die Paraffinschnitte unter Deckgläschen mit 50 µl Markierungslösung 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei wird das in der Markierungslösung enthaltene Digoxigenin-markierte UTP durch das Enzym Terminale Deoxy-nucleotidyl-Transferase (TdT) an DNS-Strangbrüche angehängt. Nach Waschen in *Tris-buffered saline* (TBS) und Blockierung mit 10 % Fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS, Seromed, Berlin) in TBS wurden die Schnitte 60 Minuten mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper F_{ab}-Fragment (Boehringer, Mannheim) 1:250 verdünnt in 10 % FCS in TBS inkubiert. Nach Waschen in TBS erfolgte die Farbreaktion durch 5 bis 15 Minuten Inkubation mit Färbelösung. Nach Abstoppen der Reaktion mit TBS wurden die Schnitte mit Nuclear Fast Red (Merck) gegengefärbt.

Tris-buffered saline (TBS) pH 7,4

25 mM Tris	3 g / l
137 mM NaCl	8 g / l
2,7 mM KCl	0,2 g / l

Markierungslösung

25 U / µl TdT (Boehringer)
1 x Digoxigenin-DNS <i>labeling mix</i> (Boehringer)
2 mM CaCl ₂
in TdT-Puffer

TdT-Puffer (Boehringer)

0.2 M Kaliumcacodylat
25 mM Tris-HCl, pH 7.5

Färbelösung (Boehringer)

100 mg / ml 4-Nitroblautetrazolium Salz
50 mg / ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyphosphat
in Reaktionspuffer

Reaktionspuffer

100 mM Tris
100 mM NaCl
50 mM MgCl ₂
pH 9.5

2.2.5.3. Gefrierschnitte

Für die Kryo-Einbettung wurde von E19,5 Mausembryos das gesamte Gewebe der oberen Rumpfreigion verwendet. Nach Waschen in PBS wurde das Gewebe 10 Minuten in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert. Um die Bildung von Kristallen zu vermeiden, die beim Einfrieren die Gewebestruktur zerstören, wurden die Proben in Sucroslösung mit zunehmender Konzentration inkubiert. Die Sucrose wurde in 0,1 M Phosphatpuffer gelöst und die Inkubation erfolgte bei 4 °C je ca. 2 Stunden in 10 % und 20 % (w/v) Sucrose und über Nacht in 30 % (w/v) Sucrose. Anschließend wurde das Gewebe in Tissue Tek (SAKURA, Vogel, Gießen) eingebettet und bei -20 °C gelagert. Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Jung Frigocut 2800E, Leica, Bensheim) in 10 µm Dicke angefertigt und dabei am Mikroskop kontrolliert, ob das Rückenmark gut sichtbar ist.

Für die Immunhistochemie wurden die Gefrierschnitte nach dem Auftauen getrocknet und 1 Minute mit 4 % PFA nachfixiert. Nach zweimal 10 Minuten Waschen in PBS wurden auf die Schnitte 50 bis 100 µl Präinkubationslösung gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präinkubation und die Antikörperinkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Für die Verdünnung der Antikörper wurde eine Antikörperinkubationslösung verwendet. Mit dem Erst-Antikörper (50 bis 100 µl) wurde über Nacht inkubiert. Nach dreimal 10 Minuten Waschen in PBS wurde eine Stunde mit dem Zweit-Antikörper (50 bis 100 µl) inkubiert und anschließend wie zuvor gewaschen. Die Schnitte wurden in Aqua Poly/Mount (Polyscience, Eppelheim) eingedeckt.

Präinkubationslösung	10 % (v/v) Ziegen Serum	2 ml / 20 ml
	1 % (w/v) Rinderserumalbumin	0,2 g / 20 ml
	0,5 % (v/v) Triton X-100	2 ml (5 %) / 20 ml
	in PBS	
Antikörperinkubationslösung	3 % (v/v) Ziegen Serum	600 µl / 20 ml
	1 % (w/v) Rinderserumalbumin	0,2 g / 20 ml
	0,5 % (v/v) Triton X-100	2 ml (5 %) / 20 ml
	0,05 % (w/v) Natriumazid	1 ml (1 %) / 20 ml
	in PBS	

Die Inkubationslösungen wurden aliquotiert (4 ml) und bei -20 °C gelagert.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
anti-NMDA-Rezeptor NR1 (Chemicon, Hofheim; Ab1516)	1:150	Alexa TM 594 Ziege anti-Kaninchen IgG (A-11012)	1:500
anti-AMPA-Rezeptor GluR2/3 (Chemicon, Hofheim; 1506)	1:100	Alexa TM 594 Ziege anti-Kaninchen IgG (A-11012)	1:500
anti-GABA _A -Rezeptor β 2/3 (Chemicon, Hofheim; 1381458)	1:50	Alexa TM 594 Ziege anti-Maus IgG (A-11005)	1:500
anti-Glycin-Rezeptor (mAb4; Pfeiffer et al., 1984)	1:100	Alexa TM 594 Ziege anti-Maus IgG (A-11005)	1:500
anti-Synaptophysin (Dako, Hamburg; A0010)	1:100	Alexa TM 488 Ziege anti-Kaninchen IgG (A-11008)	1:500
anti-Synaptophysin (SY38; Knaus and Betz, 1990)	1:100	Alexa TM 488 Ziege anti-Maus IgG (A-11001)	1:500

Tabelle 8: Verwendete Erst- und Zweitantikörper für Gefrierschnitte und dissoziierte Zellen

Neben den Antikörperbezeichnungen wurden die Bezugsfirmen* und Bestellnummern angegeben. * Alle Zweit-Antikörper waren von der Firma Molecular Probes und wurden über MoBiTec, Göttingen bezogen.

Bei den Immunfärbungen wurden die Antikörper so kombiniert, dass die detektierten Rezeptoren rote und der synaptische Marker Synaptophysin grüne Fluoreszenz zeigen.

2.2.5.4. Dissoziierte Zellen

Von primären Kulturen differenzierter hippocampaler Neuronen (vgl. Kapitel 2.2.3.2., Seite 42) wurden nach 19 Tagen Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Glasplättchen mit den Zellen wurden in geeigneten Plastikständern fixiert und gewaschen und für die Inkubation mit den Antikörpern auf Tropfen mit kleinen Volumina (25 μ l) in eine feuchte Kammer transferiert. Alle Antikörper (siehe Tabelle 8) wurden in 5 % (v/v) Ziegen Serum in PBS verdünnt.

Die Plättchen mit den Neuronen wurden aus dem Kulturmedium in PBS⁺⁺-Puffer transferiert, der die Erhaltung der Zellkontakte unterstützt. Dann wurden die Zellen in Trockeneisgekühltem 95 % Methanol (v/v) / 5 % Eisessig (v/v) oder bei Raumtemperatur mit 4 % (w/v) PFA 5 Minuten fixiert. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Plättchen wurden 15 Minuten luftgetrocknet. Paraformaldehyd-fixierte Zellen wurden durch 3 Minuten Inkubation in PBS mit 0,5 % Triton permeabilisiert. Durch 20 Minuten Inkubation in 5 % Ziegen Serum in PBS wurde die unspezifische Bindung des Zweit-Antikörpers inhibiert. Danach wurde zweimal 5 Minuten mit PBS gewaschen und 90 Minuten mit dem Erst-Antikörper inkubiert. Nach dreimal 5 Minuten Waschen mit PBS wurde 30 Minuten mit dem Zweit-Antikörper inkubiert und anschließend wie zuvor gewaschen. Die Plättchen wurden kurz in Wasser gespült und in Mowiol (Hoechst, Frankfurt) eingedeckt.

PBS++ -Puffer 1 mM MgCl₂
 0,5 mM CaCl₂
 in PBS

2.2.6. Histologie

2.2.6.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung in Gewebeschnitten färbt Hämalaun das Chromatin der Zellkerne blau und Eosin Zytoplasma und Interzellulärsubstanz rosa bis rot.

Nach Entparaffinierung mit Xylol und absteigender Alkoholreihe (100 %, 96 %, 90 %, 70 % v/v) wurde 2 bis 4 Minuten mit Hämalaun (Shandon, Frankfurt, Bestellnummer 9990107) gefärbt und anschließend 5 Minuten fließend gewässert. Mit 0,5 % Eosin (Shandon, Frankfurt, Bestellnummer 1900540) wurde danach 3 Minuten gefärbt. Nach der Entwässerung durch die aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %) wurden die Präparate je 5 Minuten in 100 % Ethanol und Xylol gestellt und dann mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckt.

2.2.6.2. Nissl-Färbung

Bei der Nissl-Färbung werden durch Cresylviolett die Nisslkörperchen in Nervenzellen violett bis blau angefärbt und das gesamte Gewebe erscheint blaß-lila. Nisslkörperchen sind chromatophile Schollen im Zytoplasma, die einen hohen Gehalt an RNA aufweisen und bei toxischer oder mechanischer Schädigung der Nervenzelle verschwinden. Alternativ kann auch durch Methylenblau oder Thionin gefärbt werden, womit jedoch eine weniger gute Anfärbung erzielt wird.

Nach Entparaffinierung und absteigender Alkoholreihe (siehe 2.2.6.1.) wurden die Schnitte über Nacht in 70 % Ethanol bei 40 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend zweimal mit H₂O gespült. Dann wurde 20 bis 30 Minuten mit 1 % Cresylviolett (Merck) gefärbt. Nach kurzem Spülen mit H₂O wurde durch Differenzierung (96 % Ethanol, 100 % Ethanol mit einigen Tropfen Essigsäure, 100 % Ethanol) der überschüssige Farbstoff ausgewaschen, wobei die Farbentwicklung unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Anschließend wurden die Präparate 5 Minuten in 100 % Ethanol und danach in Xylol eingestellt und dann mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckt.

Cresylviolett-Färbelösung 1 % (w/v) Cresylviolett 10 g / 1 l
in H₂O
2 ml 10 % Essigsäure / 1 l zugeben (ergibt ca. pH 3,5)

2.2.6.3. Versilberung nach Gomori

Durch die Versilberung nach Gomori wird spezifisch die Basalmembran durch eine dunkelbraun bis schwarze Anfärbung der Retikulinfasern deutlich sichtbar.

Nach Entparaffinierung und absteigender Alkoholreihe (siehe 2.2.6.1.) wurden die Schnitte 5 Minuten in 1 %ige Kaliumpermanganat (KMnO₄)-Lösung gestellt und dann 5 Minuten fließend gewässert. Dann wurden die Schnitte durch etwa 1 Minute Behandlung mit 2 %iger Kaliumdisulfit (K₂S₂O₅)-Lösung entfärbt und erneut 5 Minuten fließend gewässert. Nach zweiminütigem Einstellen in 2 %ige Eisenalaun ((NH₄)Fe(SO₄)₂ · 12 H₂O) -Lösung wurde 2 Minuten fließend gewässert und mit destilliertem Wasser (H₂O) gespült. Die Schnitte wurden dann etwa 10 Mal in die Silberlösung eingetaucht und mit H₂O gepült. Anschließend wurde 1 bis 2 Minuten mit 4 %iger Formaldehyd-Lösung fixiert, 2 Minuten fließend gewässert und in H₂O gespült. Nach 1 Minute Behandlung mit 1 %iger Goldchlorid (AuCl₄H · H₂O) -Lösung und Spülen in H₂O wurden die Schnitte 1 Minute in 2 %ige Kaliumdisulfit-Lösung gestellt und 2 Minuten fließend gewässert. Nach abschließender 1 einminütiger Behandlung mit 1 %iger Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃)-Lösung wurde erneut 5 Minuten fließend gewässert und im Anschluß nach Entwässerung (siehe 2.2.6.1.) mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckt.

Silberlösung	50 ml Silbernitrat (AgNO_3)	(Sigma, Bestellnr. S 6506))
	17 Tropfen 40 % NaOH	
	5 bis 7 ml Ammoniak (NH_3)	(Sigma, Bestellnr. M 5432)
	(Titrieren, sodass nur wenige schwarze Körner bleiben)	
	100 ml H_2O	

Die Lösungen wurde nach folgenden Zeiträumen erneuert:

H_2O	bei jeder Färbung
Silberlösung, KMnO_4	einmal pro Woche
alle anderen Lösungen	nach 2 Wochen

2.2.7. Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe eines Elektronenmikroskops (EM 10C, Zeiss, Oberkochen) wurde die Synapsenstruktur im Hirnstamm von letalen APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäusen sowie die fibrilläre Struktur von β -Amyloid-Peptid analysiert. Die photographische Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera (BioScan, Gatan, München).

2.2.7.1. Ultradünnschnitte

Zur Ultrastrukturanalyse wurden die Gehirne von neugeborenen Mäusen präpariert und für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet. Die Proben wurden 2 Stunden mit 2 % (v/v) Glutaraldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer / 2 % (w/v) Polyvinylpyrolipon (PVP, Sigma), pH 7.4 fixiert. Nach mehrmaligem Waschen in 0.1 M Cacodylatpuffer / 2 % PVP, pH 7.4 wurde der Hirnstamm präpariert und mit 1 % OsO_4 in 0.1 M Cacodylatpuffer nachfixiert. Das Gewebe wurde mit Ethanol dehydriert und in Epon 812 Substitut (Fluka, Buchs, Schweiz) eingebettet. Ultradünnschnitte (75 nm Dicke) wurden mit einem Ultramikrotome (Ultracut E, Reichert, Wien) angefertigt. Die Schnitte wurden mit Uranylacetat / Bleicitrat (Ultrastain Solutions 1 und 2, Leica, Bensheim) im Ultrastainer (LKB, Bromma, Schweden) gefärbt und unter dem Elektronenmikroskop beurteilt.

Cacodylatpuffer

0.1 M Dimethylarsinsäure-Natriumsalz (Merck)

2.2.7.2. Negativkontrastierung von β -Amyloid-Peptid

Die Negativkontrastierung mit anschließender Analyse unter dem Elektronenmikroskop wurde zur Darstellung der Fibrillenbildung von β -Amyloid-Peptid eingesetzt. Durch Anlagerung von Uranylacetat wird ein dunkler Kontrast erzeugt, durch den die hellen Fibrillen sichtbar werden.

Das β -Amyloid-Peptid (10 μ M) wurde auf Kohlenstoff-bedampfte Netze aufgetropft und einige Minuten getrocknet. Nach Absaugen des überschüssigen Peptids wurde 2 % (w/v) Uranylacetat in Wasser zugetropft und gleichzeitig wieder abgesaugt. Das kontrastierte Peptid kann sofort unter dem Elektronenmikroskop angeschaut werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Charakterisierung von APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäusen

3.1.1. Überlebensraten von Mäusen mit kombinierten Gendefekten im APP und den APLPs

Mäuse mit einem inaktiviertem APP- oder APLP-Genprodukt zeigen einen weitgehend unauffälligen Phänotyp. Um zu überprüfen, ob sich die APP/APLP-Genfamilienmitglieder untereinander kompensieren, wurden alle drei Kombinationen von Doppel-Knock-out-Mäusen generiert. Hierzu waren mehrere aufeinanderfolgende Verpaarungen notwendig (vgl. Tabelle 6, Seite 39). Im ersten Schritt wurden die entsprechenden Einfach-Knock-out-Mäuse miteinander verpaart, deren Nachkommen alle für beide Gene heterozygot waren. Diese Mäuse wurden erneut mit einer Einfach-Knock-out-Maus verpaart und somit Nachkommen erzeugt, welche für ein Gen heterozygot und für das andere Gen homozygot knock-out waren. Die Verpaarung dieser Mäuse untereinander führte letztendlich zur Generierung von Doppel-Knock-out-Mäusen.

Überraschenderweise waren die APP/APLP1-Doppel-Knock-out-Mäuse lebensfähig (siehe Kapitel 3.1.1.1.), während sich die APP/APLP2- und APLP1/APLP2- Doppel-Knock-out-Mäuse als postnatal letal erwiesen. Dabei war von besonderem Interesse, wann diese Mäuse sterben. Es wurden deshalb genauere Analysen des Todeszeitpunktes durchgeführt, die in den Kapiteln 3.1.1.2. und 3.1.1.3. näher beschrieben sind.

3.1.1.1. APP/APLP1-Doppel-Knock-out-Mäuse

APP^{-/-} APLP1^{-/-} -Mäuse wurden durch die Verpaarung von APP^{+/-} APLP1^{-/-} -Mäusen generiert und mit der erwarteten Häufigkeit erhalten. Im weiteren führte auch die Verpaarung von zwei Elterntieren mit dem Genotyp APP^{-/-} APLP1^{-/-} zu homozygoten APP/APLP1-Doppel-Knock-out-Mäusen. Damit wurde gezeigt, dass APP^{-/-} APLP1^{-/-} -Mäuse lebensfähig und fertil sind.

Genauere Analysen des Zuchterfolgs von Paaren mit APP^{+/-} APLP1^{-/-} -Elterntieren ergaben lediglich eine reduzierte Überlebensrate der Nachkommen. Bei 18 Zuchtpaaren mit APP^{+/-} APLP1^{-/-} -Elterntieren lag die Überlebensrate der Nachkommen in einem durchschnittlichen

Zuchtzeitraum von 14 Monaten bei 71 %. Das Verhältnis der drei verschiedenen Genotypen bei den überlebenden Nachkommen war dabei wie erwartet. Folglich starben alle Tiere gleichermaßen, unabhängig vom Genotyp. Darüberhinaus wurden insgesamt 14 Zuchtpaare mit APP^{-/-} APLP1^{-/-} -Elterntieren über einen durchschnittlichen Zeitraum von 11 Monaten analysiert, wobei die Überlebensrate der Nachkommen, die erwartungsgemäß alle den Genotyp APP^{-/-} APLP1^{-/-} hatten, bei 62 % lag. Zum Vergleich standen bei Wildtyp-Tieren nur eine kleinere Anzahl von Zuchtpaaren zur Verfügung. Bei der Verpaarung von 129SvEv-Elterntieren wurden 5 Zuchtpaare über einen Zeitraum von 5 Monaten beobachtet, wobei die Überlebensrate der Nachkommen 94 % betrug.

Abgesehen von einem etwas geringeren Körpergewicht, welches bereits bei den APP- und APLP1-Einfach-Knock-out-Mäusen gefunden wurde, zeigen die APP/APLP1-Doppel-Knock-out-Mäuse keine auffälligen Anomalien.

3.1.1.2. APP/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäuse

Im letzten Schritt führte die Verpaarung von APP^{+/-} APLP2^{-/-} -Mäusen zur Generierung von APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen. Tabelle 9 zeigt für diese Verpaarung die theoretisch erwartete Häufigkeit der Nachkommen verschiedener Genotypen und die Anzahl der tatsächlich erhaltenen Nachkommen. Bei der Genotypisierung der Nachkommen im Alter von 4 bis 8 Wochen wurde zunächst keine APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Maus gefunden. Erst die Analyse einer größeren Zahl von 355 Nachkommen führte zur Identifikation einer einzigen APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Maus. Diese Maus war wesentlich kleiner als gleichaltrige Kontrollmäuse und lebte 13 Monate. Um festzustellen, ob ein kombinierter Defekt von APP und APLP2 bereits embryonal letal ist, wurden nachfolgend Mäuse an E19 und kurz nach der Geburt (P0) untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse mit der erwarteten Häufigkeit gefunden (21 % von 131 Tieren). Bereits einen Tag nach der Geburt (P1) konnten nur noch 2 APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse unter 26 analysierten Tieren identifiziert werden, von denen eine an P2 und die andere im Alter von 4 Wochen starb.

Diese Befunde zeigen, dass APP/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäuse postnatal letal sind. Mit seltenen Ausnahmen sterben diese Mäuse innerhalb des ersten Tages nach der Geburt.

Verpaarung der Elterntiere	Nachkommen		
	Genotyp	erhalten	erwartet
<p>Genotypen</p> $\begin{bmatrix} APP^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} APP^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{bmatrix} \Rightarrow$	E19 / P0		
	APLP2 ^{-/-} , APP ^{+/+}	38 (29 %)	(25 %)
	APLP2 ^{-/-} , APP ^{+/-}	65 (50 %)	(50 %)
	APLP2^{-/-}, APP^{-/-}	28 (21 %)	(25 %)
	P1		
	APLP2 ^{-/-} , APP ^{+/+}	8 (31 %)	(25 %)
	APLP2 ^{-/-} , APP ^{+/-}	16 (61 %)	(50 %)
	APLP2^{-/-}, APP^{-/-}	2 (8 %)	(25 %)
	4 bis 8 Wochen		
	APLP2 ^{-/-} , APP ^{+/+}	134 (38 %)	(25 %)
	APLP2 ^{-/-} , APP ^{+/-}	220 (62 %)	(50 %)
	APLP2^{-/-}, APP^{-/-}	1 (0,3 %)	(25 %)

Genetischer Hintergrund

C57BL6 X 129SvEv/Ola

Tabelle 9: Überlebensraten von APP/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäusen

Von den Nachkommen dieser Verpaarung wurden 131 Tiere an E19 oder kurz nach der Geburt (P0) untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden Doppel-Knock-out-Mäuse mit der erwarteten Häufigkeit erhalten (21 %). Am ersten Tag nach der Geburt (P1) hatten von 26 analysierten Mäusen zwei den Genotyp APP^{-/-} APLP2^{-/-}. Unter den 355 Tieren, die nach Absetzen von der Mutter im Alter von 4 bis 8 Wochen genotypisiert wurden, konnte nur eine APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Maus gefunden werden.

3.1.1.3. APLP1/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäuse

Zur Generierung von APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen wurden im letzten Schritt APLP1^{+/-} APLP2^{-/-} -Mäuse miteinander verpaart (Tabelle 10). Wie bei den APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen führte auch eine kombinierte Defizienz von APLP1 und APLP2 zu postnataler Letalität, in diesem Fall sogar mit 100 % Penetranz. Unter 326 analysierten Tieren im Alter von 4 bis 8 Wochen wurde keine APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Maus gefunden. Zusätzlich wurden Nachkommen

kurz nach der Geburt (P0) und an P1 genotypisiert. Obwohl die APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse an P0 mit zu erwartenden Häufigkeit vorhanden waren (29 % von 171 Tieren), wurde an P1 keine APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Maus gefunden.

Folglich sterben alle APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse innerhalb des ersten Tages nach der Geburt.

<u>Verpaarung der Elterntiere</u>		<u>Nachkommen</u>		
<u>Genotypen</u>		<u>Genotyp</u>	<u>erhalten</u>	<u>erwartet</u>
$\begin{bmatrix} \text{APLP1}^{+/-} \\ \text{APLP2}^{-/-} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \text{APLP1}^{+/-} \\ \text{APLP2}^{-/-} \end{bmatrix} \Rightarrow$	P0			
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/+}	49 (26 %)	(25 %)	
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/-}	68 (45 %)	(50 %)	
	APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-}	54 (29 %)	(25 %)	
	P1			
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/+}	6 (21 %)	(25 %)	
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/-}	22 (79 %)	(50 %)	
	APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-}	0 (0 %)	(25 %)	
	4 bis 8 Wochen			
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/+}	123 (38 %)	(25 %)	
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/-}	203 (62 %)	(50 %)	
	APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-}	0 (0 %)	(25 %)	
Genetischer Hintergrund				
C57BL/6 X 129SvEv				

Tabelle 10: Überlebensraten von APLP1/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäusen

Von den Nachkommen dieser Verpaarung wurden 171 Tiere kurz nach der Geburt (P0) untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden Doppel-Knock-out-Mäuse mit der erwarteten Häufigkeit erhalten (29 %). Bei Analysen von älteren Tieren konnten keine APLP1^{-/-}APLP2^{-/-} -Mäuse gefunden werden. Dies ergab die Genotypisierung von 28 Mäusen an Tag P1 sowie von 326 Tieren im Alter von 4 bis 8 Wochen.

Zusätzlich zu den APLP1/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäusen mit gemischtem C57BL/6 x 129SvEv genetischen Hintergrund wurden APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse mit größtenteils 129SvEv-Hintergrund generiert. Mit diesen Mäusen sollte untersucht werden, ob möglicherweise durch den genetischen Hintergrund bedingte Interaktionen Mauslinien-spezifischer Allele den Phänotyp beeinflussen. Die APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse mit diesem genetischen Hintergrund wurden durch mehrere aufeinanderfolgende Verpaarungen von APLP1^{-/-} - und APLP2^{-/-} -Mäusen erzeugt (vgl. Kapitel 2.2.2.1., Seite 38). Verwendet wurden APLP1^{-/-} -Mäuse, die auf isogenem 129SvEv-Hintergrund generiert wurden (Heber et al., 2000), sowie APLP2^{-/-} -Mäuse (von Koch et al., 1997), die drei Generationen auf 129SvEv-Hintergrund rückgekreuzt wurden und somit einen höheren Anteil 129SvEv-spezifischer Allele aufweisen. APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse mit diesem genetischen Hintergrund wurden letztlich durch Verpaarung von APLP1^{+/-} APLP2^{-/-} -Mäuse generiert (Tabelle 11). APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Doppel-Knock-out-Mäuse mit größtenteils 129SvEv-Hintergrund konnten bei der Analyse von 4 bis 8 Wochen alten Tieren nicht vorgefunden werden (Tabelle 11), wie zuvor bei Doppelmutanten mit gemischtem C57BL/6 x 129SvEv genetischem Hintergrund (vgl. Tabelle 10) beobachtet. Allerdings wurde festgestellt, dass auf 129SvEv-Hintergrund die Überlebensdauer geringfügig höher ist. Am Tag nach der Geburt (P1) wurden unter 54 Tieren noch 5 APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse gefunden, die dann allerdings an P2 starben. Damit lebten 9 % der Doppelmutanten mit 129SvEv-Hintergrund an P1, gegenüber 0 % bei gemischtem C57BL/6 x 129SvEv Hintergrund. Die Analyse von 86 Nachkommen mit 129SvEv-Hintergrund an P0 ergab 20 APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse (23 % von 86 analysierten Tieren). Diese Mäuse werden folglich mit der erwarteten Häufigkeit geboren. Insgesamt konnten beim Vergleich der APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse mit 129SvEv-Hintergrund und gemischtem C57BL/6 x 129SvEv -Hintergrund keine wesentlichen Unterschiede, insbesondere keine zusätzlichen Anomalien, festgestellt werden.

Für alle weiteren Untersuchungen an APLP1/APLP2- Doppel-Knock-out-Mäusen in dieser Arbeit wurden Mäuse mit gemischtem C57BL/6 x 129SvEv genetischen Hintergrund verwendet.

**Verpaarung
der Elterntiere**

Nachkommen

Genotypen	Genotyp	erhalten		erwartet		
		absolut	relativ (%)	absolut	relativ (%)	
$\begin{bmatrix} \text{APLP1}^{+/-} \\ \text{APLP2}^{-/-} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \text{APLP1}^{+/-} \\ \text{APLP2}^{-/-} \end{bmatrix} \Rightarrow$	P0					
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/+}	31	(36 %)		(25 %)	
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/-}	35	(41 %)		(50 %)	
	APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-}	20	(23 %)		(25 %)	
	P1					
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/+}	18	(33 %)		(25 %)	
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/-}	31	(58 %)		(50 %)	
	APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-}	5	(9 %)		(25 %)	
	4 bis 8 Wochen					
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/+}	38	(39 %)		(25 %)	
	APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/-}	59	(61 %)		(50 %)	
	APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-}	0	(0 %)		(25 %)	

**Genetischer
Hintergrund**

129SvEv X 129SvEv

Tabelle 11: Überlebensraten von APLP1/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäusen mit 129SvEv genetischem Hintergrund

Von den Nachkommen dieser Verpaarung wurden 86 Tiere kurz nach der Geburt (P0) untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden Doppel-Knock-out-Mäuse mit der erwarteten Häufigkeit erhalten (23 %). Von 54 an Tag P1 analysierten Mäusen hatten fünf den Genotyp APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}, welche alle an P2 starben. Unter den 355 Tieren, die nach Absetzen von der Mutter im Alter von 4 bis 8 Wochen genotypisiert wurden, konnte keine APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Maus gefunden werden.

3.1.2. Analyse der letalen APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäuse

3.1.2.1. Makroskopische und histologische Befunde

Neugeborene APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäuse sind wenige Stunden nach der Geburt nicht von ihre Geschwistern zu unterscheiden. Zunächst findet man bei allen Tieren Milch im Magen, was auf normales Säugeverhalten hindeutet. Jedoch wurde bei ungefähr einem Viertel der Nachkommen etwa 5 bis 15 Stunden nach der Geburt beobachtet, dass sie vergleichsweise weniger Milch im Magen und eine auffällig blasse Hautfarbe hatten. Diese Tiere starben innerhalb 24 Stunden und die Genotypisierung ergab, dass es sich fast ausschließlich um Doppel-Knock-out-Mäuse handelte. Die Beobachtung diverser Würfe über einen Zeitraum von 1 bis 2 Stunden ergab keine Anzeichen von motorischen Paralysen oder spontanem Auftreten von Krämpfen. Es wurde jedoch keine systematische Analyse von Videoaufnahmen größerer Tierzahlen über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Daher ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht auszuschließen, dass es zu relativ seltenen Episoden von Krampfanfällen kommen könnte.

Der Vergleich von APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäusen mit Einfach-Knock-out- und Wildtyp-Tieren ergab normale Größen von Kopf und Körper. Die histologische Untersuchung von allen inneren Organen nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung ließ keinerlei Fehlbildungen erkennen. Insbesondere waren Herz und Lungen von normaler Größe sowie das Verdauungssystem normal ausgebildet. Die histologische Analyse des Gehirns ließ keine Unterschiede zwischen Knock-out-Mäusen ($APP^{-/-} APLP2^{-/-}$, $APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}$, $APLP2^{-/-}$) und Wildtyp-Tieren erkennen (Abbildung 7). Nach Nissl-Färbung wurde an P0 keine erhöhte Anzahl pyknotischer Zellkerne beobachtet, die für absterbende Zellen charakteristisch sind. Auch mittels TUNEL-Färbung konnte kein vermehrtes apoptotisches Zellsterben nachgewiesen werden. Im Kortex und Hippocampus waren die Größe und Dichte der Neuronen sowie deren Anordnung in den einzelnen Schichten, gezeigt durch Nissl-Färbung sowie immun-histochemischem Nachweis von Synaptophysin und dem Mikrotubuli-assoziierten Proteins-II (MAP-II), in APP/APLP-Knock-out- und Wildtyp-Mäusen nicht unterschiedlich.

Durch diese Befunde konnten die letalen APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäuse näher charakterisiert werden. Die Ursache der Letalität ist bisher jedoch nicht bekannt.

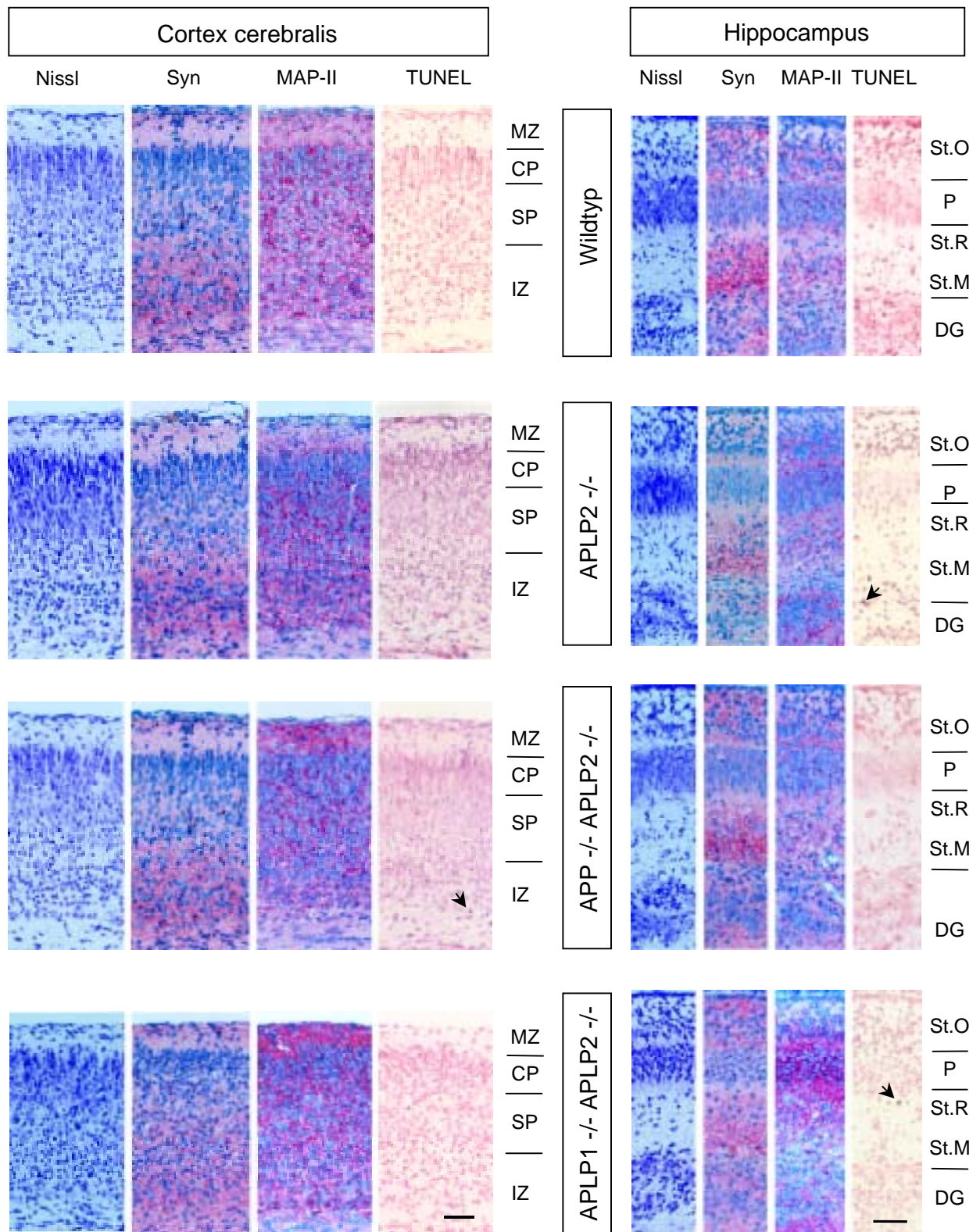


Abbildung 7: Histologie an Gehirnschnitten von APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäusen

Die histologische Analyse des Gehirns von neugeborenen Wildtyp- und Knock-out-Mäusen ergab keine auffälligen Anomalien. Gezeigt sind frontale Schnitte des parietalen Cortex cerebri (linke Spalte) und des Hippocampus (rechte Spalte) von Wildtyp-, APLP2^{-/-}, APP^{-/-} APLP2^{-/-} und APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}-Mäusen. Es wurden jeweils eine Nissl-Färbung zur Darstellung der Neuronen und immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Synaptophysin (Syn) und MAP-II zur Darstellung von Synapsen bzw. Neuriten sowie

TUNEL-Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen durchgeführt. Die Gehirnschichten sind folgendermaßen beschriftet: (im Cortex cerebialis = Großhirnrinde) MZ Marginalzone, CP Kortikale Platte, SP Subplatte, IZ Intermediärzone; (im Hippocampus) St.O Stratum oriens, P Pyramidalzellen der CA1-Region, St.R Stratum radiatum, St.M Stratum moleculare, DG Körnerzellen des Gyrus dentatus. Die Pfeile weisen auf vereinzelte apoptotische Kerne. Größenbalken: 50 μm .

Für APLP2 wurde aufgrund der in den Axonendungen erhöhten Expression eine potentielle Funktion für das Auswachsen sensorischer olfaktorischer Neurone angenommen (Thinakaran et al., 1995). Deshalb wurde zusätzlich der olfaktorische Bulbus von Wildtyp- und APP/APLP-Knock-out-Mäusen histologisch untersucht. Dabei konnten jedoch keine auffälligen Veränderungen der Anordnung und Dichte der Neuronen in den letalen Doppel-Knock-out-Mäusen gefunden werden.

3.1.2.2. Expression und Clustering von Neurotransmitterrezeptoren in Rückenmarksschnitten

Für APP^{-/-}-Mäuse wurde eine Hypersensitivität gegenüber Krämpfen, welche durch Kainat-Injektion induziert wurden, gezeigt (Steinbach et al., 1998). Demnach könnte APP an Mechanismen beteiligt sein, die bei der Eindämmung der neuronalen Erregung eine Rolle spielen. APP-Defizienz, höchstwahrscheinlich das Fehlen von neuroprotektiv wirkendem sAPP, könnte möglicherweise zu einer reduzierten Inhibition neuronaler Erregungsweiterleitung und dadurch zu erhöhter Krampfanfälligkeit führen. Eine denkbare Ursache für eine gestörte Erregungsweiterleitung könnte eine anormale Verteilung der Neurotransmitterrezeptoren an den Synapsen sein. Es wurden deshalb die wichtigsten exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren in Rückenmarksschnitten von Wildtyp- und APP/APLP-Knock-out-Mäusen untersucht, um aus deren Expressionsmuster auf mögliche Störungen in der neuronalen Erregungsleitung zu schließen.

An Gefrierschnitten des Rückenmarks aus dem Bereich der Halswirbelsäule neugeborener Mäuse wurden immunhistochemische Färbungen mit Fluoreszenz-markierten Zweit-Antikörpern durchgeführt. Gefärbt wurde mit Erst-Antikörpern gegen Rezeptoren exzitatorischer (NMDA, AMPA) und inhibitorischer (Glyzin, GABA) Neurotransmitter. In konfokalen Schnitten wurde die charakteristische punktförmige Aggregation von Rezeptoren an den Synapsen („Clustering“) dargestellt (siehe Abbildung 8). Die Neuronen aller untersuchter Genotypen, insbesondere von APLP2^{-/-}-Mäusen und den letalen Doppel-Knock-

out-Mäusen, zeigten eine dem Wildtyp ähnliche Expression und Aggregation von Neurotransmitterrezeptoren an den Synapsen.

Demnach sind die Proteine der APP-Genfamilie nicht essentiell für Expression und *Clustering* der untersuchten Neurotransmitterrezeptoren im Rückenmark.

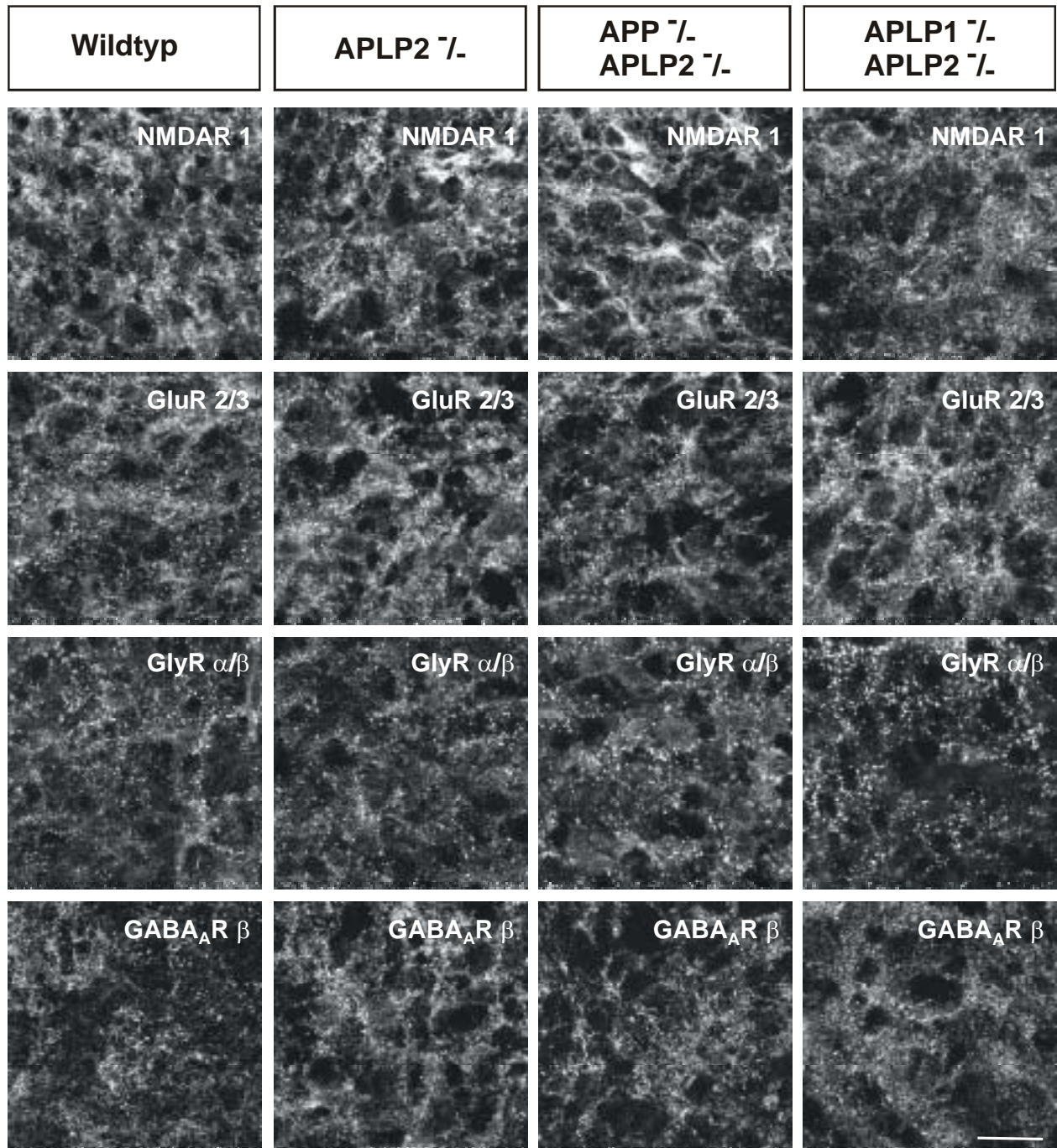


Abbildung 8: Neurotransmitterrezeptoren-Färbungen in Rückenmarksschnitten von APP/APLP- Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

Die Neurotransmitterrezeptoren im Rückenmark neugeborener Mäuse (Genotypen sind oberhalb jeder Spalte angegeben) wurden in Gefrierschnitten immunhistochemisch detektiert. Die konfokalen Schnitte zeigen

Färbungen der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, der GluR2/3-Untereinheiten des AMPA-Rezeptors, der $\beta 2/3$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptor und der α/β -Untereinheiten des Glyzinrezeptors im Rückenmark. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 (siehe Seite 51) näher beschrieben. Größenbalken: 20 μm .

3.1.2.3. Expression und Clustering von Neurotransmitterrezeptoren in primären Neuronenkulturen des Hippocampus

Die Lokalisation von APP/APLPs in synaptischen Kontaktstellen (Schubert et al., 1991, Kim et al., 1995) und deren erhöhte Expression zum Zeitpunkt verstärkter Synapsenausbildung (Moya et al., 1994, Salbaum und Ruddle, 1994), läßt eine Rolle dieser Proteine bei der Synaptogenese vermuten. Deshalb wurde die Ausbildung der Synapsen von primären Neuronen des Hippocampus aus APP/APLP-Knock-out-Mäusen in Kulturen geringer Neuronendichte untersucht.

Die immunhistochemischen Färbungen hippocampaler Neuronen aus Mausembryos (E17,5) wurden nach 19 Tagen Differenzierung in Kokultur mit Astrozyten durchgeführt. Es wurden Antikörper gegen Rezeptoren exzitatorischer (NMDA, AMPA) und inhibitorischer (GABA) Neurotransmitter verwendet. Parallel wurden alle Synapsen durch Färbung des prä-synaptischen Markerproteins Synaptophysin lokalisiert. Die Darstellung erfolgte durch Fluoreszenz-markierte Nachweisantikörper in konfokalen Schnitten (siehe Abbildung 9). Die Synaptophysin-Färbung (grüne Fluoreszenz) zeigte keine Unterschiede in der Dichte und Verteilung von Synapsen zwischen Wildtyp- und den untersuchten Knock-out-Kulturen (APLP2^{-/-}, APP^{-/-} APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}). Ebenso wurden an der Postsynapse in den untersuchten Knock-out-Neuronen eine gleichartige Expression und Aggregation von Neurotransmitterrezeptoren (rote Fluoreszenz) wie beim Wildtyp beobachtet. Die Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz zeigt an den Rändern von Neuriten und Zellkörpern sowohl gelbe Aggregate (Kokalisation von Rezeptor und Synaptophysin an der Synapse) als auch grüne Aggregate (Synaptophysin an einer Synapse, die den gefärbten Rezeptor nicht exprimiert).

Folglich sind die Proteine der APP-Genfamilie nicht essentiell für Expression und *Clustering* der untersuchten Neurotransmitterrezeptoren in Hippocampusneuronen.

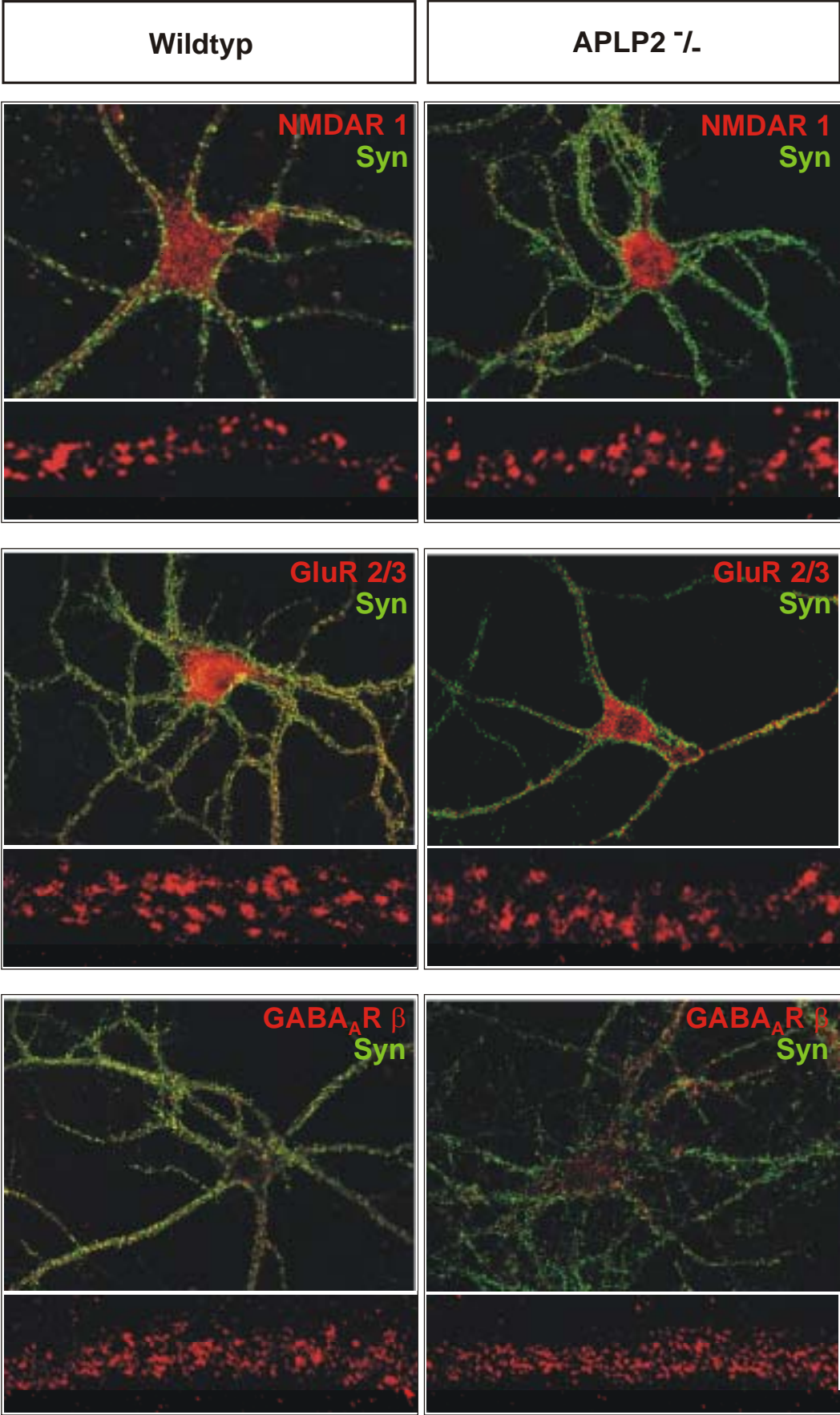


Abbildung 9: Erläuterung siehe nächste Seite

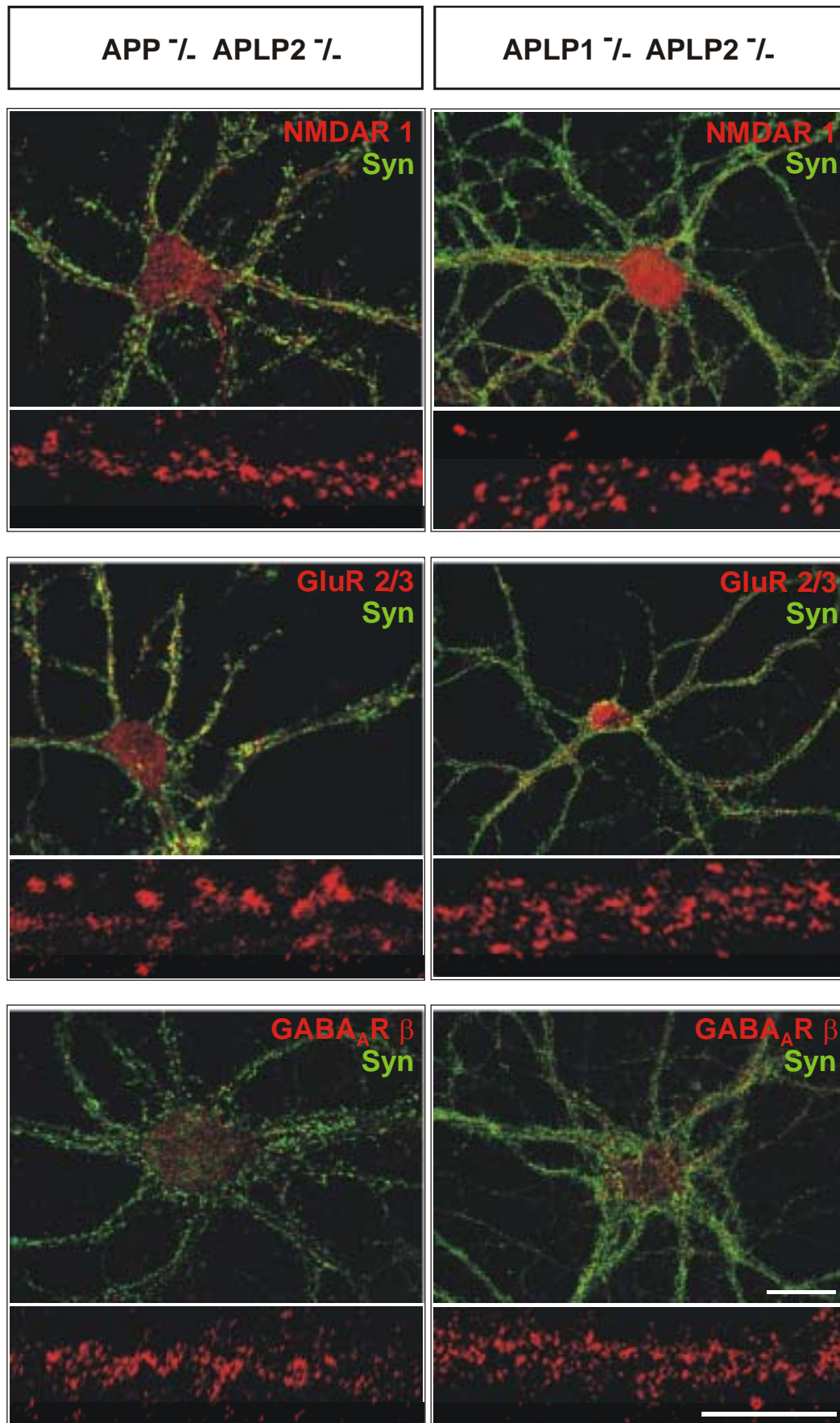


Abbildung 9: Neurotransmitterrezeptor-Färbungen in primären Hippocampusneuronen von APP/APLP-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

Primäre Hippocampusneuronen wurden an E17,5 präpariert und nach 19 Tagen in Kultur immunhistochemisch gefärbt. Der Genotyp der einzelnen Neuronen ist oberhalb jeder Spalte angegeben. In den einzelnen Bildern der Abbildung ist jeweils eine Doppelfärbung mit Synaptophysin (Syn, grün) und einem Rezeptortyp (oberer Bildausschnitt, Größenbalken: 20 μm) und eine Vergrößerung eines Dendriten mit rot angefärbtem Rezeptor (unterer Bildausschnitt, Größenbalken: 5 μm) gezeigt. Die konfokalen Schnitte zeigen Färbungen der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors, der GluR2/3-Untereinheiten des AMPA-Rezeptors und der $\beta 2/3$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors an primären Hippocampusneuronen.

3.1.2.4. Ultrastrukturelle Analyse des Hirnstamms

In einer weitergehenden Analyse der Synapsen letaler Doppel-Knock-out-Mäuse wurde deren Ultrastruktur überprüft. Hierzu wurde Ultradünnschnitte des Hirnstamms neugeborener Mäuse angefertigt und elektronenmikroskopisch untersucht. In diesem Entwicklungsstadium ist die Synapsenstruktur im Hirnstamm vergleichsweise deutlicher ausgebildet als im Kortex, wo überwiegend unreife Synapsen vorgefunden wurden. Die elektronenmikroskopische Analyse des Hirnstamms zeigte keine wesentlichen ultrastrukturellen Defekte der Synapsen, welche bei letalen Doppel-Knock-out-Mäusen und Wildtyp-Tieren in gleicher Dichte ausgebildet waren. In den präsynaptischen Endigungen der APP^{-/-} APLP2^{-/-}-Mäuse sowie der APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}-Mäuse wurden wie beim Wildtyp eine Anreicherung von Vesikeln beobachtet, die teilweise bereits an die präsynaptische Membran gebunden waren (Abbildung 10). Elektronendichte Spezialisierungen der Postsynapse waren ebenfalls in den Proben der Knock-out-Mäuse wie beim Wildtyp deutlich sichtbar.

Dies lässt darauf schließen, dass die Proteine der APP-Genfamilie nicht essentiell für die normale morphologische Entwicklung von Synapsen des Hirnstamms sind.

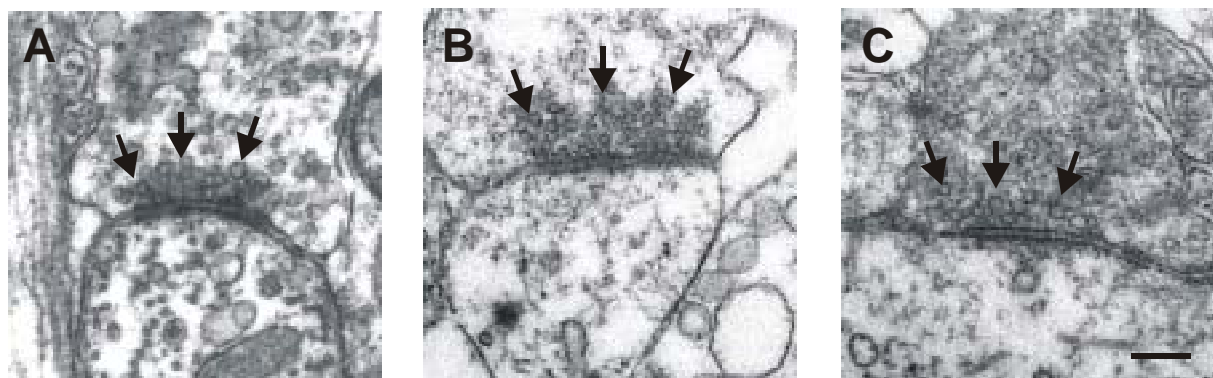


Abbildung 10: Ultrastruktur der Synapsen im Hirnstamm von APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäusen

Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen Synapsen im Hirnstamms von Wildtyp- (A), APP^{-/-} APLP2^{-/-} (B) und APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen (C) mit Anreicherungen von Vesikeln in der Präsynapse (Pfeile) und elektronendichten postsynaptischen Spezialisierungen. Größenbalken: 0,2 µm.

3.2. Überlebensrate primärer kortikaler Neuronen von APP/APLP -Knock-out-Mäusen

Primäre neuronale Kulturen können durch exogene Zugabe der sezernierten APP-Ektodomäne (sAPP) gegen Glutamat-induzierte Exzitotoxizität geschützt werden (Mattson, 1994; Mattson et al., 1993). Des Weiteren induziert der Glutamat-Agonist Kainat bei APP-Knock-out-Mäusen eine erhöhte Krampfanfälligkeit (Steinbach et al., 1998), welche möglicherweise durch das Fehlen von neuroprotektivem sAPP hervorgerufen wird. Für kultivierte primäre APP^{-/-} -Neuronen konnte jedoch überraschenderweise kein Unterschied in der Sensitivität gegenüber Glutamat im Vergleich zu Neuronen von Wildtyp-Mäusen gefunden werden (Steinbach et al., 1998; White et al., 1998). Möglicherweise ist dies auf eine funktionelle Kompensation des Verlusts von APP durch die APLPs zurückzuführen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in dieser Arbeit eine Analyse der Neuronen von APP/APLP-Doppelmutanten im Vergleich zu Einfachmutanten und Wildtyp durchgeführt.

3.2.1. Spontane Überlebensrate in vitro

Zunächst wurden an Wildtyp-Neuronen die Kulturbedingungen etabliert. Hierzu wurde getestet, ob und wie lange primäre kortikale Neuronen aus der Maus in Kulturen mit hoher Zelldichte in vitro überleben. Es wurden dafür Neuronen aus Mäusen des Entwicklungsstadiums E14 mit einer Dichte von ca. 73.000 Zellen pro cm² unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Dabei bildeten die Neuriten der Zellen innerhalb einer Woche ein dichtes Netzwerk aus. Im mikroskopischen Bild waren die Zellkörper mit langen, ausgebreiteten Neuriten sichtbar. Erst nach 18 bis 21 Tagen in Kultur trat vermehrtes Zellsterben auf. Dies war morphologisch durch ein verändertes mikroskopisches Bild nachweisbar, wobei fragmentierte Neuriten und pyknotische Zellkerne beobachtet wurden.

Für den Vergleich der Überlebensrate von Neuronen der letalen Doppel-Knock-out-Mäuse (APP^{-/-} APLP2^{-/-} und APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}) mit Wildtyp-Neuronen wurden die Zellen auf Glasplättchen mit markierten Feldern (Cellocate[®]) plattiert und Neuronen in identischen

Feldern nach einem Tag (DIV 1), sowie nochmals an DIV 7, gezählt. Für die Auswertung wurde die Zahl der lebenden Neuronen an DIV 1 als 100 % gesetzt und der prozentuale Anteil der bis DIV 7 überlebenden Neuronen berechnet. Beim Vergleich mit den Wildtyp-Neuronen konnte kein Unterschied in der Überlebensrate bei Defizienz für endogenes APLP2 allein oder in Kombination mit APP oder APLP1 festgestellt werden (Abbildung 11).

Daraus ist zu schließen, dass das Fehlen von Proteinen der APP-Genfamilie die Überlebensrate kortikaler Neuronen in vitro nicht beeinflusst.

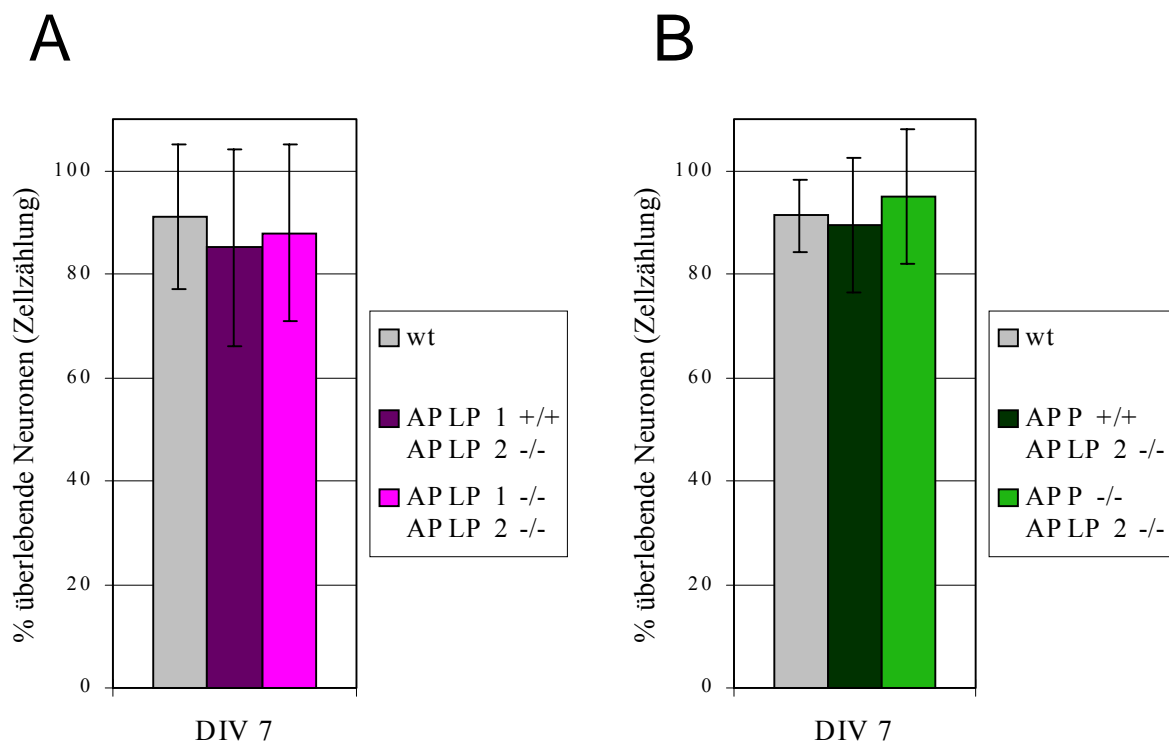


Abbildung 11: Überlebensrate kortikaler Neuronen von APP/APLP-Knock-out-Mäusen in vitro

Primäre kortikale Neuronen der in den Legenden angegebenen Genotypen wurden auf Glasplättchen (Celloclate) kultiviert. In markierten Feldern wurden nach morphologischen Kriterien lebende Neuronen nach einem (DIV 1) und 7 Tagen in Kultur (DIV 7) gezählt. Die Abbildung zeigt die Anzahl lebender Neuronen an DIV 7 als prozentuale Werte \pm Standardabweichung im Vergleich zur Anzahl lebender Neuronen an DIV 1 (100 %).

3.2.2. Empfindlichkeit gegenüber Glutamat

Weiterhin wurde ein Testsystem etabliert, mit dem die Überlebensrate primärer Neuronen nach Behandlung mit zytotoxischen Stoffen gemessen werden kann. Dazu wurden primäre kortikale Neuronen aus Wildtyp-Mäusen und den letalen Doppel-Knock-out-Mäusen ($APP^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$ und $APLP1^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$) in Kultur genommen. Nach 15 Tagen wurden die ausdifferenzierten Neuronen mit Glutamat behandelt und anschließend die Überlebensraten mittels MTT-Assay bestimmt. MTT ist ein Substrat, das von lebenden Zellen umgesetzt wird. Dabei erfolgt eine Farbreaktion, die colorimetrisch detektiert werden kann.

In einem ersten Ansatz wurden die Kulturen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit verschiedenen Glutamatkonzentrationen (10, 25, 50, 100 μ M) inkubiert. Wie erwartet führte diese Behandlung zu einer Reduktion der überlebenden Zellen, deren Ausmaß abhängig von der Glutamat-Konzentration war (Abbildung 12 A, B). Jedoch konnten bei allen getesteten Konzentrationen weder bei $APLP2^{-/-}$ -Neuronen noch bei $APP^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$ und $APLP1^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$ -Neuronen Unterschiede in der Überlebensrate im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen gefunden werden. Bereits 10 μ M Glutamat führte zu einer Reduktion lebender Zellen auf etwa 60 bis 70 % im Verhältnis zum Meßwert der unbehandelten Zellen, welcher als 100 % gesetzt wurde. Bei 25 μ M und höheren Glutamatkonzentrationen überlebten nur noch etwa 10 bis 20 % der primären Neuronen.

Der zweite Ansatz diente der Feststellung möglicher Unterschiede in der Kinetik der zellulären Reaktion auf Glutamat. Dazu wurden die Neuronen eine Stunde oder drei Stunden mit 50 μ M Glutamat behandelt (Abbildung 12 C,D). Auch unter diesen Bedingungen konnten keine Unterschiede zwischen den Wildtyp- und $APLP2^{-/-}$ -Neuronen sowie den Neuronen der Doppelmutanten ($APP^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$ und $APLP1^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$) festgestellt werden. Etwa 30 bis 40 % der Neuronen starben innerhalb einer Stunde nach Glutamatbehandlung, während nach drei Stunden 65 bis 75 % tot waren. Vergleichsweise waren nach 24 Stunden 80 bis 90 % der Neuronen gestorben (Abbildung 12 A, B).

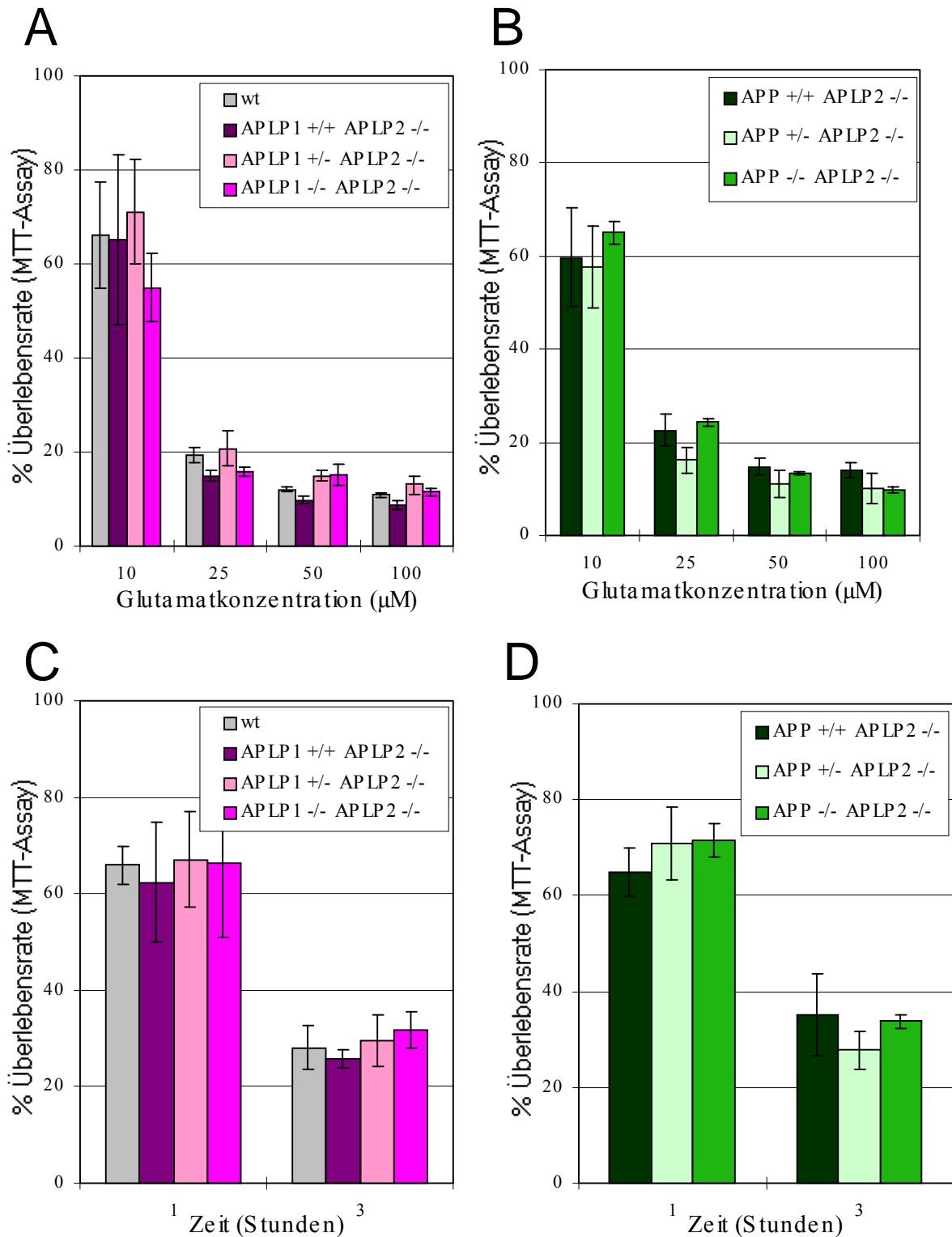


Abbildung 12: Empfindlichkeit von APP/APLP-Knock-out-Neuronen gegenüber Glutamat-Exzitotoxizität

Primäre kortikale Neuronen der in den Legenden angegebenen Genotypen wurden 15 Tage kultiviert und anschließend mit Glutamat behandelt. Die Kulturen wurden 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Glutamat (10, 25, 50, 100 µM) inkubiert (**A**, **B**). Zusätzlich wurde Glutamat (50 µM) 1 Stunde oder 3 Stunden zu den Neuronen gegeben (**C**, **D**). Anschließend wurde die Überlebensrate der Neuronen mit dem MTT-Assay bestimmt und in % ± Standardabweichung im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (100 %) angegeben.

Zusammenfassend wird durch diese Daten gezeigt, dass sich kultivierte Neuronen mit einfachen oder kombinierten Defizienzen von APP und APLPs in ihrer Überlebensrate *in vitro* und ihrer Sensitivität gegenüber exogen zugefügtem Glutamat nicht von Wildtyp-Neuronen unterscheiden.

3.2.3. Empfindlichkeit gegenüber β -Amyloid

Analog der Untersuchung der Toxizität von Glutamat wurde der Effekt von β -Amyloid auf Neuronenkulturen von Wildtyp- und Knock-out-Mäusen untersucht. Es wurde bereits 1990 in der Literatur beschrieben, dass fibrilläres β -Amyloid in Neuronenkulturen neurotoxisch wirkt (Yankner et al., 1990), während lösliches A β nicht toxisch ist (Lorenzo und Yankner, 1994). Die fibrilläre Form von A β entsteht aus zwei Vorstufen (Harper et al., 1997): Aus Monomeren und Dimeren des A β werden transient Protofibrillen mit relativ hohem α -helikalen Anteil gebildet. Zwischen Monomeren und Protofibrillen besteht ein Gleichgewicht. Bei der Bildung von fibrillärem A β erfolgt eine Umlagerung der α -Helixes in β -Faltblattstrukturen. Einmal aus Protofibrillen gebildete reife Fibrillen sind kaum wieder auflösbar. Liegt lösliches A β in hoher Konzentration ($>20 \mu\text{M}$) vor, bilden sich nach drei Tagen Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ („Alterung“) spontan A β -Fibrillen aus (Walsh et al., 1999).

Synthetisches β -Amyloid wurde nach den Herstellerangaben gelöst und durch Alterung in die fibrilläre Form überführt. Um die Ausbildung der Fibrillen zu überprüfen, wurde zuerst die Ultrastruktur des A β elektronenmikroskopisch untersucht, bevor diese A β -Suspensionen für die Toxizitätstest an Neuronen verwendet wurden. Dazu wurde die A β -Stocklösung auf $10 \mu\text{M}$ verdünnt und durch Negativkontrastierung angefärbt (Abbildung 13).



0,5 μm

Abbildung 13: Ultrastruktur von Amyloid- β -Fibrillen

Für eine Lösung mit drei Tage gealtertem synthetischen Amyloid β ($10 \mu\text{M}$) wurde eine Negativkontrastierung durchgeführt und die typischen Amyloid- β -Fibrillen mittels Elektronenmikroskop dargestellt.

Es konnte so bestätigt werden, dass das β -Amyloid nach der beschriebenen Behandlung die typischen Fibrillen von 4 bis 10 nm Durchmesser und bis zu mehreren Hundert Nanometer Länge ausgebildet hatte.

Von Lorenzo und Mitarbeitern wurde kürzlich beschrieben, dass zwischen kortikalen Neuronen von $APP^{-/-}$ -Mäusen und Wildtyp-Tieren ein Unterschied von 12 % in der Überlebensrate nach Behandlung mit $A\beta$ nachweisbar ist (Lorenzo et al., 2000). Dabei waren die $APP^{-/-}$ -Neuronen weniger empfindlich, was darauf hindeutet, dass durch APP-Defizienz ein relativer Schutz gegenüber $A\beta$ -Toxizität vermittelt wird. Da eine Bindung des β -Amyloids an membranständiges APP nachgewiesen werden konnte, wurde vorgeschlagen, dass auf diese Weise eine Modulation der $A\beta$ -Toxizität durch APP erfolgt. Um diese Beobachtungen an den von uns verwendeten $APP^{-/-}$ -Mäusen (Li et al., 1996) nachzuvollziehen, wurden primäre kortikale Neuronen mit $A\beta$ behandelt. Für diese Untersuchungen wurde ein weiteres Testsystem auf der Basis der von Lorenzo et al. verwendeten Methode (2000) etabliert. Der Test der β -Amyloid-Toxizität wurde mit dem löslichen Substrat MTS anstelle des bisher für Glutamat-Exzitotoxizitäts-Tests verwendeten MTT durchgeführt. Amyloid β wurde an DIV 2 für 72 Stunden auf primäre kortikale Neuronen gegeben und danach die Überlebensrate mittels MTS-Assay analysiert. Da diese $APP^{-/-}$ -Neuronen einen gemischtem genetischem Hintergrund (C57BL/6 x 129Ola) aufweisen, wurden zum Vergleich Wildtyp-Neuronen mit gemischtem genetischem Hintergrund (C57BL/6 x 129SvEv) untersucht und zudem Wildtyp-Neuronen mit reinem genetischem Hintergrund (C57BL/6 bzw. 129SvEv) in die Analyse einbezogen. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob der genetische Hintergrund Einfluss auf die Überlebensrate hat. Neuronen von $APP^{-/-}$ -Mäusen erwiesen sich jedoch als genauso empfindlich gegenüber $A\beta$ wie Wildtyp-Neuronen verschiedenen genetischen Hintergrunds. In den zwei bis drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsansätzen betrug die Überlebensrate durchschnittlich 36 bis 43 %. Ein repräsentatives Experiment ist in Abbildung 14 dargestellt. In den Experimenten dieser Arbeit wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Bei der zuvor von Lorenzo et al. (2000) beschriebenen geringeren Empfindlichkeit von $APP^{-/-}$ -Neuronen gegenüber $A\beta$ war der Unterschied zu Wildtyp-Neuronen vergleichsweise sehr klein, jedoch signifikant.

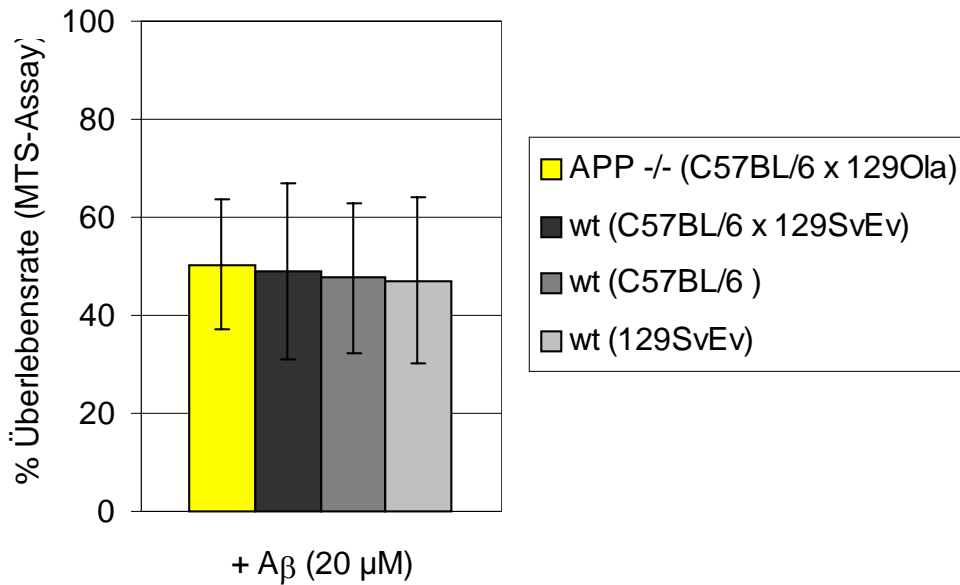


Abbildung 14: Empfindlichkeit von APP-Knock-out-Neuronen gegenüber β -Amyloid

Primäre kortikale Neuronen von Wildtyp- und APP^{-/-}-Mäusen wurden 2 Tage kultiviert und dann für 72 Stunden mit synthetischen Amyloid β (A β , 20 μ M Endkonzentration) inkubiert. Die Überlebensrate der Neuronen wurde anschließend mit dem MTS-Assay bestimmt und in % \pm Standardabweichung im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (100 %) angegeben.

3.3. Generierung von APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Tripel-Knock-out-Mäuse zu generieren, in denen alle drei Proteine der APP/APLP-Genfamilie ausgeschaltet sind, um sämtliche kompensatorische Effekte auszuschließen.

3.3.1. Reduzierte Überlebensraten von APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} - Mäusen

Ursprünglich war beabsichtigt, die APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäuse durch die Verpaarung von zwei APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-}-Mäusen zu erzeugen. Um diese Mäuse zu generieren, wurden im ersten Schritt APP^{+/-} APLP2^{-/-}-Mäuse mit APP^{+/-} APLP1^{-/-}-Mäusen gekreuzt. Nachkommen mit dem Genotyp APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{+/-} wurden in einem

weiteren Schritt mit APP^{-/-} APLP1^{-/-} -Mäusen verpaart, wobei 25 % der Nachkommen mit dem Genotyp APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} erwartet wurden. Die Genotypisierung der Nachkommen ergab jedoch, dass von insgesamt 527 analysierten Nachkommen im Alter von 4 bis 8 Wochen nur drei Mäuse den Genotyp APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} aufwiesen (Tabelle 12). Dies entspricht anstatt der erwarteten Häufigkeit von 25 % nur 0,6 %. Um den Zeitpunkt der Letalität genauer zu analysieren, wurde daraufhin eine kleinere Anzahl von Tieren kurz nach der Geburt (P0) genotypisiert. Von insgesamt 202 an P0 analysierten Tieren waren 27 % APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäuse, was ungefähr dem Erwartungswert von 25 % entspricht. Mäuse mit allen anderen Genotypen wurden an P0 ebenfalls mit der erwarteten Häufigkeit vorgefunden.

Verpaarung der Elterntiere

Nachkommen

Genotypen	Genotyp	erhalten		erwartet		
$\begin{bmatrix} \text{APP}^{-/-} \\ \text{APLP1}^{-/-} \\ \text{APLP2}^{+/+} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \text{APP}^{-/-} \\ \text{APLP1}^{+/-} \\ \text{APLP2}^{+/-} \end{bmatrix} \Rightarrow$	P0					
	APP ^{-/-} , APLP1 ^{-/-} , APLP2 ^{+/-}	55	(27 %)	(25 %)		
	APP ^{-/-} , APLP1 ^{+/-} , APLP2 ^{+/-}	51	(25 %)	(25 %)		
	APP ^{-/-} , APLP1 ^{-/-} , APLP2 ^{+/+}	45	(22 %)	(25 %)		
	APP ^{-/-} , APLP1 ^{+/-} , APLP2 ^{+/+}	51	(25 %)	(25 %)		
	4 bis 8 Wochen					
	APP ^{-/-} , APLP1 ^{-/-} , APLP2 ^{+/-}	3	(0,6 %)	(25 %)		
	APP ^{-/-} , APLP1 ^{+/-} , APLP2 ^{+/-}	203	(38 %)	(25 %)		
APP ^{-/-} , APLP1 ^{-/-} , APLP2 ^{+/+}	121	(23 %)	(25 %)			
APP ^{-/-} , APLP1 ^{+/-} , APLP2 ^{+/+}	200	(38 %)	(25 %)			

Genetischer Hintergrund

C57BL/6 X 129SvEv/Ola

Tabelle 12: Überlebensraten von APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäusen

Von den Nachkommen dieser Verpaarung wurden 202 Tiere kurz nach der Geburt (P0) untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäuse mit der erwarteten Häufigkeit erhalten (27 %). Bei der Analyse von 527 Tieren im Alter von 4 bis 8 Wochen wurden nur noch drei APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäuse gefunden (0,6 %) und damit wesentlich weniger als erwartet (25 %).

Diese Daten zeigen, dass APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäuse mit der erwarteten Häufigkeit geboren werden, jedoch nur in Ausnahmefällen älter als 4 Wochen werden. Es ist anzunehmen, dass auch diese Mutanten ähnlich wie die letalen Doppel-Knock-out-Mäuse kurz nach der Geburt sterben, zumal in den ersten postnatalen Tagen eine Verminderung der Anzahl der Nachkommen beobachtet wurde. Folglich ist nur ein intaktes APLP2-Allel, in Abwesenheit der anderen Proteine der APP/APLP-Genfamilie, nicht ausreichend um das Überleben dieser Mäuse sicherzustellen.

Neugeborene APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäuse wurden analog den Doppel-Knock-out-Mäusen untersucht (vgl. Kapitel 3.1.2.1., Seite 62) und zeigten ebenso keinerlei makroskopische und histologische Auffälligkeiten. Adulte Mäuse dieses Genotyps wurden bisher ausschließlich für die Zucht verwendet. Von den 3 lebensfähigen APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäusen überlebte ein Weibchen 5 Monate und ein Männchen 14 Monate. Die dritte männliche Maus wurde im Alter von 24 Monaten getötet und histologisch untersucht, wobei jedoch keine auffälligen morphologischen Anomalien gefunden wurden.

Bei genauerer Analyse der Genotypverteilung der Nachkommen der in Tabelle 12 dargestellten Verpaarung fiel weiterhin auf, dass APP^{-/-} APLP1^{-/-} -Tiere im Alter von 4 bis 8 Wochen leicht unterrepräsentiert sind (23 % gegenüber 38 % der beiden anderen Genotypen). Da Tiere dieses Genotyps jedoch mit annähernd normaler Häufigkeit geboren wurden (22 % gegenüber 25 % Erwartungswert), ist anzunehmen, dass sie postnatal vermehrt starben. Eine ähnlich reduzierte Überlebensrate wurde bereits bei den Nachkommen aus Verpaarungen von APP^{-/-} APLP1^{-/-} -Elterntieren beobachtet (vgl. Kapitel 3.1.1.1., Seite 56).

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Überlebensrate der Nachkommen der in Tabelle 12 dargestellten Verpaarung generell sehr niedrig ist. Lediglich 54 % aller Nachkommen überlebten die ersten 4 bis 8 Wochen. Für diese Analyse wurden 44 Zuchtpaare berücksichtigt, welche durchschnittlich 13 Monate züchteten.

3.3.2. Generierung von APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen durch verschiedene Verpaarungen

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von nur 3 APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäusen wurden Tripel-Knock-out-Mäuse durch verschiedene Verpaarungstypen generiert (Tabelle 13). Dazu wurden APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäuse entweder untereinander verpaart (Typ A) oder mit APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{+/-} -Mäusen (Typ B) verpaart, wobei APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse mit unterschiedlichen Häufigkeiten, 25 % bei Typ A und 12,5 % bei Typ B, erwartet wurden.

Allerdings konnten nur einige wenige Tripelmutanten, wie ursprünglich beabsichtigt, durch die Verpaarung nach Typ A erzeugt werden. Weil zudem die Reproduktionsrate sehr niedrig war, wurden zusätzlich Verpaarungen von zwei $APP^{-/-}$ $APLP1^{+/-}$ $APLP2^{+/-}$ -Mäusen (Typ C) angesetzt, wobei die erwartete Häufigkeit für Tripel-Knock-out-Mäuse lediglich 6,25 % betrug. Dies hatte zur Folge, dass eine erheblich höhere Anzahl von Tieren generiert werden musste, um für die Analyse ausreichende Tierzahlen von Tripelmutanten zu erhalten.

Wie entsprechend der zuvor beobachteten Letalität von Mäusen des Genotyps $APP^{-/-}$ $APLP1^{-/-}$ $APLP2^{+/-}$ zu vermuten war, wurden keine postnatal überlebenden Tripelmutanten aus den in Tabelle 13 angegebenen Verpaarungen erhalten.

Um die Frage zu klären, ob $APP^{-/-}$ $APLP1^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$ -Mäuse embryonal letal sind, wurden insgesamt 309 Embryos verschiedener Entwicklungsstadien (E12,5 bis P0) aus den Verpaarungen Typ A, B und C gesammelt (Tabelle 13). Die meisten Embryos wurden an E18,5 entnommen, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Embryonalentwicklung weit fortgeschritten ist, die Tiere aber noch nicht geboren waren. Die Gewebeproben wurden in 4 % (w/v) PFA in PBS fixiert und bei 4 °C aufbewahrt, bis nach Genotypisierung genügend Tiere für eine vergleichende histologische Analyse (siehe Kapitel 3.4., Seite 83) vorhanden waren.

Tripel-Knock-out-Verpaarung		Genotypen der Nachkommen	%	Anzahl der erhaltenen Nachkommen								
				E12,5	E13,5	E14,5	E16,5	E17,5	E18,5	E19,5	P0	
Typ A:	$\left(\begin{array}{c} \text{APP}^{-/-} \\ \text{APLP1}^{-/-} \\ \text{APLP2}^{+/-} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{c} \text{APP}^{-/-} \\ \text{APLP1}^{-/-} \\ \text{APLP2}^{+/-} \end{array} \right)$	APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/+}	25 % 50 % 25 %									2 11 3 Σ=16
Typ B:	$\left(\begin{array}{c} \text{APP}^{-/-} \\ \text{APLP1}^{-/-} \\ \text{APLP2}^{+/-} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{c} \text{APP}^{-/-} \\ \text{APLP1}^{+/-} \\ \text{APLP2}^{+/-} \end{array} \right)$	APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/+} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{-/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/+}	12,5 % 25 % 12,5 % 12,5 % 25 % 12,5 %	0 0 1 2 1 1	1 5 3 2 7 3		2 3 1 1 4 1	0 2 1 1 5 2	7 10 2 2 1 4	1 0 1 1 2 1	1 5 1 1 4 1	Σ=5 Σ=21 Σ=12 Σ=11 Σ=26 Σ=6 Σ=13
Typ C:	$\left(\begin{array}{c} \text{APP}^{-/-} \\ \text{APLP1}^{+/-} \\ \text{APLP2}^{+/-} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{c} \text{APP}^{-/-} \\ \text{APLP1}^{+/-} \\ \text{APLP2}^{+/-} \end{array} \right)$	APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/+} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{-/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/+} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{-/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{+/-} APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{+/+}	6,25 % 12,5 % 6,25 % 12,5 % 25 % 12,5 % 6,25 % 12,5 % 6,25 %	2 8 2 4 10 3 0 2 2	0 0 0 1 2 1 0 0 0	0 1 1 3 1 0 1 0		2 0 1 0 2 2 0 2 0	3 9 5 4 18 9 6 9 5	1 1 0 0 5 1 2 5 6	1 7 0 5 19 6 5 7 6	Σ=34 Σ=4 Σ=8 Σ=9 Σ=68 Σ=21 Σ=56

Tabelle 13: Verpaarungstypen für APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäuse

Für die Generierung von APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen wurden Mäuse nach drei verschiedenen Verpaarungstypen angesetzt, wobei unterschiedliche Häufigkeiten (%) für diese Mäuse erwartet wurden: Typ A: 25 % (1 von 4), Typ B: 12,5 % (1 von 8) und Typ C 6,25 % (1 von 16). Durch terminierte Verpaarungen wurden über einen Zeitraum von 18 Monaten insgesamt 23 APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse erzeugt, die in verschiedenen Entwicklungsstadien histologisch untersucht wurden. Die Gesamtzahl der generierten Mäuse betrug 16 bei Typ A, 94 bei Typ B und 199 bei Typ C.

Durch diese Daten wurde bestätigt, dass APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse in allen Entwicklungsstadien sowie unter den neugeborenen Tieren gefunden werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass die Tripel-Knock-out-Mäuse nicht embryonal letal sind.

Die Genotypisierung der Tiere aus den späten Embryonalstadien bis zur Geburt (E17,5 bis P0) ergab, dass APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse mit annähernd erwarteter Häufigkeit auftraten (Tabelle 14). Aus Typ A-Verpaarungen wurden nur drei Würfe mit insgesamt 16 Nachkommen erhalten, von denen 2 Tripel-Knock-out-Mäuse waren (12,5 % anstelle der erwarteten 25 %). Unter 56 Tieren aus Typ B-Verpaarungen waren 9 Tripel-Knock-out-Mäuse (16 %). Damit war die Häufigkeit etwas höher als der Erwartungswert von 12,5 %. Aus Typ C-Verpaarungen wurden 7 Tripel-Knock-out-Mäuse von insgesamt 199 Tieren erhalten (4,5 %). Dies entspricht einem etwas geringeren Wert als erwartet (6,25 %). Diese Daten zeigen, dass APP/APLP-Tripel Knock-out-Mäuse, denen alle drei Proteine der Genfamilie fehlen, bis in die späten Embryonalstadien lebensfähig sind.

Als Schlussfolgerung liegt nahe, dass APP und APLPs zumindest für die frühe Embryonalentwicklung nicht essentiell sind.

Tripel-Knock-out-Verpaarung		Genotypen der Nachkommen	%	Anzahl erhaltener Nachkommen (%) E17,5 – P0	
Typ A:	$\left(\begin{array}{c} APP^{-/-} \\ APLP1^{-/-} \\ APLP2^{+/-} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{c} APP^{-/-} \\ APLP1^{-/-} \\ APLP2^{+/-} \end{array} \right)$	APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}	25 %	2	(12,5 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-}	50 %	11	(69 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/+}	25 %	3	(18,5 %)
				$\Sigma = 16$	
Typ B:	$\left(\begin{array}{c} APP^{-/-} \\ APLP1^{-/-} \\ APLP2^{+/-} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{c} APP^{-/-} \\ APLP1^{+/-} \\ APLP2^{+/-} \end{array} \right)$	APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}	12,5 %	9	(16 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-}	25 %	17	(30 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/+}	12,5 %	5	(9 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{-/-}	12,5 %	5	(9 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/-}	25 %	12	(22 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/+}	12,5 %	8	(14 %)
		$\Sigma = 56$			
Typ C:	$\left(\begin{array}{c} APP^{-/-} \\ APLP1^{+/-} \\ APLP2^{+/-} \end{array} \right) \times \left(\begin{array}{c} APP^{-/-} \\ APLP1^{+/-} \\ APLP2^{+/-} \end{array} \right)$	APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}	6,25 %	7	(4,5 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-}	12,5 %	17	(11 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/+}	6,25 %	6	(4 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{-/-}	12,5 %	9	(6 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/-}	25 %	44	(28 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/+}	12,5 %	18	(12 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{-/-}	6,25 %	13	(8,5 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{+/-}	12,5 %	23	(15 %)
		APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{+/+}	6,25 %	17	(11 %)
		$\Sigma = 154$			

Tabelle 14: Häufigkeiten von Tripel-Knock-out-Mäusen in späten Embryonalstadien bis zur Geburt (E17,5 - P0)

APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäuse wurden durch die drei Verpaarungstypen A, B und C generiert. Die Tabelle zeigt die zu erwartende Häufigkeit für alle Genotypen (%), die Anzahl der in den Entwicklungsstadien E17,5 bis P0 erhaltenen Mäuse sowie deren Häufigkeit für jeden Genotyp. Durch Typ A-Verpaarungen wurden 16 Nachkommen generiert, von denen zwei Tripel-Knock-out-Mäuse waren (12,5 %, erwartete Häufigkeit 25 %). Bei der Typ B-Verpaarung lag die Häufigkeit von APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen mit 16 % (9 von 56 analysierten Mäusen) etwas über dem Erwartungswert von 12,5 %. Bei der Typ C-Verpaarung war die Häufigkeit von APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen mit 4,5 % (7 von 199 analysierten Tieren) etwas geringer als der Erwartungswert von 6,25 %.

3.4. Fehlbildungen bei APP/APLP-defizienten Mäusen

3.4.1. Exenzephalie-Phänotyp

Mit geringer Penetranz wurden bei Knock-out-Mäusen, denen mindestens zwei der insgesamt 6 APP/APLP-Allele fehlten, eine makroskopisch leicht erkennbare Fehlbildung des Gehirns gefunden. Diesen Tieren fehlte die Schädeldecke, sodass sich das Gehirn offen auf dem Kopf aufwölbte. Ein solcher Defekt tritt bei fehlerhaftem Verschluss des Neuralrohrs im Kopfbereich auf und wird als „Exenzephalie“ bezeichnet. Bei einem Tier fehlten zusätzlich die Großhirnhemisphären („Anenzephalie“, siehe Abbildung 16). Die Tiere sind trotz dieser Fehlbildungen bis zur Geburt lebensfähig. Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen Beispiele von Mausembryos verschiedener Entwicklungsstadien mit Exenzephalie.

Einen Überblick über die prozentuale Häufigkeit des Exenzephalie-Phänotyps bei den letalen Doppelmutanten gibt die Tabelle 15 (siehe Seite 86). Dabei wurden Tiere der Embryonalstadien E14 und E17 berücksichtigt. Bereits bei $APLP2^{-/-}$ -Mäusen kann es in seltenen Fällen zu Exenzephalie kommen. Aus den beiden untersuchten Verpaarungen wurden 35 bzw. 42 $APLP2^{-/-}$ -Embryos erhalten und von diesen insgesamt 77 Tieren wies nur eines Exenzephalie auf. Hingegen war die Häufigkeit von Exenzephalie bei Embryos mit 3 APP/APLP-Knock-out-Allelen erhöht auf 3 % ($APP^{+/-} APLP2^{-/-}$) bzw. 5,3 % ($APLP1^{+/-} APLP2^{-/-}$). Von den analysierten Doppelmutanten zeigten 14,7 % der $APP^{-/-} APLP2^{-/-}$ -Embryos (5 von 34) und 4,3 % der $APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}$ -Embryos (2 von 47) Exenzephalie. Daraus resultiert eine erhöhte Häufigkeit von Exenzephalie bei Doppel-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu $APLP2$ -Einfachmutanten. Dabei war der prozentuale Anteil der von Exenzephalie betroffenen Embryos bei APP/APLP2-Doppel-Knock-out-Tieren etwa dreimal so hoch wie bei $APLP1/APLP2$ -Doppel-Knock-out-Tieren.

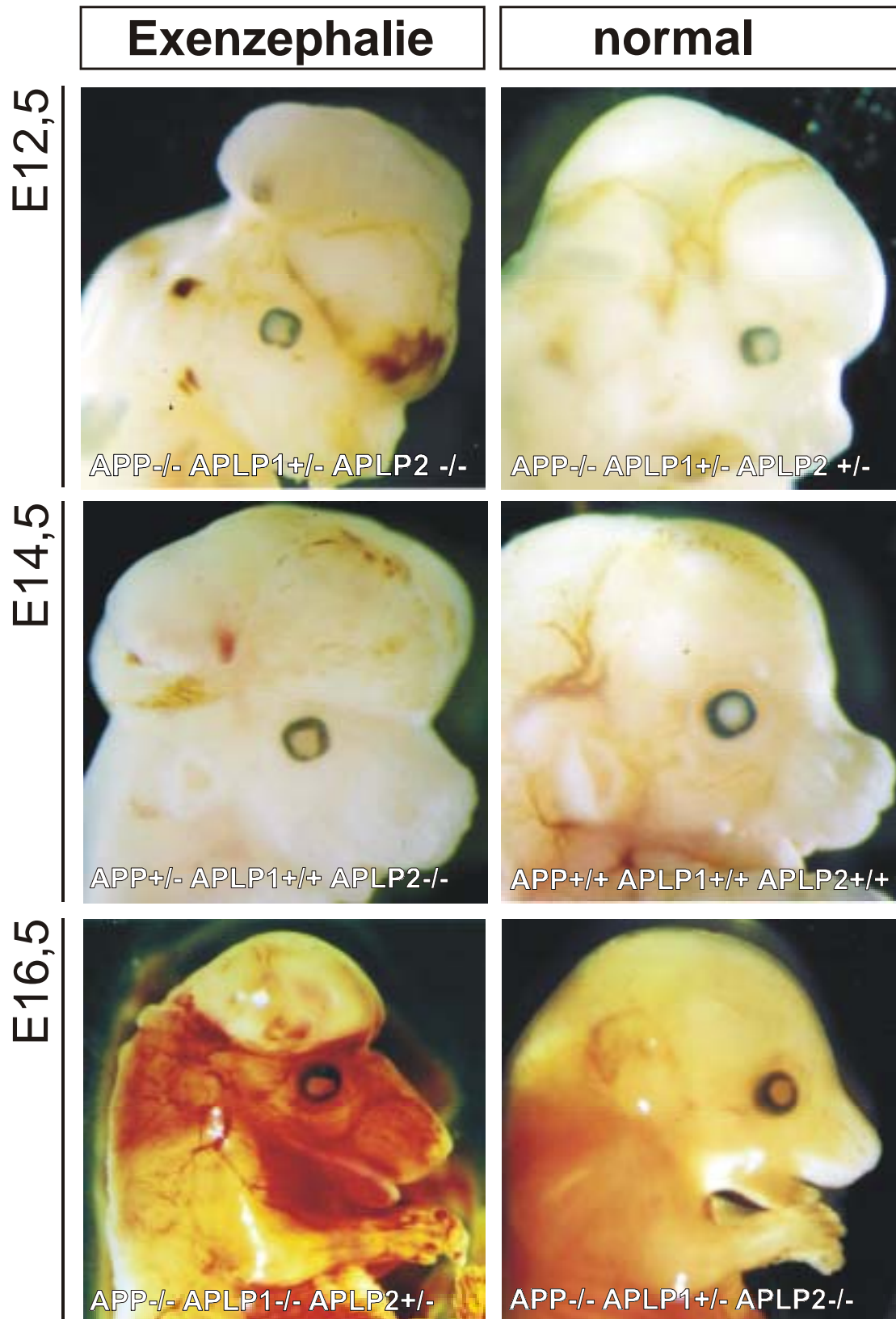


Abbildung 15: Exenzephalie bei APP/APLP-Knock-out-Mäusen in den Entwicklungsstadien E12,5 – E16,5

Die Abbildung zeigt Mäuse verschiedener Genotypen mit Exenzephalie (linke Spalte) und mit normal entwickeltem Gehirn (rechte Spalte). Bei der Fehlentwicklung des Gehirns mit Exenzephalie fehlt die Schädeldecke. Die Tiere wurden an E12,5 bzw. E16,5 aus (APP^{-/-} APLP1^{-/-}APLP2^{+/-}) x (APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{+/-}) -Verpaarungen sowie an E14,5 aus (APP^{+/-} APLP2^{-/-}) x (APP^{-/-} APLP2^{-/-}) -Verpaarungen erhalten.

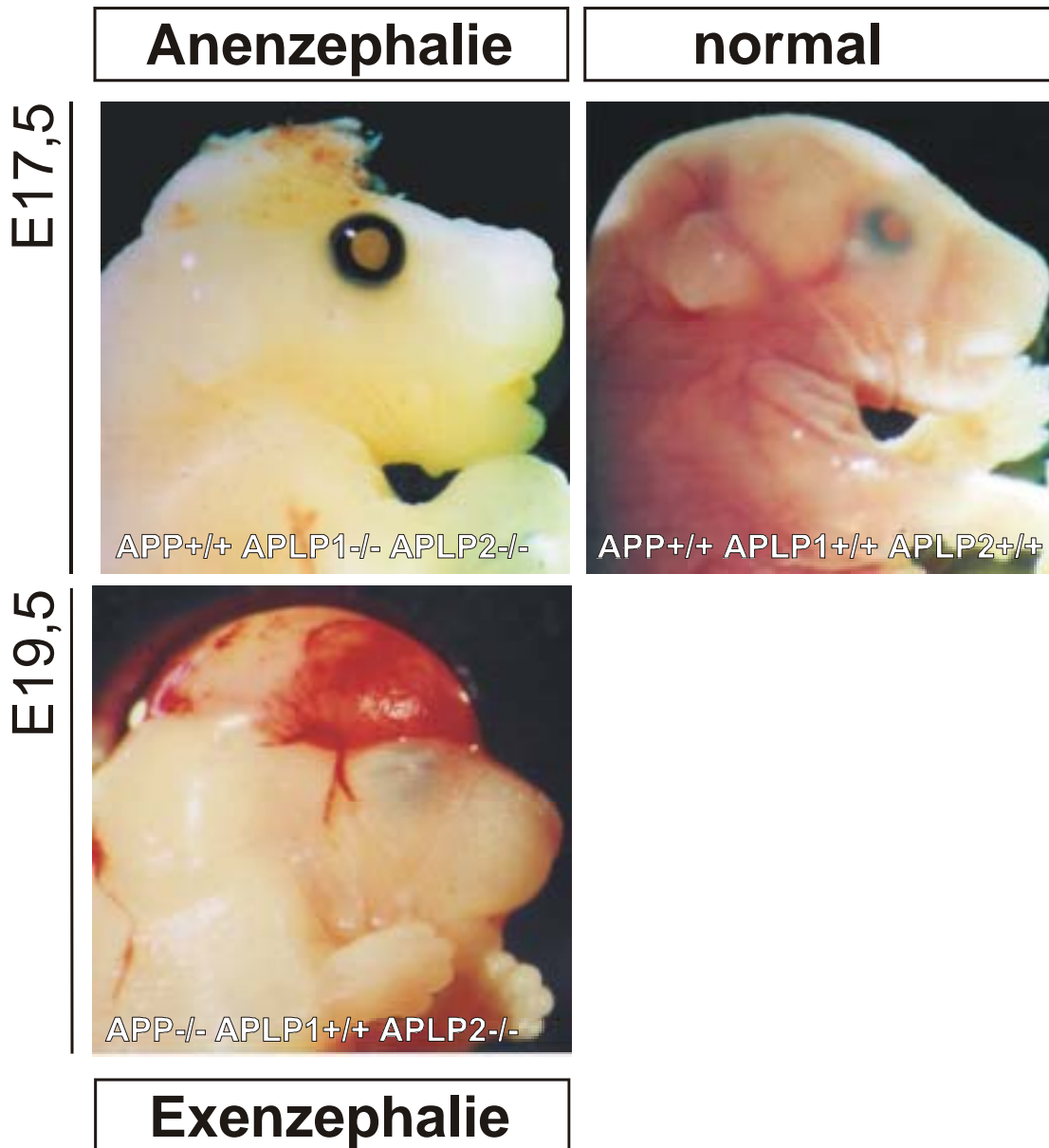


Abbildung 16: Anenzephalie und Exenzephalie bei APP/APLP-Knock-out-Mäusen kurz vor der Geburt

Die Abbildung zeigt Mäuse verschiedener Genotypen mit Anenzephalie (oberes Bild linke Spalte), Exenzephalie (unteres Bild linke Spalte) und mit normal entwickeltem Gehirn (rechte Spalte). Die Tiere wurden an E17,5 aus (APLP1^{+/-} APLP2^{-/-}) x (APLP1^{+/-} APLP2^{-/-}) -Verpaarungen und an E19,5 aus (APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{+/-}) x (APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{+/-}) -Verpaarungen erhalten. Bei Anenzephalie fehlt nicht nur die Schädeldecke, sondern auch die Hemisphären des Großhirns.

Verpaarung der Elterntiere		Nachkommen		
Genotypen		Genotyp	erhalten	Exenzephalie (%)
$\begin{bmatrix} APP^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} APP^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{bmatrix} \Rightarrow$		APLP2 ^{-/-} , APP ^{+/+}	35	1 (2,9 %)
		APLP2 ^{-/-} , APP ^{+/-}	67	2 (3 %)
		APLP2^{-/-}, APP^{-/-}	34	5 (14,7 %)
$\begin{bmatrix} APLP1^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} APLP1^{+/-} \\ APLP2^{-/-} \end{bmatrix} \Rightarrow$		APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/+}	42	0 (0 %)
		APLP2 ^{-/-} , APLP1 ^{+/-}	76	4 (5,3 %)
		APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-}	47	2 (4,3 %)

Tabelle 15: Häufigkeit von Exenzephalie bei Mäusen aus Doppel-Knock-out-Verpaarungen an E14,5 und E17,5

Die Tabelle zeigt die Genotypen der Elterntiere und Nachkommen der beiden untersuchten Doppel-Knock-out-Verpaarungen. Die Anzahl der erhaltenen Nachkommen entspricht der Summe der jeweiligen Nachkommen, welche im Embryonalstadium E14,5 und E17,5 analysiert wurden. APLP2^{-/-}-Embryos zeigten Exenzephalie mit einer Häufigkeit von 0 % bzw. 2,9 %. Bei den APP^{+/-} APLP2^{-/-}- und APLP1^{+/-} APLP2^{-/-}-Tieren war die Häufigkeit von Exenzephalie erhöht auf 3 % bzw. 5,3 %. APP^{-/-} APLP2^{-/-}-Tiere mit Exenzephalie konnten mit einer vergleichsweise hohen Häufigkeit von 14,7 % (5 Tiere von 34) gefunden werden, bei APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}-Tieren lag die Häufigkeit bei 4,3 % (2 Tiere von 47).

Auch aus Verpaarungen, die zur Generierung von Tripel-Knock-out-Tieren angesetzt wurden (siehe Tabelle 13, Seite 80) wurden vereinzelt Mäuse mit Exenzephalie in verschiedenen Entwicklungsstadien erhalten (Tabelle 16). Die Probenzahl war jedoch zu gering, um daraus ableiten zu können, dass der Exenzephalie-Phänotyp mit zunehmender Anzahl ausgeschalteter APP/APLP-Allele häufiger auftritt.

Parallel dazu wurden etwa 350 Wildtyp-Embryos (C57BL/6 x 129SvEv) analysiert, wobei kein einziges Tier Exenzephalie aufwies.

Genotyp	Anzahl der fehlenden APP/APLP-Allele	Entwicklungsstadium	Anzahl der analysierten Mäuse	Anzahl der Mäuse mit Exenzephalie
APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{+/+}	2	E12,5	2	1
APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{+/-}	3	E12,5	2	1
APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{+/-}	4	E12,5	11	1
	4	E16,5	4	1
APP ^{-/-} APLP1 ^{+/+} APLP2 ^{-/-}	4	E18,5	6	1
	4	E19,5	2	1
APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{-/-}	5	E12,5	6	1
APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-}	5	E16,5	3	1
APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{-/-}	6	E18,5	10	1

Tabelle 16: Genotypen der Mäuse mit Exenzephalie aus APP/APLP-Tripel-Knock-out-Verpaarungen

In dieser Tabelle sind die Genotypen aller Mäuse aus APP/APLP-Tripel-Knock-out-Verpaarungen aufgeführt, bei denen Exenzephalie auftrat. Neben der Anzahl der gefundenen Mäuse mit Exenzephalie ist die Anzahl der analysierten Mäuse, welche aus Typ B- und Typ C-Verpaarungen erhalten wurden (vgl. Tabelle 13, Seite 80), deren Entwicklungsstadium und die Anzahl fehlender APP/APLP-Allele angegeben.

3.4.2. Lissenzephalie Typ 2 bei APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen

Eine detaillierte histopathologische Untersuchung des Gehirns der Tripelmutanten ergab, neben Exenzephalie, weitere Fehlbildungen.

Die Hälfte der insgesamt 16 analysierten APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}-Mäuse zeigte kortikale Dysplasien in Form von Protrusionen der äußeren Kortexschicht. Hierbei wandern Neuronen, die sich normalerweise in der kortikalen Platte anreichern, durch die Marginalzone des Kortex und lagern sich in darüberliegende Schichten ein (Abbildung 17). Dies führt zu einer lokalen Störung der kortikalen Schichtung, welche durch histologische Analyse deutlich sichtbar gemacht werden kann. Beim Menschen sind mehrere Syndrome beschrieben, bei denen derartige fehlgelagerte („ektopische“) Neuronen neben anderen Anomalien zu beobachten sind, und als Lissenzephalie Typ 2 zusammengefaßt werden (Übersichtsartikel: Walsh, 1999). Bei den meisten Tieren wurden ektopische Neuronen nur an einer Stelle im fronto-parietalen Kortex gefunden, jedoch nicht im medialen kortikalen Bereich. Multiple Protrusionen

innerhalb einer Hemisphäre traten nur auf, wenn diese sehr klein waren (vgl. Abbildung 17D). Mit zunehmendem Alter der Tripelmutanten nahm die Größe der Protrusionen zu (vgl. E17,5 bis P0 in Abbildung 17 A bis F).

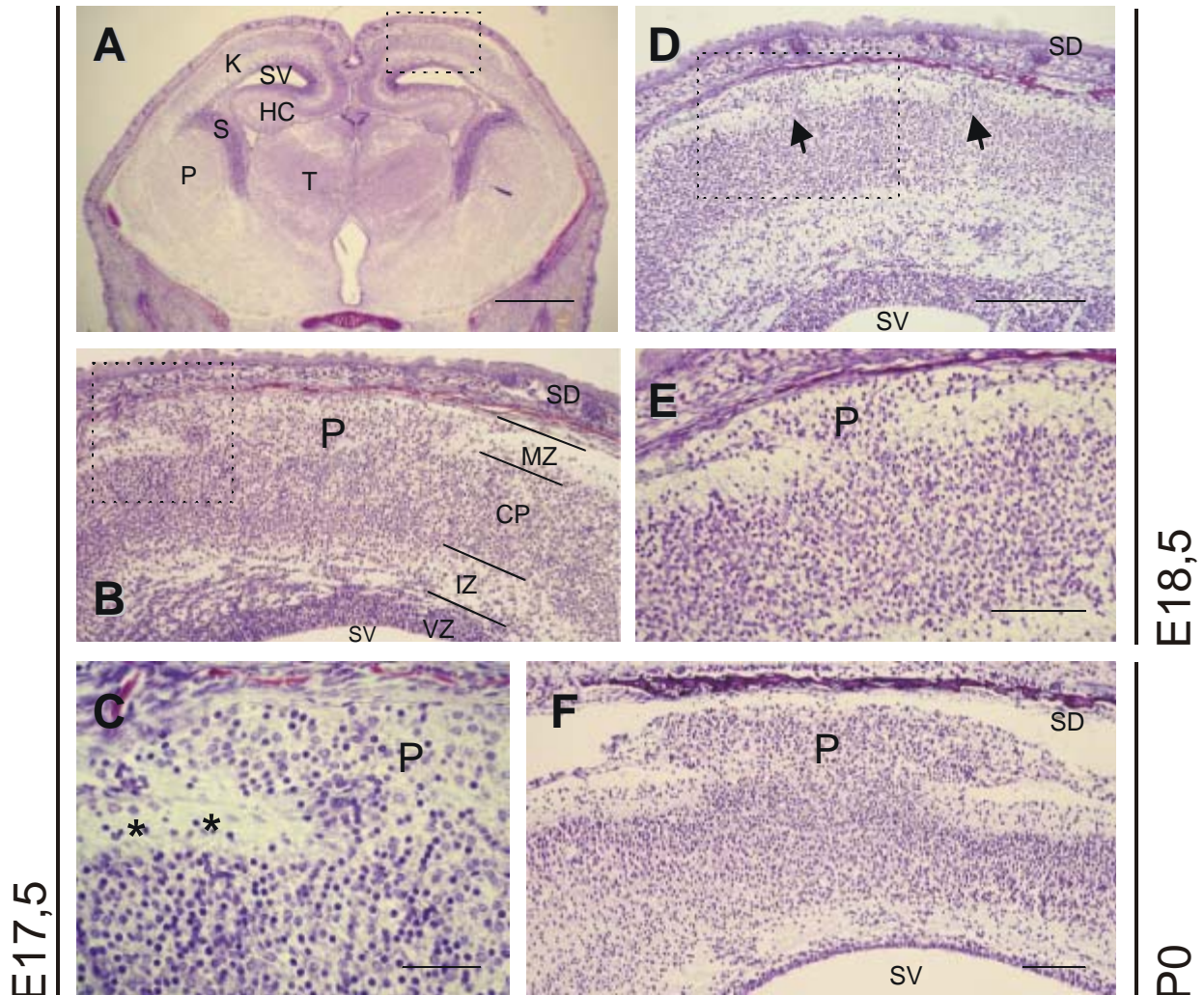


Abbildung 17: Histologie kortikaler Dysplasien (Protrusionen) bei $APP^{-/-}$ $APLP1^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$ -Mäusen

Diese Abbildung zeigt Frontalschnitte des Großhirns mit Nisslfärbung. In der Übersichtsvergrößerung in **A** sind die Regionen von Thalamus (T), Pallidum (P), Striatum (S), Hippocampus (HC), Seitenventrikel (SV) und Kortex (K) gekennzeichnet (Größenbalken 1 mm). Es handelt sich hierbei um eine Tripel-Knock-out-Maus, die an E17,5 untersucht wurde. **B** ist eine Vergrößerung (Größenbalken: 100 μ m) des in **A** gekennzeichneten Ausschnitts, in dem die kortikale Schichtung durch fehlgelagerte Neuronen (Protrusionen, P) verändert ist. Zwischen der Schädeldecke (SD) und dem Seitenventrikel (SV) sind die Schichten der Großhirnrinde gekennzeichnet: Ventrrikularzone (VZ), Intermediärzone (IZ), Kortikale Platte (CP) und Marginalzone (MZ). In **C** ist eine weitere Vergrößerung (Größenbalken: 25 μ m) des in **B** gekennzeichneten Ausschnitts dargestellt. Im linken Bereich ist die regelmäßige Ausbildung der Marginalzone mit Sternchen markiert. Rechts daneben wandern Neuronen (P) fälschlicherweise aus der kortikalen Platte in die darüberliegende Marginalzone. **D** zeigt

eine weitere Tripel-Knock-out-Maus, deren Untersuchung an E18,5 zwei Protrusionen ergab (markiert durch Pfeile; Größenbalken: 100 µm, entspricht der Vergrößerung wie in B). In **E** ist eine Vergrößerung der Protrusion (P) des in D gekennzeichneten Ausschnitts dargestellt (Größenbalken: 50 µm). In **F** ist die Protrusion (P) einer dritten Tripel-Knock-out-Maus gezeigt, welche an P0 untersucht wurde. (Größenbalken: 100 µm).

Einen Überblick über die Häufigkeit von Protrusionen bei Tripelmutanten gibt die nachfolgende Tabelle 17. Es wurde festgestellt, dass 50 % aller APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse eine Protrusion aufwiesen (8 von 16 analysierten Mäusen). Nur bei einer von 14 analysierten APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{-/-} -Mäusen wurden Protrusionen gefunden (entspricht 7 %). Hingegen waren bei sämtlichen APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäuse keine Protrusionen nachweisbar. Offenbar reicht bereits ein einzelnes, nicht inaktiviertes APP/APLP-Allel aus, um das Auftreten von Protrusionen weitgehend zu verhindern. Auch alle anderen Kontrollmäuse (Geschwister-, Doppel-Knock-out- und Wildtyp-Tiere) zeigten keine Protrusionen.

Das Fehlen aller APP/APLP-Allele führt demnach in erhöhtem Maß zu Protrusionen. Mit sehr geringer Häufigkeit traten Protrusionen jedoch auch auf, wenn nicht alle APP/APLP-Allele fehlen.

Genotyp	Anzahl der histologisch analysierten Tiere E17,5 – P0	Anzahl der Tiere mit Protrusionen (in %)
APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{-/-}	16	8 (50 %)
APP ^{-/-} APLP1 ^{+/-} APLP2 ^{-/-}	14	1 (7 %)
APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-}	34	0

Tabelle 17: Häufigkeit von Protrusionen bei APP/APLP-Tripelmutanten

Bei 50 % der APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäuse (8 von 16 analysierten Tieren) wurden Protrusionen nachgewiesen. Von 14 analysierten APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{-/-} -Mäusen zeigte nur 1 Maus (7 %) eine Protrusion, während keine der 34 analysierten APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} -Mäuse eine solche Fehlbildung aufwies.

Im Folgenden wurden die Protrusionen durch spezifische Färbungen charakterisiert (Abbildung 18, Seite 91). Die fehlerhafte neuronale Migration wird möglicherweise durch Veränderungen der Basalmembran hervorgerufen, welche sich in direktem Kontakt mit der Hirnoberfläche unterhalb der Pia Mater befindet. Deshalb wurde die Basalmembran durch Versilberung nach Gomori kenntlich gemacht, welche deren Retikulinfasern anfärbt. Dies zeigte deutlich, dass im Bereich der Protrusionen migrierende Neuronen die Basalmembran

durchbrechen. Um zu prüfen, ob der Zusammenbruch der Basalmembran primär durch abnormale Expression von Laminin verursacht wird, wurde α -Laminin immunhistochemisch angefärbt. In $\alpha 6$ -Integrin^{-/-}-Mäusen wurden ähnliche neuronale Ektopien beschrieben, wobei eine veränderte Expression dieses Strukturproteins der Basalmembran vorlag (Georges-Labouesse et al., 1998). Die Färbung von α -Laminin zeigte ein identisches Signal in der Basalmembran bei APP/APLP-Mutanten und Wildtyp-Tieren, jedoch nicht innerhalb der Protrusionen. An diesen Stellen war die Struktur der Basalmembran zerstört und keine Expression von α -Laminin nachweisbar. Aufgrund dieser Beobachtungen ist jedoch bisher nicht zu klären, ob die Defekte der Basalmembran Ursache oder Folge der gestörten neuronalen Migration sind.

Weiterhin wurde das in den synaptischen Vesikeln lokalisierte Synaptophysin als Marker für neuronale Differenzierung immunhistochemisch angefärbt. Im Bereich der Protrusionen war eine Verstärkung des Signals im Vergleich zur Marginalzone nachweisbar.

Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten kortikaler Dysplasien sind Veränderungen der Verteilung oder der Funktion der Cajal-Retzius-Neuronen. Die Anwesenheit dieser Neuronen innerhalb der Marginalzone ist essentiell für die korrekte Ausbildung der kortikalen Schichten (Ogawa et al., 1995). Bei PS1^{-/-}-Mäusen führte eine Reduktion der Cajal-Retzius-Neuronen zu neuronalen Ektopien (Hartmann et al., 1999). Bei APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}-Mäusen zeigte die immunhistochemische Färbung der Cajal-Retzius-Neuronen mit einem anti-Reelin-Antikörper deren normale Lokalisation im oberen Bereich der Marginalzone. In Protrusionen waren diese Neuronen jedoch auch in den darüberliegenden Schichten nachweisbar, als wären sie mit der kortikalen Platte nach oben ausgestülpt worden, oder sie lagen einzeln verstreut an untypischer Stelle.

Des Weiteren ergab eine Quantifizierung der Zahl der Cajal-Retzius-Neuronen in APP/APLP-Tripelmutanten keine signifikante Reduktion gegenüber Kontrolltieren (Geschwister- und Wildtyp-Tiere), wobei 3 bis 4 Tiere pro Genotyp analysiert wurden. Neuronale Ektopien in APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen ließen sich daher nicht auf eine Verminderung oder generelle Fehllokalisierung der Cajal-Retzius-Neuronen zurückführen.

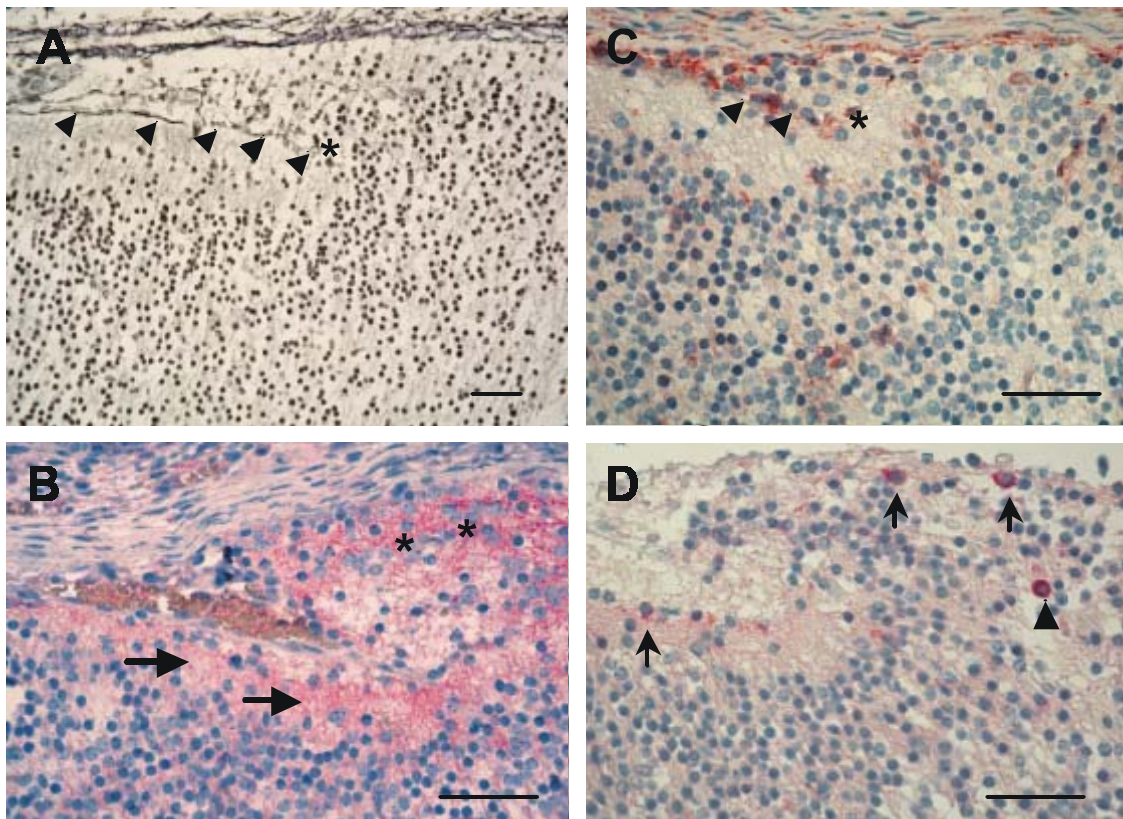


Abbildung 18: Histochemische Färbungen in Bereichen mit Protrusionen bei $APP^{-/-}$ $APLP1^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$ -Mäusen

Diese Abbildung zeigt eine Gomori-Versilberung (**A**) und immunohistochemische Färbungen (**B**, **C**, **D**) in Frontalschnitten durch das Großhirn in Höhe des Hippocampus. **A** zeigt auf der rechten Seite des Bildes eine Protrusion, welche sich über den Bereich der Basalmembran erstreckt. Die Pfeilspitzen markieren die versilberte Basalmembran der weichen Hirnhaut (Pia Mater), welche an der mit dem Stern markierten Stelle abbricht. In **B** ist gezeigt, dass im Bereich der Protrusion ein verstärktes Signal von Synaptophysin (rot, markiert durch Sterne) nachweisbar ist. Die Pfeile markieren die Marginalzone. Die Färbung von α -Laminin (rot) ist in **C** dargestellt. Die Pfeilspitzen markieren das Signal an der Basalmembran, welches an der mit dem Stern markierten Stelle abbricht. In **D** wurden Cajal-Retzius-Neuronen mit einem anti-Reelin-Antikörper angefärbt (Pfeile). Eine fehlgelagerte positive Zelle im Bereich der Protrusion ist mit einer Pfeilspitze markiert. Die Proben wurden aus zwei Tripel-Knock-out-Mäusen im Entwicklungsstadium P0 (**A**) bzw. E17,5 (**B**, **C**, **D**) gewonnen.

Größenbalken in **A**: 100 μm ; in **B**, **C**, **D**: 50 μm .

Im Gegensatz zu den relativ häufig beobachteten Protrusionen wurden bei nur einer einzigen $APP^{-/-}$ $APLP1^{-/-}$ $APLP2^{-/-}$ -Maus normalerweise nicht vorhandene tiefe Einfaltungen der Großhirnrinde und der Retina gefunden (Abbildung 19). Diese Fehlbildung wird als Polymikrogyrie bezeichnet.

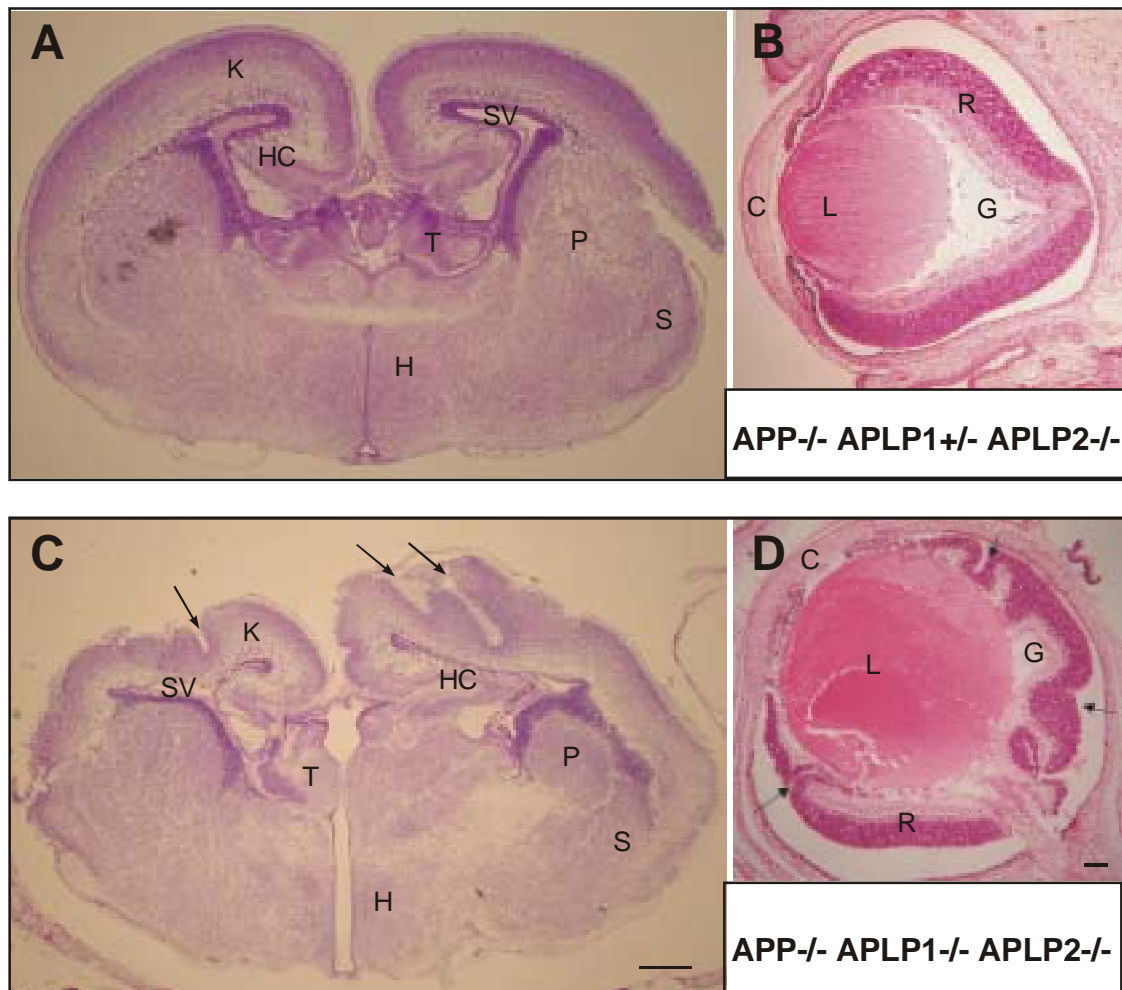


Abbildung 19: Einfaltungen der Großhirnrinde und im Auge einer $APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}$ -Maus

Die Abbildungen **A** und **C** zeigen Frontalschnitte des Großhirns mit Nissl-Färbung. Die Abbildungen **B** und **D** zeigen Schnitte des Auges mit HE-Färbung. In der oberen Bildreihe ist die normale Histologie einer unauffälligen Kontrollmaus mit dem Genotyp $APP^{-/-} APLP1^{+/+} APLP2^{-/-}$ an P0 dargestellt. Hingegen ist in der unteren Bildreihe eine $APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}$ -Maus gezeigt, die abnormale Einfaltungen (markiert durch Pfeile) der Großhirnrinde (**C**) und der Retina (**D**) aufweist. Die Bereiche des Großhirns sind gekennzeichnet als Hypothalamus (H), Striatum (S), Pallidum (P), Thalamus (T), Hippocampus (HC), Seitenventrikel (SV) und Kortex (K). Größenbalken: 1 mm. Im Auge sind die Regionen von Hornhaut (C), Linse (L), Glaskörper (G) und Retina (R) beschriftet. Größenbalken: 1 mm. Die Ablösung der Retina und die Schrumpfung des Glaskörpers sind Artefakte.

Zusammenfassend ist die Häufigkeit der Fehlbildungen bei Tripelmutanten verschiedener Entwicklungsstadien in der nachfolgenden Tabelle 18 dargestellt. Die histologisch analysierten Mäuse stammen aus den Verpaarungen Typ B und C (vgl. Tabelle 13, Seite 80). Relativ häufig traten Protrusionen auf (bei 8 von insgesamt 16 analysierten Tieren). Hingegen wurden Polymikrogyrie und Exenzephalie nur bei jeweils einem Tier gefunden. Insgesamt hatten demnach 10 der 16 in den Entwicklungsstadien E17,5 bis P0 analysierten Tripel-

Knock-out-Mäuse eine Fehlbildung (entspricht 62,5 %). Die Analyse von Tieren aus späten Entwicklungsstadien lässt keine Aussage darüber zu, wann genau diese Fehlbildungen auftreten. Gegenwärtig werden daher weitere Tiere aus früheren Entwicklungsstadien untersucht, die bisher noch nicht in genügender Anzahl generiert werden konnten.

Entwicklungsstadium	Anzahl analysierter Embryos	Fehlbildungen		
		Protrusionen	Polymikrogyrie	Exenzephalie
E17,5	2	1	0	0
E18,5	10	6	0	1
E19,5	2	0	0	0
P0	2	1	1	0

Tabelle 18: Häufigkeit der Fehlbildungen bei APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen verschiedener Entwicklungsstadien

Bei den untersuchten APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen wurden Fehlbildungen in Form von Protrusionen, Polymikrogyrie und Exenzephalie gefunden. Die Tabelle zeigt für verschiedene Entwicklungsstadien (E17,5 bis P0) die Anzahl der analysierten Embryos und wieviele Embryos davon Fehlbildungen hatten.

Im Augenblick ist der molekulare Entstehungsmechanismus der Dysplasien (Exenzephalie, Lissenzephalie Typ 2 und Polymikrogyrie), welche bei APP/APLP-defizienten Mäusen beobachtet wurden, noch unklar. Allerdings gibt der erstmalige Nachweis dieser Fehlbildungen bei APP/APLP-Knock-out-Mäusen einen bedeutsamen Hinweis auf eine Funktion dieser Proteine bei der neuronalen Migration.

4. DISKUSSION

Während das klinische Bild der Alzheimerschen Krankheit und die zugrundeliegenden neuropathologischen Veränderungen im Gehirn schon lange bekannt sind, beginnt man erst seit wenigen Jahren, die molekularen Grundlagen zu verstehen. Ein Spaltprodukt des APP, das β -Amyloid-Peptid, spielt hierbei eine zentrale Rolle. Da sich bisherige Arbeiten überwiegend auf die Funktionen von APP konzentrierten und diese meist aus in vitro-Experimenten abgeleitet wurden, ist über das Spektrum möglicher in vivo-Funktionen der Proteine der APP-Genfamilie, insbesondere der APLPs, bisher nur wenig bekannt.

In dieser Arbeit werden Knock-out-Mausmodelle beschrieben, bei denen das Amyloid-Vorläuferprotein APP sowie die beiden anderen Proteine der Genfamilie APLP1 und APLP2 ausgeschaltet wurden. Die durchgeführten Untersuchungen an APP/APLP-Knock-out-Mäusen sollten zum besseren Verständnis der physiologischen Funktionen der APP/APLP-Proteine beitragen. Dazu wurden zunächst die Doppel-Knock-out-Mäuse aller drei möglichen Kombinationen von APP, APLP1 und APLP2 generiert und charakterisiert. Weiterhin gelang es im Rahmen dieser Arbeit, Tripel-Knock-out-Mäuse zu generieren, die keinerlei APP/APLP-Proteine mehr exprimieren. Durch die Analyse des Phänotyps dieser Mäuse konnten neue Rückschlüsse auf die zellulären Prozesse gezogen werden, in welche diese Proteine involviert sind.

4.1. APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäuse sind postnatal letal

Einfach-Knock-out-Mäuse, bei denen nur eines der APP/APLP- Gene ausgeschaltet ist, haben einen weitgehend unauffälligen Phänotyp. Im Gegensatz dazu sterben zwei der drei möglichen Doppel-Knock-out-Mäuse ($APP^{-/-} APLP2^{-/-}$ und $APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}$) kurz nach der Geburt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass APP/APLP-Proteine essentielle und teilweise überlappende Funktionen haben. Erstmals konnte gezeigt werden, dass APLP2 eine zentrale Rolle spielt, da sein Fehlen sowohl in Kombination mit inaktiviertem APP als auch mit inaktiviertem APLP1 postnatal letal ist. Hingegen sind $APP^{-/-} APLP1^{-/-}$ -Mäuse überraschenderweise lebensfähig und zeigen keine auffälligen Anomalien. Dies legt die Vermutung nahe, dass lebenswichtige Funktionen bei diesen Mäusen durch APLP2 kompensiert werden.

Die in dieser Arbeit beschriebene postnatale Letalität von APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen wurde ebenfalls durch von Koch und Mitarbeitern (1997) beschrieben, welche dieselbe APLP2^{-/-} -Mauslinie mit einer APP^{-/-} -Mauslinie gekreuzt hatten, die von Zheng und Mitarbeitern (1995) generiert wurde. Während wir bei unseren APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen eine fast vollständige Penetranz der postnatalen Letalität beobachteten, überlebten 26 % der APP^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse bei von Koch und Mitarbeitern (1997) bis ins Erwachsenenalter. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die verschiedenen APP-Knock-out-Mauslinien zurückzuführen, welche sich in der Größe der Deletion im APP-Genlocus und im genetischen Hintergrund unterscheiden. Da sich der Phänotyp der beiden APP^{-/-} -Linien kaum unterscheidet, wird die unterschiedliche Penetranz wahrscheinlich durch verschiedene Allele des genetischen Hintergrunds hervorgerufen (Übersichtsartikel: Müller, 1999).

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Überlebensdauer von APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Doppel-Knock-out-Mäusen mit 129SvEv-Hintergrund geringfügig höher ist als auf gemischtem C57BL/6 x 129SvEv-Hintergrund. Dies ist vermutlich auf den Einfluss von spezifischen Allelen des 129SvEv-Hintergrunds zurückzuführen. Auch bei einer Reihe anderer Knock-out-Mäuse wurde eine Abhängigkeit der Überlebensrate vom genetischen Hintergrund gezeigt. (Übersichtsartikel: Müller, 1999).

Der Phänotyp der beiden postnatal letalen Doppel-Knock-out-Mäuse (APP^{-/-} APLP2^{-/-} und APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}) ist bezüglich des Todeszeitpunkts und des Fehlens morphologischer Anomalien sehr ähnlich und lässt einen gemeinsamen auslösenden Mechanismus vermuten, obwohl die Ursache derzeit ungeklärt ist. Da im Gegensatz zu den ubiquitär exprimierten Proteinen APP und APLP2 die Expression von APLP1 auf das Nervensystem beschränkt ist, ist eine Fehlfunktion des Nervensystems als Ursache der Letalität speziell für die APLP1/APLP2-Doppel-Knock-out-Mäuse denkbar. Diese Annahme wird unterstützt durch funktionelle Untersuchungen des homologen Proteins APL-1 in *Caenorhabditis elegans* (Daigle und Li, 1993; Hornsten A, 1999). Interessanterweise ist ein Knock-out des singulären, ubiquitär exprimierten Gens *apl-1* letal. Durch transgene, neuronenspezifische Expression des APL-1-Proteins auf dem *apl-1*^{-/-} -Hintergrund („*transgenic rescue*“) werden jedoch wiederum lebensfähige Tiere erhalten. Folglich führt das Ausschalten von APL-1 zu neuronalen Fehlfunktionen, welche Letalität hervorrufen.

4.2. Letale APP/APLP-Doppel-Knock-out-Mäuse sind morphologisch unauffällig

Detaillierte Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Ursache der postnatalen Letalität der APP^{-/-} APLP2^{-/-} und APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Doppel-Knock-out-Mäuse zu klären. Diese Analysen sollten Effekte aufdecken, die durch das Fehlen von zwei APP/APLP-Proteinen hervorgerufen werden. Die gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden genauer diskutiert. Es konnte allerdings generell nicht ausgeschlossen werden, dass in Doppel-Knock-out-Mäusen eine Kompensation durch das noch vorhandene dritte Familienmitglied erfolgt.

4.2.1. Makroskopische und histologische Analysen der letalen APP/APLP-Knock-out-Mäuse zeigen normale Organentwicklung

Die makroskopischen und histologischen Untersuchungen der letalen APP/APLP-Knock-out-Mäuse ergaben keinerlei Fehlbildungen der Organsysteme und damit keine offensichtliche Ursache für deren Letalität. Insbesondere war das Verdauungssystem normal ausgebildet und es wurden im Verdauungstrakt bereits verdaute Nahrungsbestandteile gefunden, was gegen eine Störung des Ernährungsapparates spricht. Herz und Lungen hatten normale Größe, jedoch können Schädigungen der autonomen Innervation des Herzes nicht ausgeschlossen werden. Da in dieser Arbeit keine weiterführenden Untersuchungen durchgeführt wurden, konnte nicht direkt auf funktionelle Beeinträchtigungen der Organsysteme geschlossen werden.

Um zu prüfen, ob morphologische Anomalien des Zentralnervensystems die Letalität hervorgerufen, wurde eine ausführliche histopathologische Untersuchung des Gehirns durchgeführt. Insbesondere wurde die korrekte Schichtenstruktur im Kortex und Hippocampus näher untersucht, da APP/APLPs intrazellulär an das Protein mDab1 binden (Homayouni et al., 1999) und dessen Fehlen in mDab1^{-/-} -Mäusen zu ungeordneter Migration von Neuronen führt (Rice et al., 1998). mDab1 ist an der Signaltransduktion des sezernierten Proteins Reelin beteiligt. Wie die mDab1^{-/-} -Mäuse zeigen auch Reelin^{-/-} -Mäuse eine Störung der Schichtenstruktur in verschiedenen Gehirnregionen, den sogenannten „reeler“-Phänotyp (D'Arcangelo et al., 1995). Dabei ist im Kortex eine Anordnung der Schichten in umgekehrter Reihenfolge zu beobachten (Ogawa et al., 1995). Normalerweise wird während der Ausbildung der kortikalen Schichten das Einwandern von weiteren Neuronen durch Reelin-

vermittelte Interaktionen kontrolliert. Dazu wird Reelin von den Cajal-Retzius-Neuronen in der Marginalzone sezerniert und bindet an einen Rezeptorkomplex, welcher aus dem ApoE-Rezeptor 2, dem VLDL-Rezeptor und möglicherweise Cadherinen besteht (D'Arcangelo et al., 1999; Bothwell und Giniger, 2000). An diesen Rezeptorkomplex bindet anschließend das intrazelluläre Adaptorprotein mDab1, das in phosphorylierter Form weitere Signaltransduktionskaskaden vermittelt, welche die zelluläre Antwort hervorrufen. Das Neuron erhält so z. B. das Signal, seine Migration an einer bestimmten Position zu beenden und sich auszudifferenzieren. Dieser Mechanismus führt zur Einlagerung von Neuronen in die korrekten Schichten. Die Bindung von mDab1 an APP/APLP-Proteine lässt eine Beteiligung in der Reelin-Signaltransduktionskaskade vermuten. Durch Untersuchungen an APP/APLP-Einfach- und Doppelmutanten konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Deren Gehirne wiesen keine morphologischen Anomalien auf. Sowohl die Schichtung von Kortex und Hippocampus als auch die Dichte und Anordnung von Neuronen war gegenüber Wildtyp-Tieren unverändert (vgl. Abbildung 7, Seite 63).

Da eine Anreicherung von APLP2 in olfaktorischen Neuronen beschrieben ist (Thinakaran et al., 1995), wurde außerdem eine Untersuchung des olfaktorischen Bulbus durchgeführt. Diese ergab jedoch ebenfalls keine auffälligen Veränderungen der Verteilung und Dichte der Neuronen in letalen Doppel-Knock-out-Mäusen. Eine Beeinträchtigung des Geruchsinns ist daher unwahrscheinlich.

Die Beschreibung anti-apoptotischer Eigenschaften von APP in einer APP-defizienten Neuroblastoma-Zelllinie (B103) deutet auf eine Rolle von APP während der Apoptose hin (Xu et al., 1999). Die bisherigen Analysen in Gehirnschnitten neugeborener APP/APLP-Knock-out-Mäuse zeigten jedoch keine Erhöhung der spontanen Apoptoserate (siehe TUNEL-Färbung in Abbildung 7, Seite 63). Eine ergänzende Untersuchung von Neuronen dieser Mäuse hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Dieser Ansatz wäre für weiterführende Untersuchungen von großem Interesse.

4.2.2. Die Expression und Aggregation von Neurotransmitter-Rezeptoren ist bei letalen APP/APLP-Knock-out-Mäusen nicht beeinträchtigt

Die bereits in der Literatur beschriebene Lokalisation von APP und APLP1 in Synapsen (Schubert et al., 1991; Kim et al., 1995) deutet auf eine mögliche Funktion der APP/APLP-

Proteine an neuronalen Kontaktstellen hin. In dieser Arbeit konnte durch immunhistochemische Analysen gezeigt werden, dass in Rückenmarksschnitten sowie in Kulturen primärer hippocampaler Neuronen von APP/APLP-Knock-out-Mäusen eine normale Expression und Aggregation von Neurotransmitter-Rezeptoren erfolgt. Bei mikroskopischer Untersuchung der Rezeptoraggregate an den Synapsen in APLP2^{-/-}-Mäusen und in letalen APP/APLP2- bzw. APLP1/APLP2-Doppelmutanten wurde ein ähnliches Erscheinungsbild wie bei Wildtyp-Tieren gefunden (vgl. Abbildung 8, Seite 65 und Abbildung 9, Seite 67/68). Folglich sind bei den APP/APLP-Knock-out-Tieren die Ausbildung von Synapsen sowie die Aggregation der untersuchten Neurotransmitter-Rezeptoren (NMDAR 1, GluR 2/3, GlyR α/β , GABA_AR $\beta 2/3$) nicht beeinträchtigt.

APP^{-/-}-Mäuse zeigen eine Hypersensitivität gegenüber Kainat-induzierten Krämpfen (Steinbach et al., 1998). Es wurde daher vermutet, dass diese Übererregbarkeit durch das Fehlen von neuroprotektivem sAPP verursacht wird. In Abwesenheit von sAPP könnte die Inhibition neuronaler Schaltkreise gestört sein und die resultierende Übererregbarkeit zu zellulären Schädigungen, speziell auch an den Synapsen, führen. Die hier gezeigte normale Expression und Aggregation inhibitorischer Neurotransmitter-Rezeptoren spricht gegen eine morphologische Störung der inhibitorischen neuronalen Schaltkreise als Ursache der Übererregbarkeit von APP^{-/-}-Mäusen.

4.2.3. Die Ultrastruktur der Synapsen in letalen APP/APLP-Knock-out-Mäusen ist normal

Mehrere Befunde deuten auf eine Funktion von APP und APLPs in Synapsen hin: Diese Proteine wurden nicht nur in Synapsen lokalisiert (Schubert et al., 1991; Kim et al., 1995), es wurde auch ein Anstieg der Expression während der Synaptogenese (Moya et al., 1994; Salbaum und Ruddle, 1994) sowie ein synaptotrophischer Effekt (Mucke et al., 1994) beschrieben. Zudem wird APP axonal zu den präsynaptischen Endigungen transportiert (Tienari et al., 1996) und wurde in rab5- und *clathrin-coated* Vesikeln nachgewiesen (Ikin et al., 1996; Nordstedt et al., 1993), die bei Endozytose eine wichtige Rolle spielen.

Durch die elektronenmikroskopische Analyse des Hirnstamms der letalen APP/APLP2- und APLP1/APLP2- Doppel-Knock-out-Mäuse konnten jedoch keine ultrastrukturellen Defekte an Synapsen nachgewiesen werden. Ähnlich den Wildtyp-Tieren waren in APP/APLP-

Mutanten präsynaptische Vesikel in vergleichbarer Zahl und postsynaptische Spezialisierungen zu beobachten (vgl. Abbildung 10, Seite 69).

Somit wird die Letalität von APP/APLP2- und APLP1/APLP2- Doppelmutanten vermutlich nicht durch Störungen der Ultrastruktur der Synapsen hervorgerufen. Die Abwesenheit morphologischer Anomalien schließt funktionelle Defekte der synaptischen Übertragung jedoch nicht aus. Um dies zu klären, wurden elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt, die derzeit noch nicht abgeschlossen sind.

4.3. Neuronen der APP/APLP-Knock-out-Mäuse sind nicht überempfindlich gegenüber Glutamat oder β -Amyloid

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle endogener APP/APLP-Proteine für die Überlebensrate von Neuronen *in vitro* und die Empfindlichkeit gegenüber zytotoxischen Substanzen zu untersuchen. Dazu wurden primäre kortikale Neuronen aus Embryos von Wildtyp- und APP/APLP-Knock-out-Mäusen kultiviert und mit Glutamat oder β -Amyloid behandelt.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass APLP2^{-/-} sowie APP^{-/-}APLP2^{-/-} und APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}-Neuronen unter Standardkulturbedingungen gleiche Überlebensraten wie Wildtyp-Neuronen aufwiesen (vgl. Abbildung 11, Seite 71). Dies bestätigt Ergebnisse aus früheren Studien an APP^{-/-} - und APLP2^{-/-} -Neuronen (Harper et al., 1998; Steinbach et al., 1998; White et al., 1998). Durch die zusätzlichen Daten aus Experimenten mit Neuronen der Doppelmutanten wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das Fehlen von zwei APP/APLP-Proteinen mit potentiellen neurotrophischen Eigenschaften (vgl. Kapitel 1.2.2., Seite 17) keinen Einfluss auf die Überlebensrate von Neuronen *in vitro* hat, solange ein Protein der Genfamilie noch exprimiert wird.

Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie eine um 20 % reduzierte Überlebensrate hippocampaler APP^{-/-} -Neuronen gegenüber Wildtyp-Neuronen nachgewiesen (Perez et al., 1997). Die Abweichung von dem hier beschriebenen Ergebnis ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen oder eine höhere Empfindlichkeit von Hippocampusneuronen im Vergleich zu kortikalen Neuronen zurückzuführen.

In einer Reihe von Arbeiten wurden neuroprotektive Eigenschaften von APP beschrieben. Werden Neuronen *in vitro* mit exogenem humanem sAPP versetzt, bewirkt dies einen Schutz vor den toxischen Einflüssen von Glutamat und β -Amyloid (Mattson et al., 1993). *In vivo* führte eine geringe Überexpression von humanem APP in transgenen Mäusen zu Resistenz gegenüber Kainat-induzierter Exzitotoxizität (Masliah et al., 1997). Entsprechend zeigen APP^{-/-}-Mäuse nach Kainatinjektion eine erhöhte Anfälligkeit für Krämpfe (Steinbach et al., 1998). Bei primären APP^{-/-}-Neuronen konnte allerdings keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Glutamat festgestellt werden (Steinbach et al., 1998; White et al., 1998).

In den hier beschriebenen Experimenten zeigten die kortikalen Neuronen der APP/APLP-Knock-out-Mäuse (APLP2^{-/-}, APP^{-/-}APLP2^{-/-} und APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}) im Vergleich mit Wildtyp-Neuronen ebenfalls keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Glutamat (vgl. Abbildung 12, Seite 73). Aus diesen Ergebnissen lassen sich daher keine neuroprotektiven Eigenschaften der endogenen APP/APLP-Proteine ableiten. Möglicherweise waren die Effekte zu klein, um durch diesen experimentiellen Ansatz nachgewiesen werden zu können, da die Standardabweichung der einzelnen Werte 10-15 % betrug. Ein weiterer Nachteil des verwendeten *in vitro*-Systems könnte sein, dass die sezernierten APP/APLPs im Medium so stark verdünnt werden, dass sie nicht mehr in dem Maß neuroprotektiv wirken können, wie es *in vivo* bei höherer lokaler Konzentration möglich wäre.

Die Toxizität von fibrillärem β -Amyloid für Neuronen wurde bereits 1990 durch *in vitro*-Experimente gezeigt (Yankner et al., 1990). Auch *in vivo* war fibrilläres β -Amyloid bei direkter Injektion ins Gehirn neurotoxisch (Geula et al., 1998). Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass die A β -Fibrillen der Amyloid-Plaques die Neurodegeneration bei der Alzheimerschen Krankheit hervorrufen. Die zugrundeliegenden Mechanismen des Zelltods sind jedoch noch weitgehend unklar. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Untersuchung der Toxizität von β -Amyloid an primären Neuronen von Wildtyp- und APP^{-/-}-Tieren durchgeführt. Diese sollte insbesondere die Frage beantworten, ob endogenes sAPP neuroprotektiv gegenüber β -Amyloid wirkt.

Hierzu wurde ein Testsystem mit MTS als Substrat auf der Basis der von Lorenzo und Mitarbeitern (2000) beschriebenen Methode etabliert. Aus mehreren Gründen unterscheidet sich dies von dem für die Glutamat-Toxizitäts-Experimente verwendeten Testsystem mit dem Substrat MTT: (1) Amyloid-Fibrillen beeinflussen die Exozytose intrazellulärer Transportvesikel, die den aus MTT gebildeten Formazanfarbstoff transportieren. Die an der Zelloberfläche gebildeten Farbkristalle inhibieren die Endozytose und den weiteren Umsatz von

MTT (Liu, 1999). Ein lösliches Endprodukt, wie z. B. MTS, wird ungehemmt umgesetzt, nach Freisetzung von der Zelle im Medium angereichert und ist deshalb ein besserer Indikator der Stoffwechselaktivität lebender Zellen. (2) Für das bisher in Neuronenkulturen verwendete B27-Supplement wurde eine neuroprotektive Wirkung beschrieben (Huang et al., 2000). B27 enthält Antioxidantien, die Zellsterben durch oxidativen Stress unterdrücken. Da der A β -induzierte Zelltod möglicherweise durch oxidativen Streß hervorgerufen wird, wurde B27 durch N2-Supplement ersetzt, welches nur Wachstumsfaktoren und keine Antioxidantien enthält.

Im Folgenden zeigte allerdings der MTS-Assay nach exogener Zugabe von β -Amyloid auf kortikale APP^{-/-}-Neuronen (Li et al., 1996) keine veränderte Empfindlichkeit im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen (vgl. Abbildung 12, Seite 73). Damit konnten die von Lorenzo und Mitarbeitern (2000) beschriebenen Ergebnisse nicht bestätigt werden, welche eine verminderte Empfindlichkeit von APP^{-/-}-Neuronen gegenüber toxischem A β festgestellt hatten. Eine mögliche Ursache für die fehlende Übereinstimmung dieser beiden Ergebnisse wären Unterschiede im genetischen Hintergrund der analysierten APP^{-/-}-Mauslinien (gemischt C57BL/6 x 129Ola bei unserer APP^{-/-}-Mauslinie bzw. rein C57BL/6 bei der von Lorenzo et al. verwendeten APP^{-/-}-Mauslinie). Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, da primäre Neuronen dieser Wildtyp-Stämme in dieser Arbeit gleiche Empfindlichkeit gegenüber A β zeigten. Die Ursache der unterschiedlichen experimentiellen Ergebnisse ist gegenwärtig ungeklärt.

Zusammenfassend wird durch diese Daten gezeigt, dass sich kultivierte Neuronen der untersuchten APP/APLP-Einfach- und Doppel-Knock-out-Mäuse in ihrer Überlebensrate in vitro und ihrer Sensitivität gegenüber exogen zugefügtem Glutamat oder β -Amyloid nicht von Wildtyp-Neuronen unterscheiden. Dies lässt die physiologische Relevanz der bisher angenommenen neuroprotektiven oder neurotrophischen Eigenschaften von endogenem APP und der APLPs fraglich erscheinen. Andererseits ist eine Kompensation der Doppelmutanten durch das dritte Protein der Genfamilie nicht auszuschließen.

4.4. *APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-} sind postnatal letal*

Das Auftreten kompensatorischer Effekte kann nur verhindert werden durch die Generation von Tripel-Knock-out-Mäusen, in denen alle drei Proteine der APP/APLP-Genfamilie ausgeschaltet sind. Diese sollten aus der Verpaarung zweier *APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-}*-Mäuse hervorgehen. Bei dem Versuch, Elterntiere dieses Genotyps zu generieren, wurde jedoch festgestellt, dass *APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-}*-Mäuse zu fast 100 % kurz nach der Geburt starben (vgl. Tabelle 12, Seite 77). Somit führt bereits zusätzliche Haploinsuffizienz von APLP2 in *APP^{-/-} APLP1^{-/-}*-Mäusen zu postnataler Letalität. Dies deutet auf eine Schlüsselrolle von APLP2 hin, wobei das Vorhandensein nur eines APLP2-Allels demnach nicht ausreicht, um lebenswichtige Funktionen der APP/APLP-Proteine aufrecht zu erhalten.

4.5. *APP/APLP-Proteine sind für die frühe Embryonalentwicklung nicht essentiell*

Die Erzeugung der *APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}*-Mäuse erfolgte durch verschiedene Verpaarungen (Typ A, B und C), die in Tabelle 13 genauer beschrieben sind (vgl. Seite 80). Die Genotypisierung der Tiere aus den späten Embryonalstadien bis zur Geburt (E17,5 bis P0) ergab, dass *APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}*-Mäuse mit annähernd erwarteter Häufigkeit generiert werden konnten (vgl. Tabelle 14, Seite 82). Dies zeigt, dass die APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäuse, denen alle drei Proteine der Genfamilie fehlen, bis in die späten Embryonalstadien lebensfähig sind. Folglich sind die APP/APLP-Proteine für die frühe Embryonalentwicklung nicht essentiell.

4.6. *Fehlende APP/APLP-Proteine verursachen embryonale Missbildungen*

In dieser Arbeit wurden Doppel- und Tripel-Knock-out-Mäuse generiert, in denen die Proteine der APP-Genfamilie ausgeschaltet wurden. In einigen Mäusen mit APP/APLP-Gendefekten wurden Missbildungen in Form von Exenzephalie und kortikalen Dysplasien (Lissenzephalie, Polymikrogyrie) beobachtet. Dies deutet auf eine Funktion dieser Proteine

beim Schließen des Neuralrohrs und bei der Migration der Neuronen innerhalb der Großhirnrinde hin. Eine Zusammenfassung der Phänotypen der untersuchten Mäuse zeigt die nachfolgende Tabelle 19.

Genotyp	Stadium	Phänotyp
APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-}	P0	lebensfähig, fertil keine besonderen Auffälligkeiten
APP ^{-/-} APLP2 ^{-/-}	E14 / E17	14,7 % Exenzephalie (5 von 34)
	P0	keine histopathologischen Anomalien letal innerhalb 24 Stunden nach der Geburt
APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{-/-}	E14 / E17	4,3 % Exenzephalie (2 von 47)
	P0	keine histopathologischen Anomalien letal innerhalb 24 Stunden nach der Geburt
APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{+/-}	P0	keine histopathologischen Anomalien * letal kurz nach der Geburt
APP ^{-/-} APLP1 ^{-/-} APLP2 ^{-/-}	E17 – P0	6,25 % Exenzephalie (1 von 16) 6,25 % Polymikrogyrie (1 von 16) 50 % Lissenzephalie (8 von 16) letal kurz nach der Geburt

Tabelle 19: Zusammenfassung beobachteter Phänotypen bei APP/APLP-Doppel- und Tripel-Knock-out-Mäusen

* Die Zahl der an E14 und E17 untersuchten Tiere dieses Genotyps war zu gering, um Exenzephalie bei geringer Penetranz zu beobachten.

Das Fehlen aller APP/APLP-Allele führt demnach in erhöhtem Maß zu Protrusionen, welche bei 50 % der APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse (in 8 von 16 analysierten Tieren) beobachtet wurden. Die nicht 100 %ige Penetranz deutet darauf hin, dass vermutlich eine modifizierende Interaktion mit Allelen anderer Gene die Ausbildung der Protrusion beeinflusst. Der Nachweis von Protrusionen bei 1 von 14 analysierten APP^{-/-} APLP1^{+/-} APLP2^{-/-} -Mäusen (vgl. Tabelle 17, Seite 89) deutet auf einen Gen-Dosis-Effekt hin. Mit sehr geringer Häufigkeit werden Protrusionen auch dann beobachtet, wenn nicht alle APP/APLP-Allele fehlen. Dies könnte durch den Einfluss anderer Gene, die eine Fehlbildung begünstigen, verursacht werden.

Die Fehlbildungen (Protrusionen, Polymikrogyrie, Exenzephalie) wurden erst bei der Analyse der APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse auffällig. Daraufhin zeigte eine detaillierte Untersuchung einer größeren Anzahl letaler Doppelmutanten (APP^{-/-} APLP2^{-/-}, APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}) an E14 und E17 ebenfalls Fälle von Exenzephalie bei diesen Mäusen (14,7 % bzw. 4,3 %). Der Grund, warum an P0 keine Mäuse mit Exenzephalie gefunden wurden, ist vermutlich sofortiger Kannibalismus durch die Mutter. Da Exenzephalie nicht nur bei Doppel-Knock-out-Mäusen auftrat (vgl. Tabelle 15, Seite 86), wurden missgebildete Mäuse aller Genotypen gleichermaßen gefressen.

APP/APLP-Tripelmutanten wiesen kortikale Dysplasien auf, die durch Protrusionen ektopischer Neuronen aus der Schicht der kortikalen Platte in die darüberliegende Marginalzone gekennzeichnet waren (vgl. Abbildung 17, Seite 88). Diese Anomalie ist ähnlich der beim Menschen auftretenden Erkrankung Lissenzephalie Typ 2 (Übersichtsartikel: Walsh, 1999) und wurde auch in MARCKS^{-/-}, α 6-Integrin^{-/-} - und PS1^{-/-} -Mäusen beobachtet.

Der Phänotyp der APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäuse ähnelt am meisten dem der MARCKS^{-/-} -Mäuse (Stumpo et al., 1995). Neben Anomalien der Schichtenstruktur des Kortex zeigen beide Mutanten Exenzephalie und sind postnatal letal. MARCKS (*myristoylated alanine-rich C-kinase-substrate*) dient als quervernetzendes Protein. Es ist an der Innenseite der Zellmembran verankert und bindet unter anderem an Actin. Die Aktin-Bindeeigenschaften von MARCKS werden reguliert, indem es durch Proteinkinase C phosphoryliert wird (Blackshear et al., 1996). Exenzephalie könnte durch Störungen der Reorganisation von Aktinfilamenten beim Verschluss des Neuralrohrs hervorgerufen werden, da dem Anheben und Verschluss der Neuralfaltens eine Veränderung des Zytoskeletts, unter anderem der Aktinfilamente, vorausgeht. Bei den APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen könnte die Ursache der Exenzephalie die fehlende Verbindung von APP zum Aktin-Zytoskelett sein, die normalerweise über die bereits charakterisierten intrazellulären APP-Bindepartner Fe65 und Mena erfolgt (Ermekova et al., 1998; Sabo et al. 2001). Eine Anreicherung von Mena wurde in fokalen Kontaktstellen, Lamellipodien und Filopodien gefunden (Lanier et al., 1999) und könnte auch beim Anheben der Neuralfaltens von Bedeutung sein.

Möglicherweise könnten Defekte der Basalmembran eine Störung der neuronalen Migration hervorrufen. Eine Unterbrechung der Basalmembran innerhalb der Protrusionen wurde bei den APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen durch Gomori-Versilberung und dem immunhistochemischen Nachweis des diskontinuierlichen Laminin-Signals deutlich gezeigt (vgl. Abbildung 18, Seite 91). Laminin ist ein wichtiges Strukturprotein der Basalmembran

und stimuliert zusammen mit anderen Glykoproteinen der extrazellulären Matrix das Auswachsen von Neuriten und die neuronale Migration (Calof et al., 1994). Eine veränderte Expression von Laminin wurde auch in MARCKS^{-/-} - und α 6-Integrin^{-/-} -Mäusen festgestellt (Blackshear et al., 1997, Georges-Labouesse et al., 1998). Die Integrine α 6 β 1 und α 6 β 4 sind die hauptsächlichen Rezeptoren für Laminin. Ungeklärt ist im Augenblick, ob die Schädigung der Basalmembran ein sekundärer Effekt oder Auslöser der Protrusionen ist.

Durch immunhistochemische Anfärbung von Cajal-Retzius-Neuronen in APP/APLP-Tripel-Knock-out-Mäusen wurden diese an ihrer normalen Position im oberen Bereich der Marginalzone nachgewiesen. Nur innerhalb der Protrusionen führte die Fehlorganisation der kortikalen Schichten auch zur fälschlichen Verlagerung von Cajal-Retzius-Neuronen (vgl. Abbildung 18, Seite 91). Es konnte keine Reduktion der Cajal-Retzius-Neuronen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden, wie dies bei PS1^{-/-} -Mäusen beobachtet und als Ursache des Migrationseffekt angenommen wurde (Hartmann et al., 1999). PS1-defiziente Mäuse wurden unabhängig von verschiedenen Gruppen generiert und sterben am Ende der Schwangerschaft infolge starker Gehirnblutungen und Skelettanomalien (Shen et al., 1997; Wong et al., 1997; De Strooper et al., 1998).

Nur bei einer einzigen APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Maus wurde ein Phänotyp mit abnormalen Einfaltungen der Großhirnrinde und der Retina vorgefundenen. Diese sogenannte Polymikrogyrie tritt auch als vererbare Erkrankung beim Menschen auf (Übersichtartikel: Walsh, 1999). Derzeit ist die Ätiologie von Polymikrogyrie noch vollkommen unklar und assoziierte Gene wurden noch nicht beschrieben. Vermutlich führt eine fehlerhafte Migration und Einlagerung von Neuronen zu dieser komplexen Strukturveränderung bestimmter Hirnbereiche. Aufgrund der geringen Häufigkeit von Polymikrogyrie bei APP/APLP-Knock-out-Mäusen liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der einen betroffenen Maus um eine Spontanmutation handelt und nicht die Inaktivierung der APP/APLP-Proteine der primäre Auslöser dieser Fehlbildung waren.

An den Signaltransduktionskaskaden, welche die Ausbildung der kortikalen Schichtenstruktur steuern, sind eine Vielzahl von Molekülen beteiligt (Übersichtsartikel: Gleeson und Walsh, 2000). In allen hier beschriebenen Knock-out-Mäusen mit Lissenzephalie Typ 2-Phänotyp scheint das von der Marginalzone ausgehende Stop-Signal oder eine normale Reaktion darauf zu fehlen, wodurch die Neuronen nicht wie normal in der Schicht der kortikalen Platte verweilen, sondern über die Hirnoberfläche hinauswachsen. Es ist zu vermuten, dass dadurch auch die korrekte Verschaltung der Neuronen gestört ist und dieser Defekt möglicherweise

erhöhte Letalität (z. B. infolge epileptischer Anfälle) hervorruft. Es bleibt jedoch die Frage offen, warum auch APP/APLP-Mutanten ohne Protrusionen sterben. Wahrscheinlich ist das Auftreten neuronaler Dysplasien nicht die alleinige Ursache der Letalität. Da keine Langzeitvideos von neugeborenen Doppel- und Tripelmutanten aufgenommen wurden, sind seltene Krampfepisoden als Todesursache nicht auszuschließen. So kommt es beispielsweise in humanen Syndromen mit kortikalen Dysplasien zu vermehrtem Auftreten epileptischer Krämpfe (Schwartzkroin und Walsh, 2000).

Eine interessante Fragestellung ist, inwiefern den phänotypisch ähnlichen Migrationsdefekten bei MARCKS^{-/-}, α 6-Integrin^{-/-}, PS1^{-/-} - und APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen Störungen in möglicherweise überlappenden Signaltransduktionswegen zugrunde liegen.

Gibt es Hinweise auf biochemische oder genetische Interaktionen dieser Proteine ?

Durch den Verlust der γ -Sekretaseaktivität in PS1^{-/-} -Mäusen werden möglicherweise keine C-terminalen APP-Fragmente mehr gebildet (De Strooper und Annaert, 2000). Dadurch könnte eine essentielle physiologische Funktion des zytoplasmatischen C-Terminus von APP beeinträchtigt sein. Von Cao und Sudhof wurde kürzlich gezeigt (2001), dass C-terminale Fragmente des APP einen transkriptionell aktiven Komplex bilden und auf diese Weise die Genregulation beeinflussen. Es wäre daher denkbar, dass sowohl in PS1^{-/-} -Mäusen als auch in APP/APLP-Tripelmutanten Störungen der Genexpression von (noch zu identifizierenden) APP-Zielgenen diesen Migrationsdefekt bewirken.

Interessanterweise wurde in Zellkulturexperimenten eine Kolokalisation von APP und β 1-Integrin, welches unter anderem α 6 β 1-Integrin-Komplexe bildet, gefunden (Sabo et al., 2001). Es ist jedoch bisher nicht bekannt, ob dieser Kolokalisation eine direkte biochemische Bindung zugrunde liegt.

Über eine Beziehung zwischen zwischen MARCKS und APP oder APLPs kann derzeit nur spekuliert werden, da eine molekulare Interaktion bisher ebenfalls noch nicht beschrieben wurde. Bei MARCKS^{-/-} -Mäusen wurde durch Immunhistochemie eine Reduktion von bisher nicht identifizierten Chondroitinsulfat-Proteoglykanen in der Marginalzone gefunden (Blackshear et al., 1997). Es wäre denkbar, dass bei MARCKS^{-/-} -Mutanten die Chondroitinsulfat-modifizierten Formen von APP und APLP2 in verminderten Mengen vorliegen. Dies wird gegenwärtig in Kollaboration mit der Gruppe von Blackshear getestet. Zudem sind APP und APLP2 als Proteaseinhibitoren wirksam, und bei Verlust dieser Inhibition könnten andere Proteine der extrazellulären Matrix durch erhöhte Proteaseaktivität verstärkt abgebaut werden.

4.7. APP ist wichtig für die Regulation neuronaler Migration: Rolle als Ligand oder Rezeptor ?

Trotz der zuvor beschriebenen experimentellen Befunde und möglicher Überlappungen mit Signalkaskaden anderer Proteine (PS1, MARCKS, α 6-Integrin) bleibt die Frage offen, auf welche Weise APP/APLP-Proteine direkt Einfluss auf die Koordination der Migration nehmen könnten.

Einerseits könnten die sezernierten Formen der APP/APLP-Proteine an entsprechende Rezeptoren binden und so neurotrophische Signale übermitteln. So konnte in Zellkultur-experimenten zuvor eine neuritotrophische Wirkung von APP zwar gezeigt werden (Milward et al., 1992; Qiu et al., 1995; Mattson, 1994; Perez et al., 1997), jedoch wurden bisher noch keine Interaktionspartner für die Ektodomäne von APP charakterisiert, die als Rezeptor fungieren könnten.

Andererseits sind die APP/APLP-Proteine möglicherweise selbst Rezeptoren. Dafür spricht, dass bereits mehrere intrazelluläre Interaktionspartner (vgl. Kapitel 1.2.2., Seite 17) beschrieben wurden, unter anderem das zytoplasmatische Adaptorprotein mDab1 (Homayouni et al., 1999). mDab1 bindet an die Reelin-Rezeptoren (ApoE-Rezeptor 2 und VLDL-Rezeptor) und vermittelt die intrazelluläre Signaltransduktion. Sowohl der Knock-out von Reelin oder mDab1 als auch der Doppel-Knock-out beider Rezeptoren führt zu Migrationsdefekten (D'Arcangelo et al., 1995, Howell et al., 1997, Trommsdorff et al., 1999). Infolgedessen weisen alle diese Mausmutanten den „*reeler*“-Phänotyp auf, der durch Anordnung der kortikalen Schichten in umgekehrter Reihenfolge und Laminationsstörungen des Kleinhirns gekennzeichnet ist. Mutationen der Kinase Cdk5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) oder ihrer aktivierenden Untereinheit p35 führen zu ähnlichen Defekten (Ohshima et al., 2001), sodass vermutet wurde, dass diese Proteine das Signal in dieser Kaskade intrazellulär weiterleiten. Cdk 5 phosphoryliert unter anderem das tau-Protein und spielt möglicherweise auch bei der Entstehung der Alzheimerschen Krankheit eine Rolle (Bothwell und Giniger, 2000). Interessanterweise stört das Ausschalten von Cdk 5 neben der Schichtung im Großhirn auch die Einfaltung des Kleinhirns und ist embryonal oder perinatal letal (Ohshima et al., 1999). Ebenso sind APP/APLP-Doppel- und Tripelmutanten postnatal letal, was bei „*reeler*“-Mäusen nicht der Fall ist.

Die in APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{-/-} -Mäusen beobachteten Anomalien der kortikalen Schichtenstruktur entsprechen allerdings nicht dem „*reeler*“-Phänotyp, sondern sind gekennzeichnet durch ektopische Neuronen, die lokal über die Marginalzone hinauswandern (Lissenzephalie Typ 2-Phänotyp). Auffällig ist jedoch, dass beide Phänotypen infolge von Migrationsdefekten ausgebildet werden. Es wäre denkbar, dass die neuronale Migration durch mehrere ähnliche Signalkaskaden gesteuert wird, deren jeweilige Störung zu unterschiedlichen morphologischen Veränderungen führt.

Die Vielzahl bereits gefundener intrazellulärer Interaktionspartner (vgl. Abbildung 6, Seite 23) unterstützt die Annahme, dass APP/APLP-Proteine neben einer essentiellen Rolle während der neuronalen Migration weitere physiologische Funktionen als Rezeptoren haben könnten. Es bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen um zu klären, welche dieser biochemisch charakterisierten Bindepartner auch *in vivo* relevant sind. Grundlegend neue Erkenntnisse über die *in vivo*-Funktionen von Proteinen der APP-Genfamilie wurden im Rahmen dieser Arbeit durch die Charakterisierung von APP/APLP-Knock-out-Mäusen gewonnen. So konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass durch fehlende Expression der APP- und APLP-Proteine eine Störung der neuronalen Migration hervorgerufen wird. Die erzielten Ergebnisse lassen auf eine essentielle funktionelle Bedeutung der Proteine der APP-Genfamilie für die normale Gehirnentwicklung und das Überleben kurz nach der Geburt schließen. Mit der Generierung aller möglichen APP/APLP-Mausmutanten wurden entscheidende Vorarbeiten für die weitere Charakterisierung der physiologischen Funktionen der APP/APLP-Proteine im Mausmodell geschaffen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Genfamilie des Amyloid-Vorläuferproteins (*amyloid precursor protein*, APP) umfasst bei der Maus, sowie beim Menschen, neben dem APP die beiden *amyloid precursor-like proteins* APLP1 und APLP2. Das APP spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Alzheimerschen Krankheit. Bisher sind jedoch sowohl die auslösenden Mechanismen der Neurodegeneration im Gehirn von Alzheimer-Patienten als auch die zellbiologischen in vivo-Funktionen der APP/APLP-Proteine noch ungeklärt. Die Untersuchung der physiologischen und pathologischen Eigenschaften des APP und seiner Homologen ist deshalb von großem Interesse.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung und Analyse von Doppel- und Tripel-Knock-out-Mäusen, in denen die Expression von Proteinen der APP-Genfamilie ausgeschaltet ist. Mit Hilfe dieser Mausmodelle wurden neue Hinweise auf die physiologischen Funktionen des APP und der beiden APLPs erbracht.

Ausgehend von den bereits etablierten einfach defizienten Mauslinien (APP^{-/-}, APLP1^{-/-} und APLP2^{-/-}) konnten durch mehrere aufeinanderfolgende Kreuzungen Mausmutanten mit kombinierten APP/APLP-Gendefekten erzeugt werden. Zunächst wurden erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Überlebensraten in Abhängigkeit vom Genotyp festgestellt. Im Gegensatz zum unauffälligen Phänotyp der Einfachmutanten sind APP^{-/-} APLP2^{-/-}- und APLP1^{-/-} APLP2^{-/-}-Doppelmutanten postnatal letal. Überraschenderweise sind hingegen die APP^{-/-} APLP1^{-/-}-Doppelmutanten lebensfähig und zeigen keinerlei phänotypische Anomalien. Folglich kann APLP2 das Fehlen von APP und APLP1 funktionell kompensieren, was auf eine zentrale physiologische Funktion des APLP2 hindeutet. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die beobachtete Haploinsuffizienz von APLP2 in postnatal letalen APP^{-/-} APLP1^{-/-} APLP2^{+/-}-Mäusen bestätigt. Tripel-Knock-out-Mäuse wurden in späten Embryonalstadien (E17,5 – P0) mit der erwarteten Häufigkeit erhalten. Damit konnte gezeigt werden, dass die Proteine der APP-Genfamilie für die frühe Embryonalentwicklung nicht essentiell sind.

Eine Vielzahl vergleichender Untersuchungen der Doppelmutanten konnte diese Mäuse näher charakterisieren, jedoch die Ursache der Letalität nicht klären. Die histologische Analyse der letalen Doppel-Knock-out-Mäuse ergab weder pathologische Veränderungen der Gehirnmorphologie noch der extrakraniellen Organe. Primäre kortikale Neuronen von Einfach- und Doppelmutanten zeigten die gleichen Überlebensraten in vitro sowie eine gegenüber Wildtyp-Neuronen unveränderte Empfindlichkeit gegenüber Exzitotoxinen (Glutamat, β -Amyloid).

Mit immunhistochemischen Färbungen konnten sowohl in primären Hippocampusneuronen als auch in Rückenmarksschnitten von Einfach- und Doppelmutanten keine Unterschiede in der Expression und Aggregation von Neurotransmitter-Rezeptoren an den Synapsen im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen festgestellt werden. Ergänzend wurde durch Elektronenmikroskopie eine normale Ultrastruktur der Synapsen des Hirnstamms nachgewiesen.

Während Doppelmutanten keine morphologischen Anomalien zeigten, wurden bei der histologischen Analyse des Gehirns der Tripelmutanten kortikale Dysplasien identifiziert. Die Hälfte der Tripel-Knock-out-Mäuse wies einen Phänotyp ähnlich Lissenzephalie Typ 2 auf, der durch ektopische Ansammlungen von Neuronen oberhalb der Basalmembran der Marginalzone des Kortex gekennzeichnet ist. Mit geringerer Häufigkeit traten außerdem Exenzephalie und Polymikrogyrie auf.

Damit konnte erstmalig in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass durch fehlende Expression der APP- und APLP-Proteine eine Störung der neuronalen Migration hervorgerufen wird. Die erzielten Ergebnisse lassen auf eine essentielle funktionelle Bedeutung der Proteine der APP-Genfamilie für die normale Gehirnentwicklung und das Überleben kurz nach der Geburt schließen. Mit der Generierung aller möglichen APP/APLP-Mausmutanten wurden entscheidende Vorarbeiten für die weitere Charakterisierung der physiologischen Funktionen der APP/APLP-Proteine im Mausmodell geschaffen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Allinquant, B., Hantraye, P., Mailloux, P., Moya, K., Bouillot, C. and Prochiantz, A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol* **128**, 919-27.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr* **64**, 146-148.

Banker, G. und Goslin, K. (1998). Culturing nerve cells. Cambridge, MA: MIT Press. ISBN 0-262-02438-1.

Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K. et al. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* **6**, 916-9.

Bickel, H. (2000). [Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]. *Gesundheitswesen* **62**, 211-8.

Blacker, D., Wilcox, M. A., Laird, N. M., Rodes, L., Horvath, S. M., Go, R. C., Perry, R., Watson, B., Jr., Bassett, S. S., McInnis, M. G., Albert, M. S., Hyman, B. T. and Tanzi, R. E. (1998). Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* **19**, 357-60.

Blackshear, P. J., Lai, W. S., Tuttle, J. S., Stumpo, D. J., Kennington, E., Nairn, A. C. and Sulik, K. K. (1996). Developmental expression of MARCKS and protein kinase C in mice in relation to the exencephaly resulting from MARCKS deficiency. *Brain Res Dev Brain Res* **96**, 62-75.

Blackshear, P. J., Silver, J., Nairn, A. C., Sulik, K. K., Squier, M. V., Stumpo, D. J. and Tuttle, J. S. (1997). Widespread neuronal ectopia associated with secondary defects in cerebrocortical chondroitin sulfate proteoglycans and basal lamina in MARCKS-deficient mice. *Exp Neurol* **145**, 46-61.

Borchelt, D. R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19**, 939-45.

Borg, J. P., Ooi, J., Levy, E. and Margolis, B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. *Mol Cell Biol* **16**, 6229-41.

Borg, J. P., Straight, S. W., Kaech, S. M., de Taddeo-Borg, M., Kroon, D. E., Karnak, D., Turner, R. S., Kim, S. K. and Margolis, B. (1998). Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. *J Biol Chem* **273**, 31633-6.

Bothwell, M. and Giniger, E. (2000). Alzheimer's disease: neurodevelopment converges with neurodegeneration. *Cell* **102**, 271-3.

Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. and Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-82.

Bush, A. I., Multhaup, G., Moir, R. D., Williamson, T. G., Small, D. H., Rumble, B., Pollwein, P., Beyreuther, K. and Masters, C. L. (1993). A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **268**, 16109-12.

Butz, S., Okamoto, M. and Sudhof, T. C. (1998). A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* **94**, 773-82.

Calof, A. L., Campanero, M. R., O'Rear, J. J., Yurchenco, P. D. and Lander, A. D. (1994). Domain-specific activation of neuronal migration and neurite outgrowth-promoting activities of laminin. *Neuron* **13**, 117-30.

Cao, X. and Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* **293**, 115-20.

Chen, G., Chen, K. S., Knox, J., Inglis, J., Bernard, A., Martin, S. J., Justice, A., McConlogue, L., Games, D., Freedman, S. B. and Morris, R. G. (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**, 975-9.

Chow, N., Korenberg, J. R., Chen, X. N. and Neve, R. L. (1996). APP-BP1, a novel protein that binds to the carboxyl-terminal region of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **271**, 11339-46.

Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K. and Masters, C. L. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochemistry International* **36**, 175-184.

Daigle, I. and Li, C. (1993). *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 12045-9.

D'Arcangelo, G., Homayouni, R., Keshvara, L., Rice, D. S., Sheldon, M. and Curran, T. (1999). Reelin is a ligand for lipoprotein receptors. *Neuron* **24**, 471-9.

D'Arcangelo, G., Miao, G. G., Chen, S. C., Soares, H. D., Morgan, J. I. and Curran, T. (1995). A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*. *Nature* **374**, 719-23.

de Bergeyck, V., Nakajima, K., Lambert de Rouvroit, C., Naerhuyzen, B., Goffinet, A. M., Miyata, T., Ogawa, M. and Mikoshiba, K. (1997). A truncated Reelin protein is produced but not secreted in the 'Orleans' *reeler* mutation (*Reln^{rl-Orl}*). *Brain Res Mol Brain Res* **50**, 85-90.

De Strooper, B. and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* **113**, 1857-70.

De Strooper, B., Craessaerts, K., Dewachter, I., Moechars, D., Greenberg, B., Van Leuven, F. and Van den Berghe, H. (1995). Basolateral secretion of amyloid precursor protein in Madin-Darby canine kidney cells is disturbed by alterations of intracellular pH and by introducing a mutation associated with familial Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **270**, 4058-65.

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

De Strooper, B., Van Leuven, F. and Van den Berghe, H. (1991). The amyloid beta protein precursor or proteinase nexin II from mouse is closer related to its human homolog than previously reported. *Biochim Biophys Acta* **1129**, 141-3.

Ermekova, K. S., Chang, A., Zambrano, N., de Candia, P., Russo, T. and Sudol, M. (1998). Proteins implicated in Alzheimer disease. The role of FE65, a new adapter which binds to beta-amyloid precursor protein. *Adv Exp Med Biol* **446**, 161-80.

Ermeikova, K. S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. and Sudol, M. (1997). The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled. *J Biol Chem* **272**, 32869-77.

Furukawa, K., Barger, S. W., Blalock, E. M. and Mattson, M. P. (1996). Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* **379**, 74-8.

Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F., Guido, T., Hagopian S., Johnson-Wood, K., Khan, K., Lee, M., Leibowitz, P., Lieberburg, I., Little, S., Masliah, E., McConlogue, L., Montoya-Zavala, M., Mucke, L., Paganini, L., Penniman, E., Power, M., Schenk, D., Seubert, P., Snyder, P., Soriano, F., Tan, H., Vitale, J., Wadsworth, S., Wolozin, B. and Zhao, J. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* **373**, 523-7.

Ge, R. (1999). Genetically manipulated animals and their use in experimental research. *Ann Acad Med Singapore* **28**, 560-4.

Georges-Labouesse, E., Mark, M., Messaddeq, N. and Gansmuller, A. (1998). Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* **8**, 983-6.

Geula, C., Wu, C. K., Saroff, D., Lorenzo, A., Yuan, M. and Yankner, B. A. (1998). Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* **4**, 827-31.

Giambarella, U., Yamatsuji, T., Okamoto, T., Matsui, T., Ikezu, T., Murayama, Y., Levine, M. A., Katz, A., Gautam, N. and Nishimoto, I. (1997). G protein betagamma complex-mediated apoptosis by familial Alzheimer's disease mutant of APP. *Embo J* **16**, 4897-907.

Gleeson, J. G. and Walsh, C. A. (2000). Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. *Trends Neurosci* **23**, 352-9.

Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-90.

Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., Mant, R., Newton, P., Rooke, K., Roques, P., Talbot, C., Pericak-Vance, M., Roses, A., Williamson, R., Rossor, M., Owen, M. and

Hardy, J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-6.

Goedert, M., Crowther, R. A. and Spillantini, M. G. (1998). Tau mutations cause frontotemporal dementias. *Neuron* **21**, 955-8.

Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J. and Crowther, R. A. (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* **383**, 550-3.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. and Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-7.

Guo, J., Thinakaran, G., Guo, Y., Sisodia, S. S. and Yu, F. X. (1998). A role for amyloid precursor-like protein 2 in corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 292-300.

Haass, C., Hung, A. Y. and Selkoe, D. J. (1991). Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* **11**, 3783-93.

Hardy, J., Duff, K., Hardy, K. G., Perez-Tur, J. and Hutton, M. (1998). Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* **1**, 355-8.

Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M. and Lansbury, P. T. (1997). Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* **4**, 119-25.

Harper, S. J., Bilstrand, J. G., Shearman, M. S., Zheng, H., Van der Ploeg, L. and Sirinathsinghji, D. J. (1998). Mouse cortical neurones lacking APP show normal neurite outgrowth and survival responses in vitro. *Neuroreport* **9**, 3053-8.

Hartmann, D., De Strooper, B. and Saftig, P. (1999). Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *Curr Biol* **9**, 719-27.

Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H. P., Wolfer, D. P. and Müller, U. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* **20**, 7951-63.

Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L. and De Strooper, B. (2000). Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **2**, 461-2.

Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C. M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K. and Duff, K. (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* **4**, 97-100.

Homayouni, R., Rice, D. S., Sheldon, M. and Curran, T. (1999). Disabled-1 binds to the cytoplasmic domain of amyloid precursor-like protein 1. *J Neurosci* **19**, 7507-15.

Hornsten A, H. R., Li C. (1999). The *C.elegans* amyloid precursor-related gene has an essential function. *Soc Neurosci Abstr* **25**: 2054.

Howell, B. W., Hawkes, R., Soriano, P. and Cooper, J. A. (1997). Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* **389**, 733-7.

Hsiao, K. (1998). Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Exp Gerontol* **33**, 883-9.

Huang, H. M., Ou, H. C. and Hsieh, S. J. (2000). Antioxidants prevent amyloid peptide-induced apoptosis and alteration of calcium homeostasis in cultured cortical neurons. *Life Sci* **66**, 1879-92.

Hung, A. Y. and Selkoe, D. J. (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *Embo J* **13**, 534-42.

Hussain, I., Powell, D., Howlett, D. R., Tew, D. G., Meek, T. D., Chapman, C., Gloger, I. S., Murphy, K. E., Southan, C. D., Ryan, D. M., Smith, T. S., Simmons, D. L., Walsh, F. S., Dingwall, C. and Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* **14**, 419-27.

Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A. Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Che, L., Norton, J., Morris, J., Ree, L., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P., Hayward, N., Kowk, J., Schofield, P., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B., Hardy, J., Goate, A., van

Swieten, Mann, D., Lynch T. and Hutink, P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702-5.

Ikin, A. F., Annaert, W. G., Takei, K., De Camilli, P., Jahn, R., Greengard, P. and Buxbaum, J. D. (1996). Alzheimer amyloid protein precursor is localized in nerve terminal preparations to Rab5-containing vesicular organelles distinct from those implicated in the synaptic vesicle pathway. *J Biol Chem* **271**, 31783-6.

Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., Chishti, M. A., Horne, P., Heslin, D., French, J. et al. (2000). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**, 979-82.

Jarrett, J. T., Berger, E. P. and Lansbury, P. T. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-7.

Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H. and Goldstein, L. S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* **28**, 449-59.

Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-6.

Kim, T. W., Wu, K., Xu, J. L., McAuliffe, G., Tanzi, R. E., Wasco, W. and Black, I. B. (1995). Selective localization of amyloid precursor-like protein 1 in the cerebral cortex postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res* **32**, 36-44.

Klein, W. L., Krafft, G. A. and Finch, C. E. (2001). Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* **24**, 219-24.

Knaus, P. and Betz, H. (1990). Mapping of a dominant immunogenic region of synaptophysin, a major membrane protein of synaptic vesicles. *FEBS Lett* **261**, 358-60.

Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Fujisawa-Sehara, A., Ohno, S., Suzuki, K. and Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* **343**, 371-5.

Kounnas, M. Z., Moir, R. D., Rebeck, G. W., Bush, A. I., Argraves, W. S., Tanzi, R. E., Hyman, B. T. and Strickland, D. K. (1995). LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell* **82**, 331-40.

Lamb, B. T., Sisodia, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Kearns, W. G., Pearson, P. L., Price, D. L. and Gearhart, J. D. (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice. *Nat Genet* **5**, 22-30.

Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and 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**, 3922-7.

Lanier, L. M., Gates, M. A., Witke, W., Menzies, A. S., Wehman, A. M., Macklis, J. D., Kwiatkowski, D., Soriano, P. and Gertler, F. B. (1999). Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* **22**, 313-25.

Lemere, C. A., Blusztajn, J. K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T. C. and Selkoe, D. J. (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiol Dis* **3**, 16-32.

Li, A., Sakaguchi, S., Atarashi, R., Roy, B. C., Nakaoka, R., Arima, K., Okimura, N., Kopacek, J. and Shigematsu, K. (2000). Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 553-67.

Li, Z. W., Stark, G., Gotz, J., Rulicke, T., Gschwind, M., Huber, G., Müller, U. and Weissmann, C. (1996). Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Oct 15;93(21):12052]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6158-62.

Liu, Y. (1999). Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostatis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **23**, 377-95.

Lorent, K., Overbergh, L., Moechars, D., De Strooper, B., Van Leuven, F. and Van den Berghe, H. (1995). Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three

members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, alpha-2-macroglobulin and the 40,000 molecular weight receptor-associated protein. *Neuroscience* **65**, 1009-25.

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

Lorenzo, A., Yuan, M., Zhang, Z., Paganetti, P. A., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Mautino, J., Vigo, F. S., Sommer, B. and Yankner, B. A. (2000). Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **3**, 460-4.

Lyckman, A. W., Confaloni, A. M., Thinakaran, G., Sisodia, S. S. and Moya, K. L. (1998). Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system. *J Biol Chem* **273**, 11100-6.

Magara, F., Müller, U., Li, Z. W., Lipp, H. P., Weissmann, C., Stagljar, M. and Wolfer, D. P. (1999). Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4656-61.

Maslah, E., Westland, C. E., Rockenstein, E. M., Abraham, C. R., Mallory, M., Veinberg, I., Sheldon, E. and Mucke, L. (1997). Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries in vivo. *Neuroscience* **78**, 135-46.

Mattson, M. P. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein modulate dendrite outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. *J Neurobiol* **25**, 439-50.

Mattson, M. P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* **77**, 1081-132.

Mattson, M. P., Cheng, B., Culwell, A. R., Esch, F. S., Lieberburg, I. and Rydel, R. E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* **10**, 243-54.

McLoughlin, D. M., Irving, N. G., Brownlees, J., Brion, J. P., Leroy, K. and Miller, C. C. (1999). Mint2/X11-like colocalizes with the Alzheimer's disease amyloid precursor

protein and is associated with neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* **11**, 1988-94.

Milward, E. A., Papadopoulos, R., Fuller, S. J., Moir, R. D., Small, D., Beyreuther, K. and Masters, C. L. (1992). The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron* **9**, 129-37.

Moore, C. L., Diehl, T. S., Selkoe, D. J. and Wolfe, M. S. (2000). Toward the characterization and identification of gamma-secretases using transition-state analogue inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* **920**, 197-205.

Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D. et al. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* **408**, 982-5.

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

Moya, K. L., Benowitz, L. I., Schneider, G. E. and Allinquant, B. (1994). The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis. *Dev Biol* **161**, 597-603.

Mucke, L., Abraham, C. R., Ruppe, M. D., Rockenstein, E. M., Toggas, S. M., Mallory, M., Alford, M. and Masliah, E. (1995). Protection against HIV-1 gp120-induced brain damage by neuronal expression of human amyloid precursor protein. *J Exp Med* **181**, 1551-6.

Mucke, L., Masliah, E., Johnson, W. B., Ruppe, M. D., Alford, M., Rockenstein, E. M., Forss-Petter, S., Pietropaolo, M., Mallory, M. and Abraham, C. R. (1994). Synaptotrophic effects of human amyloid beta protein precursors in the cortex of transgenic mice. *Brain Res* **666**, 151-67.

Müller, U. (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* **82**, 3-21.

Müller, U., Cristina, N., Li, Z. W., Wolfer, D. P., Lipp, H. P., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissman, C. (1996). Mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein (beta APP) gene show impaired behavior and high incidence of agenesis of the corpus callosum. *Ann N Y Acad Sci* **777**, 65-73.

Müller, U., Cristina, N., Li, Z. W., Wolfer, D. P., Lipp, H. P., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1994). Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell* **79**, 755-65.

Multhaup, G., Bush, A. I., Pollwein, P. and Masters, C. L. (1994). Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP). *FEBS Lett* **355**, 151-4.

Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1996). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). *Science* **271**, 1406-9.

Ninomiya, H., Roch, J. M., Sundsmo, M. P., Otero, D. A. and Saitoh, T. (1993). Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J Cell Biol* **121**, 879-86.

Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Murayama, Y. and Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* **362**, 75-9.

Nitsch, R. M., Deng, M., Growdon, J. H. and Wurtman, R. J. (1996). Serotonin 5-HT_{2a} and 5-HT_{2c} receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. *J Biol Chem* **271**, 4188-94.

Nordstedt, C., Caporaso, G. L., Thyberg, J., Gandy, S. E. and Greengard, P. (1993). Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol Chem* **268**, 608-12.

Ogawa, M., Miyata, T., Nakajima, K., Yagy, K., Seike, M., Ikenaka, K., Yamamoto, H. and Mikoshiba, K. (1995). The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. *Neuron* **14**, 899-912.

Ohsawa, I., Takamura, C. and Kohsaka, S. (2001). Fibulin-1 binds the amino-terminal head of beta-amyloid precursor protein and modulates its physiological function. *J Neurochem* **76**, 1411-20.

Ohshima, T., Gilmore, E. C., Longenecker, G., Jacobowitz, D. M., Brady, R. O., Herrup, K. and Kulkarni, A. B. (1999). Migration defects of cdk5(-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous. *J Neurosci* **19**, 6017-26.

Ohshima, T., Ogawa, M., Veeranna, Hirasawa, M., Longenecker, G., Ishiguro, K., Pant, H. C., Brady, R. O., Kulkarni, A. B. and Mikoshiba, K. (2001). Synergistic contributions of cyclin-dependant kinase 5/p35 and Reelin/Dab1 to the positioning of cortical neurons in the developing mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2764-2769.

Paliga, K., Peraus, G., Kreger, S., Durrwang, U., Hesse, L., Multhaup, G., Masters, C. L., Beyreuther, K. and Weidemann, A. (1997). Human amyloid precursor-like protein 1-cDNS cloning, ectopic expression in COS-7 cells and identification of soluble forms in the cerebrospinal fluid. *Eur J Biochem* **250**, 354-63.

Pangalos, M. N., Shioi, J. and Robakis, N. K. (1995). Expression of the chondroitin sulfate proteoglycans of amyloid precursor (appican) and amyloid precursor-like protein 2. *J Neurochem* **65**, 762-9.

Perez, R. G., Zheng, H., Van der Ploeg, L. H. and Koo, E. H. (1997). The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci* **17**, 9407-14.

Pfeiffer, F., Simler, R., Grenningloh, G. and Betz, H. (1984). Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7224-7.

Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu Rev Neurosci* **21**, 479-505.

Qiu, W. Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E. H. and Selkoe, D. J. (1995). Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner. *J Neurosci* **15**, 2157-67.

Rassoulzadegan, M., Yang, Y. and Cuzin, F. (1998). APLP2, a member of the Alzheimer precursor protein family, is required for correct genomic segregation in dividing mouse cells. *Embo J* **17**, 4647-56.

Rebeck, G. W., Moir, R. D., Mui, S., Strickland, D. K., Tanzi, R. E. and Hyman, B. T. (2001). Association of membrane-bound amyloid precursor protein APP with the apolipoprotein E receptor LRP. *Brain Res Mol Brain Res* **87**, 238-45.

Rice, D. S., Sheldon, M., D'Arcangelo, G., Nakajima, K., Goldowitz, D. and Curran, T. (1998). Disabled-1 acts downstream of Reelin in a signaling pathway that controls laminar organization in the mammalian brain. *Development* **125**, 3719-29.

Rosen, D. R., Martin-Morris, L., Luo, L. Q. and White, K. (1989). A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2478-82.

Rossjohn, J., Cappai, R., Feil, S. C., Henry, A., McKinstry, W. J., Galatis, D., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L. and Parker, M. W. (1999). Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol* **6**, 327-31.

Rottner, K., Behrendt, B., Small, J. V. and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* **1**, 321-2.

Russo, T., Faraonio, R., Minopoli, G., De Candia, P., De Renzi, S. and Zambrano, N. (1998). Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *FEBS Lett* **434**, 1-7.

Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D. and Greengard, P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* **153**, 1403-14.

Sabo, S. L., Lanier, L. M., Ikin, A. F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P. and Buxbaum, J. D. (1999). Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J Biol Chem* **274**, 7952-7.

Salbaum, J. M. and Ruddle, F. H. (1994). Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons. *J Exp Zool* **269**, 116-27.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratories Press. ISBN 0-87969-309-6.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K. et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* **400**, 173-7.

Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., Pericak-Vance, M. A., Goldgaber, D. and Roses, A. D. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9649-53.

Schubert, D. and Behl, C. (1993). The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from beta-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain Res* **629**, 275-82.

Schubert, D., Jin, L. W., Saitoh, T. and Cole, G. (1989). The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* **3**, 689-94.

Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dircksen, H., Multhaup, G., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1991). Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res* **563**, 184-94.

Schwartzkroin, P. A. and Walsh, C. A. (2000). Cortical malformations and epilepsy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **6**, 268-80.

Selkoe, D. J. (1996). Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **271**, 18295-8.

Selkoe, D. J. (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* **8**, 447-53.

Selkoe, D. J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* **399**, A23-31.

Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-66.

Shen, J., Bronson, R. T., Chen, D. F., Xia, W., Selkoe, D. J. and Tonegawa, S. (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* **89**, 629-39.

Simons, M., Ikonen, E., Tienari, P. J., Cid-Arregui, A., Monning, U., Beyreuther, K. and Dotti, C. G. (1995). Intracellular routing of human amyloid protein precursor: axonal delivery followed by transport to the dendrites. *J Neurosci Res* **41**, 121-8.

Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J. et al. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537-40.

Slunt, H. H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A. C., Tanzi, R. E. and Sisodia, S. S. (1994). Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem* **269**, 2637-44.

Small, D. H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K. and Masters, C. L. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of

Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* **14**, 2117-27.

Smith, R. P., Higuchi, D. A. and Broze, G. J. (1990). Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein. *Science* **248**, 1126-8.

Sprecher, C. A., Grant, F. J., Grimm, G., O'Hara, P. J., Norris, F., Norris, K. and Foster, D. C. (1993). Molecular cloning of the cDNAs for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* **32**, 4481-6.

Steinbach, J. P., Müller, U., Leist, M., Li, Z. W., Nicotera, P. and Aguzzi, A. (1998). Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice. *Cell Death Differ* **5**, 858-66.

Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D. and Roses, A. D. (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8098-102.

Stumpo, D. J., Bock, C. B., Tuttle, J. S. and Blackshear, P. J. (1995). MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 944-8.

Sturchler-Pierrat, C. and Sommer, B. (1999). Transgenic animals in Alzheimer's disease research. *Rev Neurosci* **10**, 15-24.

Suzuki, N., Iwatsubo, T., Odaka, A., Ishibashi, Y., Kitada, C. and Ihara, Y. (1994). High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol* **145**, 452-60.

Takahashi, M., Dore, S., Ferris, C. D., Tomita, T., Sawa, A., Wolosker, H., Borchelt, D. R., Iwatsubo, T., Kim, S. H., Thinakaran, G. et al. (2000). Amyloid precursor proteins inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Neuron* **28**, 461-473.

Thinakaran, G., Kitt, C. A., Roskams, A. J., Slunt, H. H., Masliah, E., von Koch, C., Ginsberg, S. D., Ronnett, G. V., Reed, R. R., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1995). Distribution of an APP homolog, APLP2, in the mouse olfactory system: a potential role for APLP2 in axogenesis. *J Neurosci* **15**, 6314-26.

Tienari, P. J., De Strooper, B., Ikonen, E., Simons, M., Weidemann, A., Czech, C., Hartmann, T., Ida, N., Multhaup, G., Masters, C. L. et al. (1996). The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *Embo J* **15**, 5218-29.

Tremml, P., Lipp, H. P., Müller, U., Ricceri, L. and Wolfer, D. P. (1998). Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Behav Brain Res* **95**, 65-76.

Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B. and Herz, J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **273**, 33556-60.

Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A. and Herz, J. (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* **97**, 689-701.

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

von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H., Price, D. L. and Sisodia, S. S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* **18**, 661-9.

Walsh, C. A. (1999). Genetic malformations of the human cerebral cortex. *Neuron* **23**, 19-29.

Walsh, C. A. (2000). Genetics of neuronal migration in the cerebral cortex. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **6**, 34-40.

Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Selkoe, D. J. and Teplow, D. B. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* **274**, 25945-52.

Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E. and Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10758-62.

Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M. D., Romano, D. M., Sisodia, S. S., Hyman, B. T., Neve, R. L. and Tanzi, R. E. (1993). Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* **5**, 95-100.

Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* **57**, 115-26.

White, A. R., Multhaup, G., Maher, F., Bellingham, S., Camakaris, J., Zheng, H., Bush, A. I., Beyreuther, K., Masters, C. L. and Cappai, R. (1999). The Alzheimer's disease amyloid precursor protein modulates copper-induced toxicity and oxidative stress in primary neuronal cultures. *J Neurosci* **19**, 9170-9.

White, A. R., Zheng, H., Galatis, D., Maher, F., Hesse, L., Multhaup, G., Beyreuther, K., Masters, C. L. and Cappai, R. (1998). Survival of cultured neurons from amyloid precursor protein knock-out mice against Alzheimer's amyloid-beta toxicity and oxidative stress. *J Neurosci* **18**, 6207-17.

Wong, P. C., Zheng, H., Chen, H., Becher, M. W., Sirinathsinghji, D. J., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Price, D. L., Van der Ploeg, L. H. and Sisodia, S. S. (1997). Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature* **387**, 288-92.

Xu, X., Yang, D., Wyss-Coray, T., Yan, J., Gan, L., Sun, Y. and Mucke, L. (1999). Wild-type but not Alzheimer-mutant amyloid precursor protein confers resistance against p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7547-52.

Yamada, T., Sasaki, H., Furuya, H., Miyata, T., Goto, I. and Sakaki, Y. (1987). Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* **149**, 665-71.

Yamaguchi, H., Nakazato, Y., Hirai, S., Shoji, M. and Harigaya, Y. (1989). Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain. *Am J Pathol* **135**, 593-7.

Yamatsuji, T., Matsui, T., Okamoto, T., Komatsuzaki, K., Takeda, S., Fukumoto, H., Iwatsubo, T., Suzuki, N., Asami-Odaka, A., Ireland, S., Kinane, T. B., Giambarella, U. and Nishimoto, I. (1996). G protein-mediated neuronal DNS fragmentation induced by familial Alzheimer's disease-associated mutants of APP. *Science* **272**, 1349-52.

Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L. and Gurney, M. E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* **402**, 533-7.

Yankner, B. A., Duffy, L. K. and Kirschner, D. A. (1990). Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **250**, 279-82.

Zambrano, N., Minopoli, G., de Candia, P. and Russo, T. (1998). The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J Biol Chem* **273**, 20128-33.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J., Hopkins, R., Smith, D. W., Heavens, R. P., Dawson, G. R., Boyce, S., Conner, M. W., Stevens, K. A., Slunt, H. H., Sisodia, S. S., Chen, H. Y. and Van der Ploeg, L. H. T. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* **81**, 525-31.

Zheng, P., Eastman, J., Vande Pol, S. and Pimplikar, S. W. (1998). PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14745-50.

7. ANHANG

Abkürzungen

AD	<i>Alzheimer's disease</i> (Alzheimersche Krankheit)
APLP	<i>amyloid precursor protein</i> (Amyloid-Vorläuferprotein)
APP	<i>amyloid precursor-like protein</i> (Amyloid-Vorläufer-ähnliches Protein)
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
DIV	<i>day(s) in vitro</i> (Tage in Kultur)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N entspricht Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymidin)
E	embryonaler Tag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Familiäre Formen der Alzheimerschen Krankheit
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
kD	Kilodalton
NPXY	Asparagin-Prolin-X (beliebige AS)-Tyrosin
OD	optische Dichte (Absorption)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PS	Präsenilin
rpm	Umdrehungen pro Minute
sAPP / sAPLP	<i>soluble</i> (lösliches) APP/APLP, entspricht den Ektodömenen
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodekylsulfat)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit zur Kennzeichnung der Enzymaktivität)
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
vgl.	vergleiche

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Sabine Heber geb. Stahl
 geboren: 14.08.1973 in Erlabrunn
 Familienstand: verheiratet
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Wohnort: Nonnhäuser Weg 10, 35043 Marburg-Ginseldorf

SCHULAUSSBILDUNG

1980-1988 Polytechnische Oberschule in Bermsgrün
 1988-1992 Mathematisch-naturwissenschaftlicher Spezialschuleteil
 am Gymnasium 7 in Erfurt
 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife, Durchschnittsnote: 1,1

HOCHSCHULSTUDIUM

Oktober 1992 bis Juni 1997 Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg
 Hauptfach: Zellbiologie
 Nebenfachpraktika: Humangenetik, Immunologie, Biochemie, Molekularbiologie, Virologie
 Industriepraktikum: 2 Monate bei Fa. Hoechst AG (DG Rheumatologie)
 Diplomarbeit: angefertigt bei HMR Marburg
 Abschluß: Diplom mit Gesamtnote "sehr gut"

TÄTIGKEITEN

November 1996 bis September 1997 Praktikantin bei Hoechst Marion Roussel Marburg
 September 1997 bis Februar 1998 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung in Marburg
 März 1998 bis z.Z. Doktorandin am Max-Planck-Institut für Hirnforschung Frankfurt

Marburg, den 20.08.2001

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Aumüller, Beato, Daut, Elsässer, Fischer, Fruhstorfer, Fuhs, Garten, Gemsa, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Hensel, Herrler, Kern, Kirchner, Klenk, Koolman, Kummer, Lang, H. G. Löffler, M. Löffler Lührmann, Marahiel, Möröy, Müller, Niessing, Radsak, Risau, Röhm, Rogausch, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Seifart, J. Seitz, K.-A. Seitz, Steinmetz, Suske, Voigt, von Löw, Zickendraht

Mein Dank gilt...

...Herrn Prof. Dr. Jan Koolman für die freundliche Bereitschaft zur externen Betreuung an der Universität Marburg und für seine Unterstützung während dieser Doktorarbeit.

...Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in der Abteilung Neurochemie des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung in Frankfurt.

...Frau PD Dr. Ulrike Müller für die Überlassung des sehr interessanten Themas, ihre ständige Hilfe bei der Durchführung praktischer und theoretischer Arbeiten sowie die Ermöglichung meines Forschungsaufenthaltes in Paris.

...meinen Kolleginnen und Kollegen des Labors 205: Brigitte Anliker, Nicole Fürst, Anja Niehuis, Katja Giehl und Marc Oliver Steinbeck für die friedliebende und angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die vielen Hilfeleistungen.

...allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie, insbesondere dem technischen Personal, für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung zur Bewältigung von Problemen im Laboralltag.

...Herrn Prof. Dr. Jochen Herms (Universität München) und seinen Mitarbeitern für die Durchführung und Dokumentation der histologischen und histochemischen Analysen der Mausmutanten an Paraffinschnitten.

...Herrn PD Dr. J. Helmut Brandstätter und Anja Hildebrand für die gute Zusammenarbeit bei den histochemischen Analysen der Mausmutanten an Gefrierschnitten.

...den Herren Prof. Dr. Pierluigi Nicotera und PD Dr. Marcel Leist (Universität Konstanz) für ihre zahlreichen Ratschläge für die Neuronenkultivierung und Überlebenstests.

...Herrn Dr. Matthias Kneussel für seine Unterstützung bei der konfokalen Mikroskopie.

...Herrn Walter Hofer für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

...Herrn Driss Benzaid für seine Hilfe bei der Erstellung von Präsentationen der umfangreichen Bilddaten am Computer.

...Frau Sabine Schulz für ihre unendliche Hilfsbereitschaft in verwaltungstechnischen Angelegenheiten und bei vielen weiteren Fragen.

...Frau PD Dr. Ulrike Müller, Dr. Monika Rapp, Brigitte Anliker und Herrn Klaus Hirzel für das kritische Lesen und Kommentieren dieser Arbeit.

...meinem Mann Gordon für die schönen Stunden in entspannter Umgebung außerhalb des Labors und seine stetige verständnisvolle und aufbauende Zuwendung.

...meinen Eltern für ihre Hilfe und liebevolle Zuwendung während meiner gesamten Ausbildung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Transgene Tiermodelle zum Verständnis der physiologischen Funktionen von Proteinen der β -Amyloid-Vorläuferprotein-Genfamilie“ am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Heinrich Betz mit Unterstützung durch Frau PD Dr. Ulrike Müller und Herrn Prof. Dr. Jan Koolman ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Auszüge dieser Arbeit wurden bzw. werden wie folgt veröffentlicht:

Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S. S., Tremml, P., Lipp, H.-P., Wolfer D. P., Müller U. (2000).

Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* **20**, 7951-63.

Heber, S., Herms, J., Kneussel, M., Brandstätter, J. H., von Koch, C., Sisodia, S. S., Müller U. (2000).

Mice with combined deficiencies in APP/APLP-family members reveal a key physiological role for APLP2. *Poster Presentation, Abstract 181.5, Society for Neuroscience 30th Annual Meeting, New Orleans.*

Herms, J., Heber, S., Anliker, B., Rhee, J.-S., Rosenmund, C., Hülsmann, S., Kneussel, M., Brandstätter, J. H., Sisodia, S. S., Müller U.

Mice deficient in all three amyloid precursor protein family members display neuronal migration defects. *Manuscript in preparation.*

Marburg, den 24.09.01

Sabine Heber