

**Dysfunktion von Signalweginteraktionen in der
hippocampalen CA1-Region in einem Mausmodell
der Alzheimer-Krankheit**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Carolin Liya Miklitz

aus Bonn

2019

Angefertigt mit der Genehmigung

der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Remy
2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Walter

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.09.2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Epileptologie

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Christian E. Elger

und dem Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen

Direktor: Prof. Dr. Dr. Pierluigi Nicotera

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	9
1.1	Alzheimer-Demenz	9
1.2	Der Hippocampus	10
1.2.1	Neuroanatomie des Hippocampus	10
1.2.2	Die hippocampale CA1-Region	12
1.2.3	Funktion der unterschiedlichen Hippocampusareale	12
1.2.4	CA1-Signalwege	13
1.2.5	Navigation im Raum	14
1.2.6	Ortszellen und Gedächtnis	15
1.2.7	Der Hippocampus bei der Alzheimer-Krankheit	16
1.2.7.1	Neuropathologische Stadien der Alzheimer-Krankheit	16
1.2.7.2	Gestörte Inhibition bei der Alzheimer-Erkrankung	17
1.3	Definition der eigenen Experimente und Zielsetzung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1	Mausmodell	19
2.2	Präparation der Versuchstiere	19
2.3	Bildgebung mit einem spannungsabhängigen Farbstoff (VSD Imaging)	21
2.4	Bestimmung der Plaquemenge	24
2.5	Datenanalyse	25
2.6	Statistik	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Gestörtes Gleichgewicht zwischen Inhibition und Exzitation nach Stimulation der Schaffer Kollateralen	28
3.2	Eingeschränkte räumliche Inhibition mit Ausdehnung der Exzitation	38

3.3	Verminderte inhibitorische Kontrolle der Schaffer Kollateralen über Input von Schicht III des entorhinalen Cortex	45
3.4	Verlust von integrativen Prozessen in der CA1-Region	48
4.	Diskussion	52
4.1	Reduzierte Inhibition in der CA1-Region	53
4.2	Verlust der Kontrolle der Schaffer Kollateralen über Input des temporoammonischen Pfades	54
4.3	Mögliche weitere Folgen verminderter Inhibition	55
4.4	Limitation der Studie	58
4.5	Fazit und Ausblick	59
5.	Zusammenfassung	61
6.	Abbildungsverzeichnis	62
7.	Tabellenverzeichnis	64
8.	Literaturverzeichnis	65
9.	Danksagung	69

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid-beta
Abb.	Abbildung
ACSF	künstliches Nervenwasser (Artificial Cerebrospinal Fluid)
APO E4	Apolipoprotein E4
APP	Amyloid Vorläufer Protein (Amyloid-Precursor-Protein)
C	Celsius
CA1	Cornu ammonis (Ammonshorn), Subregion 1
CA3	Cornu ammonis (Ammonshorn), Subregion 3
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCD	Charge Coupled Device
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Sucrose
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
di-3-ANEPPDHQ	Amino-Naphthyl-Ethenyl-Pyridinium Farbstoff
durchschn.	durchschnittlich
ΔF	Änderung der Fluoreszenz
F	Fluoreszenz
EC	Entorhinaler Cortex
Exz.	Exzitation
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Hz	Hertz
Inh.	Inhibition
KCl	Kaliumchlorid

kHz	Kilohertz
LED	Lichtemittierende Diode
MCI	Mild Cognitive Impairment (Anfangsstadium einer Demenz)
min	Minute
mA	Milliampère
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
max.	Maximal
ms	Millisekunde
µs	Mikrosekunde
mM	Millimol
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
mm ²	Quadratmillimeter
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.s.	nicht signifikant
n	Stichprobengröße
O ₂	Sauerstoff
PB	Phosphat Puffer

PS1	Präsenilin 1
REM	Rapid Eye Movement (Schlafphase)
ROI	Region of Interest (Messbereich)
s	Sekunde
SC	Schaffer Kollaterale
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SLM	Stratum Lacunosum-Moleculare
SO	Stratum Oriens
SR	Stratum Radiatum
Stim.	Stimulation
Tab.	Tabelle
t1	Zeitpunkt 1
t2	Zeitpunkt 2
t3	Zeitpunkt 3
TA	temporoammonisch
tg	Transgen
vs.	versus
VSD	spannungsabhängiger Farbstoff (Voltage Sensitive Dye)
wt	Wildtyp
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,005$
***	$p < 0,0005$

1. Einleitung

Demenzen gewinnen in unserer alternden Gesellschaft zunehmend an Bedeutung. Mit steigender Lebenserwartung steigt auch die Prävalenz von Demenzen (Prince et al., 2013). Weltweit sind Demenzerkrankungen bereits die häufigste Ursache einer Einschränkung der selbstständigen Lebensführung bei älteren Menschen (Sousa et al., 2009).

1.1 Alzheimer-Demenz

Innerhalb der Gruppe der Demenzerkrankungen spielt die Alzheimer-Krankheit, die sogenannte Demenz vom Alzheimerstyp, als häufigste Ursache eines dementiellen Syndroms eine besonders wichtige Rolle.

Erstmals im Jahr 1907 von dem Neurologen Alois Alzheimer beschrieben, ist diese Erkrankung durch das Auftreten von intrazellulär gelegenen Fibrillen aus Protein Tau sowie extrazellulären Amyloidplaques gekennzeichnet.

Die Amyloidplaqueablagerungen bestehen vorwiegend aus Aggregaten von A β -Proteinen. Diese werden durch verschiedene Sekretasen aus dem Amyloid-Präkursor Protein APP abgespalten. Die löslichen A β -Peptide, welche in Plaqueablagerungen beobachtet werden können, werden auf Grund der Länge ihrer Aminosäuren als A β 40 und A β 42 bezeichnet und besitzen ein unterschiedliches aggregatives Verhalten. Wegen der längeren Fragmentlänge aggregiert A β 42 stärker. Ein erniedrigtes A β 42/A β 40-Verhältnis sowie eine erniedrigte Absolutkonzentration von A β 42 werden in der Liquordiagnostik neben erhöhten Werten für Tau-Protein sowie Phospho-Tau als Demenzmarker verwendet (Schulz et al., 2016). Die krankheitstypischen Amyloidplaqueablagerungen können auch in Mausmodellen, die typische Alzheimer assoziierte Mutationen tragen (humanes Amyloid-Präkursor Protein (APP) Gen, PS1 Gen oder beide), zuverlässig nachgewiesen werden.

Morphometrische in vivo Studien bei Alzheimer-Patienten mit hochauflösenden kernspintomographischen Aufnahmen zeigen pathologische Veränderungen insbesondere in der hippocampalen CA1-Region (Adler et al., 2018). Diese Hirnregion hat eine entscheidende Bedeutung für die Verarbeitung von zeitlichen und räumlichen

Informationen, für die Bildung von Gedächtnisinhalten sowie den Zugriff auf bereits gespeicherte Erinnerungen (Small et al., 2011).

Die fortschreitende hippocampale Dysfunktion trägt wesentlich zum graduellen kognitiven Abbauprozess bei Alzheimer-Patienten bei. Hierbei spielen insbesondere ein Missverhältnis zwischen Inhibition und Exzitation sowie die daraus resultierende neuronale Übererregbarkeit eine entscheidende Rolle (Busche und Konnerth, 2016; Palop et al., 2007; Palop und Mucke, 2010).

Klinisch manifestiert sich die Alzheimer-Erkrankung vornehmlich in Einbußen der episodischen Gedächtnisleistung. Die Patienten haben Schwierigkeiten, sich an kurz zurückliegende Erlebnisse zu erinnern sowie neue Dinge zu erlernen. Auch autobiographische Daten und alltägliche Informationen gehen verloren. Früh zeigt sich eine topographische Desorientiertheit, welche auch bekannte Strecken betrifft. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommen weitere kognitive Störungen hinzu. Die Patienten leiden unter Wortfindungsstörungen, Apraxie und Dyskalkulie. Auch neuropsychiatrische Symptome wie Depression und Halluzinationen treten häufig auf (Walker et al., 2007).

Die bisherige medikamentöse Therapie der Alzheimer-Krankheit beruht auf der Annahme eines cholinergen Defizits. Es wird vermutet, dass die Degeneration der subcortikalen Kerne von medialem Septum, diagonalem Band und Nucleus basalis Meynert eine verminderte cholinerge Innervation von Cortex und Hippocampus verursacht. Bislang werden zwei Medikamentenklassen verwendet: Acetylcholinesteraseinhibitoren sowie NMDA-Rezeptorantagonisten. Mittels dieser Substanzklassen können der Symptomprogress verlangsamt sowie bestehende Symptome gemildert werden. Eine kurative Therapie besteht bislang nicht (Deuschl et al. 2016; Walker et al., 2007).

1.2 Der Hippocampus

1.2.1 Neuroanatomie des Hippocampus

Der Hippocampus ist durch eine einfache Gliederung in unterschiedliche Zellschichten sowie eine vorwiegend laminare Verteilung von In- und Output gekennzeichnet.

Der eigentliche Hippocampus setzt sich aus den Regionen CA1 bis CA3 zusammen. Zur hippocampalen Formation werden zusätzlich der Gyrus Dentatus, das Subiculum sowie der entorhinale Cortex (EC) gezählt (Amaral und Lavenex, 2007).

Der entorhinale Cortex fungiert als Zugangsweg von Informationen durch monosynaptische Verbindungen aus verschiedenen Cortexarealen sowie der Amygdala.

Der sogenannte "Perforant Path" liefert Input aus Schicht II des entorhinalen Cortex an den Gyrus Dentatus. Dieser sendet Informationen über die sogenannten "Moosfasern" an die nachgeschaltete CA3-Region, welche wiederum durch die "Schaffer Kollateralen" die Information an die CA1-Region des Hippocampus übermittelt. Dieser exzitatorische unidirektionale Pfad wird als "trisynaptischer Pfad" bezeichnet. Zusätzlich bestehen direkte Verbindungen von Schicht II des entorhinalen Cortex zu der hippocampalen CA3-Region sowie von Schicht III des entorhinalen Cortex zur CA1-Region. Die Verbindung des entorhinalen Cortex mit der CA1-Region wird neben dem trisynaptischen Pfad als zweite wichtige Informationsquelle des Hippocampus angesehen und als "temporoammonischer Pfad" bezeichnet. Über die CA1-Region kommuniziert der Hippocampus teils direkt, teils über das Subiculum mit vielen extrahippocampalen Hirnarealen. Die CA1-Region bildet den Endpunkt der hippocampalen Signalverarbeitung. Von hier gelangen Informationen über tiefe Schichten des entorhinalen Cortex über den parahippocampalen Gyrus zurück zu den Strukturen im Bereich des Neocortex, welche vor der hippocampalen Prozessierung als ursprüngliche Inputquelle fungierten (Small et al., 2011).

Neben diesen exzitatorischen Verbindungen gibt es ein großes Netz an inhibitorischen Interneuronen (Neves et al., 2008).

Spricht man von der Organisation des Hippocampus, so wird dieser häufig in zwei Achsen eingeteilt. Der Gyrus dentatus wird als proximaler Teil der Formation betrachtet, wohingegen der entorhinale Cortex als distaler Pol bezeichnet wird. Ferner kann man die verschiedenen Schichten des Hippocampus anhand ihrer Tiefe einteilen. Hierbei werden Strukturen, welche an die hippocampale Fissur angrenzen, als oberflächlich bezeichnet. Je ventrikelnäher eine Struktur, desto tiefer ihre Lage (Amaral und Lavenex, 2007).

1.2.2 Die hippocampale CA1-Region

Die hippocampale CA1-Region ist wie auch die anderen Regionen des Hippocampus laminar aufgebaut. Die Hauptzellschicht wird durch die Zellkörper der Pyramidenzellen gebildet und als Stratum Pyramidale bezeichnet. Unterhalb der Pyramidenzellschicht liegt das Stratum Oriens, welches Dendriten der Pyramidenzellen sowie Interneurone enthält (Amaral und Lavenex, 2007).

Als Alveus wird das noch tiefer gelegene Faserbündel bezeichnet, welches aus myelinisierten afferenten und efferenten Fasern besteht. Einige der Fasern entstammen als Teil des entorhinalen-CA1-Pfades dem entorhinalen Cortex, der Hauptanteil der Axone projiziert von den Pyramidenzellen des Hippocampus und Subiculus ausgehend in die entgegengesetzte Richtung (Amaral und Lavenex, 2007).

Direkt oberhalb der Pyramidenzellschicht befindet sich das Stratum Radiatum, welches die sogenannten Schaffer Kollateralen, die von CA3 nach CA1 laufenden Axone, enthält.

An der Oberfläche des Hippocampus befindet sich das Stratum Lacunosum-Moleculare. Hier enden die Fasern des temporoammonischen Pfades, einer direkten Projektion des entorhinalen Cortex zur CA1-Region.

1.2.3 Funktion der unterschiedlichen Hippocampusareale

Den unterschiedlichen Regionen des Hippocampus werden verschiedene Funktionen zugeschrieben.

Der entorhinale Cortex zeigt insbesondere beim Abrufen von Inhalten des Kurzzeitgedächtnisses eine erhöhte Aktivität. Die CA3-Region wird mit der Funktion der sogenannten "Mustervervollständigung" in Verbindung gebracht. Hierunter versteht man die Fähigkeit anhand eines kleinen Fragments den zugehörigen vollständigen Gedächtnisinhalt abzurufen (Small et al., 2011).

Die CA1-Region als Schnittstelle zwischen direktem Input durch den entorhinalen Cortex einerseits sowie durch den trisynaptischen Pfad andererseits hat eine besondere Bedeutung für die Verarbeitung der parallel eintreffenden Informationen.

Diese Verbindung der unterschiedlichen Inputströme spielt insbesondere beim räumlichen Lernen eine wichtige Rolle (Small et al., 2011).

1.2.4 CA1-Signalwege

Die CA1-Region des Hippocampus ist wichtig für die Verarbeitung von räumlichen Informationen über die Umgebung, welche diese Region über Schicht III des entorhinalen Cortex über den sogenannten temporoammonischen Pfad erreichen. Dieser spielt auch für die Bildung von räumlichen Langzeitgedächtnisinhalten eine wichtige Rolle (Remondes und Schuman, 2004).

Ein weiterer wichtiger Signalweg liefert aus der hippocampalen CA3-Region über die Schaffer Kollateralen situative Informationen. Gemeinsam führen diese Informationsflüsse zur Bildung der sogenannten "Place Cells" (O'Keefe und Dostrovsky, 1971).

Unter Ruhebedingungen werden exzitatorische temporoammonische Signale, welche die hippocampale CA1-Region erreichen, durch vorwärts gerichtete GABAerge Inhibition sowie intrinsische spannungsabhängige Leitfähigkeiten auf das Stratum Lacunosum-Moleculare begrenzt (Ang et al., 2005).

Diese Segregation kann unter bestimmten Umständen aufgehoben werden. Bei Bewegung oder während REM Schlaf ermöglicht eine spezifisch abgestimmte sequentielle Aktivierung der beiden exzitatorischen Signalwege von CA3 des Hippocampus sowie Schicht III des entorhinalen Cortex ein Fortleiten der Erregung bis in den axosomatischen Bereich der CA1-Pyramidenzellen. Auf diese Weise wird die Bildung von Aktionspotentialen erleichtert (Jarsky et al., 2005).

Erreicht ein exzitatorisches Signal der Schaffer Kollateralen das in CA1 gelegene Stratum Radiatum 40–200 ms vor Erregung der CA1-Region durch den temporoammonischen Pfad (in Stratum Lacunosum-Moleculare), so findet eine Ausbreitung der temporoammonischen Aktivität bis in proximale Zellkompartimente statt. Die unter Ruhebedingungen beobachtete Segregation der temporoammonischen Signale auf das Stratum Lacunosum-Moleculare wird NMDA-vermittelt sowie durch präsynaptische Disinhibition der GABAergen Endigungen in der CA1-Region aufgehoben (Ang et al., 2005).

Hierbei spielt die zeitliche Abfolge des Zusammenspiels der Signale aus CA3 (über die Schaffer Kollaterale) und vom entorhinalen Cortex (durch den temporoammonischen Pfad) eine entscheidende Rolle. Die Ausbreitung der temporoammonischen Aktivität auf das Stratum Radiatum ist nur dann möglich, wenn der Erregung ein exzitatorisches Signal aus CA3 um 40–200 ms vorangeht (Ang et al., 2005). Diese Zeitspanne entspricht unter anderem den Theta-Oszillationen, welche insbesondere bei explorativer Fortbewegung und während REM Schlaf beobachtet und mit Gedächtnisbildung assoziiert werden (Buzsáki, 2002).

Es besteht somit ein Mechanismus, welcher durch zeitlich abgestimmte, vorangehende Aktivität der Schaffer Kollateralen die Effizienz der temporoammonischen Aktivität erhöhen kann. Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus bei der Bildung von Langzeitgedächtnisinhalten eine Rolle spielt (Ang et al., 2005).

1.2.5 Navigation im Raum

1971 beschrieben O'Keefe und Dostrovsky erstmals sogenannte Ortszellen (Place Cells) im Hippocampus, welche eine ortsspezifische Erregung zeigen. O'Keefe definierte diese Ortszelle als „eine Zelle, welche die Vorstellung eines Ortes in einer Umgebung erzeugt, indem sie verschiedene multisensorische Inputs, welche sie an einem bestimmten Ort in der Umgebung erfährt, miteinander in Verbindung setzt“ (O'Keefe, 1979). Ortszellen zeigen nur in einem zellspezifischen Teil der aktuellen Umgebung Aktivität, welcher als Ortsfeld (Place Field) bezeichnet wird. Die meisten Ortszellen sind in einer bestimmten Umgebung lediglich in einem Ortsfeld aktiv. Einige zeigen jedoch auch in mehreren Ortsfeldern Aktivität. Ortszellen sind vermutlich Pyramidenzellen und wurden in der hippocampalen CA3- und CA1-Region beobachtet. Das Ortsfeld einer Ortszelle in einer spezifischen Umgebung sagt nichts über ihre Aktivität in einer anderen Umgebung voraus. Es besteht folglich keine topographische Anordnung. Nach wiederholter Exposition in einer gleichen Umgebung ändern sich die Ortsfelder einer Ortszelle nicht (Muller und Kubie, 1987). Ortszellen zeigen somit sowohl eine räumliche Spezifität als auch eine räumliche Stabilität (Kentros, 1998).

Das gemeinsame Aktivitätsmuster aller Ortszellen in einer Umgebung ist die Basis einer räumlichen Karte. Sowohl an unterschiedlichen Orten als auch unter

verschiedenen Testkonditionen wie beispielsweise Form oder Farbe der Umgebung zeigt sich ein individuelles Aktivitätsmuster (Leutgeb et al., 2005). Ob eine Ortszelle in einer bestimmten Umgebung aktiv ist, scheint von der umliegenden Inhibition abzuhängen. Ist der Level an Inhibition in einer Umgebung hoch, so kann eine potentielle Ortszelle in dieser Umgebung „schweigen“. Man spricht von einer „schweigenden Zelle“ (silent cell). Die Inhibition geht vermutlich von Interneuronen aus, welche exzitatorische Einflüsse von umliegenden aktiven Ortszellen erhalten. So sind in verschiedenen Umgebungen unterschiedliche Kombinationen von Ortszellen aus einem gemeinsamen Pool aktiv und bilden durch ihr Aktivitätsmuster eine Art räumliche Karte der Umgebung. Das Aktivitätsmuster der Ortszellen in einem bestimmten Umfeld kann nach wiederholter Exposition angepasst werden. Man spricht dann von „Remapping“, einer auf Erfahrung beruhenden Neuorganisation und somit einer Art von Lernen (O'Keefe, 1979; O'Keefe, 2007).

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass neben Ortszellen weitere räumlich modulierte Neuronen existieren, welche unter anderem „Rasterzellen“ (Grid Cells), „Kopfrichtungszellen“ und „Grenzzellen“ beinhalten und im entorhinalen Cortex lokalisiert sind. Diese Zelltypen enthalten Informationen über Geschwindigkeit, vergangene Zeit, Kopfrichtung sowie Ausgangsposition und dienen vermutlich als metrisches Maß einer Umgebung. Insbesondere die „Rasterzellen“ des entorhinalen Cortex spielen eine wichtige Rolle bei der Navigation. Sie zeigen – vergleichbar mit den oben beschriebenen Ortszellen – ein ortsspezifisches Feuermuster. Im Gegensatz zu Ortszellen besitzen Rasterzellen zahlreiche Ortsfelder, welche eine periodische Anordnung von gleichschenkligen Dreiecken bilden und auf diese Weise die gesamte Umgebung abbilden. Vermutlich ermöglicht das Zusammenspiel von Rasterzellen des entorhinalen Cortex und hippocampalen Ortszellen eine präzise Navigation im Raum (Buzsáki and Moser, 2013).

1.2.6 Ortszellen und Gedächtnis

Ortszellen spielen auch bei der Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur den aktuellen Aufenthaltsort, sondern auch Orte, an denen sich die Maus zuvor aufgehalten hatte, repräsentieren (Frank et al., 2000). Abhängig von Erfahrungen kann das Aktivitätsmuster von Ortszellen in einem bestimmten Umfeld angepasst werden

(O'Keefe, 1979). Für die Gedächtnisbildung ist eine Selektion von Informationen notwendig. Nicht alle Erlebnisse können dauerhaft gespeichert werden. Im Hippocampus können bestimmte kognitive Karten vermutlich durch eine gewichtete synaptische Wertigkeit stabilisiert werden (Bittner et al., 2017). Als möglicher Mechanismus, welcher darüber entscheidet, ob eine neue Karte der Umgebung stabilisiert wird oder nicht, wird eine Kohärenz zwischen Aktivität im entorhinalen Cortex und dem Hippocampus über verschiedene Frequenzkanäle diskutiert (Moser et al., 2008). Auch beim Menschen konnten ortsselektive Zellen sowie Rasterzellen nachgewiesen werden (Jacobs et al., 2013; Miller et al., 2013). Die genauen Mechanismen von Navigation und Gedächtnisbildung sind bislang jedoch nicht bekannt.

1.2.7 Der Hippocampus bei der Alzheimer-Krankheit

1.2.7.1 Neuropathologische Stadien der Alzheimer-Krankheit

Bei der Alzheimer-Krankheit sind vor allem der entorhinale Cortex, die CA1-Region sowie das Subiculum von Plaqueablagerungen und Zelluntergang betroffen (Small et al., 2011). 1991 führten Eva und Heiko Braak eine bis heute häufig verwendete neuropathologische Klassifikation ein. Hierbei werden in Abhängigkeit von der Lokalisation der Neurofibrillenbündel sechs neuropathologische Stadien unterschieden, welche eine gute Korrelation zu klinischen Symptomen aufweisen. In den Stadien I-II können Neurofibrillenablagerungen im Bereich der Übergangszone zwischen Temporallappen und entorhinalem Cortex nachgewiesen werden. Daher werden diese Stadien als „transentorhinale Stadien“ bezeichnet. Die Stadien III und IV werden „limbische Stadien“ genannt. Sie sind gekennzeichnet durch zusätzlich ausgeprägte Neurofibrillenablagerungen im entorhinalen Cortex sowie milden bis moderaten hippocampalen Ablagerungen, vorwiegend in der CA1-Region. Bei Fortschreiten der Pathologie werden unter Zunahme der Intensität und Ausbreitung der Neurofibrillenablagerungen der vorhergehenden Stadien die sogenannten „isocortikalen Stadien“ V und VI erreicht. Hier können Neurofibrillenablagerungen auch in kortikalen Strukturen sowie den subkortikalen Kerngebieten nachgewiesen werden. Klinisch scheinen die „transentorhinalen Stadien“ noch nicht apparent zu sein. Während der „limbischen Stadien“ zeigen sich erste Symptome einer Demenz. Die

„isocortikalen Stadien“ korrelieren mit dem Vollbild der Erkrankung (Braak und Braak, 1991).

1.2.7.2 Gestörte Inhibition bei der Alzheimer-Erkrankung

Ein exakt abgestimmtes zeitliches und räumliches Zusammenspiel von Inhibition und Exzitation ist entscheidend für den Informationsfluss während der Bildung von Gedächtnisinhalten. In Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung konnte ein Missverhältnis zwischen Inhibition und Exzitation in hippocampalen und cortikalen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden, welches eine Netzwerkübererregbarkeit verursacht. Diese Netzwerkübererregbarkeit äußert sich klinisch sowohl durch kognitiven Abbau als auch durch vermehrte epileptische Anfälle (Busche und Konnerth, 2016; Palop und Mucke, 2010).

1.3 Definition der eigenen Experimente und Zielsetzung

Schon in frühen Krankheitsstadien zeigen Alzheimer-Patienten Einbußen in der episodischen Gedächtnisleistung sowie eine topographische Desorientiertheit. Bislang ist nicht bekannt, welche Mechanismen auf hippocampaler Schaltkreis-Ebene zu der eingeschränkten Gedächtnisleistung und kognitiven Dysfunktion bei Alzheimer-Patienten führen. Die Integration von intra- und extrahippocampalen Informationszuflüssen in der CA1-Region scheint eine entscheidende Rolle für die Gedächtnisleistung sowie die Navigation im Raum zu spielen.

Ziel dieser Arbeit ist es, in einem Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung pathophysiologische Veränderungen der Funktion hippocampaler synaptischer Schaltkreise zu identifizieren. Hierfür soll zunächst untersucht werden, ob eine Dysbalance zwischen Exzitation und Inhibition vorliegt. Hierbei soll im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten insbesondere der Frage nachgegangen werden, inwieweit die räumliche Ausbreitung von Erregung und Inhibition verändert ist. Im Anschluss soll untersucht werden, inwiefern das Zusammenspiel der zwei Hauptinformationszuflüsse (via Schaffer Kollaterale und temporoammonischem Pfad) in der hippocampalen CA1-Region in Anwesenheit von Amyloidplaques gestört ist.

In unserem Versuchsaufbau nutzen wir die Technik einer Bildgebung mit einem spannungsabhängigen Farbstoff (Voltage Sensitive Dye (VSD) Imaging), um in einem APP/PS1-Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung mit nachgewiesener Amyloid- β -

Plaqueablagerung die räumliche und zeitliche Ausbreitung von Inhibition und Exzitation darzustellen. Im ersten Teil der Arbeit charakterisieren wir die Erregungsausbreitung in der CA1-Region nach isolierter Stimulation von Schaffer Kollateralen, temporoammonischem Pfad sowie des Alveus. Im zweiten Teil untersuchen wir die Integration von zeitlich abgestimmter Aktivierung von Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad.

2. Material und Methoden

Alle experimentellen Verfahren erfolgten gemäß den institutionellen Tierschutzrichtlinien und wurden von den zuständigen Behörden genehmigt.

2.1 Mausmodell

Wir verwendeten männliche, hemizygote transgene Mäuse des Modells APP/PS1 im Alter von 8,1–9,8 Monaten. [B6.Cg-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9})85Dbo/J] (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, <http://jaxmice.jax.org/strain/004462.html>) sowie wildtyp Mäuse (C57BL/6J) im gleichen Alter.

Das doppelt transgene Mausmodell APP/PS1 enthält Mutationen, welche mit der seltenen hereditären Form der Alzheimer-Krankheit assoziiert werden: Das chimäre (Maus/Mensch) Transgen APP (Mo/HuAPP695^{swe}) ermöglicht die Bildung eines humanen A β -Peptids. Das humane Transgen PS1 (PS1-dE9) verursacht als Untereinheit der γ -Sekretase, welche APP spaltet, ein für Alzheimer typisches, erhöhtes A β 42/A β 40-Verhältnis mit erhöhtem aggregativen Potential und somit vermehrter Plaquebildung. Die eingefügte sogenannte schwedische Mutation, erhöht die Menge an gebildetem Amyloid- β , indem es eine Prozessierung durch β - und γ -Sekretasen favorisiert (The Jackson Laboratory, 2019; Xiong et al., 2011).

Auf Grund der Mutationen kommt es zuverlässig ab einem Alter von 7 Monaten zu den für die Alzheimer-Krankheit typischen Amyloid- β -Ablagerungen im Gehirn.

Klinisch zeigen die transgenen Versuchstiere eine erhöhte Rate an epileptischen Anfällen sowie signifikante Gedächtnisdefizite ab einem Alter von 6 Monaten. Die kognitiven Auffälligkeiten nehmen mit dem Alter zu und betreffen insbesondere die Bildung von räumlichen Gedächtnisinhalten (Hazra et al., 2013; The Jackson Laboratory, 2019; Xiong et al., 2011).

2.2 Präparation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden während tiefer Inhalationsnarkose mit Isofluran (Actavis, Ludwigshafen) dekapitiert. Im Anschluss blockten wir das freipräparierte Gehirn in eisgekühltem künstlichen cerebralen Liquor auf Sucrose-Basis (artificial cerebrospinal fluid sucrose (ACSF Sucrose)). Dieses künstliche Nervenwasser auf Sucrose-Basis

enthielt im Vergleich zum Standard-ACSF eine verminderte Konzentration von Kaliumchlorid sowie eine erhöhte Konzentration von Magnesiumchlorid, um eine aberrante Aktivität während des Schneidevorganges zu minimieren. Es setzte sich wie folgt zusammen: 87 mM Natriumchlorid (NaCl), 75 mM Sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁), 2,5 mM Kaliumchlorid (KCl), 1,25 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄), 25 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), 0,5 mM Calciumchlorid (CaCl₂), 7 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) und 25 mM Glucose (C₆H₁₂O₆).

Anschließend erzeugten wir mit Hilfe eines Vibratoms (Leica, Wetzlar) 350 µm dicke transversale Schnitte des Hippocampus. Diese Schnitte wurden für 30 Minuten in dem oben beschriebenen künstlichen cerebralen Liquor (ACSF Sucrose) bei 35° C inkubiert. Im Folgenden wurden die Hirnschnitte bei Zimmertemperatur in einer sogenannten "Interface-Kammer" aufbewahrt, welche Standard-Nervenwasser (ACSF) beinhaltete. Dieses Standard-ACSF enthielt folgende Ingredienzien: 125 mM Natriumchlorid (NaCl), 3,5 mM Kaliumchlorid (KCl), 1,25 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄), 26 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), 2 mM Calciumchlorid (CaCl₂), 2 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) und 15 mM Glucose (C₆H₁₂O₆).

Alle extrazellulären Flüssigkeiten wurden konstant oxygeniert (95 % O₂, 5 % CO₂).

Für die Messung der Signaltransmission von den Schaffer Kollateralen in die CA1-Region, wurde ein Schnitt an der Grenze zwischen der CA3- und der CA1-Region eingefügt. Auf diese Weise limitierten wir spontane Aktivität in der CA1-Region, welche andernfalls über den trisynaptischen Pfad hervorgerufen werden kann. Ein zweiter Schnitt verlief weiter distal an der Grenze von der CA1-Region zum Subiculum durch die Schichten Stratum Radiatum, Stratum Pyramidale und Stratum Oriens. Der Alveus hingegen blieb intakt. So konnte durch Stimulation des Alveus eine isolierte, antidrome Stimulation der CA1-Axone erreicht werden, welche ein alleiniges Rekrutieren von rückwärts gerichteten Kontrollschleifen ermöglichte.

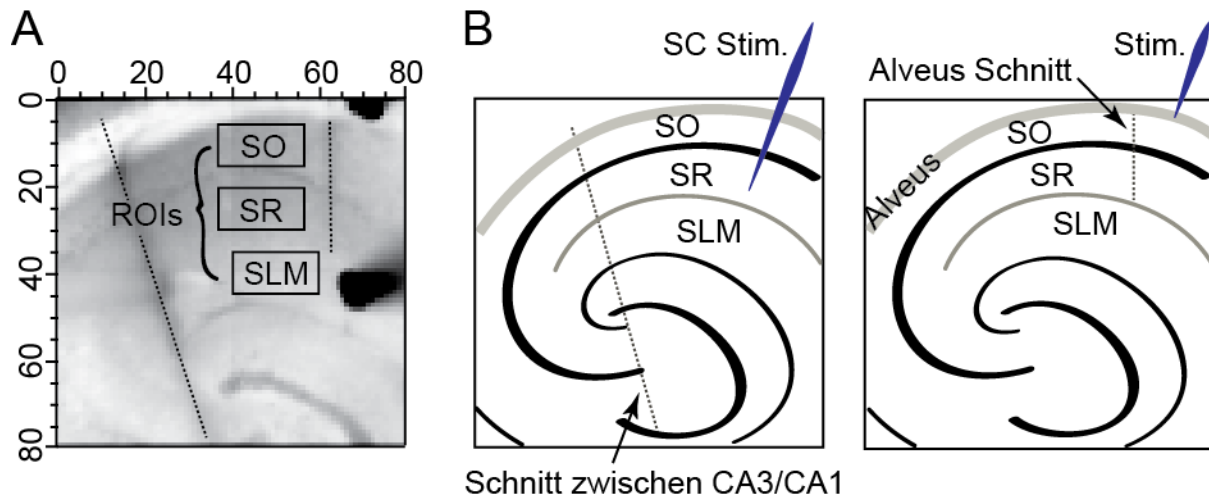


Abb. 1: Schnittführung bei Stimulation der Schaffer Kollateralen und des Alveus

Abb. 1A zeigt einen Schnappschuss einer Aufnahme mit spannungsabhängigem Farbstoff (VSD) in Graustufen (80 x 80 Pixel). Die schwarzen Kästen zeigen die Regionen Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) sowie Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM), in welchen die Fluoreszenzsignale aufgenommen wurden (Region of Interest, ROI). Es sind zwei Schnitte zu erkennen. Links im Bild werden die CA3- und die CA1-Region durch einen Schnitt getrennt, rechts im Bild ist ein Schnitt an der Grenze zwischen CA1-Region und Subiculum zu sehen, welcher durch Stratum Oriens, Stratum Pyramidale und Stratum Radiatum verläuft. Abb. 1B zeigt korrespondierend ein Schema des Hippocampus zur Darstellung des Versuchsaufbaus bei Stimulation der Schaffer Kollateralen (links) und Alveusstimulation (rechts).

2.3 Bildgebung mit einem spannungsabhängigen Farbstoff (VSD Imaging)

Mit Hilfe der Bildgebung mit einem spannungsabhängigen Farbstoff (Voltage Sensitive Dye Imaging) kann in laminar aufgebauten Strukturen wie dem Hippocampus die Aktivität von synchron agierenden Neuronenpopulationen visualisiert werden. Die Technik zeichnet sich durch eine hohe zeitliche Auflösung aus und liefert zudem Informationen über die räumliche Ausbreitung von Potentialveränderungen. Im Gegensatz zur herkömmlichen extrazellulären Feldpotentialmessung können sowohl exzitatorische als auch inhibitorische dynamische Prozesse von Neuronenpopulationen dargestellt werden.

Ein spannungsabhängiger Farbstoff wird hierbei direkt auf den Hirnschnitt aufgetragen und lagert sich in die Membran aller Zellen ein. Der Farbstoff wird durch eine Lichtquelle mit einer definierten Wellenlänge angeregt und spiegelt Veränderungen im

Membranpotential als optische Signale wider. Die emittierte Fluoreszenz ist hierbei abhängig vom Membranpotential aller Zellen unter dem aufzeichnenden Pixel (Inhibition und Exzitation verschiedener Zellkompartimente). Die emittierte Fluoreszenz wird durch eine zeitlich hochauflösende CCD-Kamera (charge coupled device) aufgezeichnet (Carlson und Coulter, 2008; Chemla und Chavane, 2010) .

In unserem Versuchsaufbau folgten wir einem Protokoll von Carlson und Coulter (Carlson und Coulter, 2008). Die Hirnschnitte des Hippocampus wurden vor Beginn des Experiments mit 100 μM des Amino-Naphthyl-Ethenyl-Pyridinium Farbstoffes di-3-ANEPPDHQ ($\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_2$ von Invitrogen) in der oben beschriebenen ACSF-Lösung inkubiert. Anschließend regten wir den fluoreszenten Farbstoff mit Hilfe einer optoLED an (Cairn Research). Epifluoreszenzbilder wurden mit einer CCD-Kamera mit einer Aufnahmerate von 1kHz aufgenommen (80 x 80 Pixel, NeuroCCD von RedShirtImaging, Decatur, Georgia, USA). Hierbei verwendeten wir ein Objektiv mit vierfacher Vergrößerung (XLFLUOR 4x, 0.28 NA; Olympus). Um externe thermische Einflüsse gering zu halten, wurden alle technischen Geräte mindestens 30 min vor Beginn der Experimente eingeschaltet. Während der Experimente hielten wir die Temperatur in der Interface-Kammer mit Hilfe einer automatischen Temperaturkontrolle (Warner Instruments, Hamden, Connecticut, USA) konstant bei $32,5 \pm 1^\circ \text{C}$.

Um sowohl intra- als auch extrahippocampale Informationszuflüsse in die CA1-Region zu untersuchen, stimulierten wir sowohl Schaffer Kollateralen als auch den temporoammonischen Pfad. Für die Schaffer Kollateral Stimulation wurde eine Cluster-Elektrode (CE2F75; FHC, Bowdoin, Maine, USA) in Stratum Radiatum platziert. Eine zweite Elektrode platzierten wir in Stratum Lacunosum-Moleculare in unmittelbarer Nachbarschaft an die hippocampale Fissur und erregten dort Afferenzen des temporoammonischen Pfades. Der elektrische Strom (200 μs) hierfür wurde durch einen Stimulus-Isolator (A-M Systems, Modell 2100, Sequim, Washington, USA) geliefert. Um die Intensität der Stimulation zu normalisieren, platzierten wir Feldpotentialelektroden in Stratum Radiatum und Stratum Lacunosum-Moleculare. Die einzelnen Strompulse der Stimulation der Schaffer Kollateralen erfolgten mit einer Intensität, welche – gemessen in Stratum Radiatum – der Intensität eines halbmaximalen Populationsspikes entsprach (0,03–0,55 mA). Der Populationsspike ist ein Summenaktionspotential, welches durch überschwellige Stimulation der Schaffer

Kollateralen in Stratum Radiatum ausgelöst wird und die dadurch hervorgerufenen nahezu synchronen Aktionspotentiale einer Vielzahl von Neuronen widerspiegelt. Bei Stimulation des temporoammonischen Pfades nutzten wir sowohl Einzel- als auch Burstpulse (bestehend aus drei Pulsen mit einer Frequenz von 100 Hz). Die Stimulationsintensität entsprach 80 % der maximalen in Stratum Lacunosum-Moleculare gemessenen Feldpotentialamplitude (0,09–0,35 mA). Die Aufnahmen erfolgten mit einer Samplingrate von 100 kHz und wurden mit Hilfe eines Analog/Digitalwandlers (Digidata 1440 A, Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) konvertiert. Als Aufnahmesoftware nutzten wir pClamp (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA).

Um die Interaktion zwischen den unterschiedlichen Informationszuflüssen in der CA1-Region zu untersuchen, nutzten wir ein Protokoll, in welchem wir Schaffer Kollateralen und temporoammonischen Pfad gepaart stimulierten. Zunächst wurden sowohl Schaffer Kollateralen als auch temporoammonischer Pfad (mit 1100 ms Interpuls Intervall) isoliert stimuliert, um für die folgenden Experimente Kontrollbedingungen zu erhalten. Nach weiteren 1520 ms, in denen die lokalen Kreisläufe in ihren Baselinezustand zurückkehren konnten, stimulierten wir die Schaffer Kollateralen 100 ms vor der Stimulation des temporoammonischen Pfades.

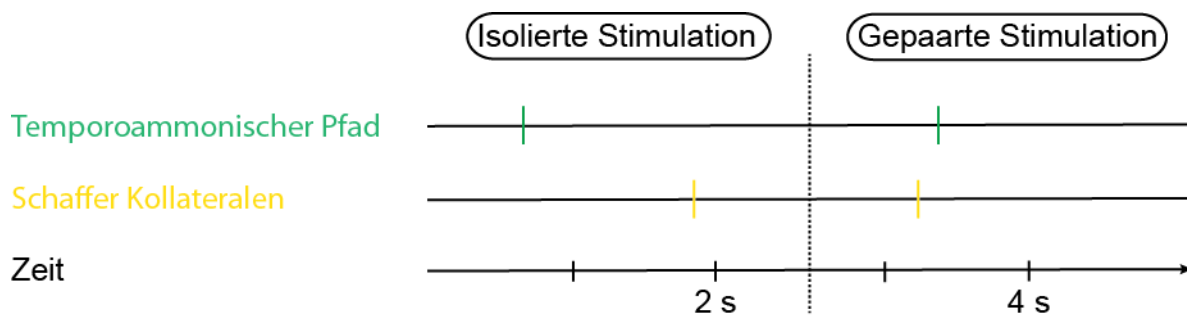


Abb. 2: Stimulationsprotokoll der gepaarten Stimulation

Abb. 2 zeigt das Stimulationsprotokoll der Stimulation der Schaffer Kollateralen (SC) sowie des temporoammonischen Pfades (TA). Zunächst erfolgte eine isolierte Stimulation des temporoammonischen Pfades sowie der Schaffer Kollateralen (links im Bild). Nach 1520 ms Pause erfolgte eine gepaarte Stimulation. Hierbei ging der Stimulation des temporoammonischen Pfades die Stimulation der Schaffer Kollateralen um 100 ms voraus (rechts im Bild).

Im Anschluss aktivierten wir lokale rückwärts gerichtete inhibitorische Kreisläufe, indem wir eine Elektrode im Alveus, distal des Schnittes an der CA1/Subiculum-Grenze, platzierten und dort die Axone der Pyramidenzellen mit Einzelpulsen (0,2 ms, 0,15 mA) stimulierten.

2.4 Bestimmung der Plaquemenge

Um die Plaquemenge zu bestimmen, wurden die Hirnschnitte im Anschluss an die bildgebenden Experimente mit Thioflavin gefärbt. Die Hirnschnitte wurden zunächst 24 Stunden lang mit einer 4 % Paraformaldehydlösung bei 4°C fixiert. Danach wurden sie zweifach 10 min in einem Phosphatpuffer (Phosphate Buffer, PB, Sigma-Aldrich) gereinigt. Die fixierten Hirnschnitte wurden mittels Applikation von 0,1 % Thioflavin-S in deionisiertem Wasser gefärbt und anschließend erneut zweifach 10 min in Phosphatpuffer (PB) gereinigt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Hilfe von Aqua-Poly/Mount (18606-20, Polysciences Inc.) auf Objektträger aufgebracht. Die oben beschriebenen Schritte zu Färbung der Hirnschnitte wurden von dem medizintechnischen Assistenten Herrn Detlef Friedrichs durchgeführt. Im Anschluss wurden mit einem konfokalen Mikroskop mit einem 10-fach Objektiv (Plan Neofluar 10 x 0.3, Zeiss, Oberkochen) Bilder von 2048 x 2048 Pixel mit einer Tiefe von 12,5 µm aufgenommen. Um den Farbstoff anzuregen, verwendeten wir einen Laser mit 488 nm Wellenlänge und 2,4 % Power. Die Emission wurde mit Hilfe eines Bandpassfilters der Bandbreite 490–555 nm aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder wurden mit dem ImageJ Programm (<https://rsb.info.nih.gov/ij/>) in einem individuell zugeschnittenen Vorgang auf Grundlage eines Schwellenwertes ausgewertet. Zunächst erfolgten im ImageJ Programm eine Subtraktion des Hintergrundes (rolling ball radius von 30 Pixeln und sliding paraboloid) und ein „Glätten“ (Smoothing). Dann wurden die Bilder in binäre Bilder umgewandelt. Ein Schwellenwert wurde bei 22 festgelegt. Um unspezifische Signale zu eliminieren, definierten wir die minimale Plaquegröße als 8 µm². Verbleibende unspezifische Signale wurden manuell entfernt. Die übrigen Plaqueablagerungen wurden innerhalb einer definierten Fläche (ROI – Region of Interest) identifiziert und ihre Oberflächengröße bestimmt. Das Fenster (ROI) zur Bestimmung der Plaquefläche betrug 0,3 mm² und wurde manuell in die hippocampale CA1-Region gelegt und dann hinsichtlich der laminaren Verteilung subdividiert.

2.5 Datenanalyse

Die aufgenommenen Daten wurden in IGOR PRO (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) mittels speziell angepasster Macros analysiert. Hierbei wurden jeweils 12 Versuchsläufe gemittelt.

Um die Spitzenwerte von Exzitation und Inhibition in den verschiedenen hippocampalen Schichten zu bestimmen, wurde die Veränderung der Fluoreszenz räumlich für definierte ROIs (Regions of Interest) in Stratum Oriens, Stratum Radiatum und Stratum Lacunosum-Moleculare gemittelt. Die Signale der Bildgebung mit einem spannungsabhängigen Farbstoff (VSD Imaging) wurden mit einem „Niedrigpassfilter“ (Lowpassfilter) bei 200 Hz und durch Boxcar-„Glätten“ (Smoothing) mit 11 Wiederholungen weiterbearbeitet. Um das lichtabhängige Ausbleichen des Farbstoffes zu korrigieren, erfolgte die Subtraktion einer angepassten doppelt exponentiellen Ausgleichskurve. Die Daten wurden als die Änderung der Fluoreszenz dividiert durch die doppelt exponentiell angepasste Ausgleichskurve der Fluoreszenz ($\Delta F/F$) dargestellt. Die Werte wurden mit -1 multipliziert, sodass – wie in der Elektrophysiologie üblich – exzitatorische Signale als positive Werte und inhibitorische Signale als negative Werte dargestellt wurden. Die Spitzenwerte der Veränderung der Fluoreszenz ($\% \Delta F/F$) wurden während der verschiedenen Stimulationsprotokolle in folgenden Zeitfenstern nach elektrischer Stimulation aufgenommen: Schaffer Kollateral Stimulation: 200 ms; Einzelstimulation des temporoammonischen Pfades: Exzitation 20 ms, Inhibition 20–120 ms; Burst Stimulation des temporoammonischen Pfades: Exzitation 60 ms, Inhibition 120-160 ms; Alveus Stimulation: Exzitation 40 ms, Inhibition 10–50 ms. Die durchschnittliche Fluoreszenz 100 ms vor Beginn der Stimulation wurde als Baseline genutzt. Bei der Analyse der Interaktion von Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad wurden die Exzitation des temporoammonischen Pfades nach vorangegangener Schaffer Kollateral Stimulation (100 ms zuvor) mit der arithmetischen Summe von isolierter Schaffer Kollateral Stimulation plus isolierter Stimulation des temporoammonischen Pfades verglichen. Die Exzitation wurde in einem Zeitfenster von 40 ms nach Stimulation des temporoammonischen Pfades bestimmt.

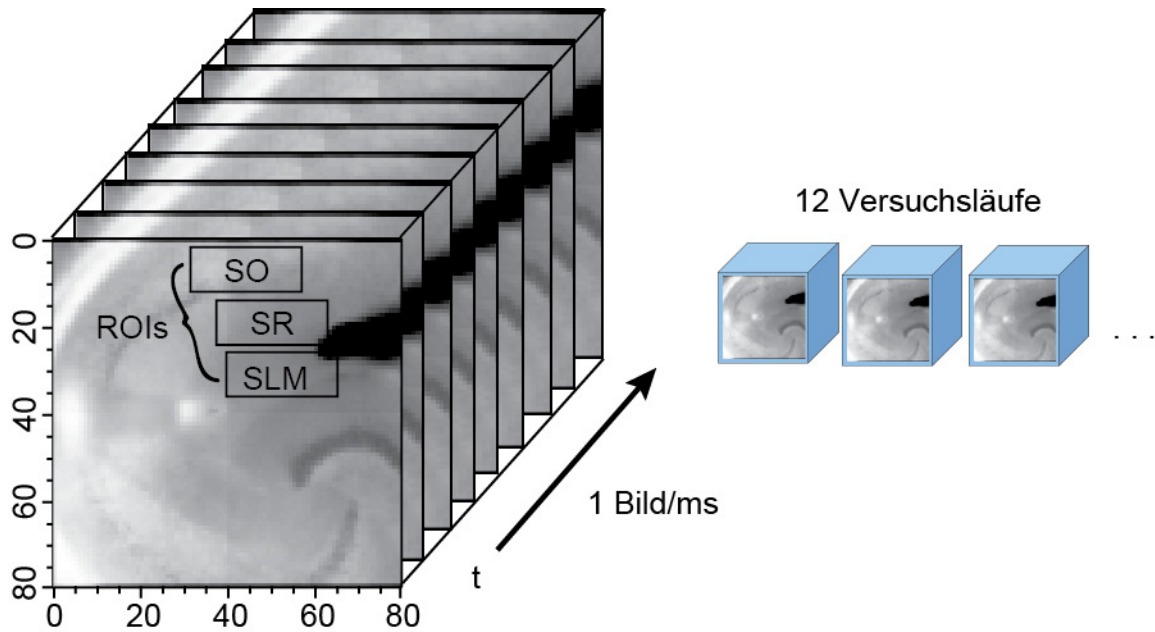


Abb. 3: Exemplarische VSD-Aufnahmen in Graustufen

Abb. 3 zeigt exemplarische VSD-Aufnahmen in Graustufen. Diese wurden mit einer Frequenz von 1kHz aufgenommen. Insgesamt wurden zur weiteren Datenanalyse jeweils 12 Versuchsläufe gemittelt.

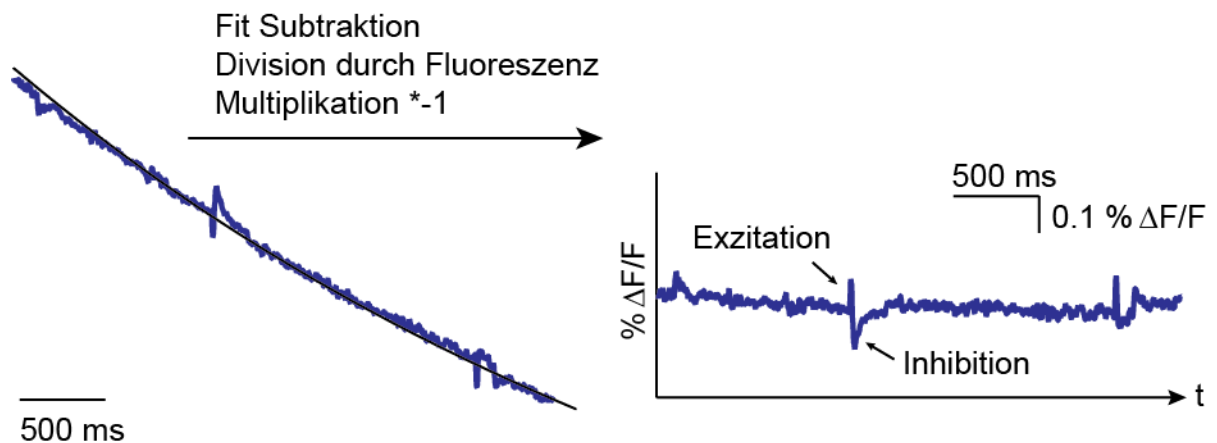


Abb. 4: Signalverarbeitung des VSD-Imaging

Abb. 4 stellt exemplarisch die Signalverarbeitung in einer Region of Interest (ROI) dar. Die Daten wurden räumlich innerhalb der entsprechenden Region of Interest gemittelt sowie eine doppelt exponentielle Ausgleichskurve angepasst (Abb. links). Nach Subtraktion der doppelt exponentiellen Ausgleichskurve, Multiplikation *-1 sowie Division durch die Ausgleichskurve erhielten wir die rechts abgebildete Darstellung der Fluoreszenz als $\% \Delta F/F$ über die Zeit.

Um die räumliche Ausbreitung der durch Stimulation der Schaffer Kollateralen hervorgerufenen Exzitation und Inhibition auszuwerten, erstellten wir Karten von aktivierten Pixeln. Hierfür erfolgte zunächst für jeden Pixel eine Subtraktion der doppelt exponentiellen Ausgleichskurve, um das Fotobleichen auszugleichen. Der korrigierte Film wurde dann Pixel für Pixel wie oben beschrieben mittels Tiefpassfilter (Lowpassfilter) und „Glätten“ (Smoothing) weiterbearbeitet. Die durchschnittliche Fluoreszenz 200 ms vor der Stimulation nutzten wir als Baseline. Der gemittelte Wert der Baseline wurde genutzt, um $\Delta F/F$ zu berechnen. Binäre Masken wurden erstellt, wobei erregte oder inhibierte Pixel als diejenigen definiert wurden, die ein Signal aufwiesen, welches mindestens zwei Standardabweichungen größer (Exzitation) beziehungsweise kleiner (Inhibition) war als der Baseline Wert. Daten wurden für eine Region of Interest (ROI) akquiriert, welche die gesamte CA1-Region enthielt und wurden als % aktivierte Pixel dargestellt. Die Region of Interest in CA1 wurde dann weiter in je eine Region of Interest für Stratum Oriens, Stratum Radiatum und Stratum Lacunosum-Moleculare unterteilt. Die maximale Prozentzahl aktivierter Pixel wurde in einem Zeitfenster von 200 ms nach der Stimulation detektiert. Die Bandbreite der Pseudocolor Darstellung betrug -5 bis +5 Standardabweichungen von der Baseline.

2.6 Statistik

Durchschnittswerte in Text und Abbildungen wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgedrückt. Die statistische Analyse der normalverteilten Daten erfolgte mit Hilfe des ungepaarten Student's T-Test. Bei nichtparametrischen Daten wurden Unterschiede zwischen wildtyp und transgenen Mäusen mit Hilfe des Mann-Whitney Tests analysiert. Die Auswertung der gepaarten Untersuchungen während simultaner Stimulation an verschiedenen Orten erfolgte bei parametrischen Daten mittels gepaartem T-Test. Sonst wurde der "Wilcoxon signed rank Test" verwendet. Zur Analyse von mehreren Gruppen nutzten wir den „Kruskal-Wallis-Test“ mit anschließendem „Dunn´s post Test“. Alle statistischen Tests wurden in Prism4 und Prism6 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Daten wurden dann als signifikant betrachtet, wenn ein p-Wert kleiner 0,05 erreicht wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Gestörtes Gleichgewicht zwischen Inhibition und Exzitation nach Stimulation der Schaffer Kollateralen

Wir untersuchten die lokalen Mikronetzwerke in der hippocampalen CA1-Region in Versuchsmäusen des APP/PS1-Modells mit nachgewiesener cerebraler Plaquelagerung mittels Voltage Sensitive Dye Imaging. Mit Hilfe einer Thioflavinfärbung bestimmten wir die Plaquemenge. Die transgenen Mäuse zeigten durchschnittlich $9,55 \pm 1,04$ Plaques in der CA1-Region mit einer durchschnittlichen Plaqueläche von $1009,75 \pm 98,3 \mu\text{m}^2$. Dies entsprach $0,35 \pm 0,03 \%$ der gesamten ausgewerteten Fläche (ROI) in der CA1-Region. In wildtyp Mäusen hingegen konnten keine Plaquelagerungen detektiert werden.

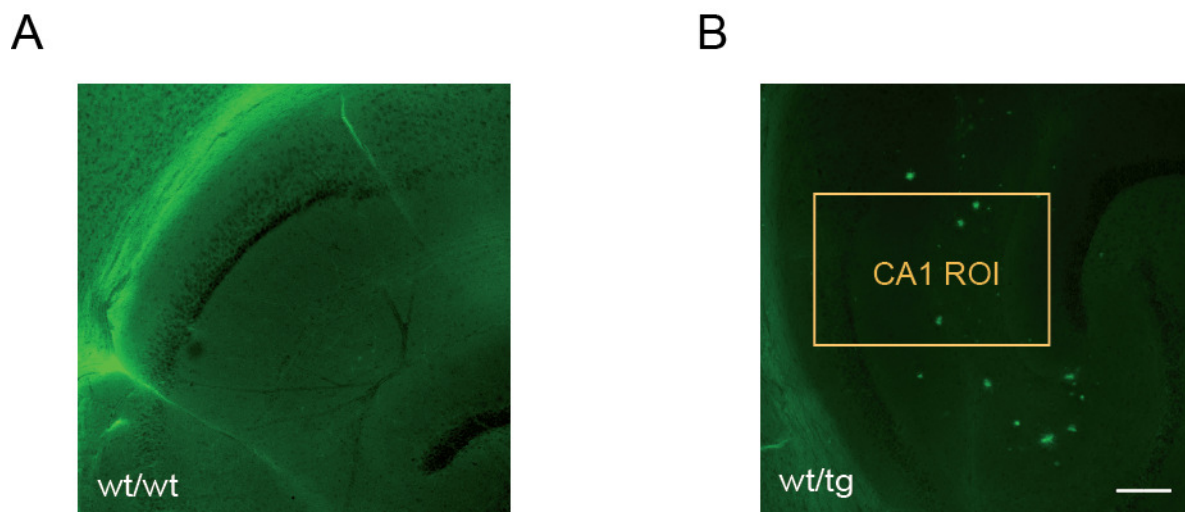


Abb. 5: Thioflavinfärbung zur Plaquedetektion

Abb. 5 zeigt Aufnahmen eines konfokalen Mikroskops nach Färbung mit Thioflavin-S (grün) von horizontalen hippocampalen Schnitten von wildtyp (A) und APP/PS-Mäusen mit Amyloidplaquelagerungen (B). Der gelbe Rahmen zeigt die Fläche in der CA1-Region, in der die Plaquemenge bestimmt wurde (Region of Interest, ROI). Der Skalierungsbalken repräsentiert $100 \mu\text{m}$. Die Amyloidplaquelagerungen erscheinen in hellgrün.

Amyloidplaques	Fläche (μm^2)	Anzahl
Wildtyp (n = 30)	0	0
Transgen (n = 29)	1009,75 \pm 98,3	9,55 \pm 1,04

Tab. 1: Quantifikation der Amyloidplaqueablagerungen in der CA1-Region

Tab. 1 fasst die gemessenen Parameter zur Bestimmung der Plaqueablagerung in wildtyp und APP/PS1-Mäusen zusammen. \pm gibt den SEM an.

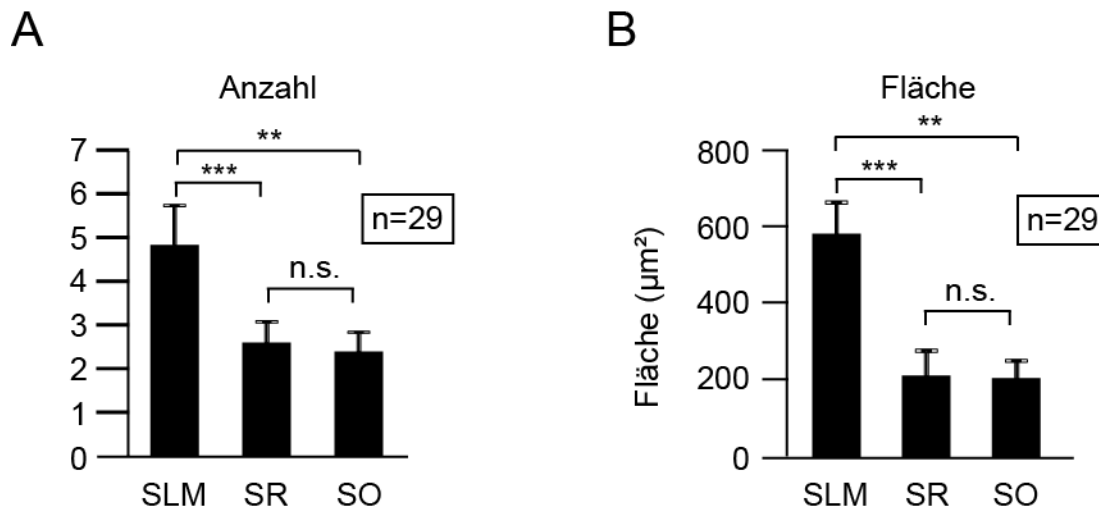


Abb. 6: Laminare Verteilung der A β -Plaqueablagerungen in der CA1-Region

Abb. 6 stellt die Verteilung der Amyloidplaqueablagerungen in APP/PS1-Mäusen untergliedert in die Schichten Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM), Stratum Radiatum (SR) und Stratum Oriens (SO) dar. Die signifikant höchste Amyloidplaqueablagerung fanden wir in Stratum Lacunosum-Moleculare – sowohl hinsichtlich der absoluten Zahl der Amyloidplaqueablagerungen (A) als auch hinsichtlich der Gesamtfläche der Ablagerung (B).

Plaquezahl	SLM	SR	SO
Durchschnitt	4,83	2,59	2,38
SEM	0,55	0,73	0,44

Tab. 2: Plaquezahl in APP/PS1-Mäusen in laminarer Verteilung

Tab. 2 zeigt die durchschnittliche Plaquezahl in Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM), Stratum Radiatum (SR) und Stratum Oriens (SO).

Plauefläche [μm^2]	SLM	SR	SO
Durchschnitt	586,63	214,48	207,71
SEM	81,24	64,87	46,15

Tab. 3: Laminare Verteilung der Plauefläche in APP/PS1-Mäusen

Tab. 3 zeigt die durchschnittliche Plauefläche in APP/PS1-Mäusen in Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM), Stratum Radiatum (SR) und Stratum Oriens (SO).

Um die Einflüsse von der hippocampalen CA3-Region auf die CA1-Region zu untersuchen, stimulierten wir zunächst die Axone der Schaffer Kollaterale. Die elektrische Stimulation in Stratum Radiatum erzeugte eine schnelle exzitatorische und eine langsame inhibitorische Antwort in allen Schichten der CA1-Region. Während die maximale exzitatorische Fluoreszenz in APP/PS1-Mäusen in keiner der Schichten der CA1-Region im Vergleich zu wildtyp Mäusen einen signifikanten Unterschied aufwies, zeigte sich die Inhibition in APP/PS1-Tieren dramatisch herabgesetzt (-39,98 % in Stratum Oriens, Wildtyp -0,1080 % $\Delta F/F$ vs. Transgen -0,0648 % $\Delta F/F$, $p=0,0002$, Mann-Whitney; -54,03 % in Stratum Radiatum, Wildtyp -0,0567 % $\Delta F/F$ vs. Transgen -0,0261 % $\Delta F/F$, $p=0,0258$, Mann-Whitney). Es ergab sich folglich ein stark gestörtes Verhältnis von Inhibition zu Exzitation (Ratio Inhibition/Exzitation in Stratum Oriens Wildtyp -1,92 vs. Transgen -0,82, $p=0,0005$, Mann-Whitney; Stratum Radiatum Wildtyp -0,25 vs. Transgen -0,08, $p=0,039$, Mann-Whitney.)

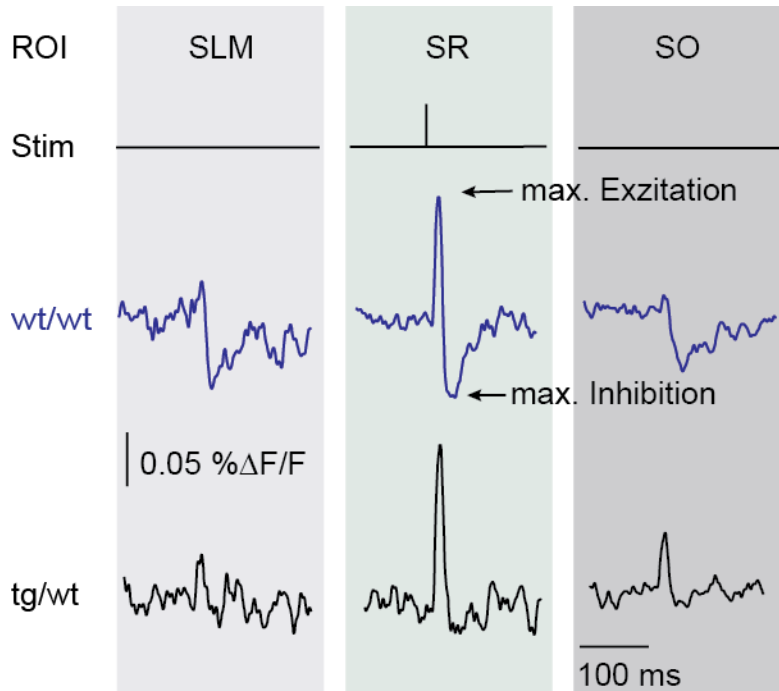


Abb. 7: Repräsentative Kurven nach Schaffer Kollateral Stimulation

Abb. 7 zeigt repräsentative Kurven der Veränderung der Fluoreszenz in $\% \Delta F/F$ in wildtyp Mäusen (obere Kurven, blau) und transgenen Mäusen (untere Kurven, schwarz) gemittelt für die Regions of Interest (ROIs) in Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM), Stratum Radiatum (SR) sowie Stratum Oriens (SO). Die Signale des Voltage Sensitive Dye Imaging wurden über 12 Versuchsläufe gemittelt. Die schnelle aufwärtsgerichtete Komponente der Kurve repräsentiert eine Depolarisation, wohingegen die langsame negative Komponente eine Hyperpolarisation widerspiegelt. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der Inhibition in Stratum Radiatum und Stratum Oriens der transgenen Tiere (untere Kurven, schwarz).

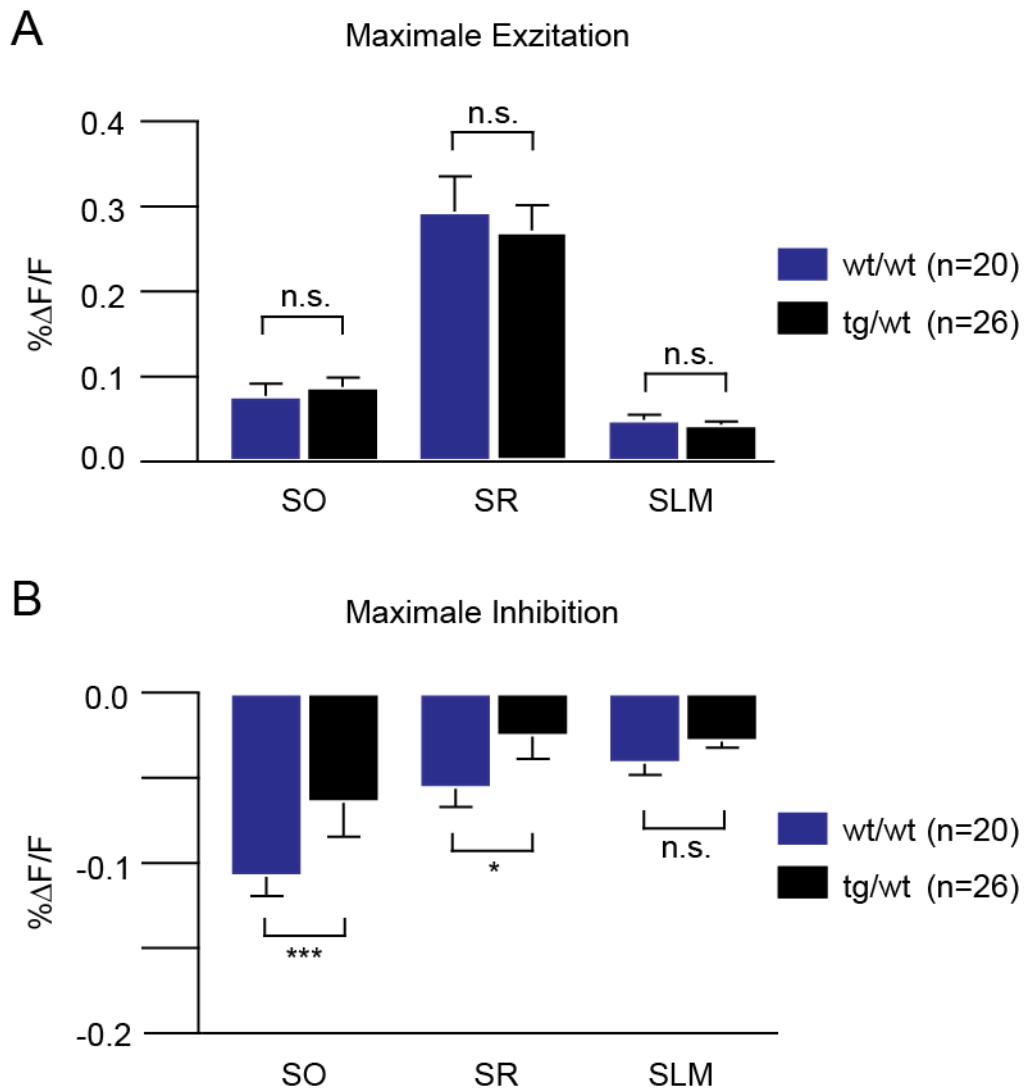


Abb. 8: Exzitation und Inhibition nach Schaffer Kollateral Stimulation

Abb. 8 fasst die Daten zu maximaler exzitatorischer (A) und inhibitorischer (B) Veränderung der Fluoreszenz in % $\Delta F/F$ in Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) sowie Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM) nach Schaffer Kollateral Stimulation zusammen. Die Sterne symbolisieren eine signifikant reduzierte maximale inhibitorische Änderung der Fluoreszenz in APP/PS1-Mäusen in den Schichten Stratum Radiatum und Stratum Oriens nach Schaffer Kollateral Stimulation (blaue Balken Wildtyp; schwarze Balken Transgen).

Fluoreszenz [% $\Delta F/F$]	SO		SR		SLM	
	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.
WT (n=20)	0,000778	-0,001080	0,002938	-0,000567	0,000493	-0,000415
SEM	0,000138	0,000110	0,000413	0,000105	0,000058	0,000065
TG (n=26)	0,000879	-0,000648	0,002720	-0,000261	0,000432	-0,000289
SEM	0,000111	0,000200	0,000291	0,000127	0,000030	0,000034

Tab. 4: Exzitation und Inhibition nach Stimulation der Schaffer Kollateralen

Tab. 4 zeigt die Veränderung der Fluoreszenz in % $\Delta F/F$ in Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) sowie Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM) nach Schaffer Kollateral Stimulation.

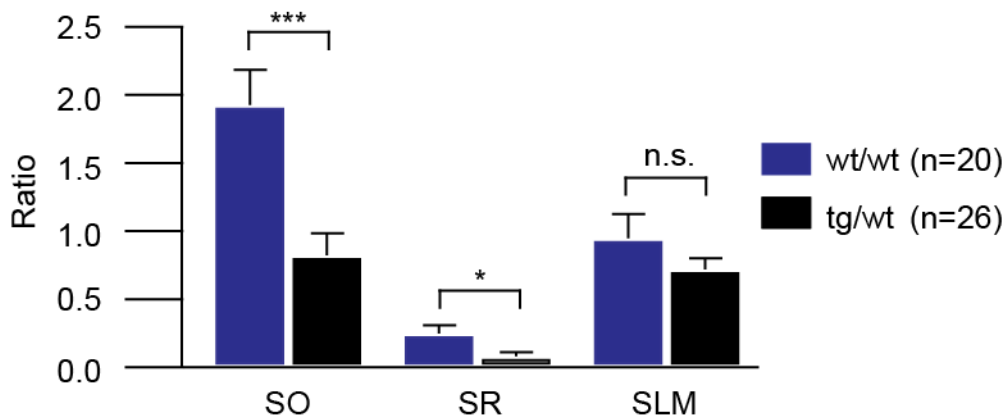


Abb. 9: Verhältnis von Inhibition/Exzitation nach Schaffer Kollateral Stimulation

In Abb. 9 sind die Lamina spezifischen Verhältnisse von Inhibition zu Exzitation nach Schaffer Kollateral Stimulation dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich in der Gruppe der transgenen Tiere ein deutliches Missverhältnis zu Ungunsten der Inhibition in Stratum Oriens und Stratum Radiatum. Zur besseren Darstellung wurde eine negative Ratio als Betrag abgebildet.

Ratio	SO	SR	SLM
WT (n=20)	-1,923383	-0,248168	-0,948857
SEM	0,254769	0,058563	0,179382
TG (n=26)	-0,821746	-0,079891	-0,721384
SEM	0,162127	0,033055	0,078827

Tab. 5: Verhältnis von Inhibition/Exzitation nach Schaffer Kollateral Stimulation

Tab. 5 stellt das Verhältnis von Inhibition zu Exzitation in Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) sowie Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM) nach Schaffer Kollateral Stimulation dar.

Im Anschluss rekrutierten wir selektiv lokale rückwärts gerichtete inhibitorische Schleifen der CA1-Region durch Stimulation des Alveus. Passend zu den oben beschriebenen Ergebnissen der vorwärts gerichteten Inhibition fanden wir auch für die durch Stimulation des Alveus hervorgerufene retrograde Inhibition deutlich herabgesetzte Werte. Sowohl die maximal gemessene inhibitorische Änderung der Fluoreszenz (Stratum Oriens -34,86 %, Wildtyp -0,0561 % $\Delta F/F$ vs. Transgen -0,0366 % $\Delta F/F$, $p=0,0406$, Mann-Whitney; Stratum Radiatum -49,18%, Wildtyp -0,0545 % $\Delta F/F$ vs. Transgen -0,0277 % $\Delta F/F$, $p=0,037$, Mann-Whitney) als auch das Verhältnis zwischen Exzitation und Inhibition waren deutlich gestört (Ratio Inhibition/Exzitation in Stratum Oriens Wildtyp -1,69 vs. Transgen -0,68, $p=0,0015$, Mann-Whitney; Stratum Radiatum Wildtyp -1,69 vs. Transgen -0,79, $p=0,0327$, Mann-Whitney).

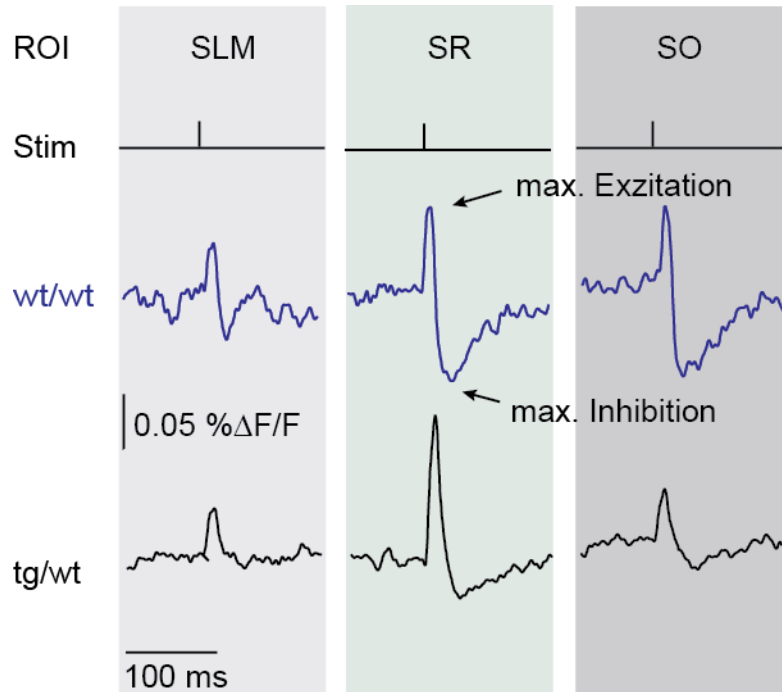


Abb. 10: Repräsentative Kurven nach Stimulation des Alveus

Abb. 10 zeigt repräsentative Kurven der Veränderung der Fluoreszenz $\% \Delta F/F$ in wildtyp Mäusen (obere Kurven, blau) und transgenen Mäusen (untere Kurven, schwarz) gemittelt für die Regions of Interest (ROIs) in Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM), Stratum Radiatum (SR) sowie Stratum Oriens (SO) nach Stimulation des Alveus. Die Signale des Voltage Sensitive Dye Imaging wurden über 12 Versuchsläufe gemittelt. Der schnelle aufwärts laufende Teil der Kurve repräsentiert eine Depolarisation, wohingegen die langsame negative Komponente eine Hyperpolarisation zeigt. Wie auch nach Stimulation der Schaffer Kollateralen zeigt sich eine signifikante Reduktion der Inhibition in Stratum Radiatum und Stratum Oriens der transgenen Tiere.

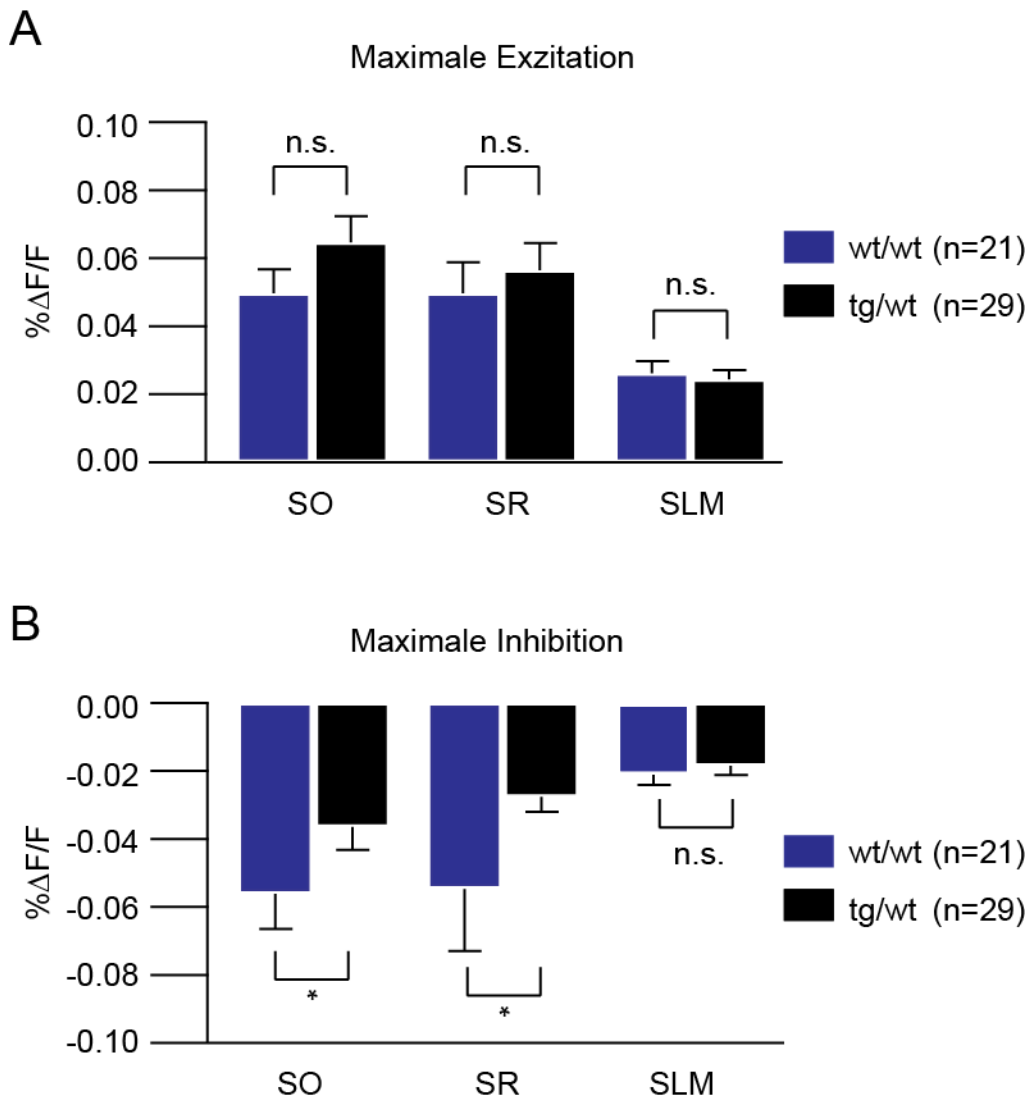


Abb. 11: Exzitation und Inhibition nach Stimulation des Alveus

Abb. 11 zeigt eine Zusammenfassung der Daten zu maximaler exzitatorischer (A) und inhibitorischer (B) Veränderung der Fluoreszenz in % $\Delta F/F$ in Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) sowie Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM) nach Stimulation des Alveus. Die Sterne zeigen eine signifikant reduzierte maximale inhibitorische Änderung der Fluoreszenz in den transgenen Tieren in den Schichten Stratum Radiatum und Stratum Oriens (blaue Balken Wildtyp; schwarze Balken Transgen).

[% $\Delta F/F$]	SO		SR		SLM	
	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.
WT (n=21)	0,000498	-0,000561	0,000496	-0,000546	0,000262	-0,000211
SEM	0,000071	0,000104	0,000092	0,000182	0,000035	0,000028
TG (n=29)	0,000646	-0,000366	0,000565	-0,000277	0,000245	-0,000187
SEM	0,000078	0,000068	0,000079	0,000043	0,000028	0,000028

Tab. 6: Exzitation und Inhibition nach Stimulation des Alveus

Tab. 6 zeigt die Veränderung der Fluoreszenz in % $\Delta F/F$ in Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) sowie Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM) nach Stimulation des Alveus.

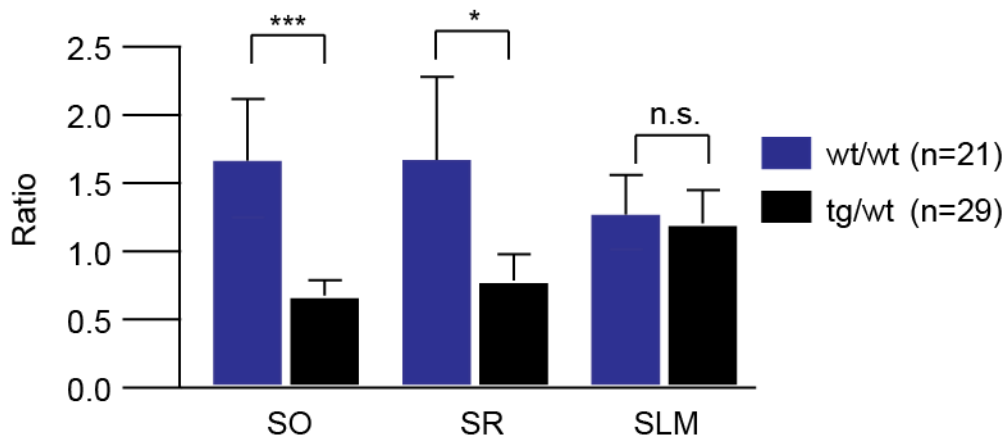


Abb. 12: Verhältnis von Inhibition zu Exzitation nach Alveusstimulation

In Abb. 12 sind die Lamina spezifischen Verhältnisse von Inhibition und Exzitation nach Stimulation des Alveus dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich vergleichbar mit der Stimulation der Schaffer Kollateralen auch nach Alveusstimulation in der Gruppe der transgenen Tiere ein deutliches Missverhältnis zwischen Inhibition und Exzitation in Stratum Oriens und Stratum Radiatum. Zur besseren Darstellung wurde eine negative Ratio als Betrag abgebildet.

Ratio	SO	SR	SLM
WT (n=21)	-1,686345	-1,692036	-1,289120
SEM	0,436430	0,590725	0,273771
TG (n=29)	-0,680097	-0,787844	-1,209477
SEM	0,108562	0,188377	0,242194

Tab. 7: Verhältnis von Inhibition zu Exzitation nach Alveusstimulation

3.2 Eingeschränkte räumliche Inhibition mit Ausdehnung der Exzitation

Anschließend untersuchten wir die räumliche Ausbreitung der durch Schaffer Kollateral Stimulation hervorgerufenen Exzitation und Inhibition. In der Gruppe der APP/PS1-Versuchstiere fanden wir eine signifikant erhöhte Ausbreitung der Erregung in Stratum Oriens. Die Exzitation breitete sich effektiv bis in die proximalen Dendriten und axosomatischen Kompartimente aus. Sowohl die maximale räumliche Ausdehnung der Erregung als auch die durchschnittlich erregte Fläche (Messzeitpunkt 200 ms nach Stimulation) waren in den APP/PS1-Versuchstieren in Stratum Oriens deutlich vergrößert (maximale Ausdehnung +83,89 %, Wildtyp 39,05 % aktivierte Pixel vs. Transgen 71,80 % aktivierte Pixel, $p=0,0005$, Mann-Whitney; durchschnittlich erregte Fläche +330,97 %, Wildtyp 2,48 % aktivierte Pixel vs. Transgen 10,69 % aktivierte Pixel, $p<0,0001$, Mann-Whitney). Die inhibitorische räumliche Antwort hingegen war stark eingeschränkt. In der Gruppe der transgenen APP/PS1-Versuchstiere konnte durch Schaffer Kollateral Stimulation lediglich eine deutlich kleinere inhibitorische Fläche in der CA1-Region rekrutiert werden (maximale Ausdehnung der Inhibition -47,31 %, Wildtyp 36,35 % inhibierte Pixel vs. Transgen 21,08 % inhibierte Pixel, $p=0,0024$, Mann-Whitney; durchschnittlich inhibierte Fläche -48,65 %, Wildtyp 12,84 % inhibierte Pixel vs. Transgen 6,59 % inhibierte Pixel, $p=0,0015$, Mann-Whitney). Sowohl in Stratum Oriens als auch in Stratum Radiatum war der Prozentsatz inhibierter Pixel stark herabgesetzt (maximal inhibierte Pixelanzahl Stratum Oriens -34,41 %, Wildtyp 72,38 % inhibierte Pixel vs. Transgen 47,47 % inhibierte Pixel, $p=0,004$, Mann-Whitney; durchschnittlich inhibierte Pixelzahl -46,81 %, Wildtyp 26,28 % inhibierte Pixel vs. Transgen 13,98 % inhibierte Pixel, $p=0,003$, Mann-Whitney; maximal inhibierte Pixelanzahl Stratum Radiatum -42,01 %, Wildtyp 36,35 % vs. Transgen 21,08 %, $p=0,0178$, Mann-Whitney; durchschnittlich inhibierte Pixelzahl -42,91 %, Wildtyp 11,55 % vs. Transgen 6,59 %, $p=0,0158$, Mann-Whitney).

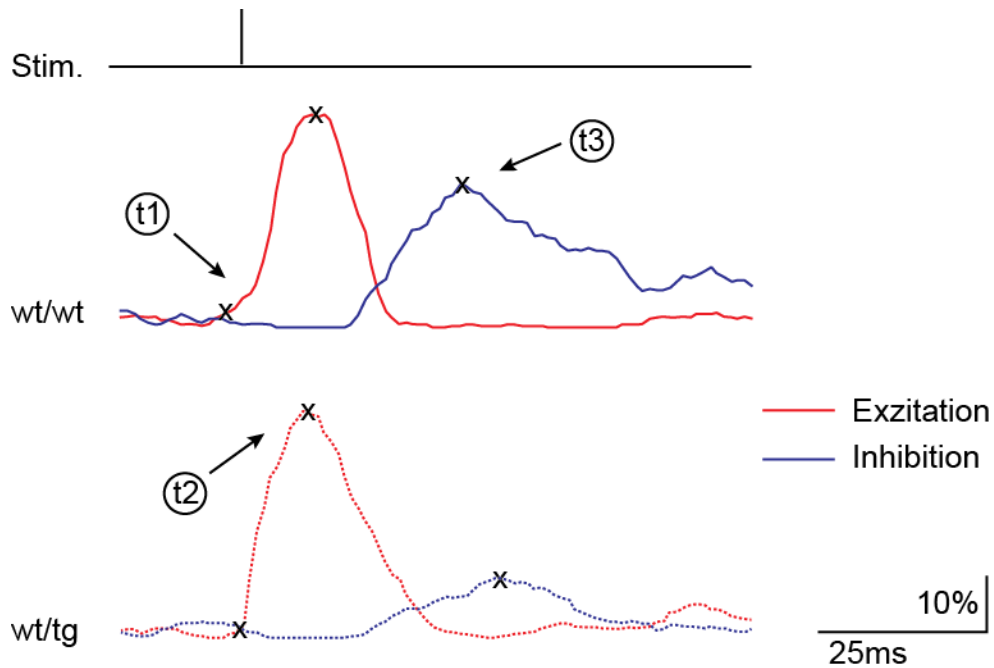
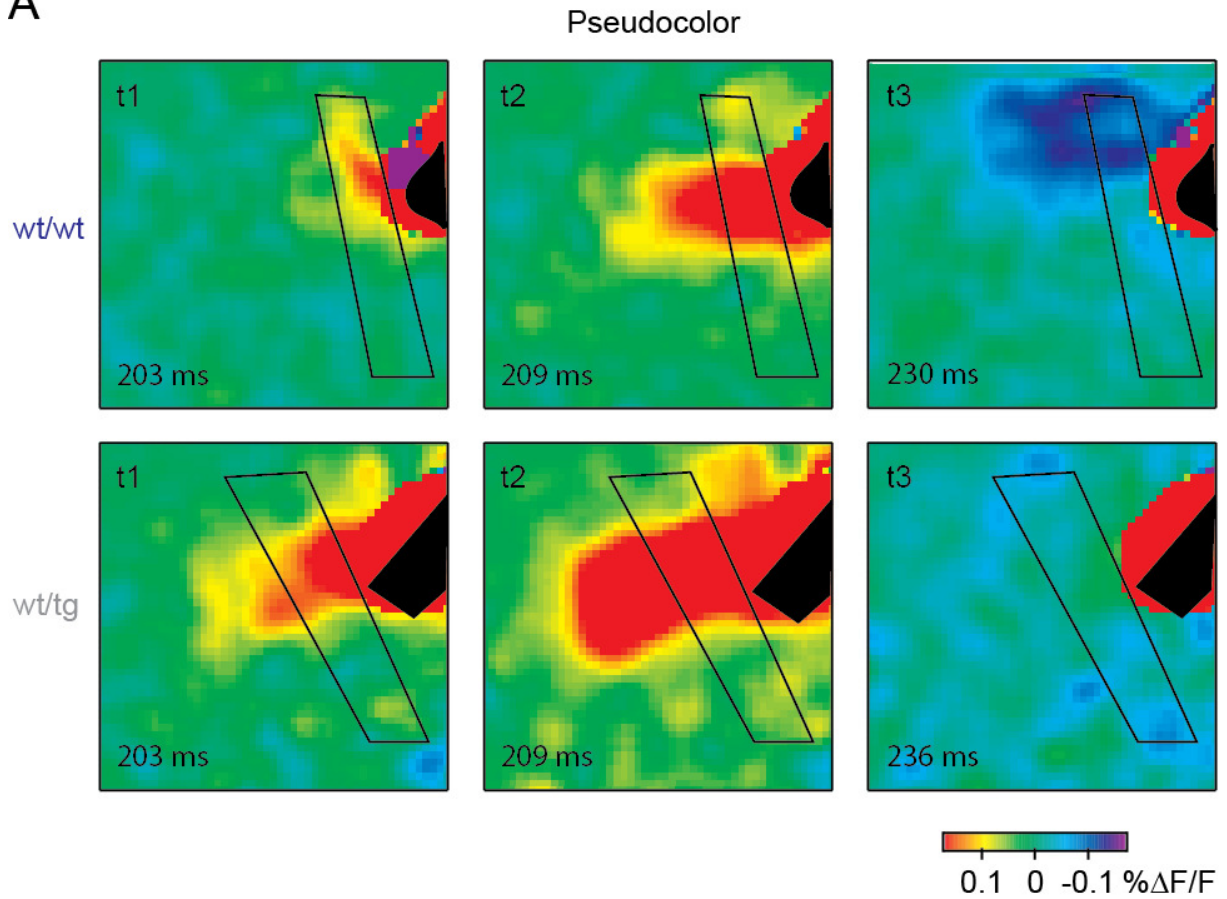


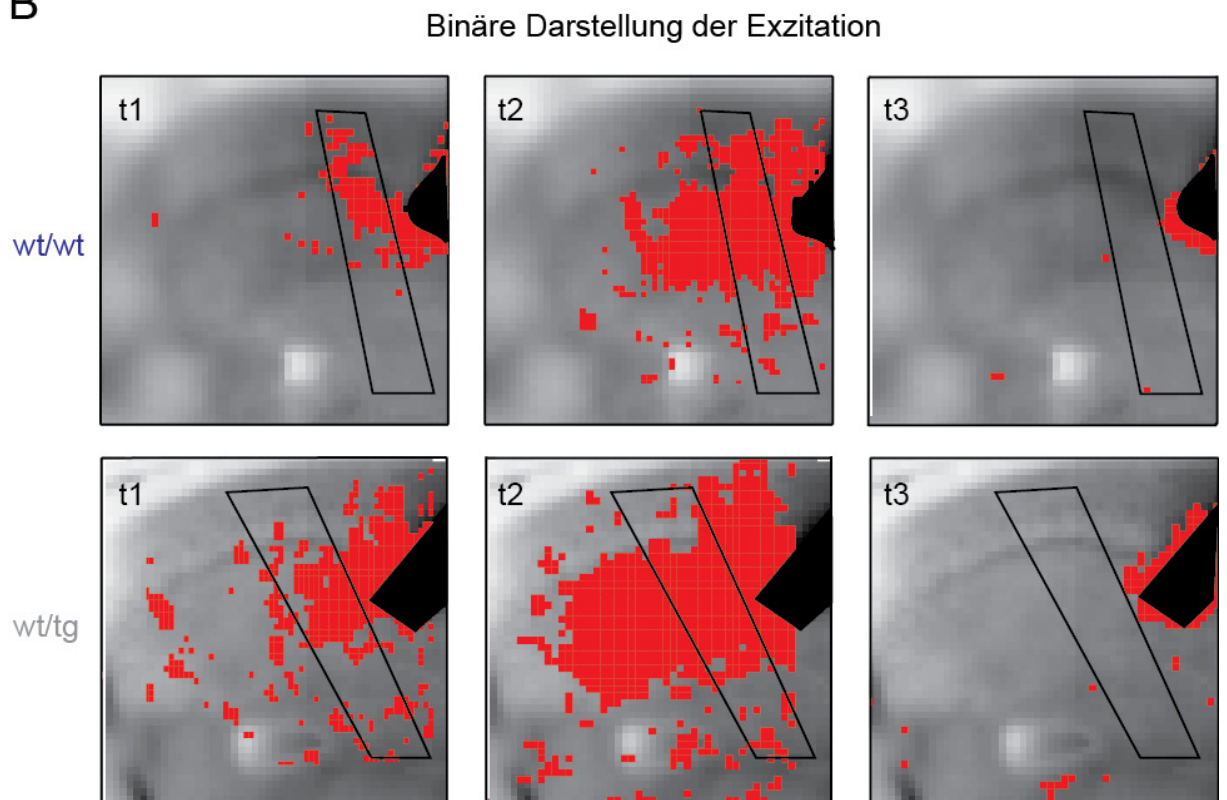
Abb. 13: Prozent aktivierter Pixel in CA1 nach Schaffer Kollateral Stimulation

Abb. 13 zeigt repräsentative Kurven der Prozentzahl aktiver Pixel in der CA1-Region nach Stimulation der Schaffer Kollateralen für wildtyp (oben) und transgene Mäuse (unten). Exzitation ist in Rot dargestellt, Inhibition in Blau. t1, t2 und t3 markieren verschiedene Zeitpunkte: Beginn der Exzitation (t1), Zeitpunkt, zu dem die maximal erregte (t2) sowie Zeitpunkt, zu dem die maximal inhibierte (t3) Fläche gemessen wurde.

A



B



C

Binäre Darstellung der Inhibition

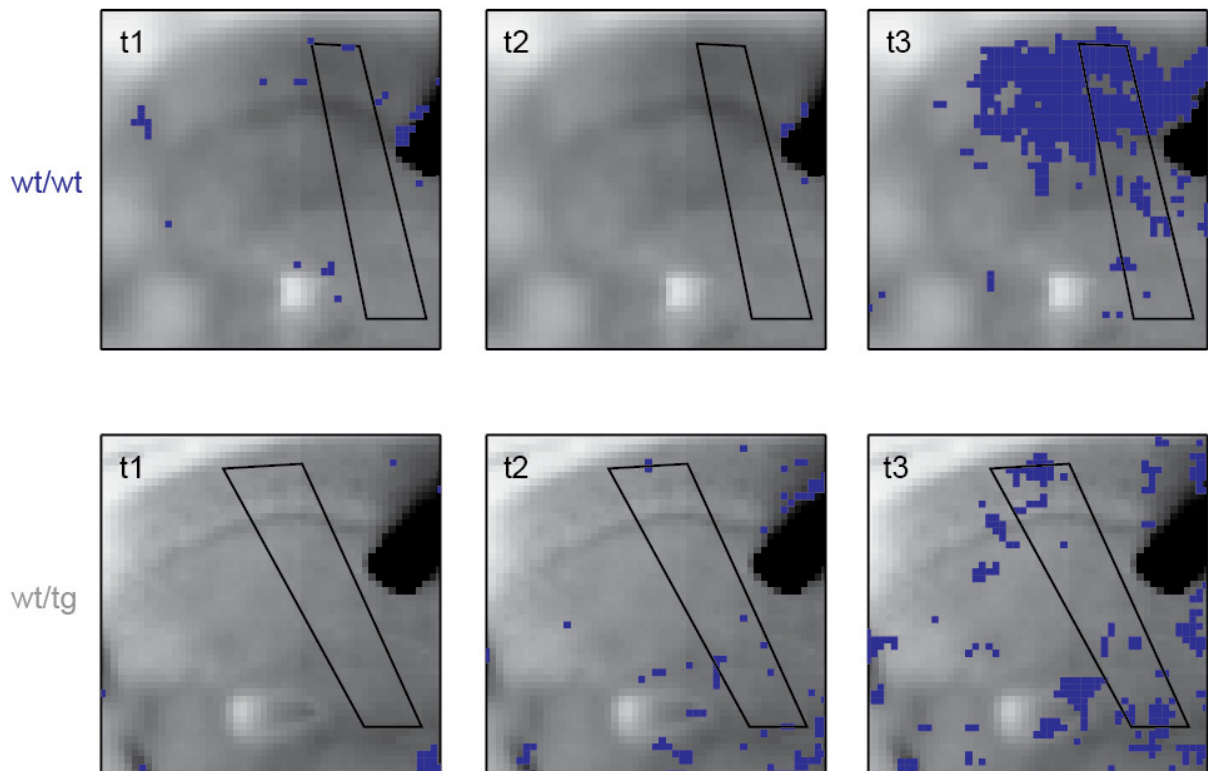


Abb. 14: Räumliche und zeitliche Ausbreitung von Exzitation und Inhibition in CA1 nach Stimulation der Schaffer Kollateralen

Abb. 14 zeigt repräsentative Momentaufnahmen des VSD-Imaging zu den Zeitpunkten t1 (Beginn der Exzitation), t2 (maximale Ausdehnung der Exzitation) und t3 (maximale Ausdehnung der Inhibition). Abb. 14 A zeigt pseudocolor Aufnahmen mit einer Farbskala von $-5 \times$ Standardabweichung (rot) bis $+5 \times$ Standardabweichung (blau) von der Baseline. In Abb. 14 B erfolgt eine binäre Darstellung der Exzitation (rot). Abb. 14 C stellt die Inhibition (blau) dar. Der Schwellenwert, welcher zur Definition eines aktiven Pixels verwendet wurde, betrug größer (Exzitation) beziehungsweise kleiner (Inhibition) $2 \times$ Standardabweichung von der Baseline. Die Aufnahmen der Kontrollgruppe sind jeweils in der oberen Reihe abgebildet. In den jeweiligen unteren Reihen sind exemplarische Aufnahmen der transgenen APP/PS1-Mäuse zu sehen.

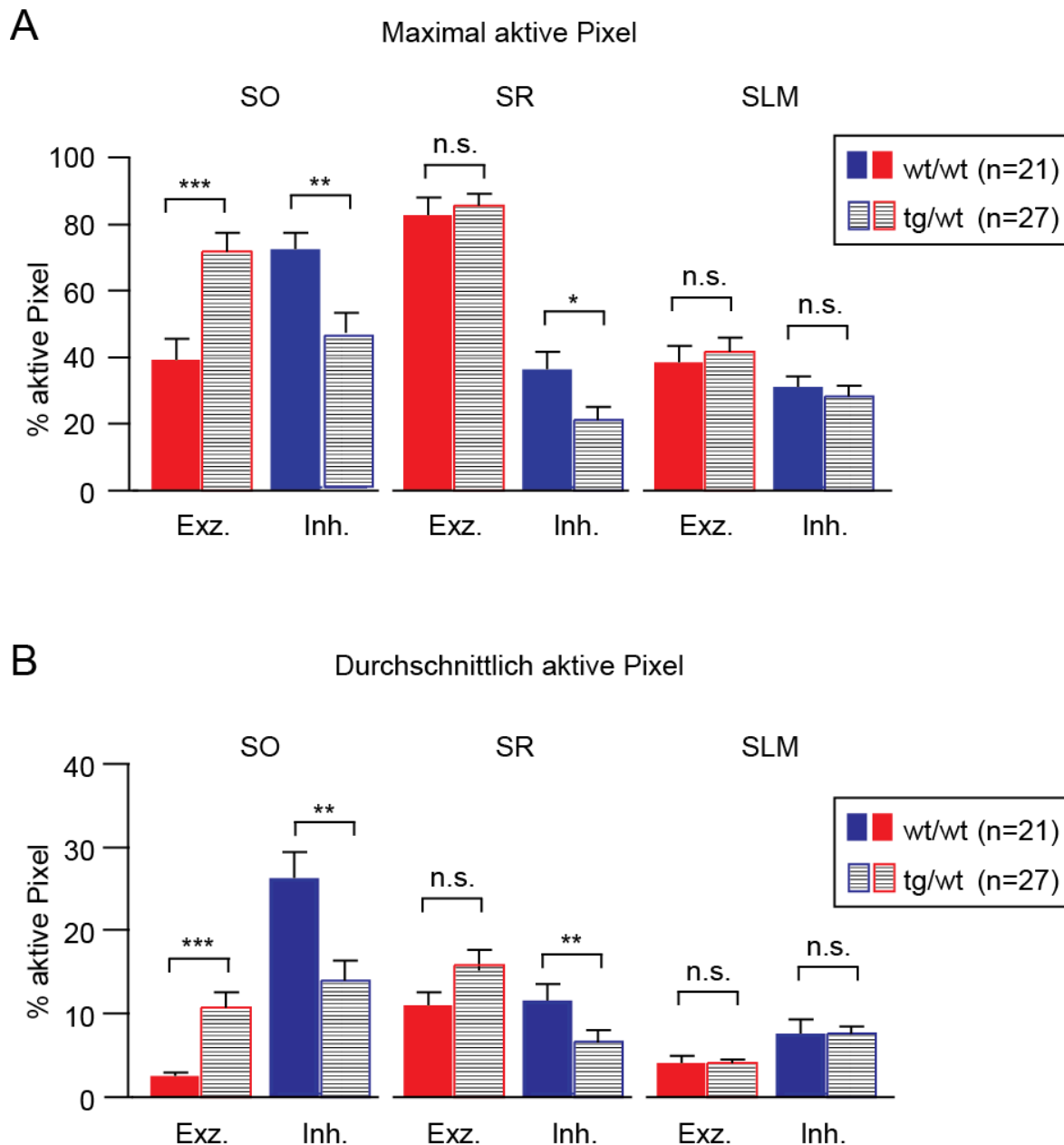


Abb. 15: Aktive Pixel nach Stimulation der Schaffer Kollateralen

Abb. 15 stellt die durchschnittlich gemessenen erregten (rot) und inhibierten (blau) Pixel aufgliedert in Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) und Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM) in % dar. Abb. 15 A zeigt den maximalen Anteil aktiver Pixel innerhalb von 200 ms nach Stimulation der Schaffer Kollateralen. Abb. 15 B zeigt die durchschnittliche Prozentzahl aktiver Pixel innerhalb von 200 ms nach Stimulation. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe sind farbig dargestellt, die der Gruppe der APP/PS1-Versuchstiere gestreift. Man beachte den in der Gruppe der transgenen Versuchstiere in Stratum Oriens stark erhöhten Anteil erregter Pixel, einhergehend mit einer deutlichen Reduktion der Inhibition.

Maximum % aktive Pixel	SO		SR		SLM	
	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.
WT (n=21)	39,05	72,38	82,81	36,35	38,49	31,19
SEM	6,49	4,89	5,41	5,27	4,92	3,29
TG (n=27)	71,80	47,47	85,54	21,08	41,67	28,44
SEM	5,58	5,99	3,43	3,97	4,31	3,19

Tab. 8: Maximal aktive Pixel nach Schaffer Kollateral Stimulation

Tab. 8 stellt die nach Stimulation der Schaffer Kollateralen gemessenen maximal erregten und inhibierten Pixel in % aufgliedert in Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) und Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM) von wildtyp und transgenen Mäusen dar.

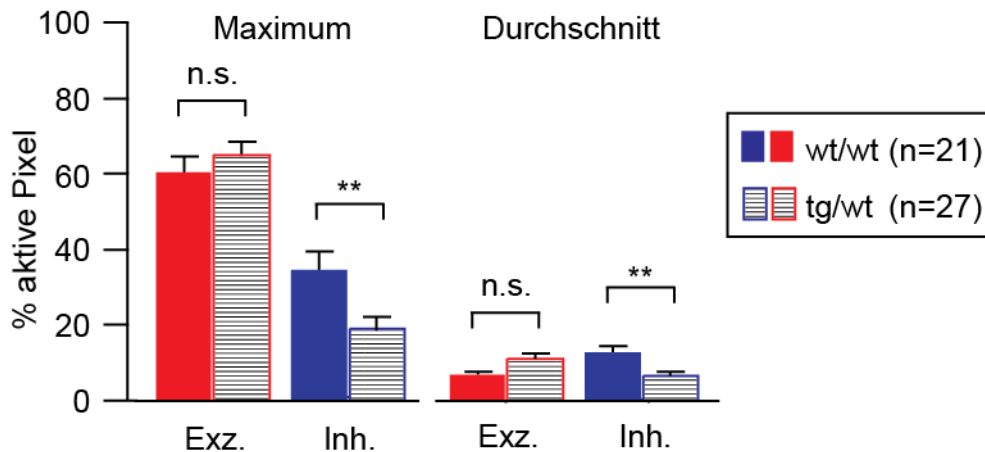


Abb. 16: Anteil aktiver Pixel nach Schaffer Kollateral Stimulation in der gesamten CA1-Region

Abb. 16 zeigt den maximalen Prozentsatz aktiver Pixel (links) sowie den durchschnittlichen Prozentsatz aktiver Pixel (rechts) gemessen in einer Fläche innerhalb der gesamten CA1-Region, welche alle Schichten umfasste (CA1 ROI). Die Ergebnisse der Kontrollgruppe sind farbig dargestellt, die der Gruppe der APP/PS1-Versuchstiere gestreift. Exzitation ist in Rot, Inhibition in Blau abgebildet. Innerhalb der gesamten CA1-Region zeigt sich in der Gruppe der APP/PS1-Versuchstiere eine deutliche Reduktion der inhibierten Fläche.

Durchschn. % aktive Pixel	SO		SR		SLM	
	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.
WT (n=21)	2,48	26,28	11,03	11,55	3,56	7,92
SEM	0,47	3,05	1,54	2,01	0,49	0,67
TG (n=27)	10,69	13,98	15,82	6,59	4,11	7,57
SEM	1,91	2,42	1,86	1,44	0,38	0,88

Tab. 9: Durchschnittlich aktive Pixel in CA1 nach Schaffer Kollateral Stimulation

Tab. 9 stellt die durchschnittlich innerhalb von 200 ms nach Stimulation der Schaffer Kollateralen gemessenen erregten und inhibierten Pixel in % aufgegliedert in Stratum Oriens (SO), Stratum Radiatum (SR) und Stratum Lacunosum-Moleculare (SLM) von wildtyp und transgenen Mäusen dar.

3.3 Verminderte inhibitorische Kontrolle der Schaffer Kollateralen über Input von Schicht III des entorhinalen Cortex

Direkte Informationszuflüsse vom entorhinalen Cortex in die hippocampale CA1-Region über den temporoammonischen Pfad spielen eine wichtige Rolle für das Lernen und die Gedächtnisbildung (Remondes und Schuman, 2004). Daher untersuchten wir im Anschluss an die Schaffer Kollateral Stimulation diesen direkten Zugangsweg in die CA1-Region.

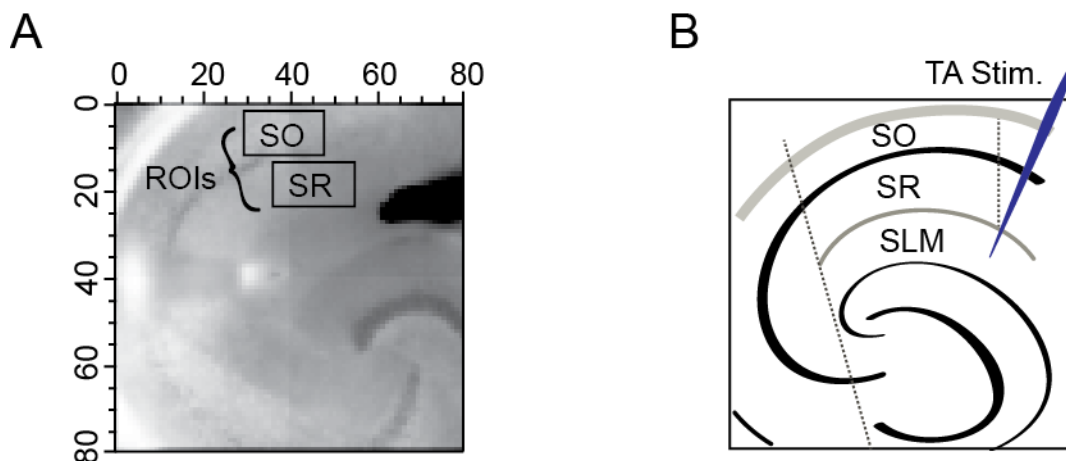


Abb. 17: Schematische Darstellung der Stimulation des temporoammonischen Pfades

Abb. 17 A zeigt einen Schnappschuss einer VSD-Imaging Aufnahme in Graustufen (80 x 80 Pixel) während Stimulation des TA Pfades. Die schwarzen Kästen zeigen die Regionen SO und SR, in denen die Fluoreszenzsignale aufgenommen wurden (Region of Interest, ROI). In Schwarz sieht man die Stimulationselektrode in SLM, wo der temporoammonische Pfad erregt wurde. Abb. 17 B zeigt eine korrespondierende schematische Darstellung des Hippocampus.

Die Burststimulation des temporoammonischen Pfades in Stratum Lacunosum-Moleculare rief in der Gruppe der transgenen APP/PS1-Versuchstiere im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich reduzierte Inhibition in Stratum Oriens und Stratum Radiatum hervor (Stratum Oriens -39,40 %, Wildtyp -0,0545 % $\Delta F/F$ vs. Transgen -0,0330 % $\Delta F/F$, $p=0,0034$, Mann-Whitney; Stratum Radiatum -27,17 %, Wildtyp -0,0423 % $\Delta F/F$ vs. Transgen -0,0308 % $\Delta F/F$, $p=0,0406$, Mann-Whitney). Die Einzelpulsstimulation des temporoammonischen Pfades ergab ebenfalls eine signifikant reduzierte Inhibition in der Gruppe der transgenen APP/PS1-Versuchstiere in Stratum Oriens (-33,24 %, Wildtyp -0,0306 % $\Delta F/F$ vs. Transgen -0,0209 % $\Delta F/F$, $p=0,0112$, Mann-Whitney).

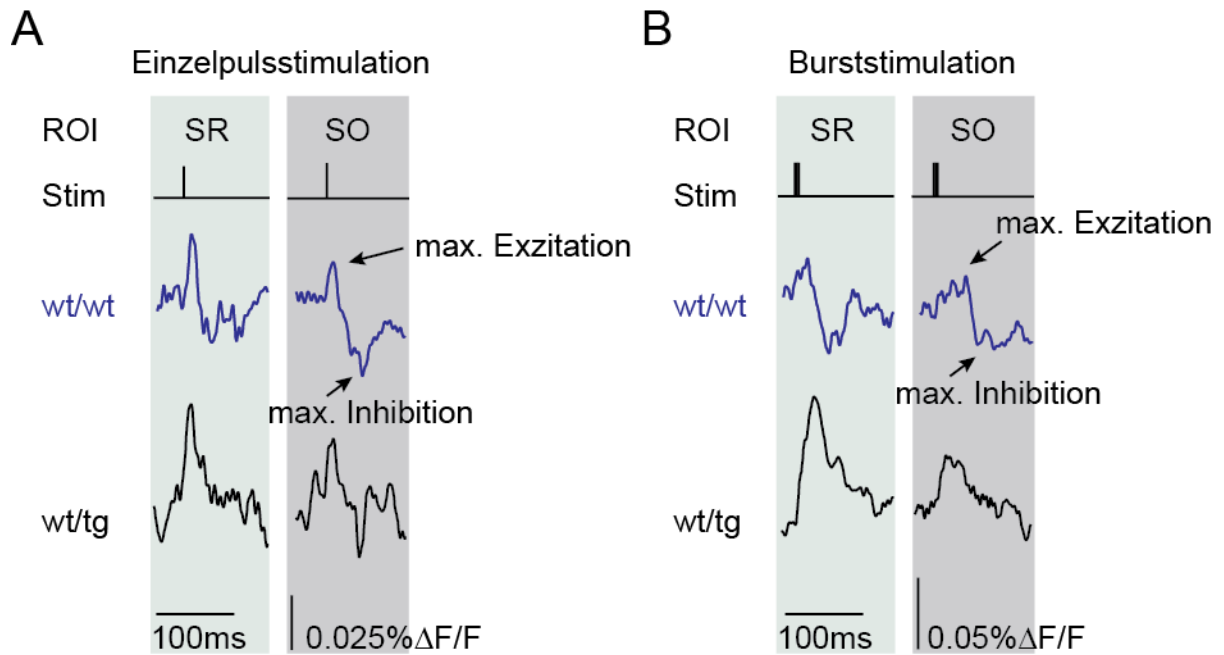


Abb. 18: Repräsentative Kurven der VSD-Imaging Aufnahmen nach Stimulation des temporoammonischen Pfades

Abb.18 zeigt repräsentative Kurven der Veränderung der Fluoreszenz $\% \Delta F/F$ in wildtyp und transgenen Mäusen gemittelt für die Regions of Interest (ROIs) in Stratum Radiatum (SR) und Stratum Oriens (SO) nach Stimulation des temporoammonischen Pfades. Die Signale des Voltage Sensitive Dye Imaging wurden über 12 Versuchsläufe gemittelt. Die aufwärtsgerichtete Komponente der Kurve repräsentiert eine Depolarisation, wohingegen die negative Komponente eine Hyperpolarisation widerspiegelt. Wie auch nach Stimulation der Schaffer Kollateralen zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (obere Kurven, blau) eine Reduktion der Inhibition in Stratum Radiatum und Stratum Oriens der transgenen Tiere (untere Kurven, schwarz).

Es zeigte sich somit, dass sowohl extrahippocampale als auch intrahippocampale Informationszuflüsse in dem untersuchten transgenen Mausmodell der Alzheimer-Krankheit nur eine stark herabgesetzte Inhibition hervorzurufen vermochten, wenn sie die wichtige hippocampale CA1-Output-Region erreichten.

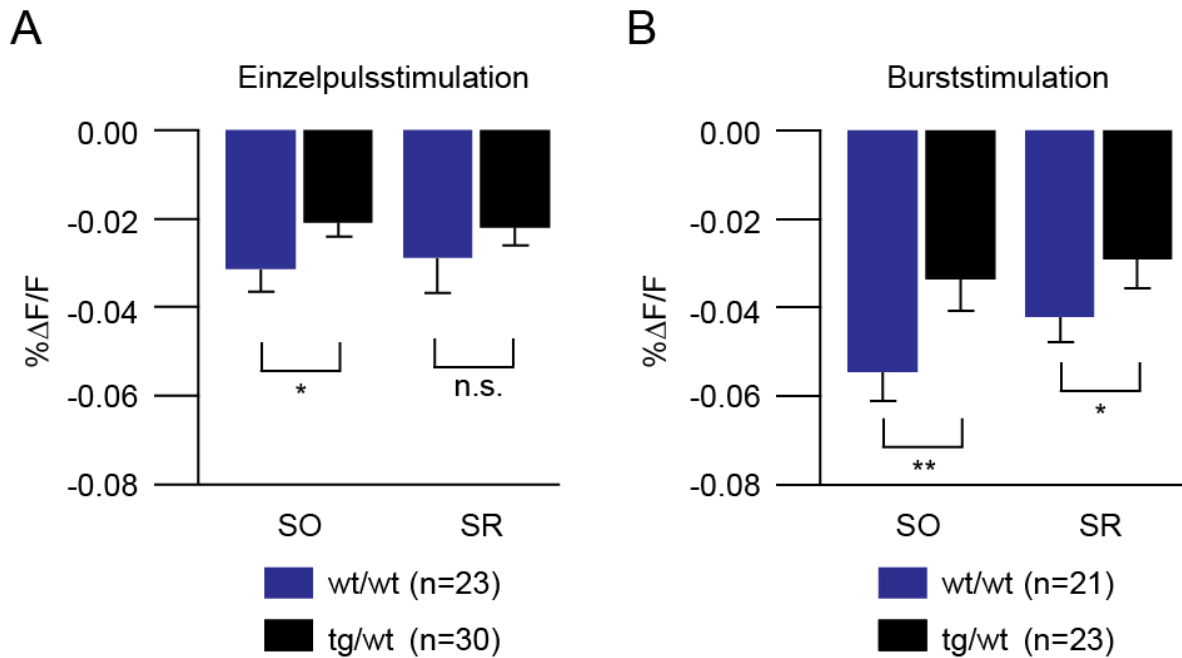


Abb. 19: Inhibition nach Stimulation des temporoammonischen Pfades

Abb. 19 zeigt die maximale inhibitorische Veränderung der Fluoreszenz $\% \Delta F/F$ in Stratum Oriens (SO) und Stratum Radiatum (SR) nach Stimulation des temporoammonischen Pfades mit Einzel- (A) und Burstpulsen (B). Die Sterne zeigen nach Burststimulation eine signifikant reduzierte maximale inhibitorische Änderung der Fluoreszenz in den transgenen Tieren in den Schichten Stratum Oriens und Stratum Radiatum (blaue Balken Wildtyp; schwarze Balken Transgen). Nach Einzelpulsstimulation zeigt sich in Stratum Oriens (SO) ebenfalls eine signifikant reduzierte Inhibition.

Fluoreszenz [% $\Delta F/F$]	SO Einzelpuls		SR Einzelpuls	
	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.
WT (n=23)	0,000342	-0,000306	0,000469	-0,000277
SEM	0,000047	0,000041	0,000065	0,000075
TG (n=30)	0,000326	-0,000209	0,000425	-0,000220
SEM	0,000067	0,000032	0,000081	0,000035

Tab. 10: Exzitation und Inhibition nach Einzelpulsstimulation des TA Pfades

Tab. 10 zeigt die Veränderung der Fluoreszenz in $\% \Delta F/F$ in Stratum Oriens (SO) und Stratum Radiatum (SR) nach Einzelpulsstimulation des temporoammonischen Pfades.

Fluoreszenz [% $\Delta F/F$]	SO Burststimulation		SR Burststimulation	
	Exz.	Inh.	Exz.	Inh.
WT (n=21)	0,000950	-0,000545	0,001095	-0,000423
SEM	0,000305	0,000065	0,000374	0,000056
TG (n=23)	0,000605	-0,000330	0,000716	-0,000308
SEM	0,000110	0,000059	0,000111	0,000057

Tab. 11: Exzitation und Inhibition nach Burststimulation des TA Pfades

Tab. 11 zeigt die Veränderung der Fluoreszenz in % $\Delta F/F$ in Stratum Oriens (SO) und Stratum Radiatum (SR) nach Burststimulation des temporoammonischen Pfades.

3.4 Verlust von integrativen Prozessen in der CA1-Region

Schließlich untersuchten wir, ob die bei transgenen APP/PS1-Versuchstieren gestörte Inhibition das Zusammenspiel der verschiedenen Zugangswege zur hippocampalen CA1-Region beeinflusst. Bei wildtyp Mäusen führt eine vorgeschaltete Erregung der Schaffer Kollateralen zu einer vermehrten Propagation der exzitatorischen Signale des temporoammonischen Pfades bis zum Zellsoma (Ang et al, 2005). Unsere Experimente zeigten, dass die Kontrolle des Schaffer Kollateral Inputs über den temporoammonischen Pfad bei APP/PS1-Versuchstieren deutlich herabgesetzt war. Die „Taktgeber“-Funktion der Schaffer Kollateralen – das heißt, das Fortleiten eines temporoammonischen Einzelpulses nach vorangegangener Stimulation der Schaffer Kollateralen bis in axosomatische Zellkompartimente – war in der Gruppe der transgenen Mäusen vollständig verloren (Wildtyp 0,0625 % $\Delta F/F$ vs. 0,0271 % $\Delta F/F$ erwartet (arithmetische Summe), $p < 0,001$, gepaarter Wilcoxon Vorzeichen-Rank-Test; Transgen 0,0348 % $\Delta F/F$ gemessen vs. 0,0312 % $\Delta F/F$ erwartet, n.s., gepaarter Wilcoxon Vorzeichen-Rank-Test). Nach Burststimulation des temporoammonischen Pfades zeigte sich die supralineare Summation („Gating“) von Schaffer Kollateral Input und Input des temporoammonischen Pfades in der CA1-Region bei APP/PS1-Mäusen im Vergleich zu wildtyp Mäusen deutlich herabgesetzt (-90,01 %, Wildtyp „Gating“ 0,0355 % $\Delta F/F$ vs. Transgen „Gating“ 0,0035 % $\Delta F/F$, $p < 0,001$, Mann-Whitney Test). Diese herabgesetzte Kontrolle der Schaffer Kollateralen über Input des temporoammonischen Pfades zeigt eine deutliche Einschränkung elementarer integrativer Prozesse in der hippocampalen CA1-Region von APP/PS1-Mäusen.

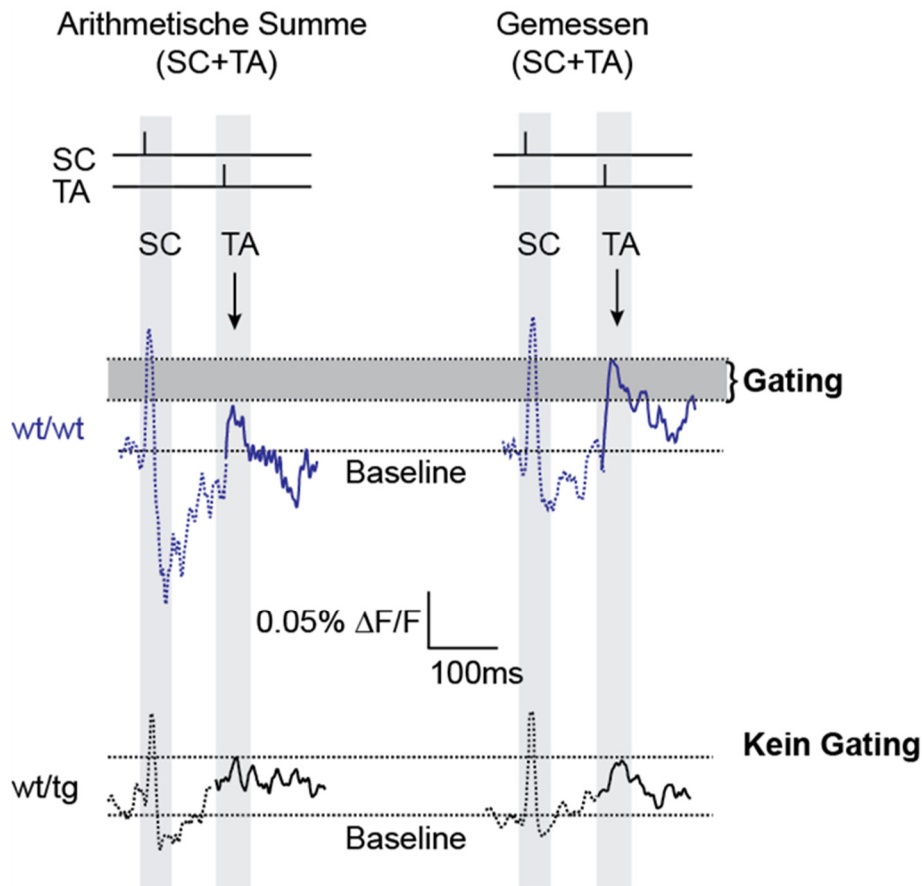


Abb. 20: Repräsentative Kurven des „Gating“- Phänomens nach Costimulation von Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad

Abb. 20 zeigt repräsentative Kurven von wildtyp (obere Kurve) und transgenen Mäusen (untere Kurven). Die Kurven zeigen die gemittelte Erregung in einer Region of Interest (ROI) in Stratum Oriens. Links sind berechnete Kurven zu sehen, welche sich aus der arithmetischen Summe von isolierter SC Stimulation plus isolierter TA Stimulation ergeben. Auf der rechten Seite wird das tatsächlich gemessene Signal nach gepaarter Stimulation von Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad dargestellt. Für dieses Protokoll ging die Stimulation der Schaffer Kollateralen der Stimulation des temporoammonischen Pfades um 100 ms voraus. Die Stimulationszeitpunkte von Schaffer Kollateralen (SC) und temporoammonischem Pfad (TA) sind in den oberen zwei Reihen in schwarz abgebildet. Bei wildtyp Mäusen führte die vorangehende Stimulation der Schaffer Kollateralen zu einer Propagation des distalen Inputs des temporoammonischen Pfades hin zu proximalen Zellkompartimenten. Das gemessene exzitatorische Signal, welches durch Stimulation des temporoammonischen Pfades hervorgerufen wurde, war nach vorangegangener Stimulation der Schaffer Kollateralen signifikant höher als die arithmetische Summe der Einzelpotentiale (linke Kurve). Die Differenz zwischen gemessenem und erwartetem (arithmetische Summe) Signal ist grau hinterlegt und wurde als „Gating“ bezeichnet (rechte Kurve). Es ist zu beachten, dass in der Gruppe der transgenen Mäuse kein „Gating“-Phänomen zu beobachten war (untere Kurven).

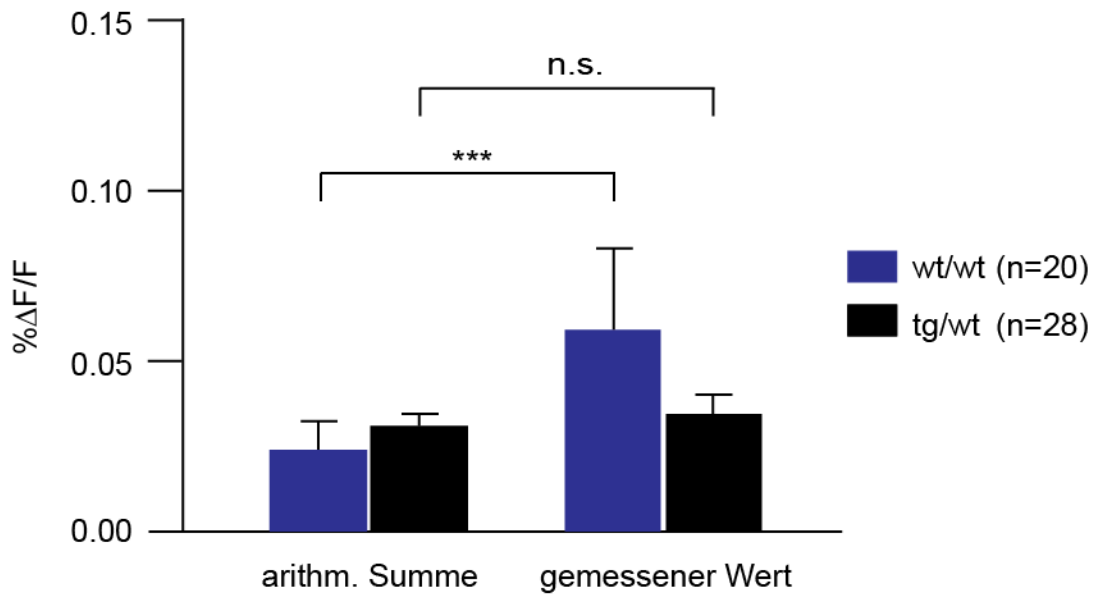


Abb. 21: Exzitation in Stratum Oriens nach Stimulation des temporoammonischen Pfades und vorangegangener Schaffer Kollateral Stimulation

Abb. 21 gibt eine Übersicht über die maximal gemessene exzitatorische Änderung der Fluoreszenz nach gepaarter Stimulation von Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad. Die arithmetische Summe (links) wird mit dem tatsächlich gemessenen Signal (rechts) verglichen. Die Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen gemessenem und erwartetem (arithmetische Summe) Signal in der Gruppe der wildtyp Mäuse (blaue Balken). Diese Differenz bezeichneten wir als „Gating“. In der Gruppe der APP/PS1-Mäuse hingegen war kein „Gating“ nachweisbar. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen gemessenem und berechnetem Signal. Es fand keine supralineare Summation der Potentiale statt.

Fluoreszenz [%ΔF/F]	Arithmetische Summe	Gemessener Wert
WT (n=20)	0,000271	0,000625
SEM	0,000083	0,000213
TG (n=28)	0,000312	0,000348
SEM	0,000036	0,000054

Tab. 12: Exzitation in Stratum Oriens nach Stimulation des temporoammonischen Pfades und vorangegangener Schaffer Kollateral Stimulation

Tab. 12 zeigt den erwarteten Wert der maximal gemessenen Fluoreszenz % ΔF/F (arithmetische Summe) sowie den tatsächlich gemessenen Wert in Stratum Oriens nach Stimulation des TA Pfades und vorangegangener SC Stimulation.

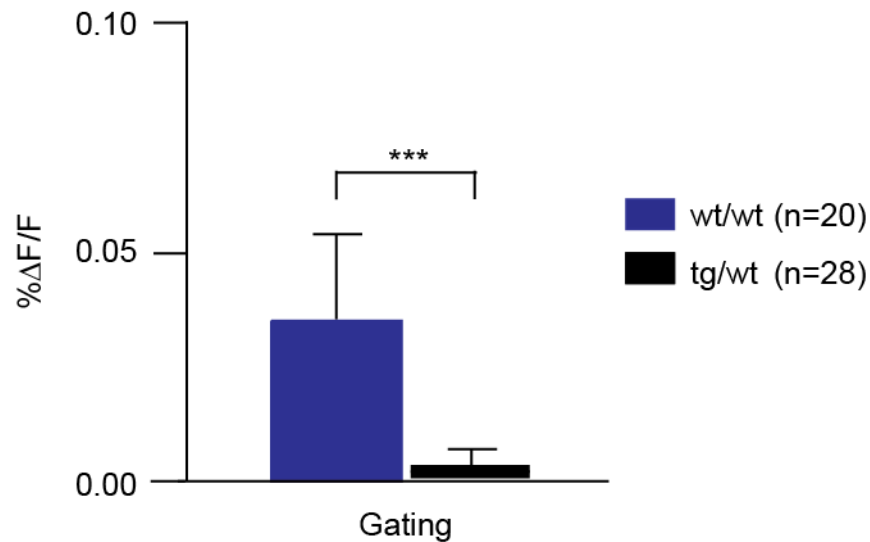


Abb. 22: „Gating“ der TA-Exzitation in Stratum Oriens durch vorangegangene Schaffer Kollateral Stimulation

Abb. 22 stellt die Höhe des berechneten „Gating“-Phänomens in der Gruppe der wildtyp Mäuse den Daten der APP/PS1-Mäuse gegenüber. Die Höhe des „Gating“ wurde als die Differenz zwischen gemessener und berechneter (arithmetische Summe) Änderung der Fluoreszenz in einer Region of Interest in Stratum Oriens definiert.

	WT (n=20)	TG (n=28)
Fluoreszenz [%ΔF/F]	0,000355	0,000035
SEM	0,000167	0,000032

Tab. 13: „Gating“ der TA-Exzitation in Stratum Oriens durch vorangegangene Schaffer Kollateral Stimulation

Tab. 13 zeigt die Werte des berechneten „Gating“-Phänomens. Die Höhe des „Gating“ wurde als die Differenz zwischen gemessener und berechneter (arithmetische Summe) Änderung der Fluoreszenz in einer Region of Interest in Stratum Oriens definiert.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation möglicher Defizite in der Funktion von synaptischen Schaltkreisen in der CA1-Region des Hippocampus in dem APP/PS1-Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung. Mit Hilfe des Voltage Sensitive Dye Imaging wurde zunächst untersucht, ob eine Dysbalance zwischen Exzitation und Inhibition vorliegt. Die CA1-Region wurde im Bereich der Schaffer Kollateralen, des Alveus sowie des temporoammonischen Pfades stimuliert, um intra- und extrahippocampale Zuflüsse zu untersuchen. Ferner wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die räumliche Ausbreitung von Erregung und Inhibition in Anwesenheit von Amyloidplaques verändert ist. Zuletzt wurde untersucht, ob das Zusammenspiel der zwei Hauptinformationszuflüsse (via Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad) im Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung in der hippocampalen CA1-Region gestört ist.

Wir konnten folgende Hauptbefunde erheben:

- 1) In der hippocampalen CA1-Region von transgenen APP/PS1-Mäusen mit nachgewiesener Amyloidplaqueablagerung ist die Inhibition nach Schaffer Kollateral Stimulation, nach Stimulation des Alveus sowie nach Stimulation des temporoammonischen Pfades im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren ohne Amyloidplaqueablagerung in Stratum Radiatum und Stratum Oriens deutlich reduziert. Sowohl intra- als auch extrahippocampale Informationszuflüsse rufen lediglich eine verminderte Inhibition hervor, wenn sie die für die Gedächtnisbildung wichtige CA1-Region erreichen. Hierbei sind die vorwärts und rückwärts gerichtete Inhibition gleichermaßen betroffen.
- 2) Durch die verminderte Inhibition entsteht ein Ungleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Aktivität.
- 3) Neben einer reduzierten maximalen Inhibition ist auch die räumliche Ausbreitung der inhibitorischen Aktivität in Stratum Oriens und Stratum Radiatum im APP/PS1-Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung deutlich herabgesetzt. Die Ausbreitung der Exzitation hingegen ist pathologisch erhöht.
- 4) Das Zusammenspiel der zwei Hauptinformationszuflüsse der CA1-Region ist nachhaltig gestört. Die supralineare Summation, welche physiologischerweise bei

zeitlich abgestimmter Aktivität von Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad auftritt, ist verloren. Somit ist ein wichtiger Mechanismus zur Integration von intra- und extrahippocampalen Informationszuflüssen in der CA1-Region gestört.

4.1 Reduzierte Inhibition in der CA1-Region

Eine in Anwesenheit von Amyloidplaques veränderte Netzwerkfunktion in Form von Defiziten in Netzwerkaktivierung und -deaktivierung, Oszillationsrhythmik und Netzwerkübererregbarkeit wurde bereits in anderen hippocampalen und kortikalen Regionen gezeigt (Hazra et al., 2013; Palop et al., 2007; Palop und Mucke, 2016).

Diese fehlerhafte Netzwerkfunktion findet unter anderem Ausdruck in einer erhöhten Neigung zu epileptischen Anfällen. In verschiedenen Mausmodellen der Alzheimer-Krankheit wurde eine vermehrte epileptische Aktivität gezeigt (Minkeviciene et al., 2009; Palop und Mucke, 2016). Auch bei Alzheimer-Patienten besteht eine erhöhte Inzidenz an epileptischen Anfällen (Amatniek et al., 2006).

Ein Zusammenhang zwischen der Übererregbarkeit kortikaler Neurone und einer verminderten GABAergen Inhibition konnte im Mausmodell nachgewiesen werden (Busche et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass der Netzwerkübererregbarkeit bei der Alzheimer-Krankheit in erster Linie eine inhibitorische Fehlfunktion zu Grunde liegt.

Parvalbumin-positive Interneurone, welche in der hippocampalen CA1-Region eine Hauptquelle der perisomatischen Inhibition bilden, zeigen üblicherweise während räumlicher Exploration eine erhöhte Rate an Aktionspotentialen. In einem Mausmodell der Alzheimer-Krankheit konnte eine Fehlfunktion dieser wichtigen Interneuron-Entität nachgewiesen werden, welche auf eine gestörte Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals zurückzuführen war. Nach Wiederherstellung der pathologischen Nav 1.1 Untereinheit konnte die zuvor beobachtete Netzwerkhypersynchronität reduziert und die kognitive Gedächtnisleistung verbessert werden (Verret et al., 2012).

Zudem zeigte der experimentelle Gebrauch des Antikonvulsivums Levetiracetam in Mausmodellen mit Amyloidplaqueablagerungen einen präventiven Nutzen vor Netzwerkdisfunktion und Übererregbarkeit (Sanchez et al., 2012). Der genaue Wirkmechanismus von Levetiracetam ist bislang nicht bekannt. Neben einer verminderten präsynaptischen Glutamatfreisetzung wird eine Steigerung der

GABAergen Inhibition angenommen (Medizinische Medien Informations GmbH, 2018). Auch beim Menschen konnte in einer Patientengruppe mit einer frühen Stufe der Alzheimer-Krankheit – im Stadium des sogenannten „mild cognitive impairment (MCI) – in funktionellen Magnetresonanztomographieaufnahmen während einer Bildwiedererkennungsaufgabe eine hippocampale Übererregbarkeit nachgewiesen werden. Diese Übererregbarkeit konnte durch die Einnahme von Levetiracetam erfolgreich reduziert und die kognitive Leistung verbessert werden (Bakker et al., 2012).

Auf Einzelzellebene wurden auch fehlerhafte exzitatorische Zellen als weitere Ursache einer Netzwerkdysfunktion identifiziert. Der Verlust von exzitatorischen Dornfortsätzen (Spines) und dendritischen Ästen, eine gesteigerte zelluläre Erregbarkeit sowie eine gestörte synaptische Plastizität konnten wiederholt in Mausmodellen der Alzheimer-Krankheit nachgewiesen werden (Dorostkar et al., 2015; Neves et al., 2009).

In unseren Experimenten fanden wir in dem APP/PS1-Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung einhergehend mit vorherigen Studien eine reduzierte Inhibition. Wir legten unser Augenmerk auf die hippocampale CA1-Region, welche für die Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle spielt, und untersuchten im Gegensatz zu vorherigen Studien mittels Voltage Sensitive Dye Imaging auch die räumliche Ausbreitung von Erregung und Inhibition. Hier fanden wir eine pathologisch gesteigerte Ausbreitung der Exzitation. Diese resultierte vermutlich aus einer verminderten Inhibition. Intra- und extrahippocampale Informationsflüsse riefen in der CA1-Region lediglich eine stark herabgesetzte Inhibition hervor, wobei sowohl vorwärts als auch rückwärts gerichtete inhibitorische Kontrollschleifen betroffen waren. Hieraus resultierte eine Dysbalance zwischen Inhibition und Exzitation. Dieses Missverhältnis ist vermutlich eine der Ursachen der bei Alzheimer-Patienten beobachteten erhöhten Inzidenz an epileptischen Anfällen.

4.2 Verlust der Kontrolle der Schaffer Kollateralen über Input des temporoammonischen Pfades

Bislang ist nicht bekannt, auf welche Art und Weise eine gestörte Interaktion von Inhibition und Exzitation auf hippocampaler Netzwerkebene zu der eingeschränkten Gedächtnisleistung und kognitiven Dysfunktion bei Alzheimer-Patienten führt.

In Mausmodellen konnte in Kontrolltieren unter bestimmten zeitlich abgestimmten Umständen eine supralineare Interaktion der zwei Hauptinformationszuflüsse zu der hippocampalen CA1-Region nachgewiesen werden. Üblicherweise erreichen extrahippocampale Zuflüsse die Pyramidenzellen der CA1-Region über ihre distalen Dendriten; der lokale, intrahippocampale Zufluss erfolgt über Synapsen in der perisomatischen Region. Auf Grund der elektrischen Isolation der Neurone sowie einer räumlichen Kompartimentierung durch inhibitorische Mikrokreisläufe werden die unterschiedlichen Inputklassen zunächst unabhängig voneinander verarbeitet. Während theta-Aktivität kann die inhibitorische Kompartimentierung durch eine spezifische zeitliche Abstimmung von Input aus der hippocampalen CA3-Region sowie aus Schicht III des entorhinalen Cortex durch synaptische Disinhibition aufgehoben werden und somit eine Propagation von direktem, extrahippocampalen Input bis in das axosomatische Kompartiment der CA1-Pyramidenzellen ermöglicht werden (Ang et al., 2005). Wir konnten zeigen, dass dieser „Gating“-Mechanismus in APP/PS1-Mäusen in Anwesenheit von Amyloidplaques gravierend gestört ist. In unseren APP/PS1-Versuchstieren zeigte sich ein Verlust der supralinearen Summation in Stratum Oriens bei zeitlich abgestimmtem Input aus der hippocampalen CA3-Region sowie Schicht III des entorhinalen Cortex. Ursache des fehlerhaften „Gating“-Mechanismus ist vermutlich eine reduzierte inhibitorische Disinhibition. Es ist anzunehmen, dass ein fehlerhafter „Gating“-Mechanismus eine veränderte Aktionspotentialrate der CA1-Pyramidenzellen während der Verarbeitung von parallel eintreffenden Informationen aus der hippocampalen CA3-Region sowie Schicht III des entorhinalen Cortex verursacht. Hieraus kann eine gestörte Integration von räumlichen und kontextualen Informationen resultieren, welche möglicherweise eine wichtige Ursache der kognitiven Defizite bei Alzheimer-Patienten darstellt.

4.3 Mögliche weitere Folgen verminderter Inhibition: fehlerhafte dendritische Plateaupotentiale und Verlust der Selektivität von Ortszellen

In vivo Experimente auf Einzelzellebene zeigten einen anderen, vermutlich zentralen, Mechanismus der Integration von intra- und extrahippocampalem Input in der CA1-Region. Zeitlich exakt aufeinander abgestimmte Zuflüsse aus der CA3-Region sowie Schicht III des entorhinalen Cortex generierten dendritische Calcium-Plateaupotentiale, welche als Mediator einer supralinearen Prozessierung der parallel eintreffenden Signale dienten. Die Erzeugung dieser Plateaupotentiale erhöhte in

Ortszellen die Aktionspotentialfrequenz in dem entsprechenden Ortsfeld. Zusätzlich zu dieser Verstärkung des CA1-Outputs führten die dendritischen Plateaupotentiale zu einer beschleunigten Formation von neuen Ortsfeldern. Die aktive dendritische Prozessierung scheint ein Detektor für parallel eintreffende intra- und extrahippocampale Informationen zu sein, welcher kontextuale und räumliche Informationen miteinander verknüpft. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus für die Erzeugung und Aufrechterhaltung einer kontextgebundenen Karte der Umgebung sein (Bittner et al., 2015).

Nur eine räumlich uniforme Inhibition scheint ein präzises Kodieren in der hippocampalen CA1-Region zu ermöglichen. Ortszellen sampeln zunächst unselektiv das gesamte exzitatorische Input ihrer Umgebung. Erst mittels uniformer Inhibition kann durch die Unterdrückung unspezifischer Erregung eine ortsspezifische, selektive Verstärkung stattfinden. Ohne Inhibition ist keine Separation zwischen Signal und Störfaktoren möglich, sodass die Fähigkeit der räumlichen Selektion von Ortszellen verloren geht. Durch eine uniforme Inhibition, welche vom Aufenthaltsort der Maus sowie von der Präsenz eines möglichen Ortsfeldes unabhängig ist, kann sowohl eine unspezifische Induktion von verschiedenen Formen der Plastizität – unter anderem der oben beschriebenen Bildung von Plateaupotentialen – verhindert als auch eine selektive Extraktion der Vielzahl an exzitatorischen Inputs ermöglicht werden. Durch die Vielzahl an exzitatorischen Inputs besitzen die CA1-Pyramidenzellen eine große Flexibilität und können jede beliebige räumliche Gegebenheit widerspiegeln. Ein präziser räumlicher Selektionsprozess wird jedoch erst durch eine uniforme Inhibition möglich. Inhibition spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Navigation im Raum. Sowohl für eine präzise Funktion der Ortszellen als auch für die Verarbeitung und Verknüpfung von intra- und extrahippocampalem Input ist eine intakte Inhibition essentiell. Sie ist die Voraussetzung für eine Verbindung von Raum und Kontext und vermutlich auch die Grundlage für die Kodierung von episodischen Gedächtnisinhalten (Grienberger et al., 2017).

Wir konnten in unseren Experimenten zeigen, dass diese in der CA1-Region so bedeutungsvolle Inhibition in dem APP/PS1-Mausmodell in Anwesenheit von Amyloidplaqueablagerungen deutlich vermindert ist. Die verminderte Inhibition speziell in der hippocampalen CA1-Region ist möglicherweise Ursache einer fehlerhaften Aktivierung von Ortszellen während der Navigation im Raum. Da eine uniforme

Inhibition üblicherweise während der Fortbewegung im Raum eine entscheidende Rolle bei der selektiven Extraktion der Vielzahl an exzitatorischen Inputs spielt, ist davon auszugehen, dass die von uns beobachtete verminderte Inhibition zu einer unspezifischen Induktion von Plastizität, z.B. in Form von dendritischen Plateaupotentialen, führt. Eine pathologisch gesteigerte dendritische Prozessierung durch die Generation von Plateaupotentialen würde sowohl zu einer erhöhten Bildung von Ortsfeldern als auch zu einer vermehrten Aktivität von Ortszellen führen. Somit entstünde als Folge einer verminderten Inhibition in der CA1-Region eine fehlerhafte Karte der Umgebung.

Da dendritische Plateaupotentiale in der CA1-Region als Detektor von parallel eintreffenden Informationen aus der CA3-Region sowie dem entorhinalen Cortex dienen, wäre durch eine mangelnde Inhibition zudem eine fehlerhafte Integration von semantischen und episodischen Informationen zu erwarten. Neben einer fehlerhaften Karte der Umgebung entstünde auf diese Weise zusätzlich eine falsche Verknüpfung von Raum und Kontext.

Die gestörte Interaktion zwischen intra- und extrahippocampalen Inputs in der CA1-Region ist eine mögliche Ursache der in Mausmodellen der Alzheimer-Krankheit beobachteten defizitären Leistung bei Orientierungsaufgaben, wie beispielsweise dem sogenannten „Water Maze“ (Gimbel et al., 2010).

Bei Menschen mit Apolipoprotein APO E4 Genotyp, dem wichtigsten genetischen Risikofaktor für eine Demenz vom Alzheimer-Typ, konnte in funktionellen kernspintomographischen Aufnahmen des Cerebrums eine Assoziation zwischen hippocampaler Hyperaktivität und reduzierter entorhinaler Raster-Zell-Repräsentation nachgewiesen werden (Kunz et al., 2015). Die bei Alzheimer-Patienten im Vordergrund stehenden Gedächtnisverluste sowie die bereits früh im Krankheitsverlauf auftretende topographische Desorientiertheit könnten somit ebenfalls Folge einer gestörten Integration von intra- und extrahippocampalem Input in der CA1-Region sein, die unter anderem durch eine verminderte Inhibition verursacht wird.

4.4 Limitation der Studie

Mittels Voltage Sensitive Dye Imaging untersuchten wir Neuronenpopulationen der hippocampalen CA1-Region. Auf Grund eines hohen Signal-to-Noise-Ratios auf Ebene der einzelnen Pixel mittelten wir die Daten sowohl über mehrere Versuchsläufe als auch räumlich. Wegen des laminaren Aufbaus des Hippocampus mit klaren anatomischen Grenzen ist dies in Stratum Oriens, Stratum Radiatum sowie Stratum Lacunosum-Moleculare mit guter Reproduzierbarkeit möglich. Stratum Pyramidale, die Schicht, welche die Zellkörper beinhaltet, ist mit der von uns verwendeten Technik auf Grund ihrer geringen Breite schwer zugänglich.

Die aufgenommene Änderung der Fluoreszenz spiegelt Veränderungen von Membranen wider und stellt neben exzitatorischen Potentialen auch inhibitorische postsynaptische Potentialänderungen sowie dendritische Prozesse dar. Hierbei kann die zeitliche Abfolge helfen, zwischen den verschiedenen Komponenten der Signale zu unterscheiden. Potentialüberlagerungen sind jedoch nicht immer sicher zu differenzieren.

Wir konnten eine verminderte Inhibition in Stratum Oriens und Stratum Radiatum sowie eine pathologisch gesteigerte räumliche Ausbreitung der Exzitation in den entsprechenden Bereichen feststellen. Die höchste Amyloidplaquedichte hingegen fanden wir in Stratum Lacunosum-Moleculare. Es bleibt offen, ob eine ursächliche Verbindung zwischen Amyloidplaques und inhibitorischer und exzitatorischer Dysbalance besteht. Hier wären weitere Experimente in früheren Krankheitsstadien ohne signifikante Amyloidplaqueablagerungen von Interesse.

In Stratum Lacunosum-Moleculare ließ sich nach Stimulation des temporoammonischen Pfades die Inhibition mittels Voltage Sensitive Dye Imaging auf Grund einer Überlagerung durch die vorangegangene ausgedehnte exzitatorische Signalkomponente nicht sicher darstellen. Diese Region ist insbesondere hinsichtlich möglicher pathologisch veränderter dendritischer Plateaupotentiale von großer Bedeutung, sodass hier weiterführende Experimente, insbesondere auf Einzelzellebene, zu mehr Aufklärung führen könnten.

Schließlich führten wir unsere Experimente in akuten Hirnschnitten durch. Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse *in vivo* wäre daher von Bedeutung.

4.5 Fazit und Ausblick

In unseren Experimenten konnten wir in dem APP/PS1-Mausmodell der Alzheimer-Krankheit mittels Voltage Sensitive Dye Imaging eine verminderte sowohl vorwärts als auch rückwärts gerichtete Inhibition in der hippocampalen CA1-Region nachweisen. Zudem zeigte sich ein Missverhältnis zwischen Exzitation und Inhibition sowie eine räumlich gesteigerte Ausbreitung der Exzitation. Diese Befunde gehen einher mit Ergebnissen vorheriger Studien, welche mit anderen Techniken ebenfalls eine Netzwerkhyperaktivität in Hippocampus und Cortex nachweisen konnten (Palop et al., 2007; Palop und Mucke, 2016). Auch die sowohl in Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung nachgewiesene als auch bei Alzheimer-Patienten zu beobachtende erhöhte Inzidenz an epileptischen Anfällen ist Ausdruck einer erhöhten Netzwerkhyperaktivität, welche vermutlich durch eine verminderte Inhibition verursacht wird (Bakker et al., 2012; Minkeviciene et al., 2009). Da eine intakte Inhibition in der hippocampalen CA1-Region eine essentielle Rolle bei der präzisen Bildung und Funktion von Ortzellen in spezifischen Ortsfeldern spielt (Grienberger et al., 2017), ist als Folge einer gestörten Inhibition eine fehlerhafte Karte der Umgebung zu erwarten.

Zudem konnten wir in unseren Experimenten eine gestörte Interaktion zwischen intra- und extrahippocampalem Input von Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad in der CA1-Region nachweisen, welche vermutlich auf einer defizitären inhibitorischen Disinhibition beruht. In der Gruppe der APP/PS1-Mäuse zeigte sich in Stratum Oriens ein Verlust der supralinearen Summation von Input aus der CA3-Region sowie aus Schicht III des entorhinalen Cortex, welche physiologischerweise bei exakter zeitlicher Abstimmung auftritt. Es ist anzunehmen, dass weitere Interaktionen zwischen diesen zwei für Navigation und Gedächtnisbildung wichtigen Zuflüssen in Anwesenheit von Amyloidplaques gestört sind. Ein möglicher weiterer defizitärer Mechanismus als Folge einer verminderten Inhibition ist eine gesteigerte Plastizität in Form fehlerhafter dendritischer Plateaupotentiale. Da dendritische Plateaupotentiale als Detektor für parallel eintreffende Informationen aus der hippocampalen CA3-Region und dem entorhinalen Cortex dienen, verursachten fehlerhafte Plateaupotentiale eine falsche Verknüpfung von Raum und Kontext.

Mittels Voltage Sensitive Dye Imaging konnten wir die maximale Exzitation und Inhibition von Neuronenpopulationen sowie deren räumliche Ausbreitung abbilden.

Weitere Experimente, insbesondere auf Einzelzellebene sowie *in vivo* sind notwendig, um die von verminderter Inhibition betroffenen Zelltypen zu differenzieren und die konsekutiv gestörten Mikrokreisläufe im Detail zu identifizieren.

Die bisherige medikamentöse Therapie der Alzheimer-Erkrankung wirkt einem cholinergen Defizit entgegen und greift in das glutamaterge Neurotransmittersystem ein. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass in der für Navigation und Gedächtnisbildung wichtigen hippocampalen CA1-Region die inhibitorische Dysfunktion eine wichtige Rolle in der Pathogenese der kognitiven Defizite bei Alzheimer-Patienten spielen könnte. Dies unterstreicht die Bedeutung weiterführender Grundlagenforschung mit dem Ziel der Wiederherstellung der herabgesetzten Inhibition.

5. Zusammenfassung

Die Alzheimer-Krankheit gewinnt in unserer alternden Gesellschaft zunehmend an Bedeutung. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten von intrazellulär gelegenen Fibrillen aus Protein Tau sowie extrazellulären Amyloidplaques im Cerebrum. Schon in frühen Krankheitsstadien zeigen Alzheimer-Patienten Einbußen in der episodischen Gedächtnisleistung sowie eine topographische Desorientiertheit (Walker et al., 2007). Bislang ist nicht bekannt, welche Mechanismen auf hippocampaler Schaltkreis-Ebene zu der eingeschränkten Gedächtnisleistung und kognitiven Dysfunktion bei Alzheimer-Patienten führen.

Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Identifikation möglicher funktioneller Defizite von synaptischen Schaltkreisen in der hippocampalen CA1-Region des APP/PS1-Mausmodells der Alzheimer-Erkrankung mit zuverlässiger cerebraler Amyloidplaqueablagerung. Hierfür nutzten wir die Technik des Voltage Sensitive Dye Imaging. Zunächst wurde untersucht, ob ein Missverhältnis zwischen Exzitation und Inhibition vorliegt. Ferner gingen wir der Frage nach, inwieweit die räumliche Ausbreitung von Erregung und Inhibition verändert ist. Schließlich untersuchten wir, ob das Zusammenspiel der zwei Hauptinformationszuflüsse (via Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad) in der hippocampalen CA1-Region in Anwesenheit von Amyloidplaques gestört ist.

In unseren Experimenten konnten wir eine verminderte sowohl vorwärts als auch rückwärts gerichtete Inhibition in Stratum Radiatum und Stratum Oriens der hippocampalen CA1-Region nachweisen. Hieraus resultierte eine Dysbalance zwischen Exzitation und Inhibition. Zudem fanden wir eine gesteigerte räumliche Ausbreitung der Exzitation. Schließlich konnten wir eine gestörte Interaktion zwischen intra- und extrahippocampalem Input von Schaffer Kollateralen und temporoammonischem Pfad in der CA1-Region nachweisen, welche vermutlich auf einer defizitären inhibitorischen Disinhibition beruht.

Zusammenfassend fanden wir in dem APP/PS1-Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung in Anwesenheit von Amyloidplaques eine herabgesetzte Inhibition in der hippocampalen CA1-Region. Diese verursachte eine pathologisch gesteigerte Ausbreitung der Exzitation sowie einen Verlust integrativer Prozesse in dieser für die Gedächtnisbildung wichtigen Hirnregion.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schnittführung bei Stimulation der Schaffer Kollateralen und des Alveus	21
Abbildung 2: Stimulationsprotokoll der gepaarten Stimulation	23
Abbildung 3: Exemplarische VSD-Aufnahmen in Graustufen	26
Abbildung 4: Signalverarbeitung des VSD-Imaging	26
Abbildung 5: Thioflavinfärbung zur Plaquedetektion	28
Abbildung 6: Laminare Verteilung der A β -Plaquerablagerungen in der CA1-Region	29
Abbildung 7: Repräsentative Kurven nach Schaffer Kollateral Stimulation	31
Abbildung 8: Exzitation und Inhibition nach Schaffer Kollateral Stimulation	32
Abbildung 9: Verhältnis von Inhibition zu Exzitation nach Schaffer Kollateral Stimulation	33
Abbildung 10: Repräsentative Kurven nach Stimulation des Alveus	35
Abbildung 11: Exzitation und Inhibition nach Stimulation des Alveus	36
Abbildung 12: Verhältnis von Inhibition zu Exzitation nach Alveusstimulation	37
Abbildung 13: Prozent aktivierter Pixel in CA1 nach Schaffer Kollateral Stimulation	39
Abbildung 14: Räumliche und zeitliche Ausbreitung von Exzitation und Inhibition in CA1 nach Stimulation der Schaffer Kollateralen	40
Abbildung 15: Aktive Pixel nach Stimulation der Schaffer Kollateralen	42
Abbildung 16: Anteil aktiver Pixel nach Schaffer Kollateral Stimulation in der gesamten CA1-Region	43
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Stimulation des TA Pfades	45
Abbildung 18: Repräsentative Kurven nach Stimulation des TA Pfades	46
Abbildung 19: Inhibition nach Stimulation des TA Pfades	47

Abbildung 20: Repräsentative Kurven des „Gating“- Phänomens nach Costimulation von Schaffer Kollateralen und TA Pfad	49
Abbildung 21: Exzitation in Stratum Oriens nach Stimulation des TA Pfades und vorangegangener Schaffer Kollateral Stimulation	50
Abbildung 22: „Gating“ der Exzitation in Stratum Oriens durch vorangegangene Schaffer Kollateral Stimulation	51

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Quantifikation der Amyloidplaqueablagerungen in der CA1-Region	29
Tab. 2: Plaquezahl in APP/PS1-Mäusen in laminarer Verteilung	29
Tab. 3: Laminare Verteilung der Plaquefläche in APP/PS1-Mäusen.....	30
Tab. 4: Exzitation und Inhibition nach Stimulation der Schaffer Kollateralen.....	33
Tab. 5: Verhältnis von Inhibition/Exzitation nach Schaffer Kollateral Stimulation ...	34
Tab. 6: Exzitation und Inhibition nach Stimulation des Alveus	37
Tab. 7: Verhältnis von Inhibition zu Exzitation nach Alveusstimulation	37
Tab. 8: Maximal aktive Pixel nach Schaffer Kollateral Stimulation	43
Tab. 9: Durchschnittlich aktive Pixel in CA1 nach Schaffer Kollateral Stimulation .	44
Tab. 10: Exzitation und Inhibition nach Einzelpulsstimulation des TA Pfades.....	47
Tab. 11: Exzitation und Inhibition nach Burststimulation des TA Pfades.....	48
Tab. 12: Exzitation in Stratum Oriens nach Stimulation des TA Pfades und vorangegangener Schaffer Kollateral Stimulation	50
Tab. 13: „Gating“ der TA-Exzitation in Stratum Oriens durch vorangegangene Schaffer Kollateral Stimulation	51

8. Literaturverzeichnis

Adler DH, Wisse LEM, Ittyerah R, Pluta JB, Ding S-L, Xie L et al. Characterizing the human hippocampus in aging and Alzheimer's disease using a computational atlas derived from ex vivo MRI and histology. *PNAS*. 2018; 115: 4252–4257

Amaral D und Lavenex P. Hippocampus and Human Disease. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. *The Hippocampus Book*. Oxford: Oxford University Press, 2007: 37–67

Amatniek JC, Hauser WA, DelCastillo-Castaneda C, Jacobs DM, Marder K, Bell K et al. Incidence and predictors of seizures in patients with Alzheimer's disease. *Epilepsia*. 2006; 47: 867–872

Ang CW, Carlson GC, Coulter DA. Hippocampal CA1 circuitry dynamically gates direct cortical inputs preferentially at theta frequencies. *J Neurosci*. 2005; 25: 9567–9580

Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE et al. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron*. 2012; 74: 467–474

Bittner KC, Grienberger C, Vaidya SP, Milstein AD, Macklin JJ, Suh J et al. Conjunctive input processing drives feature selectivity in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci*. 2015; 18:1133–1142

Bittner KC, Milstein AD, Grienberger C, Romani S, Magee JC. Behavioral time scale synaptic plasticity underlies CA1 place fields. *Science*. 2017; 357: 1033–1036

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991; 82: 239–259

Busche MA, Konnerth A. Impairments of neural circuit function in Alzheimer's disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2016; 371: 20150429

Buzsáki G. Theta Oscillations in the Hippocampus. *Neuron*. 2002; 33: 325–340

Buzsáki G, Moser EI. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*. 2013; 16: 130–138

Carlson GC, Coulter DA. In vitro functional imaging in brain slices using fast voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell patch recording. *Nat Protoc*. 2008; 3: 249–255

Chemla S, Chavane F. Voltage-sensitive dye imaging: Technique review and models. *J Physiol Paris*. 2010; 104: 40–50

Deuschl G, Maier W et al. S3-Leitlinie Demenzen 2016. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. www.dgn.org/leitlinien (Zugriffsdatum 12.03.2019)

Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: Problems and opportunities. *Acta Neuropathol*. 2015; 130: 1–19

Frank LM, Brown EN, Wilson M. Trajectory Encoding in the Hippocampus and Entorhinal Cortex. *Neuron*. 2000; 27: 169–178

Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, Gunther EC, Laurén J, Gimbel ZA, Strittmatter SM. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci*. 2010; 30: 6367–6374

Grienberger C, Milstein AD, Bittner KC, Romani S, Magee JC. Inhibitory suppression of heterogeneously tuned excitation enhances spatial coding in CA1 place cells. *Nat Neurosci*. 2017; 20: 417–426

Hazra A, Gu F, Aulakh A, Berridge C, Eriksen JL, Ziburkus J. Inhibitory neuron and hippocampal circuit dysfunction in an aged mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2013; 8: e64318

Jacobs J, Weidemann CT, Miller JF, Solway A, Burke JF, Wei X-X et al. Direct recordings of grid-like neuronal activity in human spatial navigation. *Nat Neurosci*. 2013; 16: 1188–1190

Jarsky T, Roxin A, Kath WL, Spruston N. Conditional dendritic spike propagation following distal synaptic activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*. 2005; 8: 1667–1676

Kentros C. Abolition of Long-Term Stability of New Hippocampal Place Cell Maps by NMDA Receptor Blockade. *Science*. 1998; 280: 2121–2126

Kunz L, Schröder TN, Lee H, Montag C, Lachmann B, Sariyska R et al. Reduced grid-cell-like representations in adults at genetic risk for Alzheimer's disease. *Science*. 2015; 350: 430–433

Leutgeb S, Leutgeb JK, Barnes CA, Moser EI, McNaughton BL, Moser M-B. Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science*. 2005; 309: 619–623

Medizinische Medien Informations GmbH (MMI), 2018: Levetiracetam - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen. Gelbe Liste. https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Levetiracetam_41886. (Zugriffsdatum 22.10.2018)

Miller JF, Neufang M, Solway A, Brandt A, Trippel M, Mader I et al. Neural activity in human hippocampal formation reveals the spatial context of retrieved memories. *Science*. 2013; 342: 1111–1114

Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fülöp L et al. Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *J Neurosci*. 2009; 29: 3453–3462

Moser EI, Kropff E, Moser M-B. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci*. 2008; 31: 69–89.

Muller RU, Kubie JL. The effects of changes in the environment on the spatial firing of hippocampal complex-spike cells. *J. Neurosci*. 1987; 7: 1951–1968

Neves G, Cooke SF and Bliss TVP. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 9: 65–75

O'Keefe J. A review of the hippocampal place cells. *Progress in Neurobiology*. 1979; 13: 419–439

O'Keefe J. Hippocampus and Human Disease. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. *The Hippocampus Book*. Oxford: Oxford University Press, 2007: 511–517

O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*. 1971; 34: 171–175

Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2007; 55: 697–711

Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: From synapses toward neural networks. *Nat Neurosci*. 2010; 13: 812–818

Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* 2016; 17: 777–792

Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 2013; 9: 63–75

Remondes M, Schuman EM. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature.* 2004; 431: 699

Sanchez PE, Zhu L, Verret L, Vessel KA, Orr AG, Cirrito JR et al. Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *PNAS.* 2012; 109: 2895–2903

Schulz JB, Hess K, Ludolph AC. Kognitive Einschränkungen und Demenzen. In: Hacke W, Hrsg. *Neurologie.* Berlin Heidelberg: Springer, 2016: 645-656

Small SA, Schobel SA, Buxton RB, Witter MP, Barnes CA. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12: 585–601

Sousa RM, Ferri CP, Acosta D, Albanese E, Guerra M, Huang Y et al. Contribution of chronic diseases to disability in elderly people in countries with low and middle incomes: a 10/66 Dementia Research Group population-based survey. *Lancet.* 2009; 374: 1821–1830

The Jackson Laboratory, 2019: B6C3-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/Mmjax Mouse Strain Data Sheet. <https://www.jax.org/strain/004462>. (Zugriffsdatum 6.03.2019)

Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AMI, Cobos I, Ho K et al. Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell.* 2012; 149: 708–721

Walker M, Chan D, Thom M. Hippocampus and Human Disease. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. *The Hippocampus Book.* Oxford: Oxford University Press, 2007: 769–803

Xiong H, Callaghan D, Wodzinska J, Xu J, Premyslova M, Liu Q-Y et al. Biochemical and behavioral characterization of the double transgenic mouse model (APP^{swe}/PS1^{dE9}) of Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 2011; 27: 221–232

9. Danksagung

Ich danke meinem Betreuer und Doktorvater, Prof. Stefan Remy, der mir die Arbeit an dieser Dissertationsschrift ermöglichte. Ich möchte mich ganz herzlich für seine Unterstützung, Motivation und Hilfsbereitschaft bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Hilfe, Ratschläge und die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Falko Fuhrmann für seine Hilfe beim Aufbau und der Wartung des Versuchssetups, Dr. Daniel Justus für seine Hilfe bei der Auswertung der Daten, Dr. Christina Müller für die gute Einarbeitung, Dr. Hiroshi Kaneko und Dr. Liudmila Sosulina für Ihre oft spontane Hilfe bei Fragen aller Art, Herrn Detlef Friedrichs für die Durchführung der Thioflavinfärbung sowie Frau Nancy El Deiry für ihre Hilfe bei allen organisatorischen Aufgaben.

Schließlich danke ich ganz herzlich meiner Familie, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertationsschrift motivierend und unterstützend begleitet hat. Ich danke meinem Vater und meiner Schwester Anna für das Korrekturlesen der Arbeit und ihre hilfreichen Verbesserungsvorschläge. Ich danke meinem Mann Christian für seine Unterstützung und Zeit. Und ich danke meiner kleinen Tochter Frieda, die mich dazu brachte, diese Arbeit erfolgreich zum Abschluss zu bringen.