

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Neurowissenschaften

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth)

***In vivo* Funktionsanalyse kortikaler Neurone
mittels Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie
in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit**

Marc Aurel Busche

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth
2. Priv.-Doz. Dr. J. E. Hartmann
3. Univ.-Prof. Dr. C. Zimmer

Die Dissertation wurde am 30.09.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.10.2011 angenommen.

***In vivo* Funktionsanalyse kortikaler Neurone mittels Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit**

Die Alzheimer-Krankheit ist eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung, die mit leichten Gedächtnisstörungen beginnt und über viele Jahre zu schweren kognitiven Beeinträchtigungen führt. Amyloid- β Peptide sind kausal an der Krankheitsentstehung beteiligt, allerdings sind die zugrunde liegenden Ursachen und Mechanismen noch nicht geklärt. Ziel vorliegender Arbeit war die *in vivo* Funktionsanalyse kortikaler Neurone mittels Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie im APP23xPS45-Mausmodell der Alzheimer-Krankheit. Es wird gezeigt, dass die Funktion kortikaler Neurone der Schicht 2/3 in sechs bis zehn Monate alten transgenen Mäusen massiv gestört ist. Diese Störung ist gekennzeichnet durch das gehäufte Auftreten von vermindert aktiven (*silent cells*) sowie vermehrt aktiven (*hyperactive cells*) Neuronen. Ferner wird gezeigt, dass hyperaktive Neurone nur in unmittelbarer Plaquenähe ($< 60\mu\text{m}$ Abstand vom Plaque) auftreten und der Mechanismus der Hyperaktivität auf einer synaptischen Enthemmung der Zellen beruht. Die beschriebene neuronale Funktionsstörung korreliert zeitlich mit Lern- und Gedächtnisdefiziten in APP23xPS45-Mäusen und könnte somit für das Verständnis der Mechanismen der Alzheimer-Krankheit sowie für therapeutische Ansätze unmittelbar relevant sein. Die wesentlichen Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel „Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer’s disease.“ in *Science*. **321**, 5896, (2008) veröffentlicht.

***In vivo* functional two-photon imaging of cortical neurons in a mouse model of Alzheimer's disease**

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder which evolves over a period of years from mildly impaired memory to severe cognitive loss. Amyloid β peptides have a causal role in its pathogenesis, however the underlying mechanisms remain unknown. The aim of the project was to investigate the function of cortical neurons by using two-photon imaging in the APP23xPS45 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Overall, activity of cortical layer 2/3 neurons is profoundly impaired in 6- to 10-months-old APP23xPS45 mice. This impairment includes the occurrence of abnormally silent and hyperactive neurons. Hyperactive neurons are clustered in the immediate vicinity of plaques. Notably, hyperactivity appears to be due to a relative decrease in synaptic inhibition. The dysfunction of cortical neurons correlates with learning and memory deficits in APP23xPS45 mice. Therefore, the findings may contribute to our understanding of the disease mechanisms and thus may represent a target for future therapies. The main part of this thesis was published as „Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease.“ in *Science*. **321**, 5896, (2008)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Motivation	8
2 Einleitung	9
2.1 Allgemeine Grundlagen und wissenschaftliche Fragestellung	9
2.2 <i>In vivo</i> Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie	12
2.2.1 Prinzipien	12
2.2.2 Instrumenteller Aufbau	13
2.3 <i>In vivo</i> Anfärbung von Neuronenpopulationen	16
2.3.1 Ca^{2+} -empfindliche Fluoreszenzfarbstoffe	16
2.3.2 Anfärbemethoden	20
2.3.3 Fluoreszenzmessungen	22
3 Material und Methoden	25
3.1 Versuchstiere	25
3.2 Anästhesie	25
3.3 Präparation	26
3.4 <i>In vivo</i> Anfärbung	27
3.5 <i>In vivo</i> Fluoreszenzmessungen	28
3.6 <i>In vivo</i> Pharmakologie	29
3.7 Färbung von Plaques <i>in situ</i>	29

3.8 Datenauswertung	30
4 Ergebnisse	31
5 Diskussion	45
6 Eigene Publikationen	51
Literaturverzeichnis	52
Danksagung	64

Abkürzungsverzeichnis

$[Ca^{2+}]$	Kalziumionenkonzentration
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Kalziumionenkonzentration
A β	Amyloid- β
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AM	Azetoxymethylester
NA	numerische Apertur
APD	avalanche photodiode
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APV	D-2-amino-5-phosphovaleriansäure
Ca^{2+}	Kalziumion
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
DMSO	Dimethylsulfoxid
EEG	Elektroenzephalogramm
F_0	Ruhefluoreszenz
F	Fluoreszenz
fMRI	functional magnetic resonance imaging
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	green fluorescent protein

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IR	Infrarot
K_d	Dissoziationskonstante
KCl	Kaliumchlorid
MCBL	multi cell bolus loading
Mg^{2+}	Magnesiumion
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
Na^+	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
n	Anzahl
OGB-1	Oregon Green BAPTA-1 AM
PMT	photomultiplier tube
PS	Präsenilin
ROI	region of interest
SR101	Sulforhodamin 101
TTX	Tetrodotoxin

1 Motivation

Die Interaktion von Nervenzellen in komplex verschalteten Netzwerken bildet die Grundlage kognitiver Funktionen. Neuronale Aktivität umfasst verschiedene räumliche und zeitliche Dimensionen und kann mit unterschiedlichen Methoden gemessen werden. Viele Jahre war die Analyse neuronaler Aktivität auf große Zellpopulation oder einzelne Zellen beschränkt. Erst die Entwicklung der Zwei-Photonen Mikroskopie sowie von Methoden zur *in vivo* Beladung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglichte die simultane Untersuchung einzelner Neurone und der übergeordneten, lokalen Netzwerkfunktion.

Bei zahlreichen Erkrankungen des Gehirns ist die Funktion von Neuronen und deren Netzwerken gestört, jedoch sind die genauen Ursachen und Mechanismen oftmals unbekannt. Die *in vivo* Funktionsanalyse mittels Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie kann hier einen fundamentalen Beitrag zum Verständnis dieser Störungen leisten. Eine besondere Rolle spielt hierbei die Entwicklung transgener Tiermodelle, die es erlauben, krankheitsrelevante Ursachen und Mechanismen zu untersuchen und daraus zielgerichtete Therapien zu entwickeln.

Diese faszinierenden wissenschaftlichen Perspektiven in Kombination mit meinem großen Interesse an den klinischen Neurowissenschaften haben mich besonders motiviert und angetrieben, am beschriebenen Projekt im Rahmen meiner medizinischen Dissertation zu arbeiten.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Grundlagen und wissenschaftliche Fragestellung

Die Alzheimer-Krankheit gilt als die häufigste Ursache einer Demenz im hohen Alter. Weltweit sind gegenwärtig mehr als 35 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen und die Bevölkerungsentwicklung lässt einen Anstieg auf mehr als 115 Millionen Erkrankte bis zum Jahr 2050 erwarten [Querfurth und LaFerla 2010; Ashe und Zahs 2010]. Neuropathologisch ist die Krankheit durch das Auftreten von Amyloid- β Plaques, Neurofibrillenbündeln und den fortschreitenden Verlust von Nervenzellen charakterisiert [Hardy und Higgins 1992]. Die genauen Ursachen und Mechanismen der Krankheitsentstehung sind jedoch noch nicht geklärt.

In frühen Krankheitsstadien stehen Lern- und Gedächtnisstörungen im Vordergrund [McKhann et al. 1984]. Im Verlauf kommt es zu einem fortschreitenden Abbau kognitiver Funktionen, so dass eine selbständige Lebensführung unmöglich wird. Zumeist tritt die Alzheimer-Krankheit sporadisch auf, in weniger als 2% aller Fälle liegt eine dominante Vererbung vor [Blennow et al. 2006]. Die dominant vererbte Form der Alzheimer-Krankheit tritt zwar deutlich früher als die sporadische Form auf (in der Regel vor dem 65. Lebensjahr), im klinischen Erscheinungsbild unterscheiden sich die beiden Formen jedoch nicht. Die Auf-

klärung der dominant vererbten, verantwortlichen Genmutationen ermöglichte die Erzeugung transgener Mausmodelle (zahlreiche Mausmodelle werden hier beschrieben: <http://www.alzforum.org/res/com/tra/app/default.asp>), die wesentlich zum Verständnis der Krankheit beitragen können. Die Modelle entwickeln in unterschiedlicher Ausprägung Amyloid- β Plaques und Neurofibrillenbündel sowie altersabhängige Lern- und Gedächtnisdefizite.

Ein solches transgenes Mausmodell der Alzheimer-Krankheit wurde in vorliegender Arbeit bezüglich der Funktion kortikaler Neurone untersucht. Diese APP23xPS45-Mäuse überexprimieren eine mutierte Form des humanen Amyloid-Vorläuferproteins (APP) sowie ein humanes, mutiertes Präsenilin (PS; für Details siehe Material und Methoden). Altersabhängig entwickeln die Mäuse im Gehirn Plaques und weitere typische Pathologien wie Gliose, Inflammation und Hyperphosphorylierung von Tau. Der wesentliche Vorteil einer doppelt-transgenen Maus gegenüber einer einfach-transgenen APP-Maus besteht in der beschleunigten Plaquebildung [Duff et al. 1996; Borchelt et al. 1997; Holcomb et al. 1998], so dass in APP23xPS45-Mäusen bereits mit zwei Monaten erste Plaques in tiefen Kortexschichten und mit vier Monaten Plaques in Schicht 2/3 nachweisbar sind.

Als mit den Experimenten zu vorliegender Arbeit begonnen wurde, wurden die meisten Studien, die Effekte von Amyloid- β Peptiden auf die Funktion von Neuronen untersuchten, in Zellkulturen und Hirnschnitten durchgeführt. Die wenigen Befunde aus *in vivo* Experimenten beruhten zumeist auf elektrophysiologischen Messungen [Walsh et al. 2002; Stern et al. 2004]. Geeigneter für die Funktionsanalyse einzelner Zellen und deren lokaler Netzwerke erscheint jedoch die hochauflösende Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie. Dabei wird eine Population von Neuronen mit einem Ca^{2+} -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. Oregon Green BAPTA-1 AM (OGB-1), beladen und Änderungen der intrazellulären

Ca²⁺-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) durch die Erfassung der emittierten Lichtintensität gemessen. Diese intrazellulären Ca²⁺-Signale sind zuverlässige Indikatoren elektrischer Aktivität und somit hervorragend geeignet die räumlichen und zeitlichen neuronalen Aktivitätsmuster *in vivo* zu untersuchen. Gegenüber elektrophysiologischen Methoden bietet die Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie also den Vorteil der besseren räumlichen Auflösung und der simultanen Funktionsanalyse von bis zu hundert (und mehr) Neuronen. Gleichzeitig kann deren räumliche Beziehung zu Plaques charakterisiert werden. Zudem können stumme und wenig aktive Neurone, die bei elektrischen Messungen oftmals übersehen werden, dargestellt und somit das gesamte neuronale Aktivitätsmuster präziser beurteilt werden.

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass erhöhte Konzentrationen an Amyloid- β Peptiden im Gehirn zu Störungen der synaptischen Übertragung und letztlich zu einem Verlust von Synapsen führen (*synaptic dismantling*) [Selkoe 2002]. Daher war zu Beginn vorliegender Arbeit zu erwarten, dass die Aktivität von Neuronen in APP23xPS45-Mäusen im Krankheitsverlauf global abnehme. Diese Hypothese war Ausgangspunkt vorliegender Arbeit und wurde mittels *in vivo* Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie getestet. Hierzu wurde eine Population von Schicht 2/3 Neuronen des frontalen Kortex mit OGB-1 massenbeladen (MCBL) [Stosiek et al. 2003] und deren Aktivitätsmuster *in vivo* analysiert. Simultan wurden Plaques mit dem gebräuchlichen Farbstoff Thioflavin-S [Wisniewski et al. 1989] angefärbt und deren räumliche Beziehung zu unterschiedlich aktiven Neuronen charakterisiert.

In vorliegender Arbeit wurde erstmals die neuronale Funktion in einem Alzheimer-Mausmodell mittels Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der methodische Aspekt war daher neben den biologischen Befunden von besonderer Bedeutung. Aufgrund dessen werden die relevanten Grundlagen der Zwei-Photonen Mikroskopie nachfolgend in 2.2 und 2.3 erläutert.

2.2 *In vivo* Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie

2.2.1 Prinzipien

Wurde die theoretische Grundlage der Zwei-Photonen Anregung bereits im Jahre 1931 von Maria Göppert-Mayer beschrieben [Göppert-Mayer 1930], so ermöglichte erst die Entwicklung leistungsstarker Laser mit ausreichend hohen Photonenflussdichten ($> 10^{24}$ Photonen $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) eine praktische Anwendung [Diaspro et al. 2006]. Seit der erstmaligen Demonstration durch Denk et al. im Jahre 1990, entwickelte sich die Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie zu einer entscheidenden Methode in der Untersuchung biologischer Systeme [Denk et al. 1990]. Neben der Analyse funktioneller und morphologischer Eigenschaften des Nervensystems fand sie eine breite Anwendung zum Beispiel in der Aufklärung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in Haut, Niere, Herz, Lymph- und Tumorgewebe [Helmchen und Denk 2005].

Grundlage bildet das Prinzip einer quasi-simultanen (innerhalb von weniger als 10^{-15}s) Absorption zweier Photonen durch ein Farbstoffmolekül und der nachfolgenden Emission eines einzelnen Fluoreszenzphotons [Nimmerjahn und Helmchen 2008]. Die Wahrscheinlichkeit dieses Ereignisses ist unter gewöhnlichen Lichtintensitäten vernachlässigbar klein, steigt jedoch bei hohen Photonenflussdichten, die durch die Verwendung modengekoppelter, gepulster Laser und eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur erreicht werden, an [Denk und Svoboda 1997]. Die Zwei-Photonen Absorption erfolgt fast ausschließlich in einem Sub-Femtoliter-Fokusvolumen, so dass das gesamte, nach Anregung emittierte Licht zur Signalgebung beiträgt und auf die Verwendung von Raumfiltern verzichtet werden kann [Diaspro et al. 2006; Nimmerjahn und Helmchen 2008]. Ergänzend erlaubt die Verwendung langwelligeren Lichtes (700 - 1100nm) eine höhere Eindringtiefe

(bis zu 1mm) in biologisches Gewebe, da Streuungseffekte bei der Verwendung kürzerer Wellenlängen stark zunehmen [Beaurepaire et al. 2001; Theer et al. 2003; Helmchen und Denk 2005]. Diese Prinzipien gewährleisten hochauflösende optische Messungen in biologischen Strukturen bei geringer Photobelastung und vermindertem Ausbleichen.

2.2.2 Instrumenteller Aufbau

Durch ähnliche Prinzipien im strukturellen Aufbau kann ein konfokales Mikroskop durch wenige Veränderungen in ein Zwei-Photonen Mikroskop umgewandelt werden [Denk et al. 1990]. Im Wesentlichen sind lediglich die optischen Komponenten im Anregungslichtweg an die Verwendung von Infrarot-(IR-)Licht anzupassen und die konfokale Lochblende zu entfernen. Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung eines Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopes. Die wesentlichen Bestandteile sind ein gepulster IR-Laser als Anregungslichtquelle, Scan-Spiegel und optische Komponenten sowie ein Fluoreszenzdetektor. Das Anregungslicht wird hierbei mittels dichroischem Spiegel und Objektivlinse in die zu untersuchende Probe fokussiert und diese rasterförmig gescannt. Das von der Probe emittierte Licht wird mittels selbem Objektiv und dichroischem Strahlenteiler auf einen Photodetektor gelenkt. Das Messsignal wird digital mit einer Datenerfassungssoftware verarbeitet und zu einem Bild zusammengefügt. Nachfolgend werden einige Bestandteile näher erläutert:

Lichtquelle. Als Lichtquelle wird zumeist ein Titan-Saphir Laser verwendet. Wesentliche Eigenschaften sind eine durchschnittliche Leistung von bis zu 3W, ein einstellbarer Wellenlängenbereich von 700 - 1100nm, eine Pulsdauer von circa 100fs sowie eine Pulswiederholungsrate von 100MHz [Nimmerjahn und Helmchen 2008]. Seltener zur Anwendung kommen Feststoff - (Cr:LiSAF, Nd:YLF, Nd:Glas

und Cr:Fosterite), Farbstoff - und Faserlaser [Squier und Muller 2001].

Optische Komponenten und Scan-Spiegel. Diese sollten an den Gebrauch der verwendeten Lichtquelle angepasst sein. Aufgrund der hohen Reflektivität im infraroten Wellenlängenbereich werden zumeist silberbeschichtete Scan-Spiegel verwendet [Denk und Svoboda 1997].

Trennfilter. Die Wellenlänge des Fluoreszenzlichtes liegt spektral einige hundert Nanometer vom Anregungslicht entfernt, so dass es durch entsprechende Filter vollständig vom Anregungslicht getrennt werden kann.

Photodetektoren. Als Photodetektoren kommen zumeist Photonenvervielfacher (*photomultiplier*; PMT) oder Lawinenphotodioden (*avalanche photodiode*; APD) zur Anwendung [Nimmerjahn und Helmchen 2008]. Die Quantenausbeute (*quantum efficiency*) der APD liegt zwar bei 70 - 80% im sichtbaren Spektrum, limitierend sind jedoch die geringe Größe ihrer aktiven Fläche, die niedrige innere Verstärkung ($\sim 10^2$) sowie das hohe Rauschen. Dahingegen weist der PMT eine hohe innere Verstärkung ($> 10^6$) und eine große aktive Fläche bei einer Quantenausbeute von bis zu 30% auf.

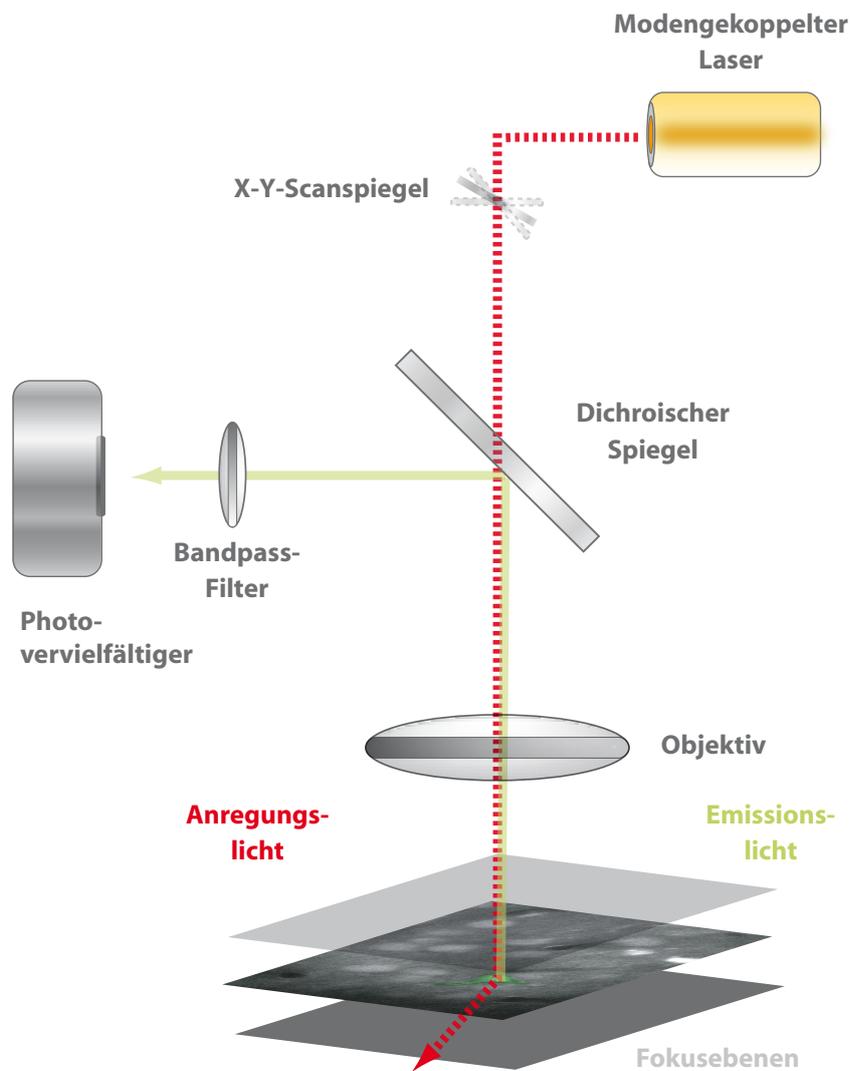


Abb. 1: Schematische Darstellung der *in vivo* Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie. Das Anregungslicht der Laserlichtquelle wird mittels dichroischem Spiegel und Objektiv in die Probe fokussiert und diese mittels der x-y-Scanspiegel rasterförmig gescannt. Das Emissionslicht wird mittels selbem Objektiv und dichroischem Spiegel auf einen Photovervielfältiger gelenkt. Der vor dem Photovervielfältiger platzierte Bandpassfilter hält störendes Streulicht ab.

2.3 *In vivo* Anfärbung von Neuronenpopulationen

2.3.1 Ca^{2+} -empfindliche Fluoreszenzfarbstoffe

Ca^{2+} ist als sekundärer Botenstoff an der Regulierung wesentlicher zellulärer Funktionen wie hormoneller Sekretion, Genexpression, Kontraktilität, Erregbarkeit und neuronaler Plastizität beteiligt [Helmchen und Waters 2002]. Darüber hinaus spielt es eine wesentliche Rolle bei der Steuerung der embryonalen Entwicklung des Nervensystems [Komuro und Kumada 2005] und bei Prozessen, die zur Einleitung von Apoptoseprozessen führen [Verkhatsky 2007]. Zudem scheinen auch neurodegenerative Erkrankungen mit einer Dysregulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase einherzugehen [Bezprozvanny und Hayden 2004; Green und LaFerla 2008].

Die Vermittlung so unterschiedlicher Funktionen resultiert aus der zeitlichen und räumlichen Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ innerhalb subzellulärer Kompartimente. Die Entwicklung Ca^{2+} -empfindlicher Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichte erstmals die Analyse der verschiedenen Formen und Mechanismen der intrazellulären Ca^{2+} -Signalgebung von einzelnen Zellen bis hin zu komplexen zellulären Netzwerken [Tsien 1989].

Im Allgemeinen lassen sich synthetisch hergestellte von genetisch kodierten Ca^{2+} -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen unterscheiden. Ein entscheidender Nachteil synthetischer Fluoreszenzfarbstoffe ist die fehlende Möglichkeit, eine spezifische Neuronenpopulation oder auch Zellorganellen selektiv anzufärben [Paredes et al. 2008]. Daher wurden in den vergangenen Jahren genetisch kodierte Ca^{2+} -empfindliche Fluoreszenzfarbstoffe entwickelt und für entsprechende Fragestellungen eingesetzt.

Synthetische Ca^{2+} -empfindliche Fluoreszenzfarbstoffe. Zur Analyse der

neuronalen Netzwerkdynamik eignen sich vor allem die synthetischen Ca^{2+} -empfindlichen Farbstoffe. Nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge ändern die Farbstoffmoleküle ihr Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Jedes Aktionspotential ist mit dem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle verbunden und resultiert in einem kurzfristigen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [Borst und Helmchen 1998; Cossart et al. 2005]. Diese Ca^{2+} -Signale sind somit zum optischen Nachweis der elektrischen Zellaktivität geeignet. Ein weiterer Vorteil Ca^{2+} -empfindlicher Farbstoffe im Vergleich zu anderen funktionellen Farbstoffen für bestimmte Ionen (z.B. Na^+ oder Mg^{2+}) ist das hohe Signal-Rausch-Verhältnis [Putney 2006].

Für den praktischen Gebrauch von Ca^{2+} -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen müssen vor allem deren unterschiedliche Anregungswellenlängen, ihre verschieden große Affinitäten zum Ca^{2+} sowie deren chemische Zusammensetzung beachtet werden [Paredes et al. 2008; Cossart et al. 2005]. Die Farbstoffe können als Salz, an Dextran gebunden oder als Azetoxymethylester (AM) vorliegen. Salz- und Dextranzusammensetzung sind nicht membrandurchlässig und müssen daher direkt in die Zellen eingebracht werden. Da die Salze sich in der Regel nach einigen Minuten inhomogen in der Zelle verteilen, sind zytosolische Ca^{2+} -Messungen nur innerhalb der ersten Stunde nach Injektion möglich [Paredes et al. 2008]. Der Azetoxymethylester eines Fluoreszenzfarbstoffes ist dagegen membrandurchlässig. Nach Spaltung der Esterverbindung durch intrazelluläre Esterasen wird eine Rückdiffusion des nun geladenen Farbstoffes in den Extrazellularraum verhindert und die Messung intrazellulärer Fluoreszenzänderungen ermöglicht [Katerinopoulos und Foukaraki 2002; Haugland und Basey 2005].

Die Dissoziationskonstante K_d beschreibt wie stark Ca^{2+} vom Fluoreszenzfarbstoff

gebunden wird [Putney 2006]:

$$K_d = \frac{[Ca^{2+}][I]}{[CaI]}$$

Sie gibt die Ca^{2+} -Konzentration an, bei der im Gleichgewicht die Hälfte aller Farbstoffmoleküle an Ca^{2+} gebunden sind. So weisen hochaffine Farbstoffe (z.B. Fura2, Fluo3, Fluo4, Oregon Green BAPTA-1) Dissoziationskonstanten um 100nM auf (entsprechend der $[Ca^{2+}]_i$) [Cossart et al. 2005]. Dadurch lassen sich zwar robuste Signale bei Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ detektieren, diese zeigen aber aufgrund der Puffereigenschaften des Farbstoffes nur einen langsamen zeitlichen Verlauf. Im Gegensatz lassen sich mit niedrigaffinen Farbstoffen (z.B. Oregon Green BAPTA-5N, Mag-Fura, Fura 2 FF; $K_d \sim 5 - 50\mu M$) auch schnellere Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$, jedoch mit deutlich niedrigerer Signalamplitude, nachweisen [Cossart et al. 2005].

Neben chemischer Zusammensetzung und Affinität müssen auch die spektralen Eigenschaften eines Ca^{2+} -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffes beachtet werden. So können Ein-Wellenlängen-Farbstoffe von ratiometrischen Farbstoffen unterschieden werden [Kao 1994]. Die Ein-Wellenlängen-Farbstoffe ändern bei Bindung von Ca^{2+} die Fluoreszenzintensität, wohingegen ratiometrische Farbstoffe durch eine Verschiebung der Anregungs- oder Emissionswellenlänge charakterisiert sind. Bei der Anregung eines Ca^{2+} -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffes müssen zudem die Wellenlängen verfügbarer Laser beachtet werden. Interessanterweise können die Zwei-Photonen-Absorptionseigenschaften einiger Farbstoffe deutlich von der Vorhersage der Ein-Photonen-Absorptionseigenschaften abweichen [Paredes et al. 2008].

In Rahmen dieser Arbeit wurde der hochaffine Ca^{2+} -empfindliche Fluoreszenzfarbstoff OGB-1 verwendet. Dieser nicht-ratiometrische Einwellenlängen-Farbstoff

mit einem Anregungsmaximum bei 488nm, einem Emissionsmaximum bei 520nm, einer K_d von 170nM und einer ausreichenden Ruhefluoreszenz eignet sich aufgrund seiner Eigenschaften besonders für Zwei-Photonen Fluoreszenzmessungen im intakten Gehirn [Paredes et al. 2008; Haugland und Basey 2005].

Genetisch kodierte Fluoreszenzfarbstoffe. Die weiteste Verbreitung hat das Grün-fluoreszierende-Protein (*green fluorescent protein*; GFP), das erstmals um 1960 aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde [Shimomura et al. 1962]. In den folgenden Jahren wurden eine große Anzahl spektraler Varianten des GFP hergestellt [Campbell et al. 2002; Shaner et al. 2004], um dessen Eigenschaften zu verbessern und unterschiedliche Anwendungen in biologischen Systemen wie z.B. bei Experimenten zur intrazellulären Proteinlokalisierung, Studien der Genaktivität und Messungen zellulärer Aktivität zu ermöglichen.

Zur Messung zellulärer Aktivität wurden in den vergangenen Jahren fluoreszierende Sensorproteine, bestehend aus Varianten des GFP, die für den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) optimiert sind, sowie verschiedenen ligandenbindenden Domänen aus Proteinen, die ihre Konformation nach Bindung des Liganden ändern, entwickelt [Qiu et al. 2008].

FRET ist eine spektroskopische Methode, bei der Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor) strahlungsfrei auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor) übertragen wird [Tsien et al. 1993]. Die Effizienz des FRET hängt von der Entfernung (<10nm) und der Orientierung von Donor und Akzeptor ab [Jares-Erijman und Jovin 2003].

Zur Messung neuronaler Aktivität wurden in den vergangenen Jahren insbesondere genetisch kodierte Ca^{2+} -Sensoren entwickelt. Die anfänglich verwendeten Sensoren (beispielsweise *cameleons* [Miyawaki et al. 1997], *camgaroos* [Baird et al. 1999] oder *G-CAMPs* [Nakai et al. 2001]) waren noch wenig geeignet für *in vivo* Messungen

von Neuronenpopulationen [Rocheffort und Konnerth 2008]. Dieses wurde erst durch die Entwicklung der Troponin C-abhängigen Ca^{2+} -Sensoren CerTN-L15 [Heim et al. 2007], TN-XL [Mank et al. 2006] und TN-XXL [Mank et al. 2008] sowie den Calmodulin-abhängigen Ca^{2+} -Sensor D3cpv [Wallace et al. 2008] ermöglicht. Gerade für Messung schneller Signale aus nicht selektierten Neuronenpopulationen, wie in der vorliegenden Arbeit erforderlich, sind die synthetischen noch immer gegenüber den genetisch kodierten Farbstoffen von Vorteil [Rocheffort und Konnerth 2008].

Die Aktivierung von Neuronen verbunden mit einer Depolarisierung der Zellmembran führt zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen [Borst und Helmchen 1998; Cossart et al. 2005]. Diese können mit einem Ca^{2+} -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff beladen und der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Änderung des Fluoreszenzverhaltens detektiert werden. Dies ermöglicht die funktionelle, optische Analyse der elektrischen Erregungsmuster in lokalen neuronalen Populationen. Hierbei sind wesentliche Vorteile in der Untersuchung von Zellpopulationen gegenüber elektrophysiologischer Methoden, wie beispielsweise Multielektroden-Ableitungen, dass funktionelle Neuronenklassen unterschieden werden können und auch die räumliche Auflösung höher ist [Göbel und Helmchen 2007; Kerr und Denk 2008].

2.3.2 Anfärbemethoden

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Verfahren zur *in vivo* Anfärbung einzelner Zellen sowie von Zellpopulationen entwickelt: So kann die Beladung einzelner Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen mittels intrazellulärer Mikroelektroden [Helmchen und Waters 2002], durch Elektroporation [Nevian und Helmchen 2007; Judkewitz et al. 2009] oder mittels biolistischer Transformation (*gene gun*) [Kettunen et al. 2002] erfolgen. Elektroporationsmethoden bieten sich ebenso an, um

kleinere Zellpopulationen (bis zu 100 Zellen) anzufärben [Nevian und Helmchen 2007].

Größere Zellpopulationen können mittels Applikation des membranpermeablen Azetoxymethylester eines Fluoreszenzfarbstoffes angefärbt und untersucht werden [Tsien 1981]. Nach anfänglicher Anwendung in Zellkulturen und Hirnschnitten etablierte unsere Arbeitsgruppe diese Methode auch im intakten Gehirn (*multi cell bolus loading*, MCBL, Abb. 2) [Stosiek et al. 2003; Garaschuk et al. 2006b]. Hierbei wird eine farbstoffhaltige Pufferlösung mittels Druckapplikation aus einer dünnen Glaskapillare ins Gewebe injiziert und die spontane Diffusion des lipophilen AM-Derivates durch Zellmembranen abgewartet. Nach Spaltung der Esterverbindung durch intrazelluläre Esterasen wird eine Rückdiffusion des nun geladenen Farbstoffes in den Extrazellularraum verhindert und die Messung intrazellulärer Fluoreszenzänderungen ermöglicht [Katerinopoulos und Foukaraki 2002; Haugland und Basey 2005].

MCBL resultiert in einer unspezifischen Färbung großer Zellpopulationen und eignet sich daher für die funktionelle Analyse der einzelnen Zelle bis hin zu größeren Netzwerken. Inzwischen wurde MCBL in verschiedenen Versuchstieren (z.B. Maus, Ratte, Katze und Zebrafisch) und Strukturen des Nervensystems angewendet [Garaschuk et al. 2006a]. Zudem ist sie altersunabhängig einsetzbar und zeigte gute Färbungen in juvenilen, adulten und sogar alten Versuchstieren. Sofern nicht genetisch kodierte Farbstoffe angewendet werden, müssen zur selektiven Anfärbung einzelner Zelltypen mehrere Farbstoffe simultan verwendet werden. So wird der rot fluoreszierende Farbstoff Sulforhodamin 101 (SR101) spezifisch von kortikalen Astrozyten aufgenommen [Nimmerjahn et al. 2004]. Bei gleichzeitiger Färbung mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff lassen sich diese dann von anderen Zelltypen, z.B. Neuronen, unterscheiden.

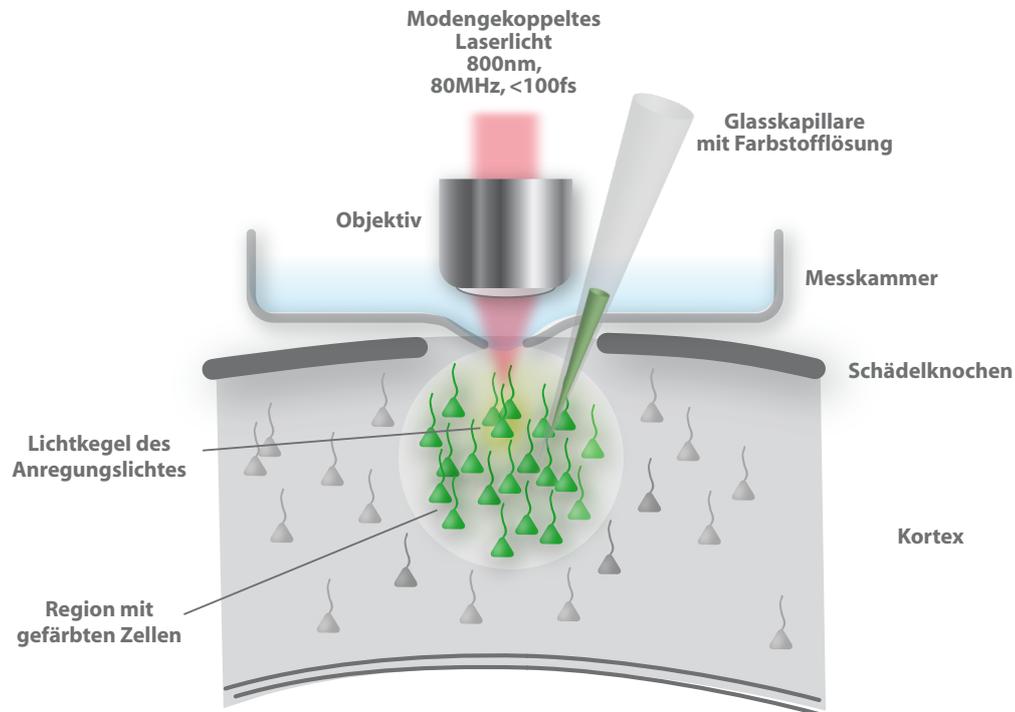


Abb. 2: Schematische Darstellung der *in vivo* Anfärbung von Zellpopulationen. Nach einer Kraniotomie wird die Messkammer mit Kleber an der Schädeloberfläche fixiert und mit gewärmter ACSF perfundiert. Eine Glaskapillare wird in Schicht 2/3 der Hirnrinde positioniert und etwa 400fl der Farbstofflösung mit Druckluft ins Gewebe injiziert. Es resultiert eine unspezifische Färbung einer Zellpopulation mit einem Durchmesser von etwa 200 - 400 μ m. Der Lichtkegel des Anregungslaserlichtes regt den Farbstoff zur Fluoreszenz an und das Emissionslicht wird über das Objektiv zurückgeleitet.

2.3.3 Fluoreszenzmessungen

Die Anfärbung von Zellnetzwerken durch MCBL kann mit verschiedenen, geeigneten Ca^{2+} -empfindlichen Fluoreszenzfarbstoffen, darunter neben OGB-1 auch Fura2 AM, Fluo4 AM und Indo1 AM, durchgeführt werden [Stosiek et al. 2003]. MCBL resultiert in einer unselektiven Färbung von Zellsomata und Neuropilstrukturen, die sich aus axonalen, dendritischen und glialen Fortsätzen zusammensetzen [Kerr et al. 2005]. Fluoreszenzänderungen können in all diesen Strukturen gemessen werden, so dass die genaue Analyse der Herkunft von Ca^{2+} -Signalen notwendig

wird:

Somatische Ca^{2+} -signale von Neuronen. Diese entstehen beim Einstrom vom Ca^{2+} -Ionen durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle, die durch Aktionspotentiale aktiviert werden [Borst und Helmchen 1998; Cossart et al. 2005]. Typischerweise weist ein solches intrazelluläres Ca^{2+} -Signal (Ca^{2+} -Transient) einen steilen Anstieg und einen exponentiellen Abfall mit Zeitkonstanten von 0,5 bis 1s auf [Göbel und Helmchen 2007]. Durch die Verwendung eines hochaffinen Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes wie OGB-1 können einzelne somatische Aktionspotentiale detektiert werden [Kerr et al. 2005].

Ca^{2+} -signale von Gliazellen. Mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff SR 101 können Astrozyten selektiv angefärbt und durch die Kombination mit einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff deren Ca^{2+} -Signalgebung untersucht werden [Nimmerjahn et al. 2004]. Somit besteht die Möglichkeit, bei gleichzeitiger Messung neuronaler Ca^{2+} -Signale, langsame Oszillationen (im Bereich von Sekunden bis Minuten) der astrozytären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aufzulösen [Hirase et al. 2004]. In verschiedenen Untersuchungen konnten diese mit der Regulation des cerebralen Blutflusses in Verbindung gebracht werden [Takano et al. 2006]. Zudem wurde gezeigt, dass astrozytäre Ca^{2+} -Signale durch sensorische Stimulation evoziert und im Rahmen neurologischer Erkrankungen wie Epilepsie und Alzheimer-Demenz verändert sein können [Göbel und Helmchen 2007].

Ca^{2+} -signale im Neuropil. Ca^{2+} -Signale im Neuropil entstehen durch Aktivitäten in den verschiedenen, dicht gepackten zellulären Fortsätzen [Kerr et al. 2005]. Spontane Ca^{2+} -Signale korrelieren mit dem Elektrokortikogramm und werden daher auch als “optisches Enzephalogramm” bezeichnet. Sie entstehen vornehmlich durch Ca^{2+} -Einstrom in axonale Fortsätze und präsynaptische Endkolben (*bouton*). Dendritische Fortsätze haben dagegen kaum Einfluss auf die gemessenen

Ca²⁺-Signale.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden APP23xPS45 doppelt-transgene Mäuse verwendet. Diese Mäuse überexprimieren humanes Amyloid-Vorläuferprotein mit der Schwedischen Doppelmutation 670/671 [Sturchler-Pierrat et al. 1997] sowie mutiertes (G384A), humanes Präsenilin 1 [Herzig et al. 2004]. Für die Untersuchungen wurden sechs bis zehn Monate alte APP23xPS45 Mäuse verwendet und mit altersgleichen Kontrolltieren verglichen. Die ersten Amyloid- β Plaques waren ab einem Alter von zwei Monaten vor allem in tiefen Schichten des Kortex sichtbar und deren Anzahl nahm altersabhängig zu. Da die Anzahl an Plaques im frontalen Kortex am höchsten war, wurden die Untersuchungen dort durchgeführt. Alle Experimente wurden entsprechend geltender Tierschutzrichtlinien ausgeführt und von der bayrischen Regierung genehmigt.

3.2 Anästhesie

Die Durchführung der chirurgischen Präparation erfolgte in Allgemeinanästhesie. Diese wurde unter Verwendung eines speziell kalibrierten Verdampfers (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (1 - 1,5% in 100%iger Sauerstoffmischung) eingeleitet und unter stetiger Überwachung der

Vitalparameter (Herzfrequenz, Blutdruck, Atemfrequenz und Körpertemperatur) mittels eines Aufzeichnungs- und Analyseprogrammes (ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland) aufrecht erhalten.

Isofluran ist ein etabliertes Inhalationsanästhetikum bei chirurgischen Eingriffen bei Nagetieren mit nur geringer Nebenwirkungsrate [Hedrich und Bullock 2004]. Es weist eine gute hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung bei nur geringer hepatischer Metabolisierungsrate auf. Als Indikator für eine ausreichende Narkosetiefe für Präparation und Anfärbung dienten der Ausfall klassischer Reflexe (Umdrehreflex, Flexorreflexe und Kornealreflex) und eine Atemfrequenz von 80 - 140/min. Während der Fluoreszenzmessungen wurde die Isoflurankonzentration entsprechend reduziert, um den Einfluss auf die kortikale Spontanaktivität zu verringern. Zur Vermeidung einer Dehydratation sowie zur Unterstützung der kardiovaskulären Funktion wurde in regelmäßigen Abständen gewärmte, isotone Kochsalzlösung subkutan injiziert. Zur Erhaltung einer konstanten Körpertemperatur von 37°C wurde das Versuchstier auf einer Heizplatte gelagert und zum Schutz der Augen eine Salbe (Isopto-Max, Alcon-Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland) appliziert.

3.3 Präparation

Unter Verwendung eines stereotaktischen Apparates wurde der frontale Kortex lokalisiert (Bregma 3 bis 3.5mm, 0.5 bis 1.5mm lateral der Mittellinie) [Paxinos und Franklin 2003] und die identifizierte Region durch die subkutane Gabe eines Lokalanästhetikums (50µl einer 2% Lidocain-Lösung) betäubt. Anschließend wurden Kutis sowie subkutanes Gewebe über der betäubten Region sorgfältig mit anatomischem Besteck entfernt und die Schädeloberfläche luftgetrocknet. Unter Verwendung einer Zahnbohrmaschine (Dr. Ihde Dental GmbH, Eching, Deutsch-

land) wurde eine hinreichend große Fläche der getrockneten Schädelsubstanz vorsichtig so abgetragen, dass der Schädel auf Druck leichtgradig nachgab. Eine perfundierbare Messkammer (Durchmesser 35mm) mit zentraler Öffnung wurde mit Cyanoacrylat Klebstoff (UHU, Bühl, Deutschland) im Bereich der gedünnten Region befestigt und das Versuchstier vom Präparationsplatz in die Versuchsvorrichtung auf eine Heizplatte gesetzt. Zur Wahrung physiologischer Versuchsbedingungen wurden Herzfrequenz, Blutdruck, Atemfrequenz und Körpertemperatur kontinuierlich gemessen und die Erhaltungskonzentration des Inhalationsanästhetikums gegebenenfalls angepasst. Die Messkammer wurde mit temperierter (37°C) und Carbogen begaster artifizierender cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF; 125mM NaCl, 4.5mM KCl, 26mM NaHCO₃, 1.25mM NaH₂PO₄, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM Glucose; pH 7.4) perfundiert. Unter Mikroskopsicht wurde mit einer dünnen Injektionsnadel (30 Gauge) eine Kraniotomie unter Erhalt der Dura mater im Bereich des gedünnten Schädeldaches vorgenommen. Mit zunehmender Größe der Öffnungsfläche stieg die Wahrscheinlichkeit von pulsatilen Bewegungsartefakten durch Atmung, Herzfrequenz und Liquorzirkulation an, so dass ein Durchmesser der Öffnungsfläche von etwa 1mm in der Regel optimal war. Ergänzend wurde zur Stabilisierung im Bereich der geöffneten Schädeloberfläche niedrig-schmelzende Agarose (2%; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgebracht.

3.4 *In vivo* Anfärbung

Die Beladung der Zellen der Schicht 2/3 erfolgte mit dem Ca²⁺-empfindlichen Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Zur Verbesserung der Löslichkeit des lipophilen Farbstoffesters wurde dieser einem Detergenz von 20% Pluronic F-127 in DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zugegeben und zur Erzielung einer Endkonzentration

von 1mM mit einer Pufferlösung (150mM NaCl, 2.5mM KCl und 10mM HEPES) verdünnt. Zur Injektion der gefilterten (Millipore-Filter mit einer Porenweite von 0.45 μ m), farbstoffhaltigen Pufferlösung wurde eine dünne Kapillare aus Borosilikatglas (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) hergestellt und rückläufig mit der Lösung gefüllt. Der elektrische Widerstand der Glaspipette betrug 6 - 9M Ω . Mit Hilfe eines Manipulators (LN-Mini 37 Methods Manipulator, Luigs & Neumann GmbH, Ratingen, Deutschland) wurde die Pipette unter Mikroskopsicht 150 - 200 μ m unterhalb der Dura in Schicht 2/3 platziert. Unter Verwendung eines Druckluftapplikationssystems (Picospritzer II, General Valve, Fairfield NJ, USA) wurde eine Menge von circa 400fl der Farbstofflösung appliziert (1x1 min, 70kPa) und die Pipette im Anschluss entfernt. Nach einer Zeitdauer von etwa 30 - 60min konnte eine ausreichende Färbung aller Zellen in einer nahezu "kugelförmigen" Region mit einem Durchmesser von circa 200 - 400 μ m erreicht werden [Stosiek et al. 2003; Garaschuk et al. 2006b]. In ähnlicher Weise wurden auch Plaques *in vivo* angefärbt. Hierzu wurde Thioflavin-S (0.001% gelöst in Pufferlösung) mittels einer dünnen Kapillare unter Druck in Schicht 2/3 eingespritzt.

3.5 *In vivo* Fluoreszenzmessungen

Das Fluoreszenzverhalten der Zellen wurde mithilfe eines Zwei-Photonen Mikroskopes detektiert. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit einem gepulsten, modengekoppelten Titan-Saphir Laser (Mai Tai, Spectra Physics, Mountain View, USA) mit einer Wellenlänge von 800nm, einer Pulswiederholungsrate von 80MHz und einer Pulslänge von 100fs angeregt. Der Laser war über ein Laser-Scanningsystem (Olympus Fluoview, Tokyo, Japan) an ein aufrechtes Lichtmikroskop (BX51WI, Olympus, Tokyo, Japan) gekoppelt. Dieses war mit folgenden Wasserimmersionsobjektiven ausgestattet: 10x, 0.3 numerische Apertur (NA); 20x, 0.5 NA; jeweils

Olympus (Tokio, Japan); 60x, 1.0 NA, Nikon (Tokio, Japan) und 40x, 0.8 NA; 63x, 0.9 NA, jeweils Leica (Bensheim, Deutschland). Die gemessene, durchschnittliche Leistung unter dem Objektiv war 50 - 70mW und wurde zur Vermeidung übermäßiger Fluoreszenzbleichung so niedrig wie möglich eingestellt. Die Erfassung der Messdaten erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms Olympus Fluoview 300. Zur Messung spontaner Ca^{2+} - Transienten wurde das Gewebe mit einer Frequenz von 5 - 10Hz abgetastet. Hochauflösende Fluoreszenzbilder entstanden aus der Projektion von Einzelbildern verschiedener Aufnahmeebenen und einer Frequenz der Einzelbildaufnahme von 1Hz. Zur simultanen Visualisierung von Neuronen und Plaques wurde die emittierte Fluoreszenz bei 515nm getrennt und in zwei Kanälen gemessen.

3.6 *In vivo* Pharmakologie

Die Kraniotomie ermöglichte entweder die Applikation pharmakologischer Substanzen in der Badlösung sowie die lokale Einspritzung mittels Iontophorese oder Druckapplikation. Folgende Substanzen kamen zur Anwendung: Tetrodotoxin (TTX, 1 μ M, Calbiochem, Schwalbach, Deutschland); 6-Cyano-7-Nitroquinoxalin-2,3-Dion (CNQX, 50mM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); D-2-Amino-Phosphovaleriansäure (D-APV, 25mM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); Glutamat (10mM, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); Gabazin (500 μ M, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Diazepam (1mg/ml in der Pipette, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

3.7 Färbung von Plaques *in situ*

Zur Dokumentation der Plaquelast wurde das Tier im Anschluss an die Fluores-

zenzmessungen enthauptet und sagittale Hirnschnitte angefertigt. Diese wurden mittels Badapplikation von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thioflavin-S für 20 Minuten angefärbt. Nach Auswaschen des ungebundenen Farbstoffes wurde die Plaquelast in der frontalen Großhirnrinde mittels Zwei-Photonen Mikroskopie ermittelt.

3.8 Datenauswertung

Die Bildanalyse erfolgte *offline* mit Hilfe des Java-basierten Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) und dem Datenanalyseprogramm Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA): Zuerst wurden die Neuronsomata in ImageJ als *region of interest* (ROI) markiert und deren Fluoreszenzintensitäten gemessen. Zur Messung der Hintergrundfluoreszenz wurde ein Blutgefäß mit einer ROI markiert. Die Detektion der Ca^{2+} -Transienten erfolgte anschließend in Igor Pro. Dazu wurde die Hintergrundfluoreszenz von den jeweiligen zellulären Fluoreszenzintensitäten subtrahiert. Ca^{2+} -Signale wurden als relative Fluoreszenzänderung im Vergleich zur Ruhefluoreszenz (F_0) ausgedrückt als das Verhältnis von:

$$\frac{\Delta F}{F} = \frac{F - F_0}{F_0}$$

In der Analyse wurden Signale immer dann als Ca^{2+} -Transienten detektiert, wenn die relative Fluoreszenzänderung größer als die dreifache Standardabweichung der Ruhefluoreszenz war.

4 Ergebnisse

In vorliegender Arbeit wurde die Funktion kortikaler Neurone im APP23xPS45-Mausmodell der Alzheimer-Krankheit mittels Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* untersucht. Hierzu wurden die Mäuse anästhesiert, eine Kraniotomie vorgenommen und jeweils eine Zellpopulation in Schicht 2/3 mittels Massenbeladung mit dem Ca^{2+} -empfindlichen Farbstoff OGB-1 angefärbt. Simultan wurden Plaques mit Thioflavin-S angefärbt. In den beladenen Neuronen wurden spontan auftretende Ca^{2+} -Transienten beobachtet. Es wurde das spontane Aktivitätsmuster der Neurone in sechs bis zehn Monate alten APP23xPS45-Mäusen analysiert und mit altersgleichen, nicht-transgenen Wildtyp-Mäusen verglichen.

Störung der neuronalen Funktion in APP23xPS45-Mäusen. Die Wildtyp-Mäuse wiesen eine niedrige Frequenz spontan auftretender Ca^{2+} -Transienten auf (1.41 ± 0.04 Transienten/min, $n=564$ Zellen). Diese spärliche Aktivierung von Neuronen (*sparse activity*) scheint ein allgemeines Muster kortikaler Informationsverarbeitung zu sein, da es in verschiedenen Kortexarealen gefunden wurde [Kerr et al. 2005; Rochefort et al. 2009]. Im Gegensatz dazu war die Funktion der Hälfte aller untersuchten Neurone in APP23xPS45-Mäusen massiv gestört. Diese Störung beinhaltete eine Zunahme an nicht aktiven, stummen Zellen (*silent cells*) und zugleich eine Zunahme an vermehrt aktiven, hyperaktiven Zellen (*hyperactive cells*) (Abb. 4). Insgesamt waren 29% aller untersuchten Neurone stumm und 21% aller

Neurone waren hyperaktiv (Abb. 5). Somit war der Anteil normal aktiver Zellen in transgenen Mäusen drastisch reduziert. Stumme Zellen konnten durch lokale Gabe von Glutamat aktiviert werden, waren also nicht abgestorben (Abb. 3). Ein typisches Beispiel der unterschiedlichen Aktivitätsmuster in einer transgenen sowie einer Wildtyp-Maus zeigt Abb. 4. In Abb. 5 wird die Frequenzverteilung aller Zellen der untersuchten transgenen (n=20 Mäuse, 564 Zellen) und nicht-transgenen Mäuse (n=10 Mäuse, 564 Zellen) quantitativ dargestellt. Zu beachten ist der massive Anstieg an stummen und hyperaktiven Zellen in APP23xPS45-Mäusen. Die spontanen Ca^{2+} -Transienten bilden somatische Aktionspotentiale optisch ab [Kerr et al. 2005]. Verschiedene experimentelle Befunde deuten darauf hin, dass die Alzheimer-Krankheit mit einer Dysregulation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase einhergehen kann [LaFerla 2002; Supnet und Bezprozvanny 2010]. Eine derartige Störung kann zu Veränderungen von Amplitude und Zeitverlauf der Ca^{2+} -Transienten führen. Die Analyse von Amplituden und Zeitkonstanten ergab jedoch keine Hinweise auf eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase in APP23xPS45-Mäusen (Abb. 6). Insbesondere unterschieden sich die Eigenschaften der Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen nicht von denen in normal aktiven Zellen (Amplituden $37\pm 4\% \Delta F/F$ in Wildtyp und $39\pm 4\% \Delta F/F$ in APP23xPS45, jeweils n=564 Zellen und Zeitkonstanten $0.96\pm 0.02\text{s}$ in Wildtyp sowie $0.83\pm 0.01\text{s}$ in APP23xPS45).

Hyperaktivität in Plaquenähe. Stumme und hyperaktive Neurone wurden in sechs bis zehn Monate alten APP23xPS45 Mäusen, die bereits zahlreiche Plaques in Schicht 2/3 hatten, beobachtet. Ein entscheidender Vorteil der Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie gegenüber elektrophysiologischen Methoden ist in diesem Zusammenhang, dass die Funktion einzelner Zellen und die Lokalisation der umgebenden Plaques durch geeignete Fluoreszenzfilter simultan untersucht werden können. Es wurde daher die Distanz von den Plaques zu den Zellen gemessen

und die räumliche Verteilung von stummen, normal aktiven sowie hyperaktiven Zellen dargestellt (Abb. 7). Da Plaques als Läsionen betrachtet werden können und dystrophe Neuriten und Spineverlust in Plaquenähe besonders ausgeprägt erscheinen [Meyer-Luehmann et al. 2008], waren stumme und wenig aktive Zellen vor allem in der Umgebung von Plaques zu erwarten. Überraschenderweise traten aber gerade hyperaktive Zellen in Plaquenähe ($< 60\mu\text{M}$ Entfernung vom nächsten Plaque) auf (Abb. 7B und C). Stumme Zellen waren ubiquitär verteilt und traten mit zunehmender räumlicher Distanz zu Plaques sogar häufiger auf (Abb. 7B und C). Dieser Befund deutete darauf hin, dass die Plaqueumgebung ein spezielles Milieu, das neuronale Funktionen stören kann, ausbildet.

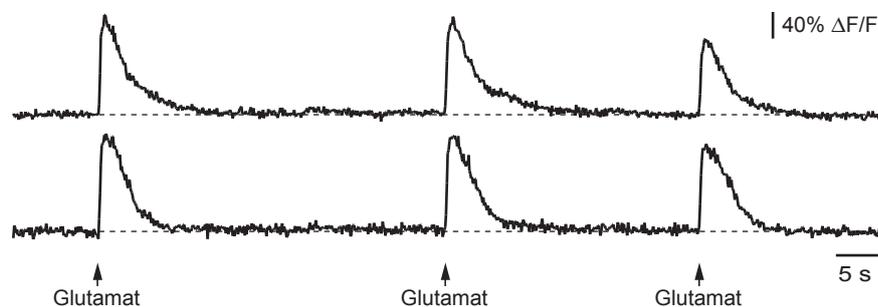


Abb. 3: Glutamat aktiviert stumme Zellen. Die lokale Gabe von Glutamat (10mM) aktiviert stumme Zellen.

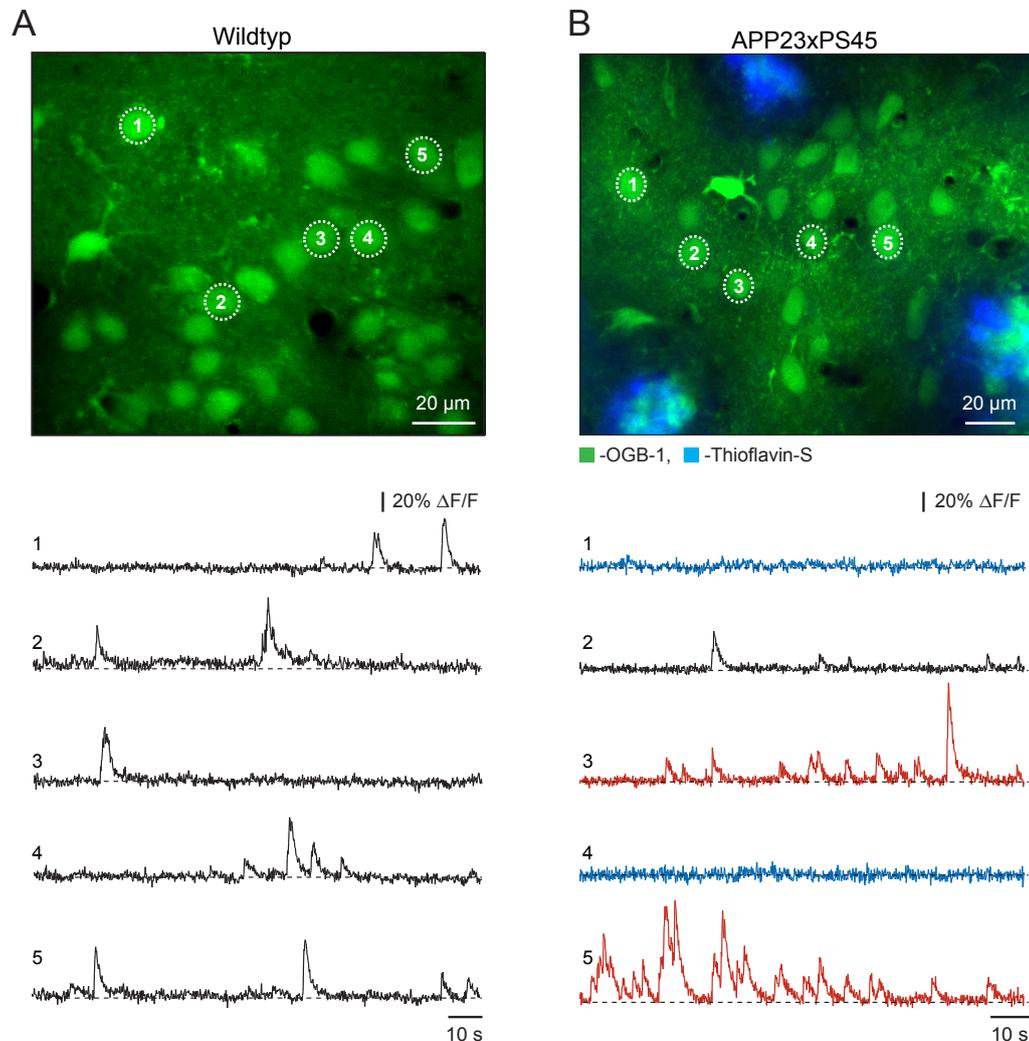


Abb. 4: *In vivo* Messung spontaner Ca^{2+} -Transienten in Neuronen des Kortex von Wildtyp- und APP23xPS45-Mäusen. (A) *In vivo* Zwei-Photonen Aufnahme einer mit OGB-1 angefärbten Zellpopulation in Schicht 2/3 des Frontalkortex einer Wildtyp-Maus sowie die spontanen Ca^{2+} -Transienten in den markierten Zellen. (B) *In vivo* Zwei-Photonen Aufnahme einer mit OGB-1 angefärbten Zellpopulation in Schicht 2/3 des Frontalkortex einer APP23xPS45 Maus sowie die spontanen Ca^{2+} -Transienten in den markierten Zellen. Stumme Zellen sind blau, normal aktive Zellen schwarz und hyperaktive Zellen rot dargestellt.

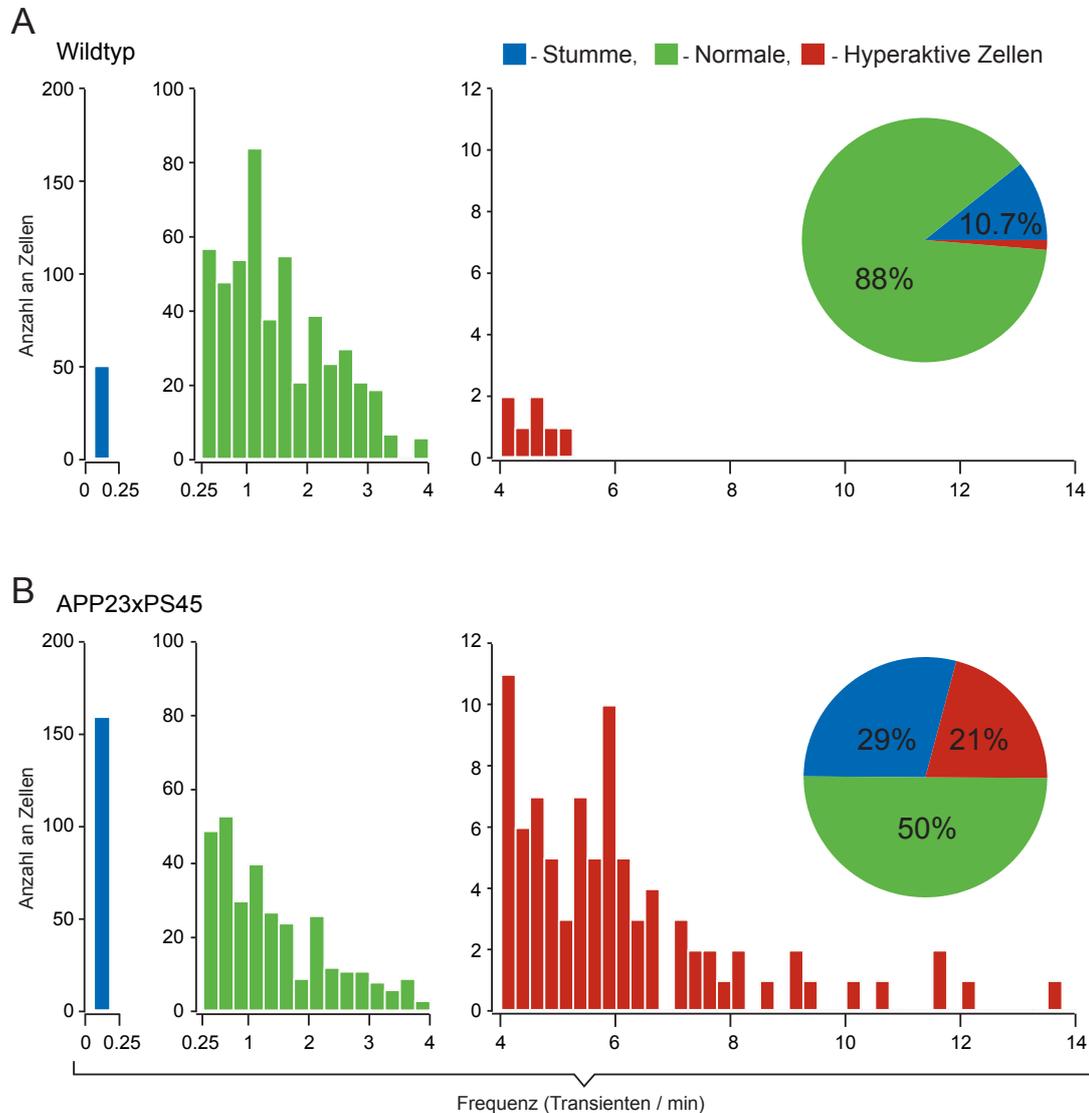


Abb. 5: Frequenzverteilung der Schicht 2/3 Neurone aller Wildtyp- und APP23xPS45-Mäuse. (A) Frequenzhistogramm der Schicht 2/3 Neurone aller untersuchter Wildtyp-Mäuse (n=564 Zellen). (B) Frequenzhistogramm der Schicht 2/3 Neurone aller untersuchter APP23xPS45-Mäuse (n=564 Zellen). Auffällig ist der Anstieg in der Anzahl an stummen und hyperaktiven Zellen in APP23xPS45-Mäusen. Die eingebetteten Tortendiagramme verdeutlichen die relativen Anteile an stummen, normal aktiven und hyperaktiven Zellen in Wildtyp- (n=10 Mäuse) sowie APP23xPS45-Mäusen (n=20 Mäuse).

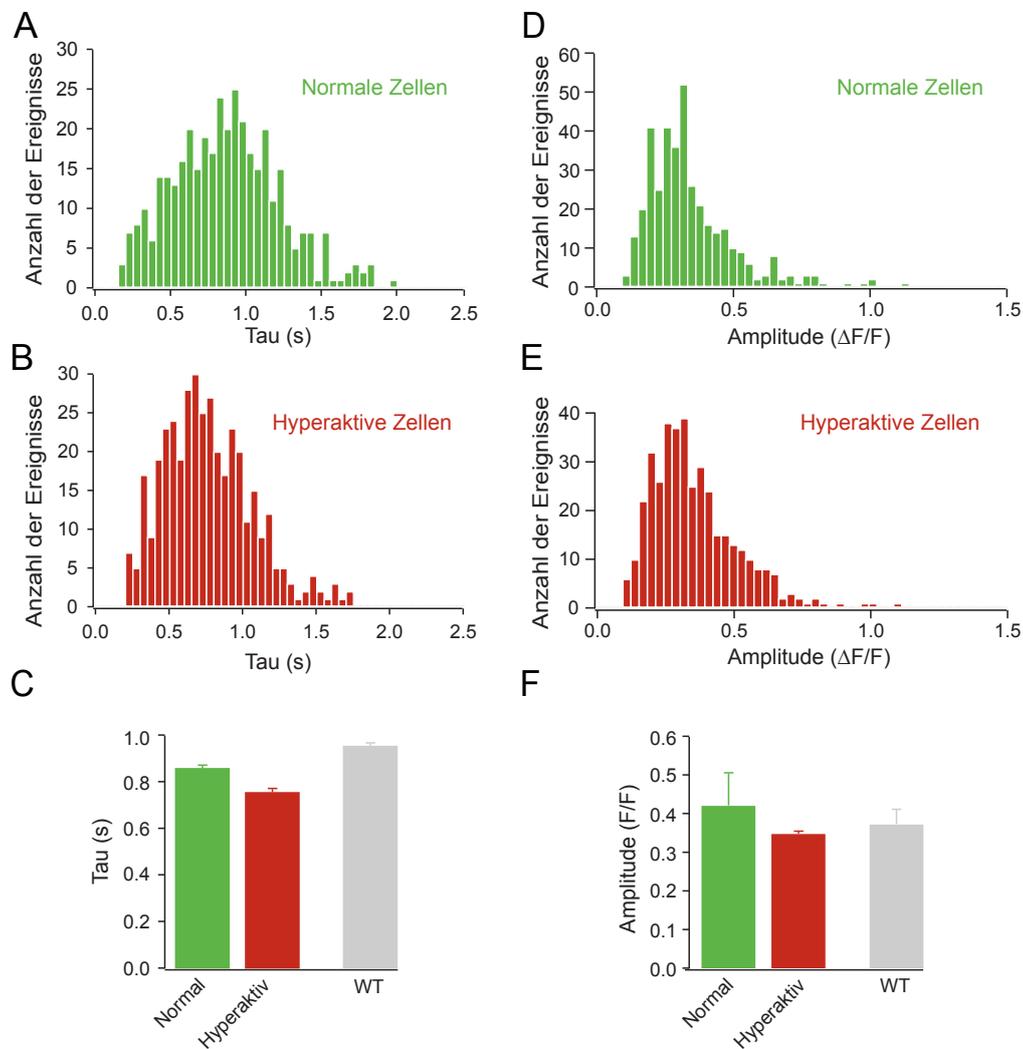


Abb. 6: Ähnliche Amplituden und Zeitverläufe spontaner Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven und normal aktiven Neuronen in APP23xPS45-Mäusen. (A) Histogramm der Zeitkonstanten spontaner Ca^{2+} -Transienten in normal aktiven Zellen (n=172 Zellen). (B) Histogramm der Zeitkonstanten spontaner Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen (n=91 Zellen). (C) Die mittleren Zeitkonstanten in normal aktiven und hyperaktiven Zellen unterscheiden sich nicht. Beide unterscheiden sich nicht von der mittleren Zeitkonstante in Wildtyp-Mäusen. (D) Histogramm der Amplituden spontaner Ca^{2+} -Transienten in normal aktiven Zellen. (E) Histogramm der Amplituden spontaner Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen. (F) Die mittleren Amplituden in normal aktiven und hyperaktiven Zellen unterscheiden sich nicht. Beide unterscheiden sich nicht von der mittleren Amplitude in Wildtyp-Mäusen (WT). Alle Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM) an.

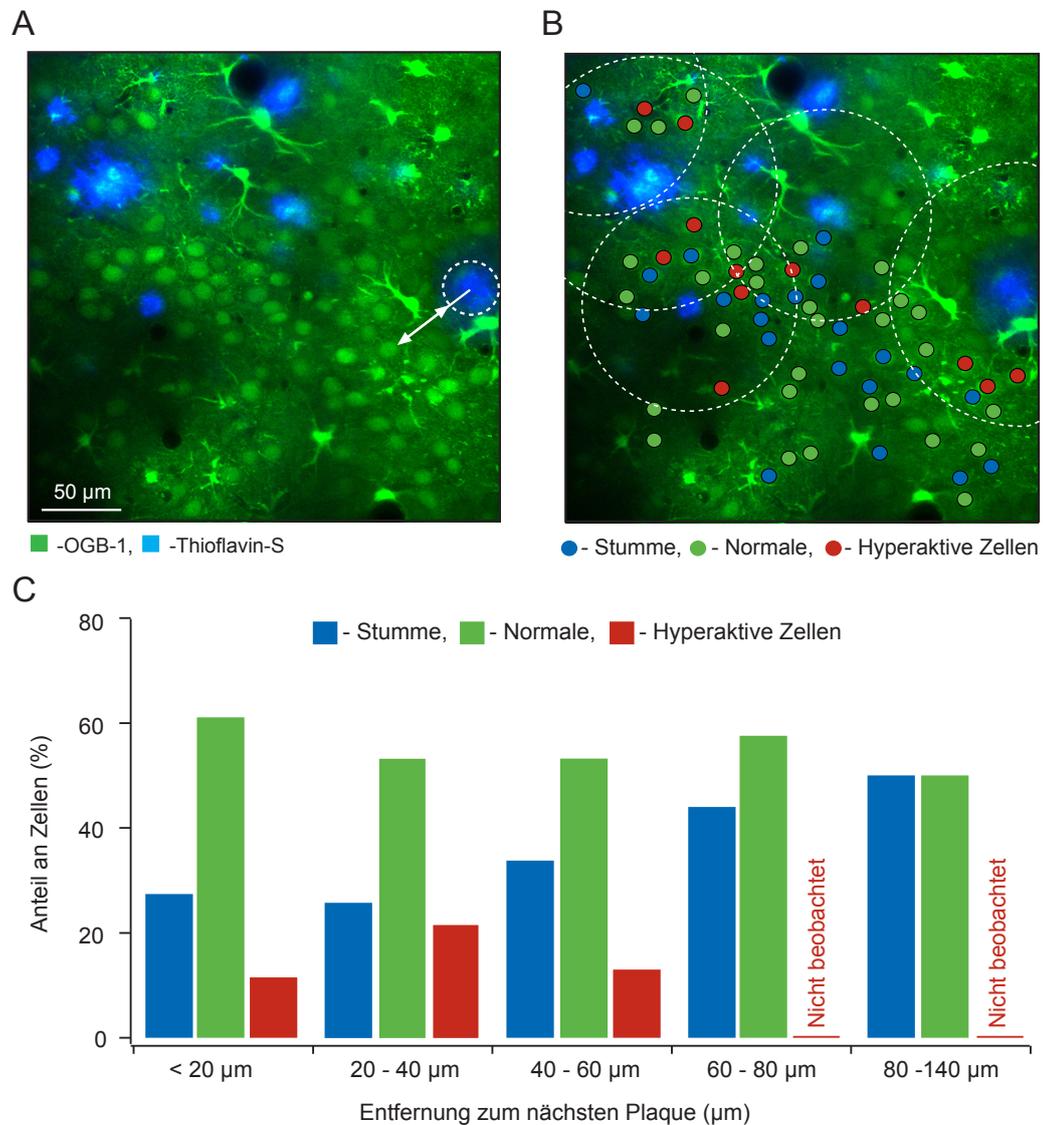


Abb. 7: Räumliche Verteilung stummer und hyperaktiver Zellen in APP23xPS45-Mäusen. (A) *In vivo* Zwei-Photonen Aufnahme einer mit OGB-1 angefärbten Zellpopulation sowie Thioflavin-S gefärbte Plaques in Schicht 2/3 einer APP23xPS45-Maus. Zur Entfernungsmessung zwischen Plaque und Zelle wurde der Plaque kreisförmig begrenzt und die naheste Entfernung von Plaquerand zu Zelle ausgemessen. (B) Die Zellen sind anhand ihres Aktivitätsmusters farblich markiert. Die weißen, durchbrochenen Kreise stellen die Bereiche dar, die weniger als 60μm vom jeweiligen Plaquerand entfernt sind. Die Entfernung der hyperaktiven Zellen zum Plaquerand ist stets geringer als 60μm. (C) Zusammenfassung der relativen Anteile stummer, normal aktiver und hyperaktiver Zellen in unterschiedlicher Entfernung vom Plaque (n=422 Zellen).

Mechanismus der Hyperaktivität. Welcher Mechanismus führte zur Hyperaktivität von Neuronen in Plaquenähe? Der Frequenzanstieg spontaner Ca^{2+} -Transienten konnte zum einen durch eine Zunahme von Aktionspotentialen und zum anderen durch eine vermehrte spontane Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern bedingt sein. In der Tat konnten in ähnlichen transgenen Mausmodellen erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]$ im endoplasmatischen Retikulum beobachtet werden [Stutzmann et al. 2006; Mattson 2010]. Die Gabe von TTX, einem Antagonisten spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle, zur Badlösung führte zu einer reversiblen Blockade sämtlicher spontaner Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen (n=4 Mäuse, Abb. 8). Dieser Befund deutete darauf hin, dass die Hyperaktivität durch vermehrtes Feuern von Aktionspotentialen bedingt war.

Durch welchen Mechanismus kam es zum vermehrten Feuern von Aktionspotentialen in Plaquenähe? Zum einen war eine gesteigerte synaptische Erregung vorstellbar, zum anderen konnten aber auch extrasynaptische Mechanismen nicht ausgeschlossen werden. Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass Amyloid- β Peptide direkt Kationen-permeable Kanäle in der Plasmamembran bilden und dadurch Zellen depolarisieren können [LaFerla 2002]. Um diese Hypothese zu testen, wurden die Glutamatrezeptorantagonisten APV und CNQX lokal zu hyperaktiven Zellen appliziert. Dadurch wurden sämtliche spontane Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen reversibel blockiert (n=5 Mäuse, Abb. 9). Dieser Befund deutete darauf hin, dass Hyperaktivität synaptisch vermittelt war. Zudem waren spontane Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen zeitlich eng mit dem umgebenden Neuropilsignal korreliert (Abb. 10). Dieses entsteht durch Aktivität in Zellen tieferer Kortexschichten und bildet damit das Eingangssignal zu Zellen in Schicht 2/3 [Kerr et al. 2005]. Aus diesen Befunden ergab sich die Hypothese, dass die synaptische Hemmung in hyperaktiven Zellen gestört sein könnte.

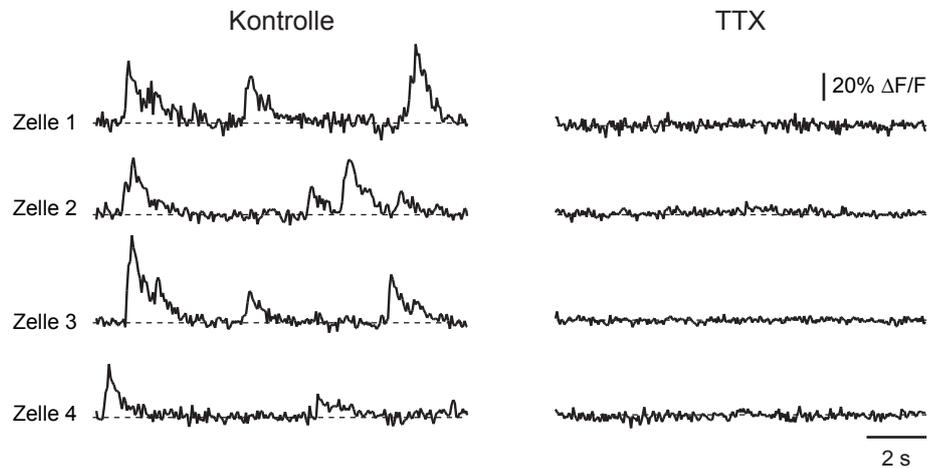


Abb. 8: Hyperaktivität wird durch TTX blockiert. Spontane Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen einer APP23xPS45-Maus vor und nach Badapplikation von 2.5 μM TTX.

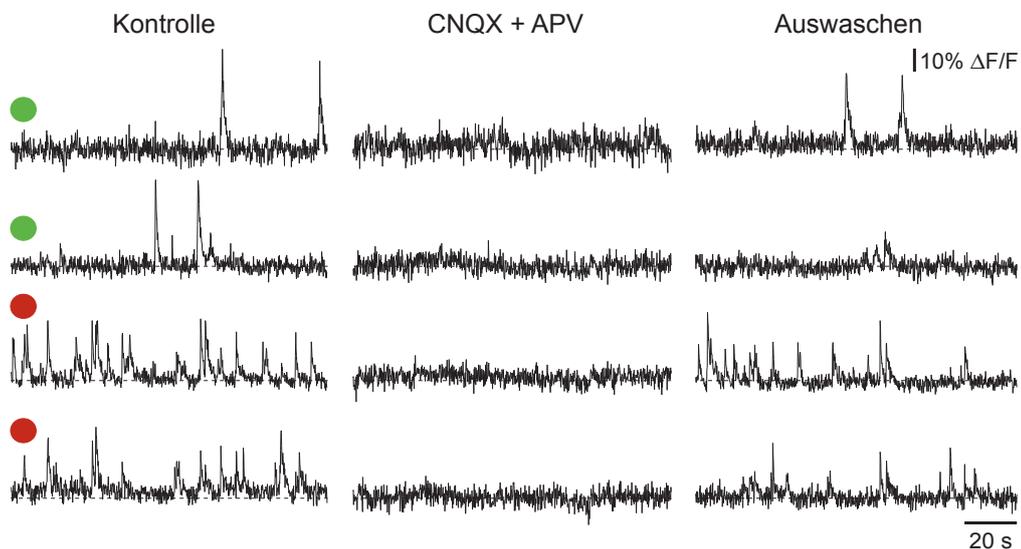


Abb. 9: Hyperaktivität wird durch CNQX und APV blockiert. Spontane Ca^{2+} -Transienten in Schicht 2/3 Neuronen vor, während und nach lokaler Gabe von CNQX und APV. Normal aktive Zellen sind grün und hyperaktive Zellen rot markiert.

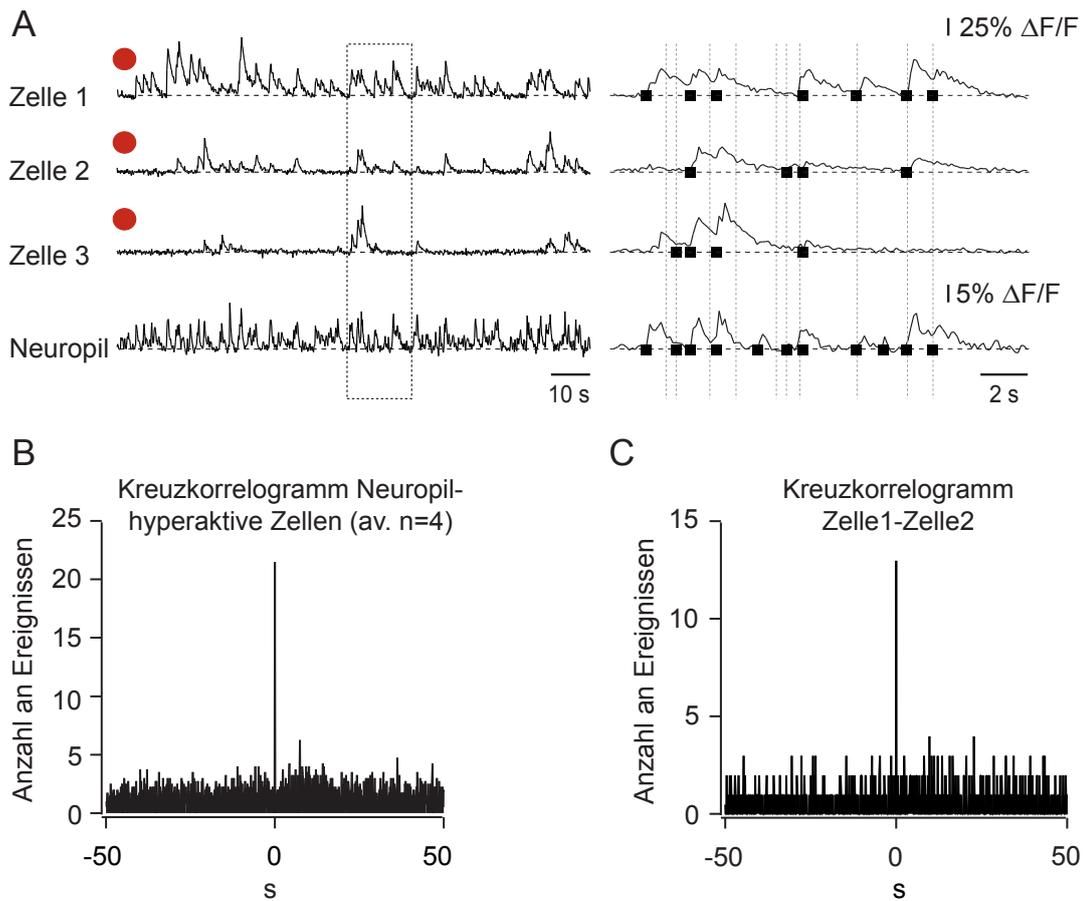


Abb. 10: Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen sind mit dem Neuropilsignal korreliert. (A) Spontane Ca^{2+} -Transienten in hyperaktiven Zellen (rot markiert) und im umgebenden Neuropil. Sämtliche zellulären Ca^{2+} -Transienten sind zeitlich mit Transienten im Neuropil korreliert. (B und C) Kreuzkorrelogramme zeigen, dass hyperaktive Zellen zeitlich untereinander sowie mit dem Neuropil korreliert sind.

Benzodiazepine, wie z.B. Diazepam, verstärken die hemmende Wirkung des Neurotransmitters GABA [Kandel et al. 2000]. Durch die lokale Gabe von Diazepam sollte die Hemmung in APP23xPS45-Mäusen verstärkt werden. Erwartungsgemäß verminderte Diazepam die spontane Aktivität in hyperaktiven Zellen (Abb. 11A und B). Dagegen führte die lokale Applikation des GABA_A Antagonisten Gabazin [Ueno et al. 1997] zu einer erhöhten Frequenz spontaner Ca²⁺-Transienten in hyperaktiven und normal aktiven Zellen (Abb. 11C). Zudem aktivierte Gabazin stumme Zellen (Abb. 11C). Nach Gabe von Gabazin stieg die Frequenz spontaner Ca²⁺-Transienten in allen drei Zellklassen auf 30-40 Transienten/min an, so dass der relative Frequenzanstieg in hyperaktiven Zellen (5.7-facher Anstieg; n=4 Mäuse) deutlich geringer als in normal aktiven und stummen Zellen war (Abb. 11D). Dieser Befund deutete darauf hin, dass die synaptische Hemmung in hyperaktiven Zellen unter Ruhebedingungen vermindert war. Umgekehrt war die Hemmung in stummen Zellen verstärkt. Diese stummen Zellen wurden nur unter bestimmten Bedingungen, wie einer lokalen Enthemmung durch Gabazin, funktionell ins Netzwerk integriert.

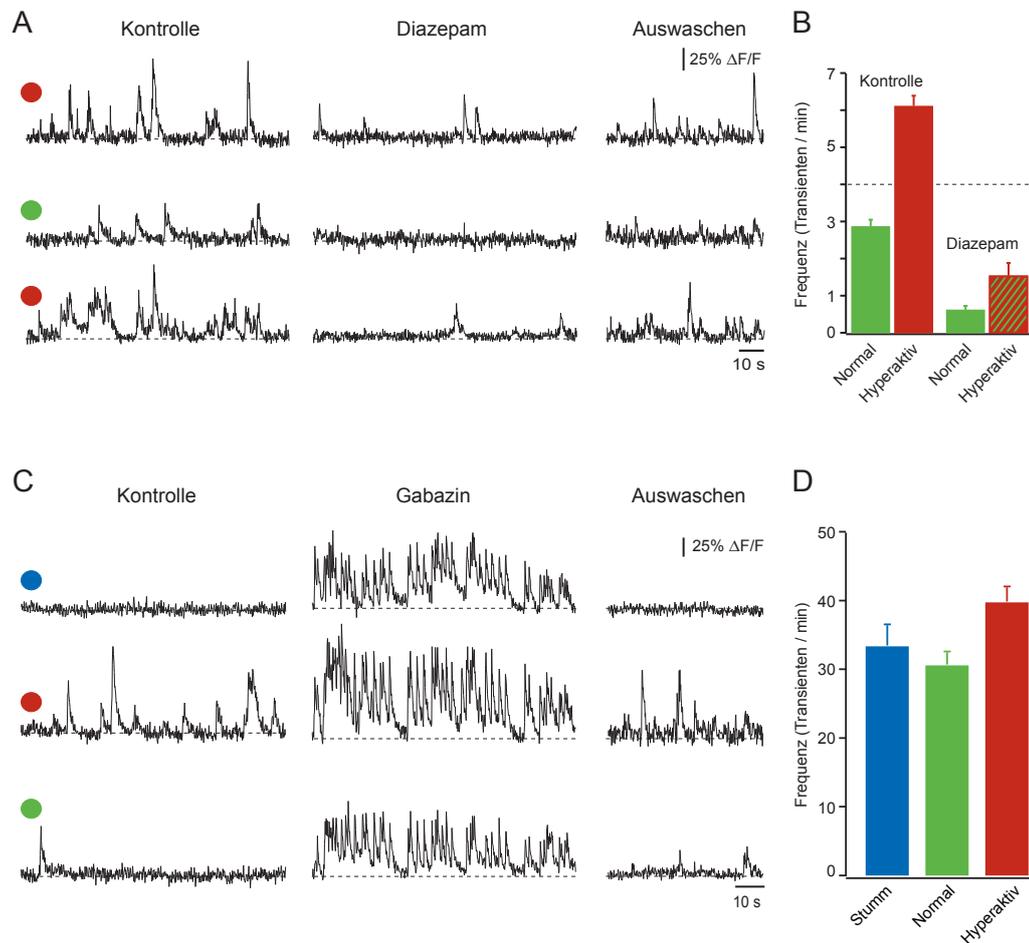


Abb. 11: Störung der synaptischen Hemmung in APP23xPS45-Mäusen. (A) Spontane Ca^{2+} -Transienten vor, während und nach lokaler Gabe von Diazepam. Die normal aktive Zelle ist grün und hyperaktive Zellen sind rot markiert. (B) Diazepam senkt die Frequenz spontaner Ca^{2+} -Transienten in normal aktiven und hyperaktiven Zellen ($n=21$ normale und $n=13$ hyperaktive Zellen). (C) Spontane Ca^{2+} -Transienten vor, während und nach lokaler Gabe von Gabazin (60s, $500\mu\text{M}$ in der Pipette). Die stumme Zelle ist blau, die normal aktive Zelle grün und die hyperaktive Zelle rot markiert. (D) Gabazin erhöht die Frequenz spontaner Ca^{2+} -Transienten in allen drei Zellklassen auf 30-40 Transienten/min ($n=6$ stumme, $n=13$ normal aktive und $n=9$ hyperaktive Zellen). Alle Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM) an.

Zusammenfassend deuteten alle Befunde darauf hin, dass die Störung der Funktion von Schicht 2/3 Neuronen im APP23xPS45-Mausmodell auf einer räumlichen Umverteilung von synaptischer Hemmung und Erregung beruhte. In Plaquenähe war die Hemmung gestört, so dass hyperaktive Zellen ausschliesslich dort auftraten. Mit zunehmender Distanz vom Plaque kam es zu einer Zunahme der Hemmung und parallel zu einem relativen Anstieg stummer Zellen. Die Befunde sind demnach nicht vereinbar mit der initialen Hypothese einer globalen neuronalen Aktivitätsabnahme im Krankheitsverlauf. Vielmehr scheinen Hypo- und Hyperaktivität gleichzeitig aufzutreten und auf diese Weise die Funktion der kortikalen Netzwerke zu stören.

Keine Störung der neuronalen Funktion in jungen APP23xPS45 Mäusen.

Unmittelbar relevant war die Frage, zu welchem Zeitpunkt die neuronale Funktionsstörung erstmals festgestellt werden konnte. Waren Zellen bereits in jungen Mäusen, vor Plaqueablagerung, zu beobachten? Aus diesem Grund wurden ein bis zwei Monate alte APP23xPS45-Mäuse untersucht und mit altersgleichen Wildtyp-Mäusen verglichen. Es zeigte sich, dass Schicht 2/3 Neurone in jungen Mäusen noch nicht gestört waren. Die Störung setzte also erst nach der Ablagerung von Plaques ein.

Verhaltensdefizite in alten APP23xPS45 Mäusen.

In Parallelexperimenten wurde untersucht, ob sechs bis zehn Monate alte APP23xPS45-Mäuse neben der neuronalen Funktionsstörung ein verändertes Verhalten aufwiesen. Hierzu wurden transgene Mäuse im Morris-Water-Maze und Y-Maze getestet. In der Tat hatten APP23xPS45-Mäuse ausgeprägte Defizite in beiden Gedächtnisprüfungen im Vergleich zu altersgleichen Wildtyp-Mäusen. Diese Defizite waren in ein bis zwei Monate alten APP23xPS45 noch nicht nachweisbar.

Zusammenfassung. Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vivo* Funktionsanalyse kortikaler Neurone in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit. Es zeigte sich, dass die untersuchten APP23xPS45-Mäuse zum einen eine massive Störung der neuronalen Funktion und zum anderen eine altersabhängige Lern- und Gedächtnisstörung aufwiesen. Die neuronale Dysfunktion war gekennzeichnet durch eine Zunahme stummer sowie hyperaktiver Zellen (Abb. 4 und 5). Dadurch resultierte eine drastische Abnahme normal aktiver Zellen. Insbesondere überraschte, dass die hyperaktive Zellen in Plaquenähe zu finden waren (Abb. 7). Desweiteren wurde der Mechanismus der Hyperaktivität aufgeklärt: Es wurde eine Störung der synaptischen Hemmung gefunden, die zur Hyperaktivität in Plaquenähe führte (Abb. 9, 10 und 11).

5 Diskussion

Gegenstand vorliegender Arbeit war die *in vivo* Funktionsanalyse von kortikalen Neuronen in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit. Hierzu wurden Neurone des Kortex mit dem Ca^{2+} -empfindlichen Farbstoff OGB-1 beladen und deren Funktion mittels Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass Schicht 2/3 Neurone in sechs bis zehn Monate alten APP23xPS45-Mäusen funktionell gestört waren. Kennzeichen der Störung war das Auftreten von hyperaktiven sowie stummen Neuronen und damit verbunden eine drastische Reduktion normal aktiver Neurone. Überraschend war, dass hyperaktive Zellen ausschliesslich in Plaquenähe ($< 60\mu\text{m}$) auftraten. Als Mechanismus der Hyperaktivität wurde eine Störung der synaptischen Hemmung herausgefunden. Die beobachtete Netzwerkdisfunktion korrelierte zeitlich mit dem Auftreten von Defiziten in Lern- und Gedächtnistests.

Die vorgestellten Befunde sind gut vereinbar mit neueren *in vivo* Arbeiten an ähnlichen Alzheimer-Mausmodellen sowie klinischen Befunden von Alzheimer-Patienten. So wurden in zwei unterschiedlichen Alzheimer-Mausmodellen epilepsietypische Potentiale im EEG sowie erhöhte neuronale Aktivitätsmarker als Zeichen von neuronaler Hyperaktivität gefunden [Palop et al. 2007; Minkeviciene et al. 2009]. Zugleich gab es Hinweise auf eine vermehrte synaptische Hemmung, die als Kompensationsmechanismen für hyperaktive Netzwerke interpretiert wurden und zu Defiziten der synaptischen Plastizität führten. Übereinstimmend mit diesen Er-

gebnissen aus Tierstudien haben auch Alzheimer-Patienten ein erhöhtes Risiko für epileptische Anfälle [Palop und Mucke 2009]. Dieser klinisch relevante Aspekt wird nachfolgend näher diskutiert.

Dass hyperaktive Zellen nur in unmittelbarer Plaquenähe beobachtet wurden, war initial überraschend. Dennoch weisen verschiedene Befunde in eine ähnliche Richtung. So wurde gezeigt, dass Dendriten und Spines erhöhte $[Ca^{2+}]$ in unmittelbarer Plaquenähe aufweisen [Kuchibhotla et al. 2008]. Diese „ Ca^{2+} -Überladung“ (*calcium overload*) war mit typischen neuritischen Dystrophien verbunden und durch die Aktivierung von Calcineurin bedingt. Neben der neuronalen Dysfunktion erscheint auch die astrozytäre Funktion im Krankheitsverlauf gestört. So wurde in doppelt-transgenen APP/PS1-Mäusen nachgewiesen, dass Astrozyten quantitativ erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ haben und im Vergleich zu Kontrolltieren vermehrt spontane Ca^{2+} -Transienten zeigen [Kuchibhotla et al. 2009]. Interessanterweise wurden sogar Ca^{2+} -Wellen über längere räumliche Distanzen beobachtet. Diese Wellen wurden stets von Astrozyten in Plaquenähe initiiert. Zusammenfassend deuten all diese Ergebnisse darauf hin, dass Plaques sowohl lokale als auch globale Veränderungen der zellulären Funktionen im Kortex bewirken. Diese Änderungen beinhalten Anstiege der $[Ca^{2+}]$ in Nervenfortsätzen ($< 25\mu\text{m}$), gestörte neuronale Aktivität ($< 60\mu\text{m}$) sowie eine gestörte Ca^{2+} -Signalgebung in Astrozyten ($< 200\mu\text{m}$) [Bezprozvanny 2009].

Interessanterweise rückten in den vergangenen Jahren vor allem die löslichen Amyloid- β Peptide, insbesondere als Oligomere, in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses. So korrelieren lösliche A β -Konzentrationen besser mit dem Krankheitsverlauf bei Patienten, zudem lassen sich zahlreiche neurophysiologische Veränderungen und Verhaltensdefizite in Mausmodellen bereits vor Plaquentstehung beobachten [Hsia et al. 1999; Mucke et al. 2000; Haass und Selkoe 2007].

Daraus resultierte die Hypothese, dass Plaques *in vivo* ein Reservoir für lösliche Amyloid- β Peptide bilden könnten [Koffie et al. 2009]. Es ist demnach möglich, dass lösliche Amyloid- β Peptide die Hyperaktivität in Plaquenähe auslösen, allerdings lässt sich nicht ausschliessen, dass andere Faktoren wie Mikrogliaaktivierung oder Inflammation in Plaquenähe zur Hyperaktivität beitragen.

Klinische Relevanz der neuronalen Hyperaktivität. Die Inzidenz epileptischer Anfälle ist in Patienten, die an der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit leiden, erhöht [Palop und Mucke 2009]. Ähnlich zum Mausmodell bleiben die meisten epileptischen Anfälle klinisch stumm. Dennoch haben 7% bis 21% aller Patienten mit sporadischer Alzheimer-Krankheit im Verlauf ihrer Erkrankung mindestens einen voll ausgeprägten epileptischen Anfall. Patienten, die an einer frühen, vererbten Form der Alzheimer-Krankheit leiden, haben nochmals ein deutlich höheres Risiko, einen epileptischen Anfall zu erleiden. Diese autosomal-dominant vererbten Formen der Alzheimer-Krankheit führen zu erhöhten A β -42 Konzentrationen bzw. einem Anstieg des A β -42 zu A β -40 Verhältnis, hinweisend darauf, dass Amyloid- β Peptide eine ursächliche Rolle für das erhöhte Risiko spielt. Übereinstimmend erkranken Patienten mit Down-Syndrom, bei denen drei Kopien des APP-Gens vorliegen, früh an der Alzheimer-Demenz und erleiden in den meisten Fällen (84% aller Patienten) epileptische Anfälle [Lai und Williams 1989]. Ebenso weisen auch Träger des APO ϵ 4-Allels, die ein erhöhtes Risiko für die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit haben, epilepsieähnliche Aktivität in EEG-Messungen auf [Ponomareva et al. 2008].

Im Tiermodell bleibt die epilepsieartige Überaktivität zumeist klinisch stumm [Palop et al. 2007]. Interessanterweise waren transiente, amnestische Episoden bei Alzheimer-Patienten mit klinisch inapparenten epilepsietypischen Potentialen im EEG assoziiert [Rabinowicz et al. 2000]. Derartige fluktuierende Symptome

bei Alzheimer-Patienten, zu denen neben den transienten Amnesien unter anderem auch Orientierungslosigkeit oder agitierte Phasen gehören, könnten durch abnormale Netzwerkaktivität und insbesondere durch hyperaktive Phasen ausgelöst werden. Unterstützung erfährt diese Hypothese durch bildgebende Studien an Alzheimer-Patienten. Mittels funktioneller Kernspintomographie wurden bei Alzheimer-Patienten Störungen in der Deaktivierung gedächtnisrelevanter Netzwerke (*default network*) während kognitiver Anforderungen gefunden [Sperling et al. 2009]. Zudem scheinen bestimmte Hirnregionen (insbesondere der parietale Kortex sowie der posteriore cinguläre Kortex) in frühen Phasen der Alzheimer-Krankheit hyperaktiv zu sein. Diese Hyperaktivität korrelierte mit der Anzahl an Amyloid-Plaques, gefärbt mit dem plaquebindenden Farbstoff Pittsburgh Compound B.

Insgesamt deuten diese Befunde auf einen Zusammenhang zwischen funktioneller Netzwerkstörung und dem klinischen Verlauf der Alzheimer-Krankheit hin. Die Hyperaktivität könnte als ein relevanter Mechanismus einigen Symptomen der Alzheimer-Krankheit zugrunde liegen.

Die Entwicklung wirkungsvoller Therapien gegen die Alzheimer-Krankheit ist unbedingt notwendig. Die derzeitig zugelassenen Medikamente können die Symptome der Erkrankung nur vorübergehend mildern [Citron 2010]. Die meisten neueren Therapieansätze zielen darauf ab, A β -Konzentrationen im Gehirn zu senken, allerdings steht eine Beurteilung der langfristigen Wirksamkeit und Sicherheit dieser Medikamente noch aus. Es scheint zudem ratsam unterschiedliche Therapieansätze zu verfolgen. Dass neuronale Netzwerke im Verlauf der Alzheimer-Krankheit sowohl durch Hyperaktivität als auch Hypoaktivität geprägt zu sein scheinen und der kausale Zusammenhang mit kognitiven Symptomen bei Patienten noch unklar ist, erschwert die Suche nach geeigneten Therapien. Naheliegend war der Versuch, Antiepileptika einzusetzen, mit dem Ziel epilepsietypische Potentiale

sowie Hyperaktivität zu behandeln. Erste präklinische Experimente in transgenen Mäusen zeigten jedoch, dass die Gabe gebräuchlicher Antiepileptika das Auftreten epilepsietypischer Potentiale sogar verstärken kann [Palop und Mucke 2009]. Ebenso verliefen erste klinische Patientenstudien enttäuschend [Herrmann et al. 2007]. Es gilt also die kausalen Zusammenhänge zwischen neuronaler Dysfunktion und Verhaltensdefiziten besser zu verstehen. Insbesondere erscheint notwendig auch andere Hirnregionen bezüglich der neuronalen Funktion zu untersuchen, da zum einen qualitative Unterschiede und zum anderen auch Unterschiede im Zeitverlauf der Störung existieren könnten. Dieses Verständnis kann helfen Therapien zielgerichtet und effektiv zu gestalten.

Ausblick. In vorliegender Arbeit wurde erstmals die Funktion kortikaler Neurone in einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit *in vivo* analysiert. Im Gegensatz zu elektrophysiologischen Methoden erlaubt die Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie eine deutliche bessere räumliche Auflösung sowie die simultane Funktionsanalyse von bis zu hundert (und mehr) Neuronen. Die methodische Weiterentwicklung wird diese bereits bestehenden Vorteile noch weiter verbessern. So könnte beispielsweise die Aktivität von Dendriten und sogar Spines in Plaquenähe analysiert werden [Jia et al. 2010]. Zudem könnten schnellere Messungen die Analyse von hunderten bis tausenden Neuronen simultan ermöglichen und somit letztlich eine Verbindung zu den existierenden Populationsmessungen wie EEG oder fMRI geschaffen werden [Göbel et al. 2007; Grewe et al. 2010]. Nicht nur die Mikroskopiemethoden sondern auch die eingesetzten Farbstoffe entwickeln sich rasant weiter. Besonders interessant sind hierbei die genetisch kodierten Fluoreszenzfarbstoffe, die chronische Funktionsanalysen in Mäusen erlauben und somit Plastizitätsmechanismen sichtbar machen können [Holtmaat und Svoboda 2009; Holtmaat et al. 2009]. Es ist vorstellbar, Neurone in der selben Maus wiederholt zu

analysieren und so die zeitliche Entwicklung einer Veränderung zu charakterisieren. Zudem ließen sich die funktionellen Messungen besser mit Verhaltensversuchen im gleichen Tier kombinieren.

Eine relevante zukünftige Fragestellung ist, wie Hyperaktivität induziert wird. Bewirken Amyloid- β Peptide direkt Hyperaktivität oder wird diese durch einen sekundären Mechanismus wie beispielsweise Mikrogliaaktivierung, Gliosis oder Inflammation ausgelöst? In welchem Aggregatzustand induziert A β Hyperaktivität? Findet sich Hyperaktivität auch in anderen Hirnregionen, beispielsweise im Hippocampus, der sehr früh im Verlauf der Alzheimer-Krankheit betroffen ist? Treten hyperaktive und stumme Zellen gleichzeitig auf oder gibt es eine Sequenz im Auftreten? Welcher kausale Zusammenhang besteht zwischen neuronaler Funktion und dem Verhalten? Lässt sich die Netzwerkstörung therapieren?

All diese und weitere Fragen werden in Zukunft beantwortet werden müssen, um ein besseres Verständnis für die Krankheit zu erlangen und zielgerichtet Therapien entwickeln zu können. Die funktionelle Zwei-Photonen Mikroskopie wird hierbei in Kombination mit elektrischen Messungen maßgeblich zu deren Beantwortung beitragen.

6 Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden mit dem Titel „Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer’s disease.“ in *Science*. **321**, 5896, Seiten 1686-1689, 2008, veröffentlicht.

Ein Übersichtsartikel mit dem Titel „*In vivo* calcium imaging of the aging and diseases brain.“ wurde in *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. **35**, Suppl 1, Seiten 99-106, 2008, veröffentlicht.

Literaturverzeichnis

- [Ashe und Zahs 2010] ASHE, KH ; ZAHS, KR: Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. In: *Neuron* 66 (2010), Jun, Nr. 5, S. 631–45
- [Baird et al. 1999] BAIRD, GS ; ZACHARIAS, DA ; TSIEN, RY: Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Sep, Nr. 20, S. 11241–6
- [Beaurepaire et al. 2001] BEAUREPAIRE, E ; OHEIM, M ; MERTZ, J: Ultra-deep two-photon fluorescence excitation in turbid media. In: *Optics Communications* 188 (2001), Februar, Nr. 1-4, S. 25–29
- [Bezprozvanny 2009] BEZPROZVANNY, I: Amyloid goes global. In: *Sci Signal* 2 (2009), Nr. 63, S. 16
- [Bezprozvanny und Hayden 2004] BEZPROZVANNY, I ; HAYDEN, MR: Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. In: *Biochem Biophys Res Commun* 322 (2004), Oct, Nr. 4, S. 1310–7
- [Blennow et al. 2006] BLENNOW, K ; LEON, MJ de ; ZETTERBERG, H: Alzheimer's disease. In: *Lancet* 368 (2006), Jul, Nr. 9533, S. 387–403
- [Borchelt et al. 1997] BORCHELT, DR ; RATOVITSKI, T ; LARE, J van ; LEE, MK ; GONZALES, V ; JENKINS, NA ; COPELAND, NG ; PRICE, DL ; SISODIA, SS: Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. In: *Neuron* 19 (1997), Oct, Nr. 4, S. 939–45

- [Borst und Helmchen 1998] BORST, JG ; HELMCHEN, F: Calcium influx during an action potential. In: *Methods Enzymol* 293 (1998), S. 352–71
- [Campbell et al. 2002] CAMPBELL, RE ; TOUR, O ; PALMER, AE ; STEINBACH, PA ; BAIRD, GS ; ZACHARIAS, DA ; TSIEN, RY: A monomeric red fluorescent protein. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Juni, Nr. 12, S. 7877–7882
- [Citron 2010] CITRON, M: Alzheimer’s disease: strategies for disease modification. In: *Nat Rev Drug Discov* 9 (2010), May, Nr. 5, S. 387–98
- [Cossart et al. 2005] COSSART, R ; IKEGAYA, Y ; YUSTE, R: Calcium imaging of cortical networks dynamics. In: *Cell Calcium* 37 (2005), May, Nr. 5, S. 451–7
- [Denk et al. 1990] DENK, W ; STRICKLER, JH ; WEBB, WW: Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. In: *Science* 248 (1990), Apr, Nr. 4951, S. 73–6
- [Denk und Svoboda 1997] DENK, W ; SVOBODA, K: Photon upmanship: why multi-photon imaging is more than a gimmick. In: *Neuron* 18 (1997), Mar, Nr. 3, S. 351–7
- [Diaspro et al. 2006] DIASPRO, A ; BIANCHINI, P ; VICIDOMINI, G ; FARETTA, M ; RAMOINO, P ; USAI, C: Multi-photon excitation microscopy. In: *Biomed Eng Online* 5 (2006), S. 36
- [Duff et al. 1996] DUFF, K ; ECKMAN, C ; ZEHR, C ; YU, X ; PRADA, C M. ; PEREZTUR, J ; HUTTON, M ; BUEE, L ; HARIGAYA, Y ; YAGER, D ; MORGAN, D ; GORDON, M N. ; HOLCOMB, L ; REFOLO, L ; ZENK, B ; HARDY, J ; YOUNKIN, S: Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. In: *Nature* 383 (1996), Oct, Nr. 6602, S. 710–3
- [Garaschuk et al. 2006a] GARASCHUK, O ; MILOS, RI ; GRIENBERGER, C ; MARANDI, N ; ADELSBERGER, H ; KONNERTH, A: Optical monitoring of brain function in vivo: from neurons to networks. In: *Pflugers Arch* 453 (2006), Dec, Nr. 3, S. 385–96
- [Garaschuk et al. 2006b] GARASCHUK, O ; MILOS, RI ; KONNERTH, A: Targeted

- bulk-loading of fluorescent indicators for two-photon brain imaging in vivo. In: *Nat Protoc* 1 (2006), Nr. 1, S. 380–6
- [Göbel und Helmchen 2007] GÖBEL, W ; HELMCHEN, F: In vivo calcium imaging of neural network function. In: *Physiology (Bethesda)* 22 (2007), Dec, S. 358–65
- [Göbel et al. 2007] GÖBEL, W ; KAMPA, BM ; HELMCHEN, F: Imaging cellular network dynamics in three dimensions using fast 3D laser scanning. In: *Nat Methods* 4 (2007), Jan, Nr. 1, S. 73–9
- [Göppert-Mayer 1930] GÖPPERT-MAYER, M: *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*, Dissertation, 1930
- [Green und LaFerla 2008] GREEN, KN ; LAFERLA, FM: Linking calcium to Abeta and Alzheimer’s disease. In: *Neuron* 59 (2008), Jul, Nr. 2, S. 190–4
- [Grewe et al. 2010] GREWE, BF ; LANGER, D ; KASPER, H ; KAMPA, BM ; HELMCHEN, F: High-speed in vivo calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision. In: *Nat Methods* 7 (2010), May, Nr. 5, S. 399–405
- [Haass und Selkoe 2007] HAASS, C ; SELKOE, DJ: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer’s amyloid beta-peptide. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), Feb, Nr. 2, S. 101–12
- [Hardy und Higgins 1992] HARDY, JA ; HIGGINS, GA: Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis. In: *Science* 256 (1992), Apr, Nr. 5054, S. 184–5
- [Haugland und Basey 2005] HAUGLAND, M ; BASEY, A: *The handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies*. Molecular Probes, 2005
- [Hedrich und Bullock 2004] HEDRICH, H ; BULLOCK, G: *The laboratory mouse*. Academic Press, 2004
- [Heim et al. 2007] HEIM, N ; GARASCHUK, O ; FRIEDRICH, MW ; MANK, M ; MILOS, RI ; KOVALCHUK, Y ; KONNERTH, A ; GRIESBECK, O: Improved calcium imaging in

- transgenic mice expressing a troponin C-based biosensor. In: *Nat Methods* 4 (2007), Feb, Nr. 2, S. 127–9
- [Helmchen und Denk 2005] HELMCHEN, F ; DENK, W: Deep tissue two-photon microscopy. In: *Nat Methods* 2 (2005), Dec, Nr. 12, S. 932–40
- [Helmchen und Waters 2002] HELMCHEN, F ; WATERS, J: Calcium imaging in the mammalian brain in vivo. In: *Eur J Pharmacol* 447 (2002), Jul, Nr. 2-3, S. 119–29
- [Herrmann et al. 2007] HERRMANN, N ; LANCTÔT, KL ; ROTHENBURG, LS ; ERYAVEC, G: A placebo-controlled trial of valproate for agitation and aggression in Alzheimer's disease. In: *Dement Geriatr Cogn Disord* 23 (2007), Nr. 2, S. 116–9
- [Herzig et al. 2004] HERZIG, MC ; WINKLER, DT ; BURGERMEISTER, P ; PFEIFER, M ; KOHLER, E ; SCHMIDT, Stephen D. ; DANNER, S ; ABRAMOWSKI, D ; STÜRCHLER-PIERRAT, C ; BÜRKI, K ; DUINEN, SG van ; MAAT-SCHIEMAN, MLC ; STAUFENBIEL, M ; MATHEWS, PM ; JUCKER, M: Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. In: *Nat Neurosci* 7 (2004), Sep, Nr. 9, S. 954–60
- [Hirase et al. 2004] HIRASE, H ; QIAN, L ; BARTHÓ, P ; BUZSÁKI, G: Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. In: *PLoS Biol* 2 (2004), Apr, Nr. 4, S. E96
- [Holcomb et al. 1998] HOLCOMB, L ; GORDON, MN ; 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, CM ; ECKMAN, C ; YOUNKIN, S ; HSIAO, K ; DUFF, K: Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. In: *Nat Med* 4 (1998), Jan, Nr. 1, S. 97–100
- [Holtmaat et al. 2009] HOLTMAAT, A ; BONHOEFFER, T ; CHOW, DK ; CHUCKOWREE, J ; DE PAOLA, V ; HOFER, SB ; HÜBENER, M ; KECK, T ; KNOTT, G ; LEE, WCA ;

- MOSTANY, R ; MRSIC-FLOGEL, TD ; NEDIVI, E ; PORTERA-CAILLIAU, C ; SVOBODA, K ; TRACHTENBERG, JT ; WILBRECHT, L: Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. In: *Nat Protoc* 4 (2009), Nr. 8, S. 1128–44
- [Holtmaat und Svoboda 2009] HOLTMAAT, A ; SVOBODA, K: Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. In: *Nat Rev Neurosci* 10 (2009), Sep, Nr. 9, S. 647–58
- [Hsia et al. 1999] HSIA, AY ; MASLIAH, E ; MCCONLOGUE, L ; YU, GQ ; TATSUNO, G ; HU, K ; KHOLODENKO, D ; MALENKA, RC ; NICOLL, RA ; MUCKE, L: Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer’s disease mouse models. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Mar, Nr. 6, S. 3228–33
- [Jares-Erijman und Jovin 2003] JARES-ERIJMAN, EA ; JOVIN, TM: FRET imaging. In: *Nat Biotechnol* 21 (2003), Nov, Nr. 11, S. 1387–95
- [Jia et al. 2010] JIA, H ; ROCHEFORT, NL ; CHEN, X ; KONNERTH, A: Dendritic organization of sensory input to cortical neurons in vivo. In: *Nature* 464 (2010), Apr, Nr. 7293, S. 1307–12
- [Judkewitz et al. 2009] JUDKEWITZ, B ; RIZZI, M ; KITAMURA, K ; HÄUSSER, M: Targeted single-cell electroporation of mammalian neurons in vivo. In: *Nat Protoc* 4 (2009), Nr. 6, S. 862–9
- [Kandel et al. 2000] KANDEL, E ; SCHWARTZ, J ; JESSELL, T: *Principles of Neural Science*. Bd. 4. McGraw-Hill Medical, 2000
- [Kao 1994] KAO, JPY: *Fluorescent Calcium Indicators*. Academic Press, 1994
- [Katerinopoulos und Foukaraki 2002] KATERINOPOULOS, HE ; FOUKARAKI, E: Polycarboxylate fluorescent indicators as ion concentration probes in biological systems. In: *Curr Med Chem* 9 (2002), Jan, Nr. 2, S. 275–306

- [Kerr und Denk 2008] KERR, JND ; DENK, W: Imaging in vivo: watching the brain in action. In: *Nat Rev Neurosci* 9 (2008), Mar, Nr. 3, S. 195–205
- [Kerr et al. 2005] KERR, JND ; GREENBERG, D ; HELMCHEN, F: Imaging input and output of neocortical networks in vivo. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Sep, Nr. 39, S. 14063–8
- [Kettunen et al. 2002] KETTUNEN, P ; DEMAS, J ; LOHMANN, C ; KASTHURI, N ; GONG, Y ; WONG, ROL ; GAN, WB: Imaging calcium dynamics in the nervous system by means of ballistic delivery of indicators. In: *J Neurosci Methods* 119 (2002), Sep, Nr. 1, S. 37–43
- [Koffie et al. 2009] KOFFIE, RM ; MEYER-LUEHMANN, M ; HASHIMOTO, T ; ADAMS, KW ; MIELKE, ML ; GARCIA-ALLOZA, M ; MICHEVA, KD ; SMITH, SJ ; KIM, ML ; LEE, VM ; HYMAN, BT ; SPIRES-JONES, TL: Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), Mar, Nr. 10, S. 4012–7
- [Komuro und Kumada 2005] KOMURO, H ; KUMADA, T: Calcium transients control CNS neuronal migration. In: *Cell Calcium* 37 (2005), May, Nr. 5, S. 387–93
- [Kuchibhotla et al. 2008] KUCHIBHOTLA, KV ; GOLDMAN, ST ; LATTARULO, CR ; WU, HY ; HYMAN, BT ; BACSKAI, BJ: Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. In: *Neuron* 59 (2008), Jul, Nr. 2, S. 214–25
- [Kuchibhotla et al. 2009] KUCHIBHOTLA, KV ; LATTARULO, CR ; HYMAN, BT ; BACSKAI, BJ: Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. In: *Science* 323 (2009), Feb, Nr. 5918, S. 1211–5
- [LaFerla 2002] LAFERLA, FM: Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer’s disease. In: *Nat Rev Neurosci* 3 (2002), Nov, Nr. 11, S. 862–72

- [Lai und Williams 1989] LAI, F ; WILLIAMS, RS: A prospective study of Alzheimer disease in Down syndrome. In: *Arch Neurol* 46 (1989), Aug, Nr. 8, S. 849–53
- [Mank et al. 2006] MANK, M ; REIFF, DF ; HEIM, N ; FRIEDRICH, MW ; BORST, A ; GRIESBECK, O: A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. In: *Biophys J* 90 (2006), Mar, Nr. 5, S. 1790–6
- [Mank et al. 2008] MANK, M ; SANTOS, AF ; DIRENBERGER, S ; MRSIC-FLOGEL, TD ; HOFER, SB ; STEIN, V ; HENDEL, T ; REIFF, DF ; LEVELT, C ; BORST, A ; BONHOEFFER, T ; HÜBENER, M ; GRIESBECK, O: A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. In: *Nat Methods* 5 (2008), Sep, Nr. 9, S. 805–11
- [Mattson 2010] MATTSON, MP: ER calcium and Alzheimer’s disease: in a state of flux. In: *Sci Signal* 3 (2010), Nr. 114, S. 10
- [McKhann et al. 1984] MCKHANN, G ; DRACHMAN, D ; FOLSTEIN, M ; KATZMAN, R ; PRICE, D ; STADLAN, EM: Clinical diagnosis of Alzheimer’s disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer’s Disease. In: *Neurology* 34 (1984), Jul, Nr. 7, S. 939–44
- [Meyer-Luehmann et al. 2008] MEYER-LUEHMANN, M ; SPIRES-JONES, TL ; PRADA, C ; GARCIA-ALLOZA, M ; CALIGNON, A de ; ROZKALNE, A ; KOENIGSKNECHT-TALBOO, J ; HOLTZMAN, DM ; BACSKAI, BJ ; HYMAN, BT: Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer’s disease. In: *Nature* 451 (2008), Feb, Nr. 7179, S. 720–4
- [Minkeviciene et al. 2009] MINKEVICIENE, R ; RHEIMS, S ; DOBSZAY, MB ; ZILBERTER, M ; HARTIKAINEN, J ; FÜLÖP, L ; PENKE, B ; ZILBERTER, Y ; HARKANY, T ; PITKÄNEN, A ; TANILA, H: Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. In: *J Neurosci* 29 (2009), Mar, Nr. 11, S. 3453–62

- [Miyawaki et al. 1997] MIYAWAKI, A ; LLOPIS, J ; HEIM, R ; MCCAFFERY, JM ; ADAMS, JA ; IKURA, M ; TSIEN, RY: Fluorescent indicators for calcium based on green fluorescent proteins and calmodulin. In: *Nature* 388 (1997), Aug, Nr. 6645, S. 882–7
- [Mucke et al. 2000] MUCKE, L ; MASLIAH, E ; YU, GQ ; MALLORY, M ; ROCKENSTEIN, EM ; TATSUNO, G ; HU, K ; KHOLODENKO, D ; JOHNSON-WOOD, K ; MCCONLOGUE, L: High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. In: *J Neurosci* 20 (2000), Jun, Nr. 11, S. 4050–8
- [Nakai et al. 2001] NAKAI, J ; OHKURA, M ; IMOTO, K: A high signal-to-noise calcium probe composed of a single green fluorescent protein. In: *Nature Biotechnology* 19 (2001), Februar, Nr. 2, S. 137–141
- [Nevian und Helmchen 2007] NEVIAN, T ; HELMCHEN, F: Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation. In: *Pflugers Arch* 454 (2007), Jul, Nr. 4, S. 675–88
- [Nimmerjahn et al. 2004] NIMMERJAHN, A ; KIRCHHOFF, F ; KERR, Jason N. ; HELMCHEN, F: Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. In: *Nat Methods* 1 (2004), Oct, Nr. 1, S. 31–7
- [Nimmerjahn und Helmchen 2008] NIMMERJAHN, P ; HELMCHEN, F ; BRAUN, M (Hrsg.) ; GILCH, P (Hrsg.): *Two-photon laser scanning microscopy*. Bd. Ultrashort Laser Pulses in Biology and Medicine. Springer, 2008
- [Palop et al. 2007] PALOP, JJ ; CHIN, J ; ROBERSON, ED ; WANG, J ; THWIN, MT ; BIEN-LY, N ; YOO, J ; HO, KO ; YU, GQ ; KREITZER, A ; FINKBEINER, S ; NOEBELS, JL ; MUCKE, L: Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer’s disease. In: *Neuron* 55 (2007), Sep, Nr. 5, S. 697–711

- [Palop und Mucke 2009] PALOP, JJ ; MUCKE, L: Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. In: *Arch Neurol* 66 (2009), Apr, Nr. 4, S. 435–40
- [Paredes et al. 2008] PAREDES, R M. ; ETZLER, JC ; WATTS, LT ; ZHENG, W ; LECHLEITER, JD: Chemical calcium indicators. In: *Methods* 46 (2008), Nov, Nr. 3, S. 143–51
- [Paxinos und Franklin 2003] PAXINOS, G ; FRANKLIN, KBJ: *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2. Academic Press, 2003
- [Ponomareva et al. 2008] PONOMAREVA, NV ; KOROVAITSEVA, GI ; ROGAEV, EI: EEG alterations in non-demented individuals related to apolipoprotein E genotype and to risk of Alzheimer disease. In: *Neurobiol Aging* 29 (2008), Jun, Nr. 6, S. 819–27
- [Putney 2006] PUTNEY, JW: *Calcium signaling*. Bd. 2. CRC/Taylor and Francis, 2006
- [Qiu et al. 2008] QIU, DL ; AKEMANN, W ; CHU, CP ; ARAKI, R ; KNÖPFEL, T: Targeted optical probing of neuronal circuit dynamics using fluorescent protein sensors. In: *Neurosignals* 16 (2008), Nr. 4, S. 289–99
- [Querfurth und LaFerla 2010] QUERFURTH, HW ; LAFERLA, FM: Alzheimer’s disease. In: *N Engl J Med* 362 (2010), Jan, Nr. 4, S. 329–44
- [Rabinowicz et al. 2000] RABINOWICZ, AL ; STARKSTEIN, SE ; LEIGUARDA, RC ; COLEMAN, AE: Transient epileptic amnesia in dementia: a treatable unrecognized cause of episodic amnesic wandering. In: *Alzheimer Dis Assoc Disord* 14 (2000), Nr. 4, S. 231–3
- [Rocheffort et al. 2009] ROCHEFORT, NL ; GARASCHUK, O ; MILOS, RI ; NARUSHIMA, M ; MARANDI, N ; PICHLER, B ; KOVALCHUK, Y ; KONNERTH, A: Sparsification of neuronal activity in the visual cortex at eye-opening. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), Sep, Nr. 35, S. 15049–54

- [Rocheffort und Konnerth 2008] ROCHEFORT, NL ; KONNERTH, A: Genetically encoded calcium sensors come of age. In: *Nat Methods* 5 (2008), Sep, Nr. 9, S. 761–2
- [Selkoe 2002] SELKOE, DJ: Alzheimer's disease is a synaptic failure. In: *Science* 298 (2002), Oct, Nr. 5594, S. 789–91
- [Shaner et al. 2004] SHANER, NC ; CAMPBELL, RE ; STEINBACH, PA ; GIEPMANS, BNG ; PALMER, AE ; TSIEN, RY: Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein. In: *Nature Biotechnology* 22 (2004), Dezember, Nr. 12, S. 1567–1572
- [Shimomura et al. 1962] SHIMOMURA, O ; JOHNSON, FH ; SAIGA, Y: Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, *Aequorea*. In: *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (1962), Nr. 3, S. 223–226
- [Sperling et al. 2009] SPERLING, RA ; LAVIOLETTE, PS ; O'KEEFE, K ; O'BRIEN, J ; RENTZ, DM ; PIHLAJAMAKI, M ; MARSHALL, G ; HYMAN, BT ; SELKOE, DJ ; HEDDEN, T ; BUCKNER, RL ; BECKER, JA ; JOHNSON, KA: Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. In: *Neuron* 63 (2009), Jul, Nr. 2, S. 178–88
- [Squier und Muller 2001] SQUIER, J ; MULLER, M: High resolution nonlinear microscopy: A review of sources and methods for achieving optimal imaging. In: *Review of Scientific Instruments* 72 (2001), Juli, Nr. 7, S. 2855–2867
- [Stern et al. 2004] STERN, EA ; BACSKAI, BJ ; HICKEY, GA ; ATTENELLO, FJ ; LOMBARDO, JA ; HYMAN, BT: Cortical synaptic integration in vivo is disrupted by amyloid-beta plaques. In: *J Neurosci* 24 (2004), May, Nr. 19, S. 4535–40
- [Stosiek et al. 2003] STOSIEK, C ; GARASCHUK, O ; HOLTHOFF, K ; KONNERTH, A: In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Jun, Nr. 12, S. 7319–24

- [Sturchler-Pierrat et al. 1997] STURCHLER-PIERRAT, C ; ABRAMOWSKI, D ; DUKE, M ; WIEDERHOLD, KH ; MISTL, C ; ROTHACHER, S ; LEDERMANN, B ; BÜRKI, K ; FREY, P ; PAGANETTI, PA ; WARIDEL, C ; CALHOUN, ME ; JUCKER, M ; PROBST, A ; STAUFENBIEL, M ; SOMMER, B: Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Nov, Nr. 24, S. 13287–92
- [Stutzmann et al. 2006] STUTZMANN, GE ; SMITH, I ; CACCAMO, A ; ODDO, S ; LAFERLA, FM ; PARKER, I: Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to calcium disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice. In: *J Neurosci* 26 (2006), May, Nr. 19, S. 5180–9
- [Supnet und Bezprozvanny 2010] SUPNET, C ; BEZPROZVANNY, I: The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease. In: *Cell Calcium* 47 (2010), Feb, Nr. 2, S. 183–9
- [Takano et al. 2006] TAKANO, T ; TIAN, GF ; PENG, W ; LOU, N ; LIBIONKA, W ; HAN, X ; NEDERGAARD, M: Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. In: *Nat Neurosci* 9 (2006), Feb, Nr. 2, S. 260–7
- [Theer et al. 2003] THEER, P ; HASAN, MT ; DENK, W: Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. In: *Opt Lett* 28 (2003), Jun, Nr. 12, S. 1022–4
- [Tsien 1981] TSIEN, RY: A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. In: *Nature* 290 (1981), Apr, Nr. 5806, S. 527–8
- [Tsien 1989] TSIEN, RY: Fluorescent probes of cell signaling. In: *Annu Rev Neurosci* 12 (1989), S. 227–53
- [Tsien et al. 1993] TSIEN, RY ; BACSKAI, BJ ; ADAMS, SR: FRET for studying intracellular signalling. In: *Trends Cell Biol* 3 (1993), Jul, Nr. 7, S. 242–5
- [Ueno et al. 1997] UENO, S ; BRACAMONTES, J ; ZORUMSKI, C ; WEISS, DS ;

- STEINBACH, JH: Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABA-A receptor. In: *J Neurosci* 17 (1997), Jan, Nr. 2, S. 625–34
- [Verkhratsky 2007] VERKHRATSKY, A: Calcium and cell death. In: *Subcell Biochem* 45 (2007), S. 465–80
- [Wallace et al. 2008] WALLACE, DJ ; ALTEN BORGLOH, S Meyer zum ; ASTORI, S ; YANG, Y ; BAUSEN, M ; KÜGLER, S ; PALMER, AE ; TSIEN, RY ; SPRENGEL, R ; KERR, JND ; DENK, W ; HASAN, MT: Single-spike detection in vitro and in vivo with a genetic calcium sensor. In: *Nat Methods* 5 (2008), Sep, Nr. 9, S. 797–804
- [Walsh et al. 2002] WALSH, DM ; KLYUBIN, I ; FADEEVA, JV ; CULLEN, WK ; ANWYL, R ; WOLFE, MS ; ROWAN, MJ ; SELKOE, DJ: Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. In: *Nature* 416 (2002), Apr, Nr. 6880, S. 535–9
- [Wisniewski et al. 1989] WISNIEWSKI, HM ; WEN, GY ; KIM, KS: Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. In: *Acta Neuropathol* 78 (1989), Nr. 1, S. 22–7

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Arthur Konnerth für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die prägende wissenschaftliche Ausbildung und die stetige Unterstützung. Ich danke Frau Professor Dr. Olga Garaschuk für das große Engagement in der wissenschaftlichen Betreuung meines Projektes. Frau Dr. Iulia Milos danke ich für die unterstützende und geduldige Einarbeitung in die wissenschaftlichen Methoden. Ich danke Herrn Dr. Nima Marandi für die persönliche und fachliche Unterstützung insbesondere in der Anfangsphase meines Projektes. Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen für die Unterstützung sowie die schöne Zeit, die wir gemeinsam verbracht haben.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, Rilana und Maja.