

Analyse des Einflusses des Amyloid- β 42 Peptids bei der Genregulation

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Christian Barucker
aus Potsdam

Oktober 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerd Multhaup am
Institut für Chemie und Biochemie des Fachbereichs
Biologie, Chemie und Pharmazie der
Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup
 2. Gutachter: Prof. Dr. Otmar Huber
- Disputation am: 16.12.2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1 Zusammenfassung | VI |
| 1.1 Summary | VIII |
| 2 Einleitung | 1 |
| 2.1 Die Alzheimer Krankheit | 1 |
| 2.2 Das Amyloide Vorläuferprotein („amyloid precursor protein“, APP) | 2 |
| 2.2.1 Funktion des APP | 2 |
| 2.2.2 Die APP Prozessierung | 3 |
| 2.2.3 Einfluss der APP intrazellulären Domäne AICD auf die Genregulation | 6 |
| 2.3 Das Amyloid- β Peptid (A β) | 7 |
| 2.3.1 Toxizität des A β Peptids | 7 |
| 2.3.2 Das GxxxG-Motiv im A β Peptid | 9 |
| 2.3.3 Therapeutische Ansätze zur Bekämpfung der durch A β Peptide induzierten Neurotoxizität | 10 |
| 2.3.4 Einfluss auf die Genregulation von A β | 11 |
| 2.4 Zielsetzung | 13 |
| 3 Ergebnisse | 14 |
| 3.1 Verifizierung der Kernpräparation | 14 |
| 3.2 Nachweis verschiedener A β Spezies im Zellkern von SH-SY5Y Zellen | 15 |
| 3.3 Aggregationsverhalten von A β Peptiden | 17 |
| 3.4 Toxizität verschiedener A β Peptide | 18 |
| 3.5 Nachweis von A β Peptiden im Zellkern | 19 |
| 3.5.1 Synchronisation von Neuroblastom Zellen | 19 |
| 3.5.2 Vergleich von A β 42 wt und A β 42 G33A | 19 |
| 3.5.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zum Nachweis von A β 42 im Zellkern | 20 |
| 3.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie zum Nachweis von A β 42 im Zellkern | 22 |
| 3.6 Direkte oder indirekte Bindung von A β 42 wt an Promotoren | 23 |
| 3.7 Charakterisierung des Einflusses von A β Peptiden auf die Genregulation | 26 |
| 3.7.1 Qualitätskontrolle isolierter RNA | 26 |
| 3.7.2 Einfluss von A β 42 wt auf die Genregulation | 27 |
| 3.7.3 Einfluss des GxxxG-Motives im A β 42 auf die Genregulation | 29 |
| 3.7.4 Einfluss von kürzeren und längeren A β Peptiden auf die Genregulation | 31 |
| 3.8 Quantifizierung der mRNA Menge mittels Illumina als Indikator für die Genexpression | 33 |
| 3.8.1 Verifizierung der biostatistischen Microarray-Daten mittels qRT-PCR | 36 |
| 3.9 Charakterisierung des Einflusses von A β 42 wt auf die Genregulation in Abhängigkeit von der Zeit | 38 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.10 | Nachweis von A β 42 Peptiden in Neuronen- und Gliazellkernen im transgenen Mausmodell | 40 |
| 4 | Diskussion | 44 |
| 4.1 | Möglicher Translokationsmechanismus von A β Peptiden in den Zellkern | 44 |
| 4.2 | Neurotoxisches Potential von A β 43 | 48 |
| 4.3 | Charakterisierung der A β 42-DNA-Interaktion | 49 |
| 4.4 | Neurotoxizität der A β Peptide korreliert mit der Genregulation | 52 |
| 4.5 | Charakterisierung der Lokalisation von A β 42 Peptiden in Zellkernen im transgenen Mausmodell | 56 |
| 4.6 | Ausblick | 58 |
| 5 | Material | 60 |
| 5.1 | Geräte | 60 |
| 5.2 | Chemikalien | 61 |
| 5.2.1 | Enzyme & Standards | 61 |
| 5.3 | Antiseren & Antikörper | 62 |
| 5.4 | Puffer | 63 |
| 5.5 | Zellkultur-Medien | 63 |
| 5.6 | Verbrauchsmaterial | 63 |
| 5.7 | Software | 64 |
| 6 | Methoden | 65 |
| 6.1 | Molekularbiologische Methoden | 65 |
| 6.1.1 | Phenol/ Chloroformextraktion von DNA | 65 |
| 6.1.1.1 | Ethanol-Präzipitation | 65 |
| 6.1.2 | Isolierung von RNA | 65 |
| 6.1.2.1 | Qualitätsbestimmung der RNA | 65 |
| 6.1.3 | RT- PCR & Real Time PCR | 66 |
| 6.2 | Illumina | 66 |
| 6.3 | Proteinbiochemische Methoden | 67 |
| 6.3.1 | Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen | 67 |
| 6.3.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 68 |
| 6.3.3 | Tris Tricin SDS-PAGE | 68 |
| 6.3.4 | Western Blot | 68 |
| 6.3.4.1 | Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen | 68 |
| 6.3.4.2 | Immunologischer Nachweis von Proteinen | 69 |
| 6.3.5 | Herstellen von Zelllysaten | 69 |
| 6.3.6 | Immunpräzipitationen | 69 |
| 6.3.7 | Synthetische A β Peptide | 70 |
| 6.3.7.1 | Monomerisieren und Lösen synthetischer Peptide | 70 |
| 6.3.8 | Kernpräparation | 70 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 6.3.9 | Chromatinimmunpräzipitation ChIP | 71 |
| 6.3.10 | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 74 |
| 6.4 | Zellbiologische Methoden | 74 |
| 6.4.1 | Kultivierung von eukaryotischen Zellen | 74 |
| 6.4.1.1 | Subkultivierung eukaryotischer Zellen | 75 |
| 6.4.1.2 | Auftauen von Zellen | 75 |
| 6.4.1.3 | Kryogene Lagerung | 76 |
| 6.4.2 | Erzeugung stabiler Zelllinien | 76 |
| 6.4.2.1 | Transiente Transfektion | 76 |
| 6.4.3 | Synchronisation von SH-SY5Y Zellen | 77 |
| 6.4.4 | Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit synthetischen Peptiden | 77 |
| 6.4.5 | <i>In vitro</i> Toxizitätstest | 77 |
| 6.5 | Bildgebende Verfahren | 78 |
| 6.5.1 | Konfokale Mikroskopie | 78 |
| 6.5.2 | Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 78 |
| 6.5.2.1 | TEM - SH-SY5Y Zellen | 78 |
| 6.5.2.2 | TEM - Gewebe | 79 |
| 6.5.2.2.1 | Reinigung von kolloidalem Gold | 79 |
| 6.5.2.2.2 | Goldmarkierung von Antikörpern | 80 |
| 6.6 | Computergestütztes Modell | 80 |
| 7 | Abkürzungen | 81 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 83 |
| 9 | Anhang | 101 |
| 9.1 | Veröffentlichungen | 101 |
| 9.2 | Lebenslauf | 104 |
| 9.3 | Danksagung | 105 |
| 9.4 | Erklärung | 106 |

1 Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass A β 42 Peptide stark neurotoxisch wirken, jedoch konnte bis heute der genaue Mechanismus der Toxizität nicht geklärt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, potentielle Mechanismen in der Zelle zu beleuchten, die Aufschluss über die neurotoxische Wirkungsweise von A β 42 wt geben.

In dieser Arbeit konnte mittels ELISA, Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass A β Peptide von Zellen aufgenommen werden und in den Zellkern translozieren. Die Aufnahme der Peptide in den Zellkern steht in einem engen Zusammenhang mit der Hydrophobizität der Peptide. Es wurde gezeigt, dass kürzere, weniger hydrophobe Peptide besser in den Zellkern gelangen als die längeren, hydrophoberen A β Peptide.

Im Zellkern bindet das neurotoxische A β 42 Peptid spezifisch an die Promotoren von LRP1 und KAI1 und rekrutiert das Adapterprotein Fe65 und die Histonacetyltransferase Tip60. Als Kontrollpromotor wurde HES1 verwendet, mit dem keine Bindung von A β 42 wt nachgewiesen werden konnte.

Die Bindungsereignisse an die Promotoren stehen in direktem Zusammenhang mit den mRNA Mengen. Es wurde gezeigt, dass das neurotoxische A β 42 wt Peptid die mRNA Mengen von LRP1 und KAI1 supprimiert. Auf die mRNA Mengen von HES1 hatte A β 42 wt keinen Einfluss. Interessanterweise wurde festgestellt, dass A β 42 wt die mRNA Mengen seines Vorläufers, APP, erhöht. Im Gegensatz dazu hatten kürzere und längere, nicht-neurotoxische A β Peptide (A β 38, 40, 42 G33A und 43) keinen Einfluss auf die mRNA Mengen der untersuchten Gene.

Mit einem Illumina Micorarray wurden Gene identifiziert, die von dem neurotoxischen A β 42 wt Peptid beeinflusst werden. Sechs der dabei identifizierten Gene (ID1-3, IGFBP3/ 5, LMO4) wurden Mittels qRT-PCR analysiert. Es konnte bestätigt werden, dass die mRNA Mengen der untersuchten Kandidaten von dem neurotoxischen A β 42 wt erhöht wurden.

Die Lokalisation von A β 42 Peptiden im Zellkern konnte *in vivo* mittels TEM in Maushirnschnitten bestätigt werden. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass neurotoxische A β 42 Peptide in Neuronen- und Gliazellkernen von transgenen Alzheimer-Mäusen (APPPS1/2) lokalisiert sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen neue Hypothesen bezüglich der Neurotoxizität des A β 42.

In der vorliegenden Studie wird die Hypothese aufgestellt, dass A β 42 wt durch die spezifische Bindung an Promotoren als Transkriptioninhibitor oder –aktivator wirksam wird. Die Dysregulation verschiedener Zielgene des A β 42 könnte ein alternativer Mechanismus der durch A β 42 wt induzierten Neurotoxizität sein.

1.1 Summary

It was reported that A β 42 peptides are neurotoxic, although the exact mechanism remains still unclear. The aim of this project was to identify potential toxicity mechanisms, which provide information about the neurotoxic effectiveness of A β 42 wt.

In this study it could be demonstrated using ELISA, immunofluorescent microscopy and electron microscopy that A β peptides are taken up by living cells and finally translocate into the nucleus. The uptake of the peptides is in close connection with the peptide hydrophobicity. It was shown that the shorter, less hydrophobic peptides preferentially translocate better into the nucleus than the longer, hydrophobic peptides.

Within the nucleus neurotoxic A β 42 peptides bind specific to the promoter of LRP1 and KAI1. A β 42 wt peptides recruit the adapter protein Fe65 and the histone-acetyltransferase Tip60. The HES1 promoter was used as a control hence no interaction was detected.

The A β 42 wt binding to the promoters is in direct correlation with the mRNA levels. Neurotoxic A β 42 wt lead to a decrease of the mRNA levels of LRP1 and KAI1, whereas the mRNA levels of HES1 are not affected.

Interestingly, A β 42 wt increases the mRNA levels of its own precursor APP. In contrast the shorter and longer non-toxic peptides (A β 38, 40, 42 G33A and 43) did not affect mRNA levels of the examined genes.

Using Illumina Microarray further genes were identified, which were affected by the neurotoxic A β 42 wt peptide. The mRNA levels of six identified genes (ID1-3, IGFBP3/ 5, LMO4) were characterized via qRT-PCR and supported to be upregulated upon A β 42 wt treatment.

The localization of A β 42 wt peptides within the nucleus was confirmed by TEM in *in vivo* mice brain slices. For the first time it was demonstrated that neurotoxic A β 42 peptides are localized in both neuronal nuclei and in the nuclei of glia cells in a transgenic Alzheimer mouse model (APPPS1/ 2).

In conclusion these results arise a new hypothesis concerning the neurotoxic mechanism of A β 42 peptides.

A β 42 wt bind specific to promoters and act as repressors or activators of transcription. The desregulation of genes caused by the neurotoxic A β 42 wt in the nucleus could be an alternative pathway of A β -induced neurotoxicity. This study postulates that A β 42 wt tetramers or low-n oligomers induce the effect in gene regulation.

2 Einleitung

2.1 Die Alzheimer Krankheit

In Deutschland leben gegenwärtig ungefähr 1,2 Millionen Menschen, die an neurodegenerativen Demenzerkrankungen leiden. Zwei Drittel von ihnen sind von der Alzheimer Krankheit („Alzheimer Disease“, AD) betroffen.

Charakteristisch für AD ist die zunehmende Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit, die in der Regel durch neuropsychologische Symptome, wie Wortfindungsstörungen bis hin zum Verlust des Gedächtnisses, gekennzeichnet ist.

Erstmals wurde diese Krankheit durch den Würzburger Nervenarzt Alois Alzheimer (1864-1915) auf der 37. Versammlung Südwestdeutscher Irrenärzte 1906 in Tübingen am Beispiel seiner Patientin Auguste Deter beschrieben (Alzheimer, 1907). Im Hirngewebe dieser Patientin konnte Alois Alzheimer zwei Formen neuropathologischer Ablagerungen unterscheiden. Er beschrieb intrazelluläre Neurofibrillen und extrazelluläre amyloide Plaques (Alzheimer 1907). Bei den Neurofibrillen handelt es sich um intraneuronale Aggregate des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau, das in seiner hyperphosphorylierten, unlöslichen Form doppelsträngige helikale Filamente bildet (Goedert and Spillantini, 2000). Neurofibrillen sind nicht spezifisch für AD, da sie auch bei anderen Demenzerkrankungen auftreten können (Goedert and Spillantini, 2006). Als wichtigster biochemischer Marker für AD sind die amyloiden Plaques anzusehen. Die amyloiden Plaques bestehen aus extrazellulären Aggregaten des Amyloid- β Peptids ($A\beta$ Peptid), welches ein Spaltprodukt des Amyloiden Vorläuferproteins („amyloid precursor protein“, APP) ist (Kang et al., 1987). $A\beta$ Peptide stellen ein spezifisches Merkmal der Alzheimer Krankheit dar (Glennier and Wong, 1984; Masters et al., 1985).

Die Zahl der Demenzkranken nimmt infolge der demographischen Entwicklung kontinuierlich zu. Sofern kein Durchbruch in Prävention und Therapie gelingt, wird sich nach Vorausberechnungen aufgrund der demographischen Entwicklung die Krankenzahl bis zum Jahr 2050 auf etwa 2,6 Millionen erhöhen (<http://www.deutsche-alzheimer.de/> Die Epidemiologie der Demenz, Stand 08/ 2010).

Das Altern der Menschen stellt beim Auftreten von AD den größten Risikofaktor dar. Die sporadischen Fälle von AD, die im Alter zwischen circa 65 bis 80 Jahren auftreten, machen mit ungefähr 97% den größten Teil der Erkrankungen aus. Als weitere Risikofaktoren sind

das Allel $\epsilon 4$ des Apolipoproteins E (APOE) (Poirier et al., 1993; St George-Hyslop, 2000) oder ein hoher Cholesterin-Spiegel bekannt (Michikawa, 2004).

Die übrigen 3% der auftretenden AD Erkrankungen sind auf genetisch bedingte Mutationen zurückzuführen. Bei den sogenannten familiären Alzheimer Erkrankungen („familiar Alzheimer's disease“, FAD) tritt die Krankheit bereits im Alter zwischen 30 und 50 Jahren auf. Die Ursache ist auf autosomal dominant vererbte Mutationen auf den Chromosomen 1, 14 und 21 (Robakis et al., 1987) zurückzuführen, welche die Gene für Presenilin 2, Presenilin 1 und das Amyloide Vorläuferprotein tragen (Van Broeckhoven, 1989; Citron et al., 1992; Tanzi and Bertram, 2001; Di Fede et al., 2009; Zhou et al., 2011).

2.2 Das Amyloide Vorläuferprotein („amyloid precursor protein“, APP)

APP ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert und wurde 1987 das erste Mal kloniert (Goldgaber et al., 1987; Kang et al., 1987). Es gehört zur Genfamilie der Typ I-Transmembranproteine. Es ist jedoch bis heute nicht gelungen, die Funktion und die Struktur vollständig aufzuklären. APP wird ubiquitär exprimiert. Es wurde beispielsweise im Gehirn, Herz, Milz und Niere nachgewiesen (Tanzi et al., 1988). Es sind neun Isoformen des APP bekannt, die durch alternatives Spleißen der Exons 2, 7, 8 und 15 generiert werden (Tang et al., 2003). Daraus ergeben sich gewebsspezifische Expressionsunterschiede. Das Spleißen in den Neuronen wird unter anderem von microRNAs reguliert (Smith et al., 2011).

2.2.1 Funktion des APP

Im menschlichen Gehirn werden die Isoformen APP695, APP751 und APP770 exprimiert, wobei APP751 und APP770 auch in peripheren Organen nachgewiesen wurden. APP695 wird ausschließlich im Gehirn exprimiert und ist dort am häufigsten von den APP Isoformen vertreten. Im Gegensatz zu APP695 enthalten APP751 und APP770 eine Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne (KPI) (Kang and Muller-Hill, 1990; LeBlanc et al., 1991; Shioi et al., 1995). Eine Kupfer- und Zinkbindestelle konnte in allen Ektodomänen der APP-Spleißvarianten nachgewiesen werden (Bush et al., 1993; Multhaup et al., 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass APP an der Regulierung der Kupferhomöostase beteiligt ist (Treiber et al., 2004).

Das Vorhandensein zweier Heparinbindestellen und einer Kollagenbindestelle gibt Hinweise darauf, dass APP eine Bedeutung sowohl bei der Zell-Zell- als auch bei der Zell-Matrix-

Interaktion zugeschrieben werden kann (Breen et al., 1991; Chen and Yankner, 1991; Multhaup, 1994; Small et al., 1994; Behr et al., 1996; Siemes et al., 2006). Der N-terminalen Heparinbindestelle konnte eine Bedeutung beim Neuriten- und Axonwachstum zugesprochen werden (Small et al., 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass APP überwiegend in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist, aber auch zur Plasmamembran transportiert wird. Von dort kann es dann wieder zu einer Internalisierung kommen (Weidemann et al., 1989; Kaden et al., 2009).

Die Konsensussequenz „NPXY“ am C-terminalen Bereich des APP bewirkt die Clathrin-vermittelte Endocytose des APP und dessen Lokalisation in Endosomen (Koo et al., 1996; Thinakaran and Koo, 2008). Das am C-terminalen Bereich befindliche YENPTY-Motiv interagiert mit dem Adapterprotein Fe65, sodass die APP-intrazelluläre Domäne („APP intracellular domain“, AICD) in den Zellkern transloziert und dort eine genregulatorische Funktion ausübt (Cao and Sudhof, 2001, 2004b; Buoso et al., 2010) (siehe 2.2.4).

APP besitzt drei Dimerisierungsstellen, wovon zwei in der Ektodomäne lokalisiert sind, die Dritte in der Transmembransequenz (Kaden et al., 2011). Die Dimerisierung in der Ektodomäne erfolgt über die N-terminale Heparin bindende Domäne (auch Loop Region genannt) (Scheuermann et al., 2001; Kaden et al., 2008; Kaden et al., 2009) und über die Kollagen bindende Region (Behr et al., 1996). Die dritte Dimerisierungsstelle wurde in der Transmembranregion identifiziert und wird über drei konsekutive GxxxG-Motive vermittelt (Munter et al., 2007).

2.2.2 Die APP Prozessierung

APP wird auf zwei unterschiedlichen Wegen prozessiert (Abb. 1). Der amyloidogene Weg führt zur Entstehung von A β Peptiden. Im nicht-amyloidogenen Weg, der zu zwei Dritteln überwiegt (Selkoe, 2004), erfolgt die initiale proteolytische Spaltung des APP durch die α -Sekretase („a desintegrin and metalloprotease“, ADAM 10, 17) an Position 612 (Isoform 695) (Vergl. Abb. 3) (Lammich et al., 1999; De Strooper and Annaert, 2000). Das dabei generierte lösliche sAPP α („soluble APP, sAPP α) wird in den Extrazellularraum entlassen, wo es eine neuroprotektive Wirkung haben kann (Small et al., 1994; Furukawa et al., 1996). Da sich die Schnittstelle der α -Sekretase in der A β Sequenz befindet, wird die Entstehung von A β Peptiden durch die Aktivität der α -Sekretase verhindert (Esch et al., 1990). Das membranständige α CTF wird durch den γ -Sekretase-Komplex in der Membran gespalten. Diese Spaltung generiert das kürzere, nicht neurotoxische, p3 Peptid. C-terminal wird die AICD abgespalten (Haass et al., 1993).

Der aktive γ -Sekretase-Komplex ist aus vier Untereinheiten aufgebaut: Presenillin-1 (PS-1) (Rogaev et al., 1995), „anterior-pharynx-defective“ (APH-1), „presenillin enhancer protein“ (PEN-2) und Nicastrin (Edbauer et al., 2003). Der Aufbau des Komplexes beginnt mit der Assemblierung von Nicastrin und APH-1 zu einem Subkomplex im Endoplasmatischen Reticulum, an den sich PS-1 als Volllängen-Protein anlagert, welches durch die Anlagerung von PEN-2 endoproteolytisch geschnitten wird (LaVoie et al., 2003). PS-1 ist die katalytisch aktive Untereinheit des Komplexes und gehört zu den Aspartat-Proteasen (Thinakaran et al., 1998).

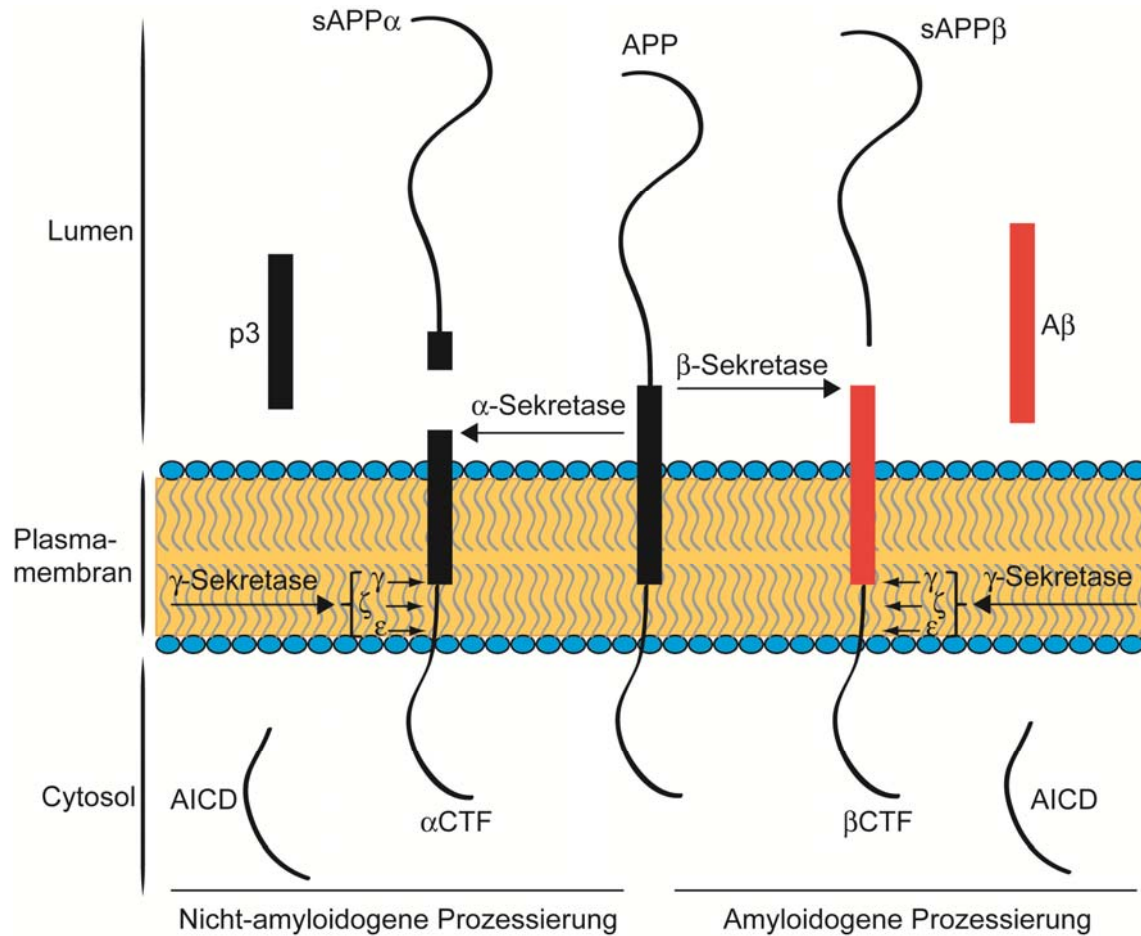


Abb. 1: **Schematische Darstellung der Prozessierung des APP.** Die amyloidogene Prozessierung beginnt mit dem Schnitt der β -Sekretase, die APP in die lösliche Ektodomäne (sAPP β) und das membranständige C-terminale Fragment (β CTF) spaltet. Das β CTF wird von der γ -Sekretase zu A β und AICD abgebaut, worauf beide entstandenen Fragmente aus der Membran entlassen werden. Die nicht-amyloidogene Prozessierung beginnt mit der α -Sekretase. Es entsteht die lösliche Ektodomäne (sAPP α) und das membranverankerte α CTF. Das α CTF wird von der γ -Sekretase zu dem löslichen p3-Fragment und zum AICD gespalten. sAPP: „soluble APP“, AICD: „APP intracellular domain“

Die initiale proteolytische Spaltung des APP im amyloidogenen Weg erfolgt durch die Aspartat-Protease β -Sekretase (BACE1) (Vassar et al., 1999). Dabei wird die Ektodomäne (sAPP β) in den Extrazellularraum entlassen. Das APP C-terminale Fragment (β CTF) bleibt in der Zellmembran verankert (Annaert and De Strooper, 2002). Nach Entfernung der Ektodomäne erkennt die γ -Sekretase ihr Substrat β CTF und spaltet dieses innerhalb der Transmembransequenz (TMS) (Struhl and Adachi, 2000). Dabei entstehen A β Peptide unterschiedlicher Länge und die AICD. Bei der Entstehung von AD nimmt A β 42 eine zentrale Rolle ein (Annaert and De Strooper, 2002).

Der genaue Schnittmechanismus der γ -Sekretase ist sehr komplex. Zwischen den Aminosäurepositionen 49 und 50 befindet sich die ϵ -Schnittstelle (Weidemann et al., 2002) (Abb. 2 und 3). Zwischen den Positionen 46 und 47 wurde die ζ -Schnittstelle identifiziert (Zhao et al., 2004). Durch eine Verschiebung in der Schnittstelle existieren zwei Produktlinien. Ausgehend von A β 49 wird durch den sequenziellen Schnittmechanismus der γ -Sekretase in einer Linie über A β 46 zu A β 43 und letztlich das Peptid A β 40 generiert. Die zweite Linie führt ausgehend von A β 48 über A β 45 zu A β 42 (Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2005; Takami et al., 2009) (Abb. 2/ 3).

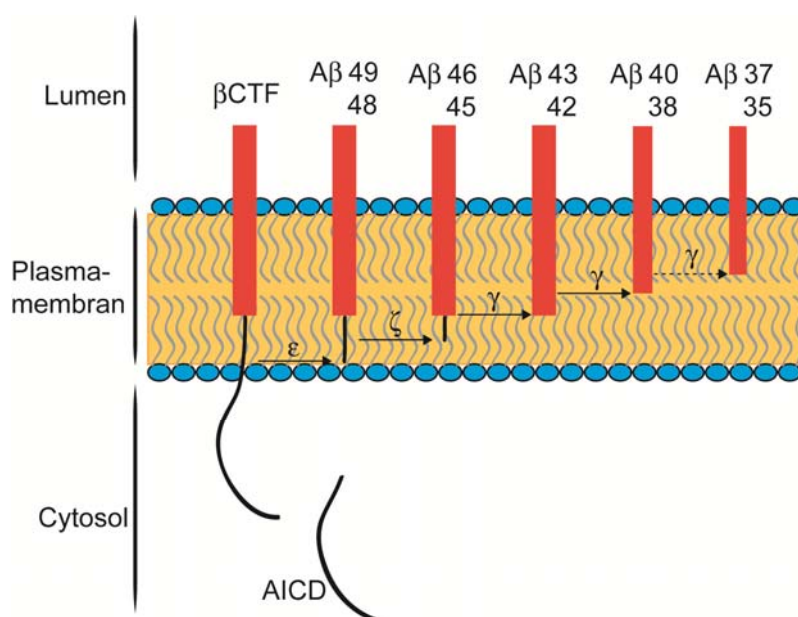


Abb. 2: **Produktlinien der A β Peptide generiert durch die γ -Sekretase.** Produktlinie 1 beginnt mit dem ϵ -Schnitt der γ -Sekretase zwischen AS 50 und 49. Sequenziell werden die A β Peptide um jeweils drei AS durch den ζ - und mehrere γ -Sekretaseschnitte verkürzt, so dass folgende A β Peptide entstehen: A β 49, 46, 43, 40, 37. Der ϵ -Schnitt in Produktlinie 2 liegt zwischen AS 49 und 48. Auch hier werden die A β Spezies sequenziell verkürzt, so dass die Peptide A β 48, 45, 42, 38, 35 generiert werden können. Produktlinie 2 beinhaltet das stark neurotoxische A β 42.

2.2.3 Einfluss der APP intrazellulären Domäne AICD auf die Genregulation

In den vergangenen Jahren wurde immer wieder gezeigt, dass die bei der APP-Prozessierung durch die γ -Sekretase generierte AICD einen Einfluss auf die Transkription und teilweise die Expression verschiedener Gene bzw. Proteine hat.

AICD gelangt vermutlich mit dem Adapterprotein Fe65 in den Zellkern und bildet dort mit der Histon-Acetyltransferase Tip60 einen Komplex (Cao and Sudhof, 2001, 2004b; von Rotz et al., 2004; Buoso et al., 2010). In Chromatinimmunpräzipitationen (ChIP) konnte gezeigt werden, dass ein Komplex bestehend aus AICD, Fe65 und Tip60 an den KAI1 (CD82) Promotor bindet und die Transkription von KAI1 erhöht (von Rotz et al., 2004; Telese et al., 2005). Der Tumorsuppressor KAI1 supprimiert die Metastasierung von Prostatakarzinomen (Dong et al., 1996) und steht unter der Kontrolle von p50 und dem Corepressor N-CoR (Baek et al., 2002; Kim et al., 2005).

Der AICD-Fe65-Tip60-Komplex bindet auch an den Promotor von LRP1 („low density lipoprotein receptor-related protein“) und unterdrückt seine Transkription (Liu et al., 2007). LRP1 reguliert im zentralen Nervensystem die Spiegel von Apolipoprotein E und Cholesterin (Herz and Chen, 2006). Cholesterin stellt einen Risikofaktor bei der Entstehung von AD dar, da ein zu hoher Cholesteringehalt die A β Produktion durch erhöhte β - und γ -Sekretase-Aktivitäten fördert (Xiong et al., 2008; Marquer et al., 2011).

Es ist bekannt, dass die AICD die Transkription und Expression des Enzyms Neprilysin negativ beeinflusst. Neprilysin ist an der Degradierung von A β Peptiden beteiligt (Pardossi-Piquard et al., 2005).

Es wird auch berichtet, dass die AICD die Transkription und die Expression von APP, BACE1, Tip60 und der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) erhöht (von Rotz et al., 2004).

In *in vivo* Studien zeigte sich, dass transgene AICD Mäuse eine erhöhte Aktivierung von GSK-3 β haben, was eine vermehrte Phosphorylierung von CRMP2 zur Folge hatte. CRMP2 spielt eine Rolle im Semaphorin3a-vermittelten axonalen Wachstum (Ryan and Pimplikar, 2005).

2.3 Das Amyloid- β Peptid (A β)

A β Peptide variierender Längen werden aufgrund des komplexen Schnittmechanismus des γ -Sekretase-Komplexes bei der Prozessierung des β CTF generiert (Weidemann et al., 2002; Zhao et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2005; Munter et al., 2007; Takami et al., 2009). Den größten messbaren Teil im Blut, im Liquor cerebrospinalis und in *post mortem* Gehirnen nimmt das Peptid A β 40 mit ungefähr 90% ein. Das für die AD pathologisch relevante Peptid A β 42 ist mit circa 5-10% vertreten (Dovey et al., 1993; Vigo-Pelfrey et al., 1993; Suzuki et al., 1994; Younkin, 1998). Es konnten jedoch auch Peptide kürzerer Länge wie A β 39, A β 38, A β 37 und A β 34 als auch A β 43 im Liquor cerebrospinalis und in *post mortem* Gehirnen nachgewiesen werden. Darüber hinaus sind auch modifizierte Peptide wie beispielsweise N- und C-terminal verkürzte Formen als auch pyroGluA β 3-42 nachgewiesen worden (Naslund et al., 1994; Wiltfang et al., 2001; Welander et al., 2009; Millucci et al., 2010; Portelius et al., 2010).

Nach Entlassung von A β 42 aus der lipophilen Membran in eine hydrophile Umgebung, den Extrazellularraum, kommt es zu einer Strukturänderung der α -helikalen Transmembranregion zu einem β -Faltblatt. Nach dem Umfaltungsprozess erlangt das hydrophobe Peptid seine neurotoxische Wirkung (Simmons et al., 1994; Xu et al., 2005). In der β -Faltblattkonformation aggregiert das hydrophobe A β 42 Peptid zu löslichen Oligomeren, die bereits in geringen Konzentrationen neurotoxisch wirken (Walsh et al., 2002) und formt schnell Fibrillen, die sich letztlich zu amyloiden Plaques ablagern (Hsia et al., 1999; Mucke et al., 2000; Schmechel et al., 2003; Xu et al., 2005). Das Peptid A β 42 bildet schneller und stabilere Oligomere als das Peptid A β 40 (Levine, 1995).

2.3.1 Toxizität des A β Peptids

Es ist bekannt, dass A β 38 und A β 40 keine neurotoxische Wirkung ausüben (Harmeier, 2008; Welander et al., 2009). Der genaue Mechanismus der durch A β Peptide ausgelösten Neurotoxizität ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die löslichen Oligomere von A β 42, nicht aber die Fibrillen, die Neurotoxizität vermitteln (Walsh et al., 2002; Shankar et al., 2008; Harmeier et al., 2009; Sandberg et al., 2010; Ono and Yamada, 2011). Es wurde beschrieben, dass Tetramere des A β 42 besonders neurotoxisch wirken. A β 42 Di-, Hexa- und Decamere besitzen ein geringeres toxisches Potential auf Neuronen. Höhere Oligomere (16- oder 20-mere) zeigen keine toxische Wirkung auf Neuronen (Harmeier et al., 2009).

Untersuchungen belegen, dass A β 42 postsynaptisch an Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDAR) bindet und dadurch den Influx von Calciumionen aktiviert (De Felice et al., 2007). A β 42 bewirkt die vollständige Inhibition der Langzeit Potenzierung (LTP) (Puzzo and Arancio, 2006; Harmeier et al., 2009).

Es wurde beschrieben, dass extrazelluläre A β Peptide lösliche Oligomere bilden, die Ionenkanäle in der Plasmamembran formen können. Diese Ionenkanäle ermöglichen den Einstrom von Calciumionen. Bedingt durch die veränderte Calciumhomöostase werden prä-apoptotische Prozesse ausgelöst. Die cytotoxischen Eigenschaften von A β 42 sind auf die Ionenkanalbildungen zurückzuführen (Lin et al., 1999; Arispe et al., 2007; Jang et al., 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass eine gestörte Calciumhomöostase zu einer Deregulation der APP Prozessierung führt (Khachaturian, 1989; LaFerla, 2002). Bei einem erhöhtem Calciumspiegel in der Zelle steigt die A β 42 Produktion (Demuro et al., 2005).

Die intrazelluläre Aggregation von A β Peptiden beginnt, bevor extrazelluläre Plaques nachzuweisen sind (Knauer et al., 1992; Ida et al., 1996c; Gouras et al., 2000; Wirths et al., 2001; Mori et al., 2002; Oddo et al., 2003). Extra- und intrazelluläres A β scheinen miteinander in Verbindung zu stehen. Ihre Beziehung zueinander ist komplex und nicht abschließend erforscht - jedoch können sie sich gegenseitig beeinflussen (Yang et al., 1999; Oddo et al., 2006; Tampellini et al., 2009).

Ein weiterer Erklärungsversuch für die Neurotoxizität von A β 42 beruht darauf, dass A β 42 in der mitochondrialen Matrix an die Alkoholdehydrogenase bindet, was zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien führen kann, die sich durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auszeichnet (Chen and Yan, 2007) .

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres A β von Neuronen internalisiert wird. Der genaue Mechanismus konnte jedoch bis heute nicht abschließend geklärt werden (Yang et al., 1999; Saavedra et al., 2007; Kandimalla et al., 2009). Einige Gruppen gehen davon aus, dass für die zelluläre Aufnahme von A β 42 Peptiden und deren neurotoxische Wirkung das Prionprotein als Rezeptor benötigt wird (Nygaard and Strittmatter, 2009; Bate and Williams, 2011; Resenberger et al., 2011).

Die Akkumulation von intraneuronalem A β 42 findet vorzugsweise im frühen Stadium der AD an den Synapsen statt, was mit pathologischen Veränderungen der Synapsen einhergeht. Intraneuronales A β 42 wird im Gegenzug in den synaptischen Spalt entlassen, was eine Degeneration der Synapse zur Folge hat (Tampellini and Gouras, 2010).

2.3.2 Das GxxxG-Motiv im A β Peptid

Das APP enthält in der A β Sequenz drei konsekutive GxxxG-Motive (Abb. 3). Das erste G₂₅XXXG₂₉-Motiv liegt N-terminal außerhalb der TMS. Die folgenden G₂₉XXXG₃₃XXXG₃₇-Motive befinden sich am N-terminalen Bereich in der TMS in der A β Sequenz.

GxxxG-Motive sind häufig auftretende Motive, die die Dimerisierung von α -helikalen Strukturen in TMS innerhalb der Membran vermitteln können. In α -helikaler Konformation liegen die Glycine eines GxxxG-Motivs auf einer Seite der Helix. Aufgrund der fehlenden Seitenkette und der rechtshändigen Verkreuzung zweier Helices kann es zu stabilisierenden Wechselwirkungen durch van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken kommen (Senes et al., 2001; Senes et al., 2004). Das GxxxG-Motiv in der TMS des APP hat einen Einfluss auf die Entstehung verschiedener A β Spezies. Nach proteolytischer Spaltung des APP durch ADAM oder BACE haben Gly₂₉ und Gly₃₃ eine entscheidende Bedeutung bei der Dimerisierung der entstandenen CTFs. Die proteolytische Spaltung des β CTF durch den γ -Sekretase-Komplex bedingt die Entstehung von A β 42 bzw. von A β 40. Substitutionen der Aminosäuren Gly₂₉ und/ oder Gly₃₃ zu einem Ala und/ oder Ile schwächen die Dimerisierung in der TMS und reduzieren die Entstehung von A β 42, begünstigen aber die Bildung von A β 38 und kürzerer A β Spezies (Abb. 2/ 3). Die Dimerisierung des β CTF in der TMS stellt einen Risikofaktor für AD dar, da durch die Dimerisierung die Bildung von A β 42 begünstigt wird (Munter et al., 2007).

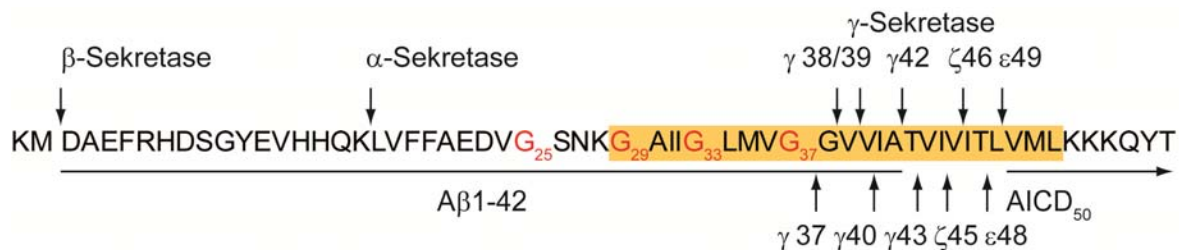


Abb. 3: **Ausschnitt der APP695 Sequenz (AS 595-654)**. Schnittstellen der Sekretasen sind durch Pfeile markiert. A β 1-42 Sequenz ist unterstrichen, die Glycine, der drei konsekutiven GxxxG-Motive, sind in rot dargestellt. Der Transmembranbereich ist orange unterlegt. Durch die Prozessierung der β - und γ -Sekretase werden A β -Peptide mit variierenden C-Termini generiert. Die γ -Sekretase schneidet sequenziell innerhalb der TMS beginnend mit dem ϵ -Schnitt. Längere A β Spezies werden durch den ϵ - (A β 49/ 48) und ζ -Schnitt (A β 46/ 45) generiert. Kürzere A β Formen (37, 38, 39, 40, 42) werden durch den γ -Schnitt erzeugt. Der N-Terminus der AICD wird durch den ϵ -Schnitt generiert.

In β -Faltblattstrukturen fördern GxxxG-Motive die Aggregation. Für Glycophorin A wurde gezeigt, dass das GxxxG-Motiv, das die Dimerisierung in α -helikaler Konformation stärkt, eine erhöhte Aggregation, nach Umfaltung in wässriger Lösung zu einem β -Faltblatt, begünstigt (Smith et al., 1994; Liu et al., 2005). Es wurde weiterhin gezeigt, dass GxxxG-Motive in der A β Sequenz die β -Faltblattbildung fördern, sobald das Peptid in wässriger Lösung vorliegt. Darüber hinaus wird die Verdichtung einzelner β -Faltblätter zu Amyloid-ähnlichen Fibrillen stabilisiert (Liu et al., 2005; Xu et al., 2005). Durch gezielte Aminosäuresubstitutionen im GxxxG-Motiv der A β Sequenz (Abb. 3) konnte gezeigt werden, dass die Position Gly₃₃ von entscheidender Bedeutung für die Aggregation und die Toxizität des A β 42 ist. Der Austausch zu einem Ala oder Ile verstärkt die Hydrophobizität des Peptids. Das zieht eine sehr schnelle Aggregation nach sich, so dass kaum noch Dimere oder Tetramere detektiert werden können. Die Austauschpeptide liegen nahezu vollständig als 20-mere vor, die nicht neurotoxisch sind (Harmeier et al., 2009). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass der Sequenzabschnitt A β 25-35 für die Toxizität entscheidend zu sein scheint (Harmeier et al., 2009; Millucci et al., 2010). Ein Aminosäureaustausch im GxxxG-Motiv an den Positionen Gly₃₃ oder Gly_{29/33} zu einem Ala und/ oder Ala/ Ile verändert nicht nur die Aggregation dieser Peptide, sondern hat auch zur Folge, dass die noch vorhandenen tetrameren Formen der Peptide weder *in vitro* noch *in vivo* eine neurotoxische Wirkung haben (Harmeier et al., 2009; Resenberger et al., 2011).

2.3.3 Therapeutische Ansätze zur Bekämpfung der durch A β Peptide induzierten Neurotoxizität

Es gibt mehrere therapeutische Ansätze die neurotoxischen Oligomere zu bekämpfen. Der Versuch eine Immunisierung mit A β Peptiden durchzuführen, um eine Immunantwort gegen die neurotoxischen Spezies zu erhalten, musste bereits in der ersten klinischen Phase abgebrochen werden, da die Probanden eine Meningoenzephalitis entwickelt haben (Shah and Federoff, 2011). Durch eine passive Immunisierung mittels mono- und polyklonaler anti-A β Antikörper gelang es einer Studie bereits die klinische Phase III zu erreichen (Pul et al., 2011). Kritisch sollte bei dieser Art Studie jedoch hinterfragt werden, wie sinnvoll dieser Therapieansatz ist. Mit dieser Art der Immunisierung werden unter Umständen den amyloiden Plaques A β Oligomere entzogen, die so wieder ihre toxische Wirkung ausüben könnten. Darüber hinaus wurde bereits vor einigen Jahren gezeigt, dass sowohl die aktive als auch die passive Immunisierung eine kongophile Angiopathie (zerebrovaskuläre Amyloidose) – auch bekannt als „cerebral amyloid angiopathy“ (CAA) - nach sich ziehen kann (Pfeifer et al., 2002; Ferrer et al., 2004; Wilcock et al., 2004; Racke et al., 2005). Hierbei kann es zu zerebralen Massenblutungen, die meist okzipital lokalisiert sind, kommen.

Ein weiterer möglicher Ansatzpunkt ist die Verwendung von γ -Sekretase-Inhibitoren (GSI) oder γ -Sekretase-Modulatoren (GSM). GSIs haben den Nachteil, dass nicht nur die Prozessierung des APP inhibiert wird, was einen positiven Effekt darstellt, sondern auch andere Substrate der γ -Sekretase nicht mehr gespalten werden können (Golde and Kukar, 2009). Die Verwendung von GSMs stellt einen eleganteren Therapieansatz dar. Hierbei werden kleine Moleküle, meist nicht größer als 600 Da, verwendet. Vor allem sind das nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente („non-steroidal anti inflammatory drug“, NSAID), die zum Teil als GSM wirksam sind (Weggen et al., 2001; Weggen et al., 2003). Bei den NSAIDs handelt es sich um die erste Generation der GSMs. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nicht alle NSAIDs als GSMs wirksam sind (Zettl et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass einige GSMs an das GxxxG-Motiv in der A β Sequenz binden und somit die Dimerisierung schwächen. Die Schwächung der Dimerisierung wirkt sich wiederum auf die Prozessierung des APP aus. So entstehen bei einer Behandlung mit Sulindacsulfid vermehrt kürzere A β Spezies (A β 38) wobei die Produktion von A β 42 gesenkt wird (Richter et al., 2010).

Eine weitere Möglichkeit die neurotoxischen Eigenschaften von A β Peptiden zu unterbinden ist der Einsatz von Aggregationsinhibitoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass kleine Peptide die Aggregation von A β 42 inhibieren können. Dieses Inhibitorpeptid (NH $_3^+$ -RGTFEGKF-CONH $_2$) besitzt nicht nur die Fähigkeit die Aggregation von A β zu unterbinden, vielmehr reduziert es auch die neurotoxischen Eigenschaften des A β Peptids (Sato et al., 2006). Das Inhibitorpeptid beinhaltet ein GxxxG-Motiv. Sato et al. haben bereits 2006 postuliert, dass der Aggregationsinhibitor über das GxxxG-Motiv in der A β Sequenz bindet, wobei die genaue Bindungsstelle noch nicht identifiziert wurde. Das untermauert die zentrale Bedeutung des GxxxG-Motivs in der A β Sequenz.

2.3.4 Einfluss auf die Genregulation von A β

Für die AICD wurde eine transkriptionsregulatorische Wirkung beschrieben. In letzter Zeit wird immer mehr diskutiert, dass auch intrazelluläres A β 42 solch ein Wirkungspotenzial haben kann. Es wurde indirekt beschrieben, dass intrazelluläres A β 42 den Promotor des Tumorsuppressorproteins p53 aktiviert, was zu p53-vermittelter Apoptose führt. Intrazelluläres A β 40 hat einen ähnlichen, jedoch schwächeren Effekt. Der intrazelluläre Signalweg von A β 42/ p53 könnte eine direkte Relevanz für den neuronalen Verlust bei der Alzheimer Krankheit darstellen (Ohyagi et al., 2005).

Es wurde gezeigt, dass A β 42 die Transkription von BACE1 erhöht (Buggia-Prevot et al., 2008). Erst kürzlich wurde beschrieben, dass A β 42, nach induziertem oxidativen Stress oder Hitzestress, in den Zellkern transloziert und dort *in vitro* die Transkription von APP und BACE1 erhöhen soll (Bailey et al., 2011). Es konnte eine DNA-Sequenz aus dem „heat shock element“ des p53 Promotor (Ohyagi et al., 2005) ermittelt werden, an die A β 42 spezifisch binden soll. Dieses Decamer (GGATTGGGGT) bindet bevorzugt A β 25-35 (Maloney and Lahiri, 2011). Bei genauer Betrachtung der A β -Sequenz fällt auf, dass dieser Peptidabschnitt die konsekutiven GxxxG-Motive enthält, die bereits als entscheidend für die Toxizität und die Aggregation beschrieben wurden (Harmeier, 2008; Resenberger et al., 2011). Das identifizierte DNA-Decamer befindet sich auf einer ganzen Reihe von Promotorsequenzen. So konnte gezeigt werden, dass A β 42 an den Promotor von APP, BACE1 und des APOE bindet (Maloney and Lahiri, 2011).

2.4 Zielsetzung

Eine Vielzahl von Publikationen hat sich in den letzten Jahren mit der Frage der neurotoxischen Wirkung des bei der Alzheimer Krankheit relevanten A β 42 Peptids beschäftigt. Es konnte gezeigt werden, dass nicht A β Fibrillen, sondern niedere Oligomere (Dimere bis Decamere) das größte toxische Potential haben.

Nach ersten Hinweisen aus meiner Diplomarbeit, in der ich gezeigt habe, dass A β 42 von Neuroblastom Zellen aufgenommen wird und im Zellkern detektiert werden kann, sollte in der vorliegenden Arbeit die Funktion von A β Peptiden im Zellkern aufgeklärt werden.

Eine zentrale Frage, die bis heute nicht geklärt werden konnte, befasst sich damit, warum A β 42 toxisch ist. Es ist bekannt, dass intrazelluläre und extrazelluläre Ablagerungen von A β Peptiden zum Ausbruch der Alzheimer Krankheit führen. Es konnte jedoch noch nicht abschließend geklärt werden, welcher molekulare Mechanismus der neurotoxischen Wirkung des A β 42 zugrunde liegt.

Ziel dieser Arbeit war es zu analysieren, welche A β Spezies in den Zellkern translozieren. Dabei sollte versucht werden, biochemisch und zellbiologisch eine zeitliche Abhängigkeit der Internalisierung der Peptide zu zeigen. Eines der Hauptziele war die Untersuchung der Funktion der A β Spezies im Zellkern. Es wurde die Bindung von A β 42 an Promotoren untersucht. Darüber hinaus sollte sowohl das neurotoxische A β 42 als auch die nicht-neurotoxischen A β Spezies (A β 38, 40, 42 G33A, 43) hinsichtlich ihres Einflusses auf transkriptionsregulatorische Effekte charakterisiert werden.

Mit Hilfe eines Illumina „Microarray“ als Indikator für die Genexpression sollten mRNA Mengen aus Neuroblastom Zellen nach Behandlung mit A β 42 bzw. den nicht-neurotoxischen A β Peptiden A β 40 und A β 42 G33A, vergleichend untersucht werden.

Auch sollte die Frage geklärt werden, ob *in vivo* neurotoxische A β 42 Peptide in den Zellkernen von Neuronen nachzuweisen sind.

3 Ergebnisse

3.1 Verifizierung der Kernpräparation

In meiner Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass A β Peptide im Zellkern neuronaler SH-SY5Y Zellen nachzuweisen sind (Barucker, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Aufnahme von synthetischen A β Peptiden, die dem Zellkulturmedium zugesetzt wurden, bis in den Zellkern verfolgt. Die Zellkerne von behandelten und unbehandelten Zellen wurden mit dem „Nuclei Isolation Kit“ aus Neuroblastom Zellen isoliert. Anschließend wurde die Kernmembran mittels Ultraschall und Hitze aufgebrochen. Mit einer daran anschließenden Zentrifugation wurden die Kernlumenproteine von der Kernmembran und daran gebundenen Zellorganellen, wie Golgiapparat und Endoplasmatisches Retikulum (ER), getrennt. Es konnte sichergestellt werden, dass die präparierten Kernlumenproteine (lösliche Kernfraktion) weder mit cytosolischen noch mit membranständigen Proteinen verunreinigt gewesen sind. Die Reinheitskontrollen der Kernpräparation wurden mit sechs monoklonalen Antikörpern verifiziert (Abb. 4).

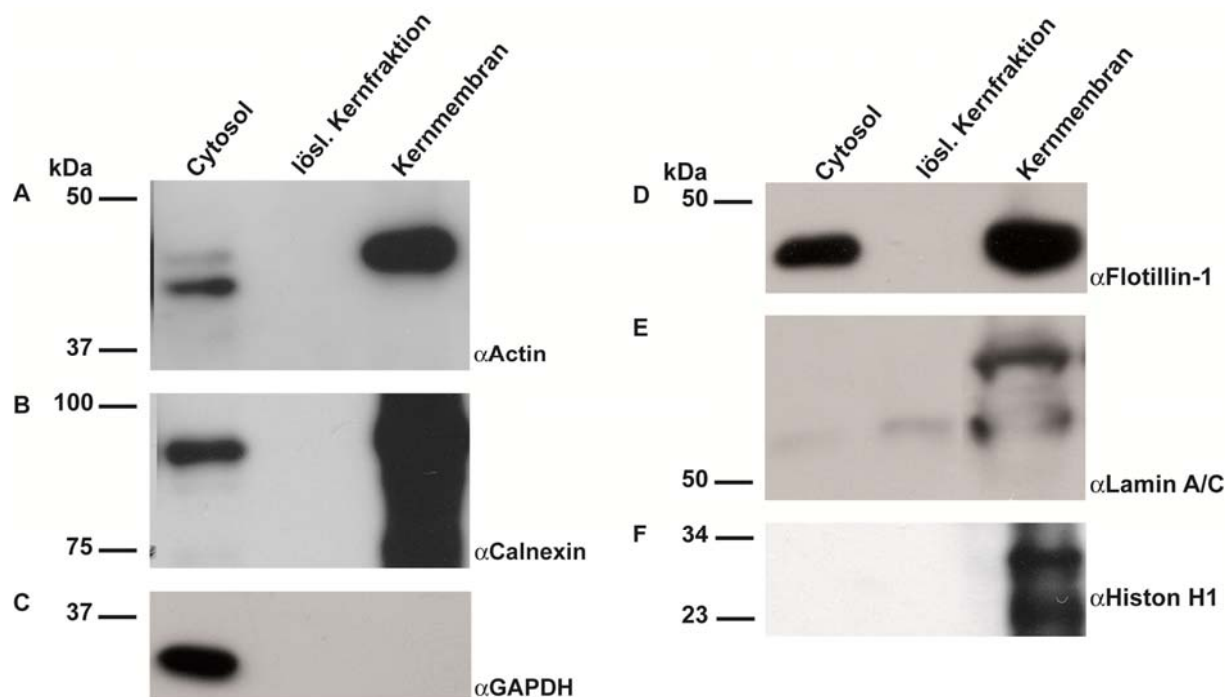


Abb. 4: Western Blot zur Verifizierung der Kernpräparation von SH-SY5Y-Zellen. Die Kernpräparation erfolgte mit dem Nuclei Isolation Kit (Sigma). Die Analysen erfolgten mit einem α Actin AK (A), α Calnexin AK (B), α GAPDH AK (C), α Flotillin-1 AK (D), α Lamin A/C AK (E) und mit einem α Histon H1 AK (F). Lösliche Kernfraktion: Kernlumenproteine

Actin (A) und GAPDH (C) stellten dabei die Marker für cytosolische Proteine dar, Calnexin (B) wurde als spezifisches Protein für das ER verwendet. Flotillin-1 (D), das in der Plasmamembran lokalisiert ist, stellte den Marker für diese dar. Mit dem verwendeten Aufreinigungsprotokoll der Zellkerne wurde keine detaillierte Fraktionierung der einzelnen Zellorganellen erreicht. Letztlich wurden nur die Zellkerne isoliert und aus diesen schließlich die Kernlumenproteine. Aus diesem Grund ist es nicht überraschend, dass in der Spur des Cytosols (Abb. 4) sowohl Transmembranproteine, ER-Proteine und cytosolisch lokalisierte Proteine zu detektieren waren, da die verwendeten Zellyse- und Zentrifugationsbedingungen keine differentielle Isolierung der einzelnen Zellorganellen zugelassen hat. Das war jedoch auch nicht notwendig. Von Bedeutung waren nur die Kernlumenproteine.

Lamin A/C (E) und Histon H1 (F) sind typische Kernproteine. Mit dem verwendeten Protokoll konnten die Histone nicht in der löslichen Kernfraktion nachgewiesen werden, sondern nur in der Kernmembran-Fraktion. Lamin A/C konnte in der Spur „lösl. Kernfraktion“ nachgewiesen werden. Da in dieser Spur ausschließlich LaminA/C enthalten war, wurde sichergestellt, dass mit der verwendeten Aufreinigungsmethode die Kernlumenproteine nicht mit cytosolischen oder membranständigen Proteinen verunreinigt gewesen sind.

Aufgrund der hohen Reinheit der Kernlumenproteinfraktion (löslichen Kernfraktion) war das verwendete Protokoll zur Isolierung von Zellkernen aus Neuroblastom Zellen sehr gut geeignet für die weitere Analyse der löslichen Kernfraktion mittels „enzyme linked immunosorbent assay“ ELISA. Im ELISA wurde folgend die Menge an verschiedenen internalisierten A β Spezies aus dem Zellkern quantifiziert.

3.2 Nachweis verschiedener A β Spezies im Zellkern von SH-SY5Y Zellen

Diverse Befunde deuten darauf hin, dass A β Peptide in zwei unterschiedlichen Produktlinien bei der Prozessierung des APP durch die γ -Sekretase generiert werden (Qi-Takahara et al., 2005; Munter et al., 2007; Takami et al., 2009). Eine Produktlinie läuft über A β 49, 46, 43, 40 und 37, die andere Linie läuft über A β 48, 45, 42, zu 38 (siehe 2.2.2, Abb. 2 und 2.3.2 Abb. 3). Ausgehend von der Theorie der zwei möglichen Produktlinien von A β Peptiden wurden aus jeder Produktlinie synthetische A β Peptide im Hinblick auf ihre Aufnahme in den Zellkern von Neuroblastom Zellen untersucht. Aus der Produktlinie, die das stark neurotoxische A β 42 enthält, wurden neben dem A β 42 wt Peptid zusätzlich die Peptide A β 42 G33A und A β 38 untersucht. A β 42 G33A ist aufgrund der substituierten Aminosäure im GxxxG-Motiv sehr viel hydrophober und aggregiert schneller zu höheren Oligomeren als A β 42 wt. Das

Austauschpeptid ist zudem nicht neurotoxisch (Harmeier et al., 2009). A β 38 ist ebenfalls nicht neurotoxisch, neigt aber nicht zur Aggregation (Harmeier, 2008). Aus der Produktlinie in der A β 40 entsteht, wurde dieses und ebenfalls A β 43 analysiert. Aus beiden Produktlinien ließen sich alle A β Spezies im Zellkern mittels ELISA nachweisen (Abb. 5). Mit Ausnahme von A β 42 G33A sieht es zudem so aus, als würde die Aufnahme in den Zellkern mit der Länge bzw. der zunehmenden Hydrophobizität der A β Peptide korrelieren. Im Vergleich zu A β 42 wt wurde von A β 38 die doppelte Menge und von A β 40 50% mehr im Kern detektiert. Im Gegensatz dazu wurde von A β 43 nur eine Menge von 50%, verglichen mit A β 42 wt, im Zellkern nachgewiesen. Die Menge von A β 42 G33A im Zellkern ist vergleichbar mit A β 38.

Um zu gewährleisten, dass es sich bei der beobachteten Internalisierung von A β Peptiden in den Zellkern von Neuroblastom Zellen nicht um ein Artefakt handelt, wurden diese Ergebnisse in anderen Zelllinien verifiziert. Die Aufnahme von A β Peptiden in den Zellkern war sowohl in HEK-Zellen („human embryonic kidney“) als auch in „mouse embryonic fibroblast“ (MEF) Presenilin1/ 2 „knock out“ Zellen (MEF PS1/ 2^{-/-}) mittels ELISA nachzuvollziehen. Die MEF PS1/ 2^{-/-} Zellen wurden verwendet um etwaige Einflüsse von endogenem A β ausschließen zu können. (Daten nicht gezeigt.)

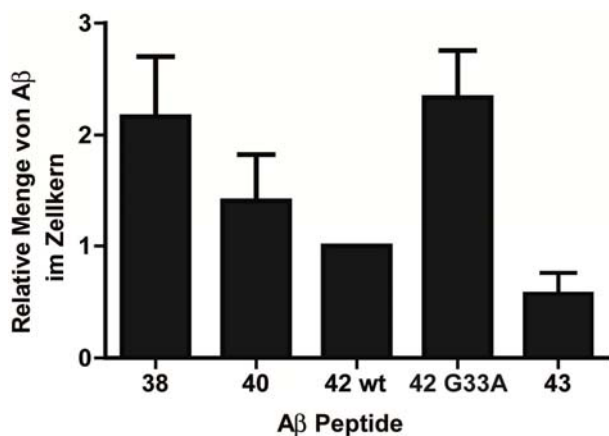


Abb. 5: Quantifizierung synthetischer A β Peptide im Zellkern von SH-SY5Y Zellen. Die Zellen wurden 2 h mit jeweils 1 μ M synthetischem A β Peptid (nicht toxische Konzentration) behandelt, die Zellkerne präpariert und die lösliche Kernfraktion hinsichtlich der A β Peptide mittels ELISA (4G8 AK) analysiert. A β 42 wt wurde auf 1 gesetzt und die relative Menge der anderen Spezies berechnet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STABWN, n=4-8.

3.3 Aggregationsverhalten von A β Peptiden

Da die unterschiedlich starke Internalisierung der A β Peptide sehr unerwartet war, wurde die Oligomerisierung der Peptide in der SDS-PAGE („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“) und anschließendem Western Blot untersucht. Frisch gelöstes synthetisches A β 38 und A β 40 lagen nach SDS-PAGE in monomerer und dimerer Form vor (Abb. 6). Für A β 42 wt konnten Signale für Monomere bis hin zu Tetrameren und ein schwaches Signal für höhere Oligomere detektiert werden. A β 42 G33A zeigte ein anderes Laufverhalten als A β 42 wt. Wie bereits Harmeier et al., 2009 zeigen konnten, bildet dieses Peptid schneller höhere Oligomere im Vergleich zu A β 42 wt. Diese Ergebnisse konnten hier bestätigt werden. Überraschend ist das Laufverhalten von A β 43. Es konnten keine Tetramere nachgewiesen werden. Lediglich eine Monomerbande und schwache Signale für Dimere/ Trimere wurden detektiert. Das Peptid bildet sehr schnell höhere Oligomere, was an dem Signal beginnend bei 34 kDa bis zum oberen Rand des Gels (größer als 250 kDa) zu beobachten ist.

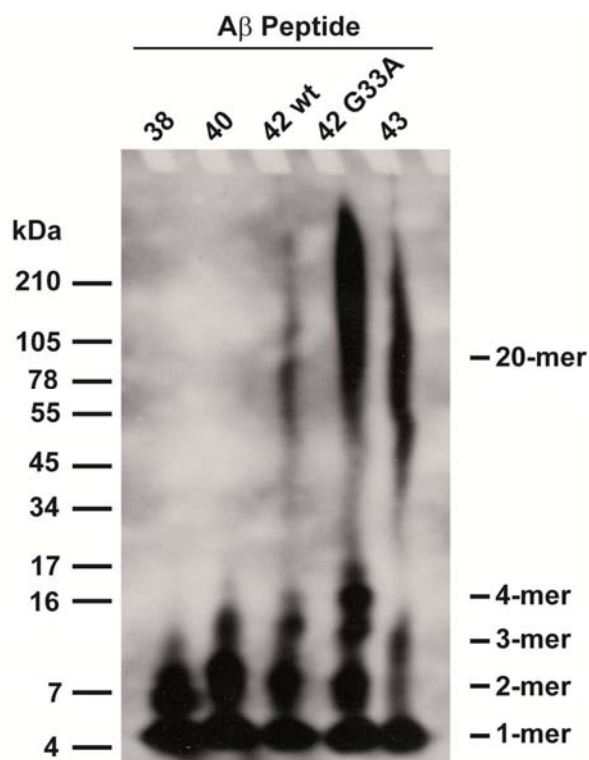


Abb.6: Western Blot frisch gelöster A β Peptide. Vergleichbare Proteinkonzentrationen wurden auf das Gel aufgetragen. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper W02.

Es ist zu beachten, dass SDS die Eigenschaft besitzt, nicht kovalente Wechselwirkungen aufzuheben. Es sollte davon ausgegangen werden, dass die hier detektierten Oligomere unter nativen Bedingungen nicht vollständig in dieser Verteilung vorliegen müssen. So ist zu berücksichtigen, dass detektierte Monomere, Dimere und Trimere aus höheren Oligomeren

herausgelöst sein können. Andererseits wurde beschrieben, dass SDS die Aggregation von A β Peptiden begünstigen (Podlisny et al., 1995; Barghorn et al., 2005; Rangachari et al., 2006).

Es kann jedoch festgestellt werden, dass mit steigender Hydrophobizität der Peptide die Aggregation begünstigt wird (Harmeier et al., 2009), so dass die Menge an höheren Oligomeren zunimmt.

3.4 Toxizität verschiedener A β Peptide

Um ausschließen zu können, dass die Aufnahme verschiedener A β Spezies in den Zellkern auf sekundäre Effekte aufgrund der Neurotoxizität einzelner Peptide zurückzuführen ist, wurde die Zellviabilität durch Verwendung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Tetrazoliumsalz, MTT-Test) bestimmt. Verglichen wurden hier mit A β 42 und A β 43 behandelte Zellen in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Beide Peptide sind bei einer Konzentration von 2,5 μ M signifikant toxisch, wobei A β 42 die Lebendzellzahl um 40% und A β 43 nur um 25% reduziert hat. Wird die Konzentration auf 1 μ M herabgesetzt, weisen beide Peptide keine Toxizität auf (Abb. 7). A β 38, A β 40 und A β 42 G33A sind bei einer Konzentration von 2,5 μ M nicht neurotoxisch (Harmeier 2008, Harmeier et al., 2009).

Daher wurden alle nachfolgenden Experimente in dieser Arbeit mit einer Konzentration von 1 μ M Peptid durchgeführt.

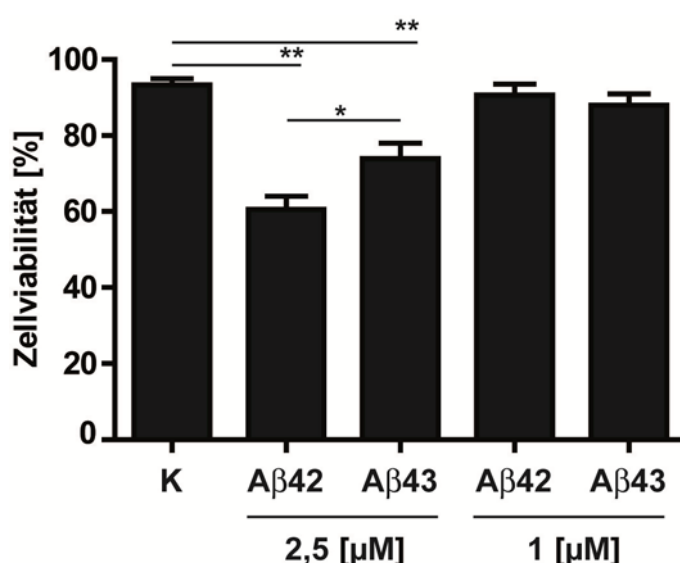


Abb. 7: Toxizitätstest von A β Peptiden auf SH-SY5Y Zellen. Die Zellen wurden 12 h mit synthetischen A β 42 bzw. A β 43 Peptiden inkubiert. Anschließend wurden die lebenden Zellen mittels MTT-Test gemessen. Die Peptide wurden nach Schmechel et al., 2003 gelöst. Die Kontrollzellen (K) wurden dazu analog behandelt und inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STABWN, n=12-17. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Referenzwert an mit *p<0,05, **p<0,0005, 1-way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test.

3.5 Nachweis von A β Peptiden im Zellkern

3.5.1 Synchronisation von Neuroblastom Zellen

Im Folgenden wurde analysiert, ob die Aufnahme von A β Peptiden in den Zellkern mit der Inkubationszeit korreliert. Um eventuelle Einflüsse auszuschließen, die vom Zellzyklus herrühren können, wurden die Zellen mit einem Doppel-Thymidinblock synchronisiert (Fang et al., 1998; Mannioui et al., 2004). Thymidin hemmt die Ribonucleotid-Reduktase. Diese wird durch die Bindung von Thymidin allosterisch inhibiert, sodass die Zellen kein desoxy-Cytosin Triphosphat (dCTP) synthetisieren können und es somit nicht zur Replikation der DNA kommen kann. Die Zellen werden in der G1/ S-Phase arretiert.

Alle nachfolgenden *in vitro* Experimente in dieser Arbeit wurden mit synchronisierten Zellen durchgeführt.

3.5.2 Vergleich von A β 42 wt und A β 42 G33A

Kürzlich wurde gezeigt, dass eine Substitution in der A β Sequenz an Position Gly₃₃ zu einem Ala die Aggregation und die Toxizität des Peptids grundlegend verändert. Größenausschlusschromatographien zeigten, dass frisch gelöstes synthetisches A β 42 wt Peptid überwiegend als Tetramere, aber auch als höhere Oligomere (10-20-mere) vorliegen. Im Gegensatz dazu lassen sich bei dem Austauschpeptid (A β 42 G33A) deutlich weniger Tetramere nachweisen, jedoch aggregiert dieses schnell zu höheren Oligomeren (10-20-mere) (Harmeier et al., 2009). Im Hinblick auf die Internalisierung von A β Peptiden in die Zelle und in den Zellkern wurden die beiden Peptide miteinander verglichen.

Untersucht wurde die Aufnahme in den Zellkern über einen Zeitraum von acht Stunden. In den Zellkern internalisierte A β Peptide wurden im ELISA mit dem A β 42 spezifischen Antikörper G2-13 quantifiziert. Zeitverlaufsstudien zeigten, dass sowohl das neurotoxische A β 42 wt als auch die nicht-neurotoxische Form A β 42 G33A von SH-SY5Y Zellen aufgenommen wurden und im Kern der Zellen akkumulieren (Abb. 8).

Erneut wurde deutlich, dass A β 42 G33A stärker im Zellkern akkumuliert als A β 42 wt (Vergl. Abb. 5).

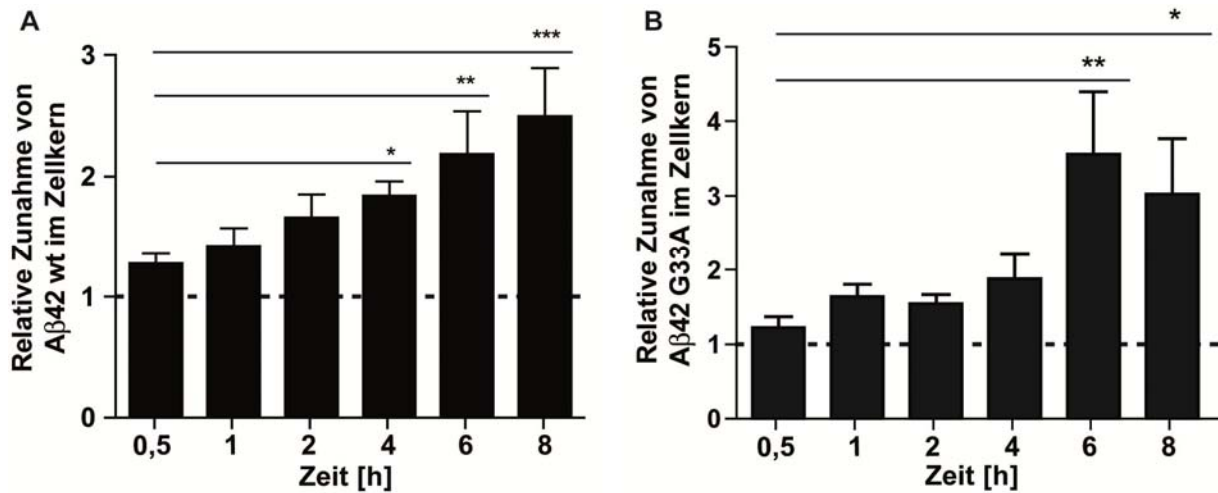


Abb. 8: Quantifizierung von synthetischem Aβ42 wt und Aβ42 G33A im Zellkern von SH-SY5Y Zellen. Synchronisierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischen Aβ Peptiden (1 μM) inkubiert. Die Zellkerne wurden isoliert und die lösliche Kernfraktion mit einem Aβ42 spezifischen ELISA (G2-13) auf das Vorhandensein von Aβ im Zellkern quantifiziert. (A) Aβ42 wt und (B) Aβ42 G33A akkumulieren zeitabhängig im Zellkern. Gezeigt sind Mittelwerte ± STABWN, n=4-7, *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, 1 way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test.

3.5.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie zum Nachweis von Aβ42 im Zellkern

Nachdem die Internalisierung verschiedener Aβ Spezies aus dem Zellkulturüberstand in den Zellkern mittels ELISA nachgewiesen wurde, sollten diese Daten durch mikroskopische Methoden verifiziert werden. Für die Konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde dem Zellkulturmedium N-terminal biotinyliertes Aβ42 hinzugefügt. Mit Hilfe eines Alexa488 markierten Zweitantikörpers wurde die Verteilung von Aβ42 in der Zelle mikroskopisch über einen Zeitraum von acht Stunden verfolgt. Bereits nach 30 Minuten Inkubation konnten Aβ Peptide im Cytosol und im Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 9). Im Zeitverlauf akkumuliert das Peptid im Cytosol und im Zellkern. Auffällig ist, dass die intrazellulären Aggregate mit fortschreitender Zeit an Größe zunehmen. Gezeigt werden die Aufnahmen nach 30 Minuten und nach acht Stunden Inkubation. In der Übereinanderlagerung „Merge“ von dem grünen Kanal (Aβ) und dem DAPI Kanal ist zu erkennen, dass die Aβ Oligomere sowohl im Cytosol als auch im Zellkern lokalisiert sind.

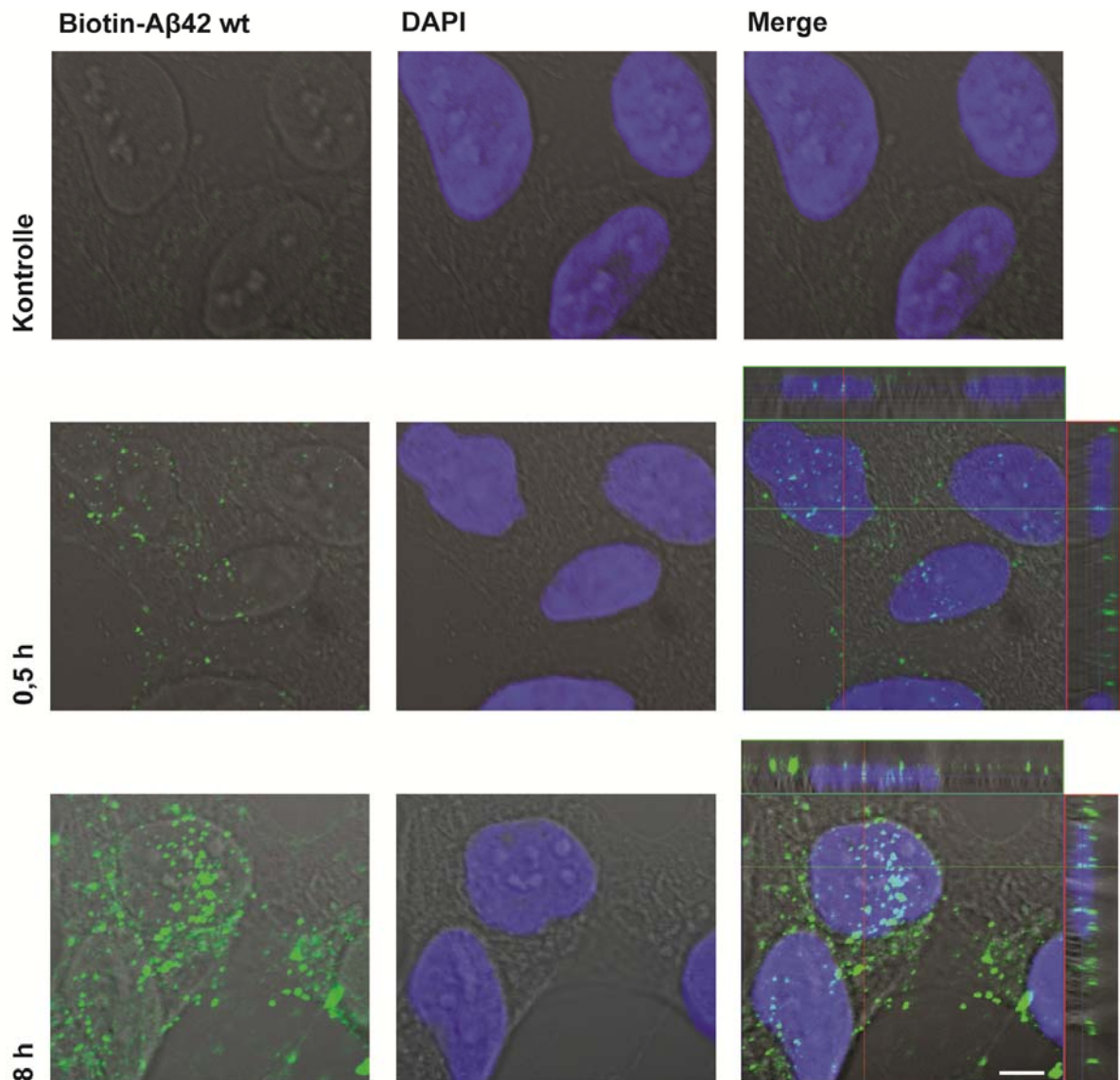


Abb. 9: Immunfluoreszenz-Analyse zur Lokalisation von synthetischem A β 42 in Neuroblastom Zellen. Synchronisierte Zellen wurden mit N-terminal biotinyliertem synthetischen A β 42 wt (1 μ M) inkubiert. Die Zellen wurden fixiert, A β mit einem α Biotin AK markiert, der Sekundär AK war mit Alexa488 markiert. Gezeigt sind konfokale Aufnahmen aus der Mitte eines jeweiligen Z-Scans. A β akkumuliert im Cytosol und im Zellkern von SH-SY5Y Zellen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, der Skalierungsbalken zeigt 5 μ m an.

Deutlich wird dies in den orthogonalen Projektionen (Merge) für 0,5 und acht Stunden. Dabei ist eine Ebene aus einem Z-Scan durch den Zellkern gezeigt. Das entstehende Kreuz aus der roten und grünen Linie markiert ein Fluoreszenzsignal von A β im Zellkern in der zweidimensionalen Ansicht. Am rechten und oberen Bildrand zeigen die beiden Linien jeweils an (orthogonale Projektion), dass das markierte Signal tatsächlich im Kern und nicht nur an der Außenseite der Kernmembran lokalisiert ist.

3.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie zum Nachweis von A β 42 im Zellkern

Mittels der konfokalen Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die in Zellkultur zugegebenen A β Peptide von SH-SY5Y Zellen aufgenommen und über die Zeit sowohl im Cytosol als auch im Zellkern akkumulieren. Es war jedoch nicht möglich, eine genaue Lokalisation der Peptide in der Zelle ausmachen zu können. Dieses Problem konnte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie gelöst werden. Gezeigt ist eine Abbildung, die mit dem α A β Antikörper W02 aufgenommen wurde. Dieser Antikörper erkennt die Aminosäuresequenz 5-8 (Ida et al., 1996b) im A β . In den Kontrollaufnahmen wurde nur wenig endogenes Signal detektiert. Nach Zugabe von A β 42 wurden nach acht Stunden Inkubation die internalisierten A β Peptide im Zellkern detektiert. Dies lässt sich, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, an der Anzahl der Goldpartikel belegen. Die Signale für das internalisierte A β 42 sind vorrangig in den Mitochondrien und im Zellkern lokalisiert (Abb. 10, Pfeile).

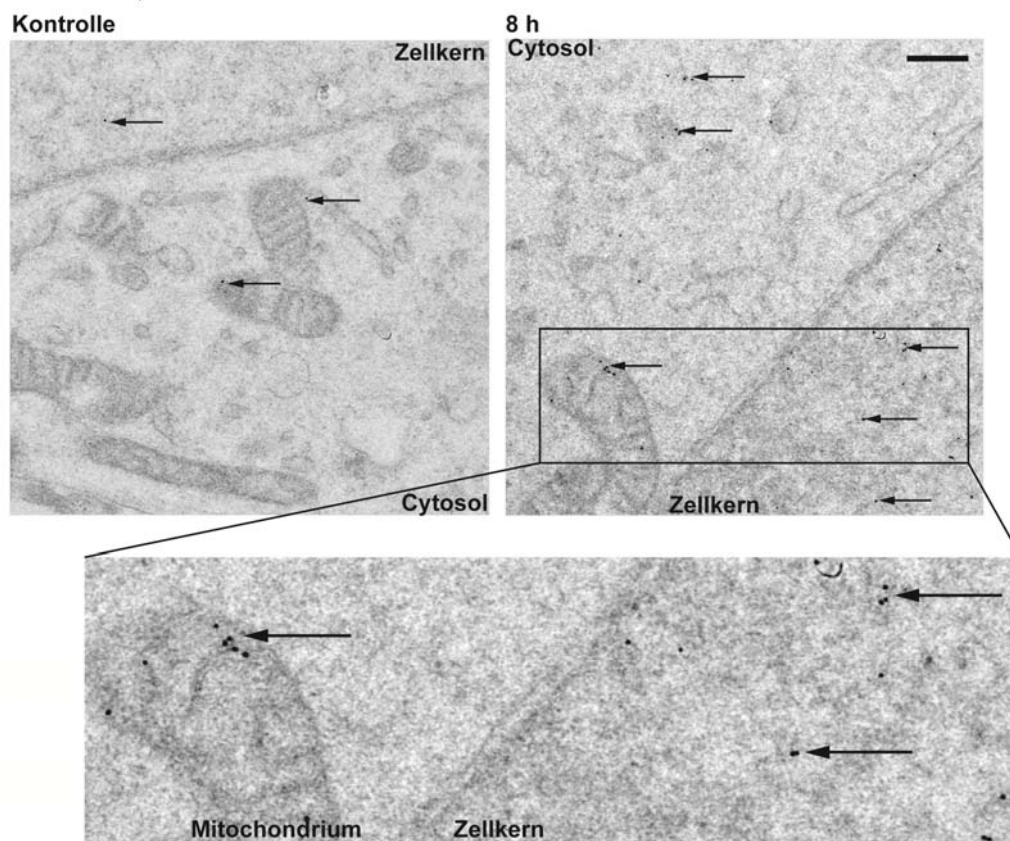


Abb. 10: Immungold-Markierung zur Lokalisation von synthetischem A β 42 in Neuroblastom Zellen. Synchronisierte Zellen wurden mit synthetischem A β 42 wt (1 μ M) inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und auf „Gold-Grids“ aufgebracht. Anschließend wurde ein „Antigen Retrieval“ durchgeführt. A β wurde mit dem W02 AK markiert, welcher mit einem Sekundärantikörperconjugat 10 nm Au sichtbar gemacht wurde. A β wurde verstärkt in Mitochondrien und in Zellkernen von SH-SY5Y Zellen detektiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen, der Skalierungsbalken zeigt 500 nm an.

Ein identisches Signalmuster lieferte der A β 42 spezifische Antikörper G2-13. Bei diesem war die Signalintensität jedoch insgesamt schwächer. (Daten nicht gezeigt.)

3.6 Direkte oder indirekte Bindung von A β 42 wt an Promotoren

Nachdem mit drei verschiedenen Methoden gezeigt werden konnte, dass A β Peptide von SH-SY5Y Zellen aufgenommen werden und diese über die Zeit im Zellkern akkumulieren, sollte folgend geklärt werden, ob die Peptide im Kern eine funktionelle Bedeutung haben. Um diese Frage beantworten zu können, wurde versucht A β 42, das eventuell direkt oder indirekt mit Promotorregionen interagiert, mittels Antikörper zu präzipitieren. Um von einer Interaktion zwischen DNA und A β 42 sprechen zu können, wurden im Anschluss bestimmte Promotorregionen mit einer PCR amplifiziert und das Vorhandensein der amplifizierten DNA auf Polyacrylamidgelen überprüft (Chromatinimmunpräzipitation, ChIP).

Bekannt ist, dass die „APP intracellular domain“ AICD im Komplex mit dem Adapterprotein Fe65 und der Histonacetyltransferase Tip60 an den LRP1 Promotor („low density lipoprotein receptor-related protein) bindet (Liu et al., 2007). Weiterhin bindet der Komplex aus AICD, Fe65 und Tip60 auch an den KAI1 Promotor (Baek et al., 2002). Im Cytosol interagiert Fe65 mit seiner PTB2-Domäne mit dem noch nicht von der γ -Sekretase prozessierten α - oder β CTF über ein YENPTY-Motiv und transloziert nach dem ϵ -Schnitt der γ -Sekretase in den Zellkern (Cao and Sudhof, 2004a; Buoso et al., 2010). Im Zellkern findet die Formation eines transkriptionsaktivierenden Komplexes bestehend aus AICD, Fe65 und Tip60 statt (von Rotz et al., 2004).

Da LRP1 und KAI1 in der Literatur im Zusammenhang mit der AICD für die Alzheimer Erkrankung in Verbindung gebracht wurden, jedoch nicht mit A β , wurden diese beiden Promotoren in dieser Arbeit hinsichtlich einer direkten oder indirekten Interaktion von A β 42 untersucht.

Die ChIP-Experimente zeigten, dass A β 42 bereits nach 30 Minuten Inkubation mit dem LRP1 Promotor (Abb. 11A) präzipitiert werden konnte. Nach einer Stunde verstärkte sich das Signal für A β 42, das unverändert bis zum Zeitpunkt von acht Stunden blieb. Nach einer Stunde wurden Fe65 und Tip60 co-präzipitiert. Nach zwei Stunden hatten die Signale für Fe65 und Tip60 ihr Intensitätsmaximum erreicht. Nach vier Stunden Inkubation nimmt die Intensität von Fe65 und Tip60 deutlich ab, nach acht Stunden Inkubation sind Fe65 und Tip60 vollständig dissoziiert (Abb. 11A).

Die Analyse der KAI1 Promotors (Abb. 11B) ergab ähnliche Resultate. Nach 30 Minuten Inkubation assoziiert A β 42 mit dem Promotor. Die Interaktion mit A β erreicht bei 1 bis 2 Stunden Inkubation ein Maximum und bleibt konstant. Nach zwei Stunden assoziieren Fe65 und Tip60. Nach vier Stunden Inkubation nimmt die Signalintensität für Fe65 und Tip60 deutlich ab, nach acht Stunden Inkubation mit A β sind Fe65 und Tip60 vollständig dissoziiert. Nach einer Stunde Inkubation mit A β 42 dissoziiert der Corepressor N-CoR. Nach sechs Stunden assoziiert dieser wieder mit dem Promotor, nach acht Stunden ist die Intensität vergleichbar mit dem Ausgangswert vor Inkubation mit A β 42. KAI1 steht unter der Kontrolle von NF κ B wovon p50 eine Untereinheit darstellt und zu jeder Zeit unverändert mit dem Promotor assoziiert (Baek et al., 2002; Kim et al., 2005).

Zeitgleich wurden ChIPs von Neuroblastom Zellen durchgeführt, die nicht mit A β 42 inkubiert wurden. Diese Zellen wiesen zu allen Zeitpunkten dasselbe Bandenmuster wie der Kontrollwert bei null Stunden auf (Abb. 11A, B, C). (Daten der Kontrollen nicht gezeigt.)

Weiterhin wurde der HES1 Promotor im Hinblick auf die Bindung von A β 42 untersucht. Der HES1 Promotor ist ein Ziel im Notch-Signalweg. Notch wird, wie APP, durch die γ -Sekretase proteolytisch gespalten. Die Prozessierung von Notch durch die γ -Sekretase ist während der Embryonalentwicklung und der Zellspezialisierung wichtig, da die dabei entstehende „Notch-intracellular-C-terminal-domain“ (NICD) im Zellkern unter anderem die Transkription der Genfamilien von HES und HEY kontrolliert (Kim et al., 2007; Zanotti and Canalis, 2010). Der HES1 Promotor ist dem Gen *Hes1* vorangestellt, das für den Transkriptionsfaktor HES1 („Hairy and enhancer of split“) kodiert (Ingram et al., 2008). Der AICD-Fe65-Tip60-Komplex wird nicht vom HES1 Promotor gebunden (Liu et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass A β 42 zu keiner Zeit an den HES1 Promotor gebunden hat (Abb. 11C). Somit stellte der HES1 Promotor eine interne Kontrolle dar. Dieses Ergebnis ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Bindung von A β 42 an den LRP1 und KAI1 Promotor spezifisch ist.

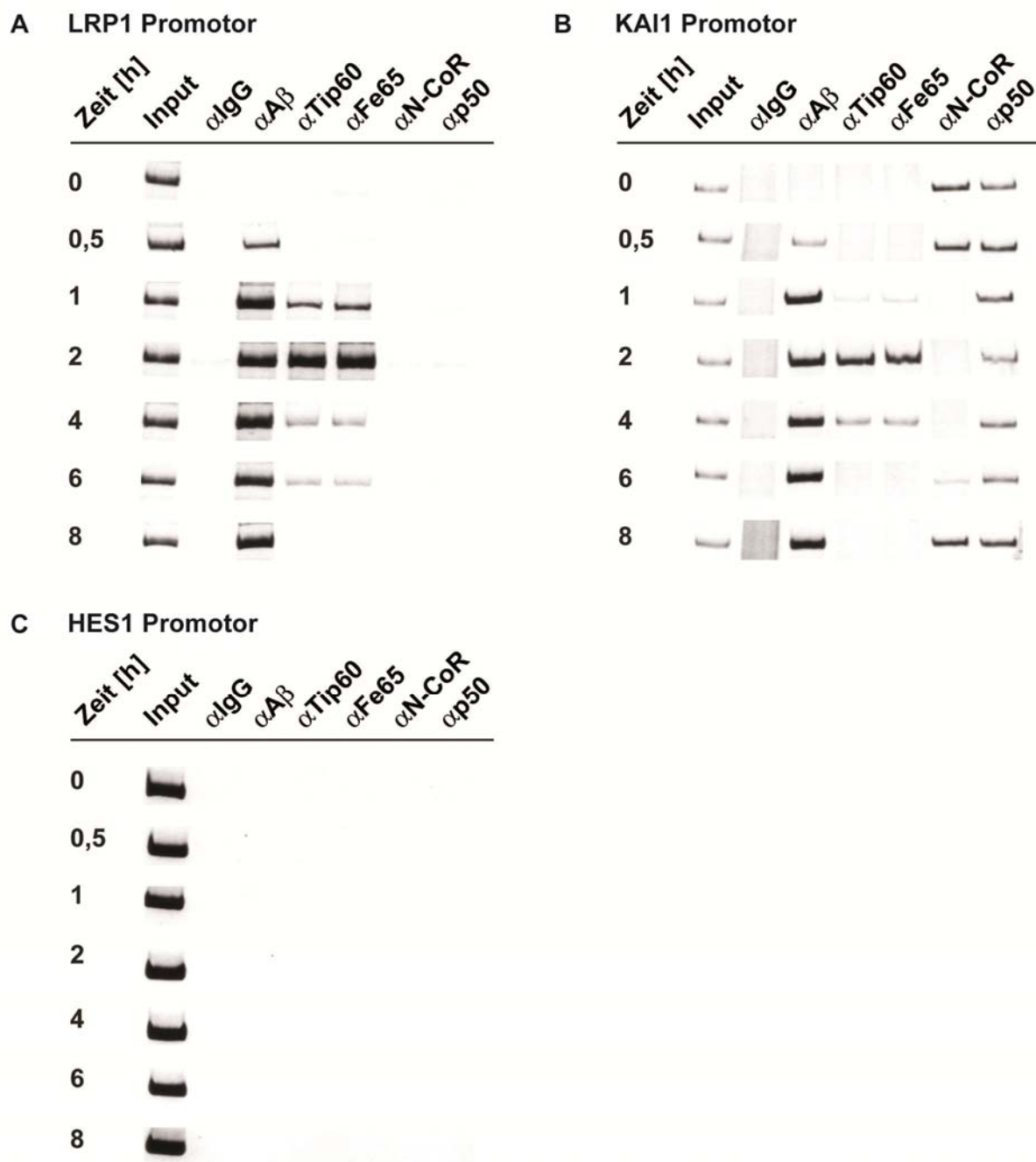


Abb. 11: Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) von DNA-Fragmenten der Promotoren von LRP1, KAI1 und HES1. Vor der Chromatinimmunpräzipitation wurden die Zellen mit den Kreuzvernetzern Formaldehyd und DSG (Disuccinimidylglutarat) behandelt. „Input“: eingesetzte DNA. A β 42 interagiert mit dem LRP1 Promotor (A), mit dem KAI1 Promotor (B) jedoch nicht mit dem HES1 Promotor (C).

3.7 Charakterisierung des Einflusses von A β Peptiden auf die Genregulation

Die bisherigen Ergebnisse, wie die Internalisierung von A β Peptiden in die Zelle und die Akkumulation im Zellkern sowie die Interaktion von neurotoxischen A β 42 wt Peptiden mit DNA-Promotor-Regionen, deuten darauf hin, dass A β Peptide direkt an der Genregulation beteiligt sein könnten.

3.7.1 Qualitätskontrolle isolierter RNA

Um die aufgestellte Hypothese testen zu können, wurde mRNA aus Neuroblastom Zellen isoliert, die zuvor mit A β -Peptiden inkubiert wurden. Die mRNA wurde mittels „reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) in cDNA transkribiert und anschließend mittels quantitativer „real time - PCR“ (qRT-PCR) quantifiziert. Die Reinheit der RNA ist bei dieser Methode von besonderer Bedeutung.

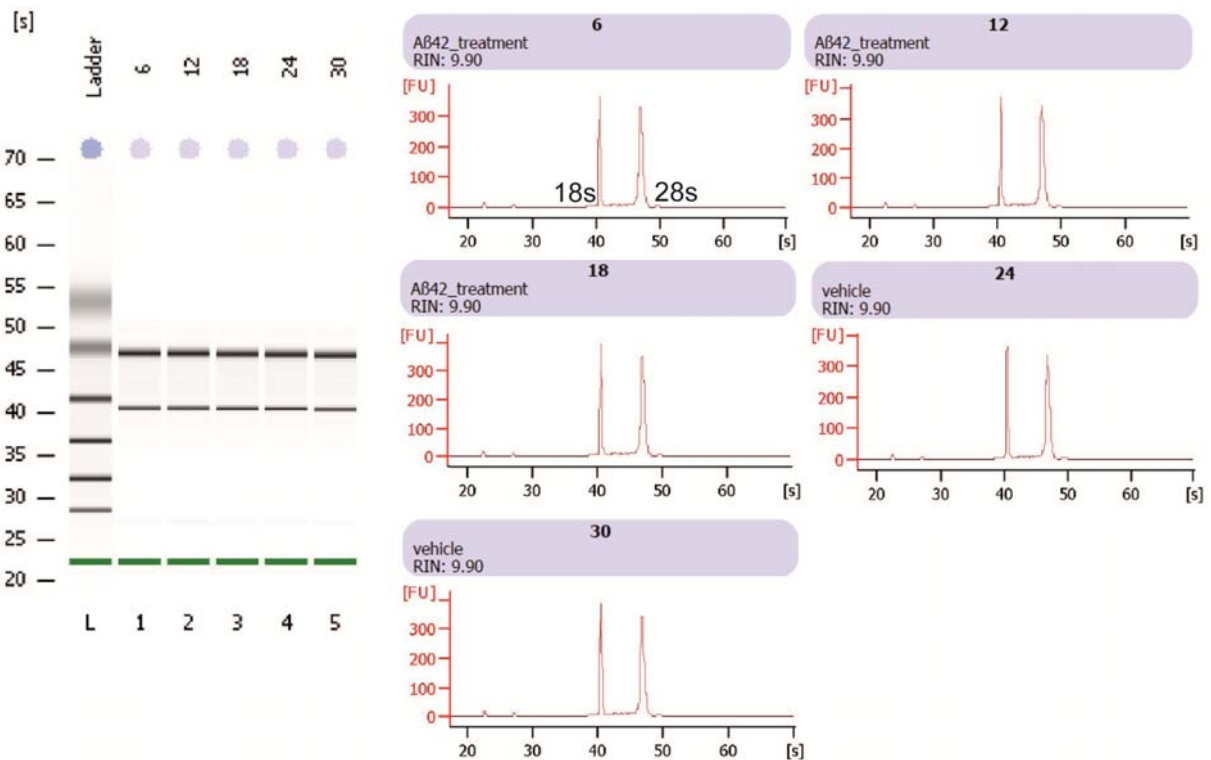


Abb. 12: Qualitätskontrolle der isolierten mRNA. Stichprobenartig wurden die RNA-Proben mittels Bioanalytiker auf ihre Reinheit untersucht. Die mRNA war sehr rein, die sehr hohen RIN-Werte „RNA Integrity Number“ lagen bei 9,9 (maximal 10,0 möglich).

Sollte die isolierte RNA beispielsweise durch RNasen degradiert sein, könnte das falsch-negative Ergebnisse bei der Auswertung der qRT-PCR nach sich ziehen. Die Qualität der RNA wurde stets photometrisch mit einem NanoDrop bestimmt (Verhältnis 260/ 280). Zusätzlich wurde die Reinheit mit einem Bioanalyzer überprüft. Der RIN Wert „RNA integrity number“ (0 – 10) lag dabei nie unter 9,1 (in Abb. 12 RIN Werte: 9,9). Das entsprach einer sehr hohen Reinheit und Stabilität der isolierten mRNA.

3.7.2 Einfluss von A β 42 wt auf die Genregulation

Da mit den ChIP Analysen eine direkte oder indirekte Bindung von A β 42 wt an die Promotorregionen von LRP1 und KAI1 nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden untersucht, ob die Bindung an die Promotorregionen einen regulatorischen Effekt haben. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde die Beeinflussung der Genregulation auf mRNA Ebene in SH-SY5Y Zellen untersucht. Mit A β 42 wt behandelte Zellen und unbehandelte Kontrollzellen wurden dabei miteinander verglichen. Die quantitative Auswertung der qRT-PCRs ergab, dass A β 42 wt eine Absenkung der mRNA von LRP1 (Abb. 13A) und KAI1 (Abb. 13B) nach vier und sechs Stunden Inkubation bewirkt. In beiden Fällen wurden die mRNA Mengen nach vier Stunden um 40% und nach sechs Stunden um 70% reduziert. Es handelt sich jedoch um transiente Effekte, da diese nach acht Stunden Inkubation wieder auf den Ausgangswert gestiegen sind. Auf die mRNA Menge von HES1 (Abb. 13C) hat A β 42 wt keinen Einfluss. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Promotorbindungsstudien (Abb. 11A-C).

Kürzlich wurde gezeigt, dass A β 42 die Menge der mRNA des APP erhöht (Bailey et al., 2011). Diese Befunde konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Nach acht Stunden Inkubation der Neuroblastom Zellen mit A β 42 wt wurde die Menge der APP mRNA um 50% erhöht (Abb. 13D).

Es wurde beschrieben, dass A β 42 wt einen Einfluss auf die mRNA Menge von BACE1 hat (Buggia-Prevot et al., 2008). Im hier verwendeten System konnten diese Effekte nicht reproduziert werden. A β 42 wt hat unter den verwendeten Bedingungen keinen Einfluss auf die mRNA Menge von BACE1 (Abb. 13E).

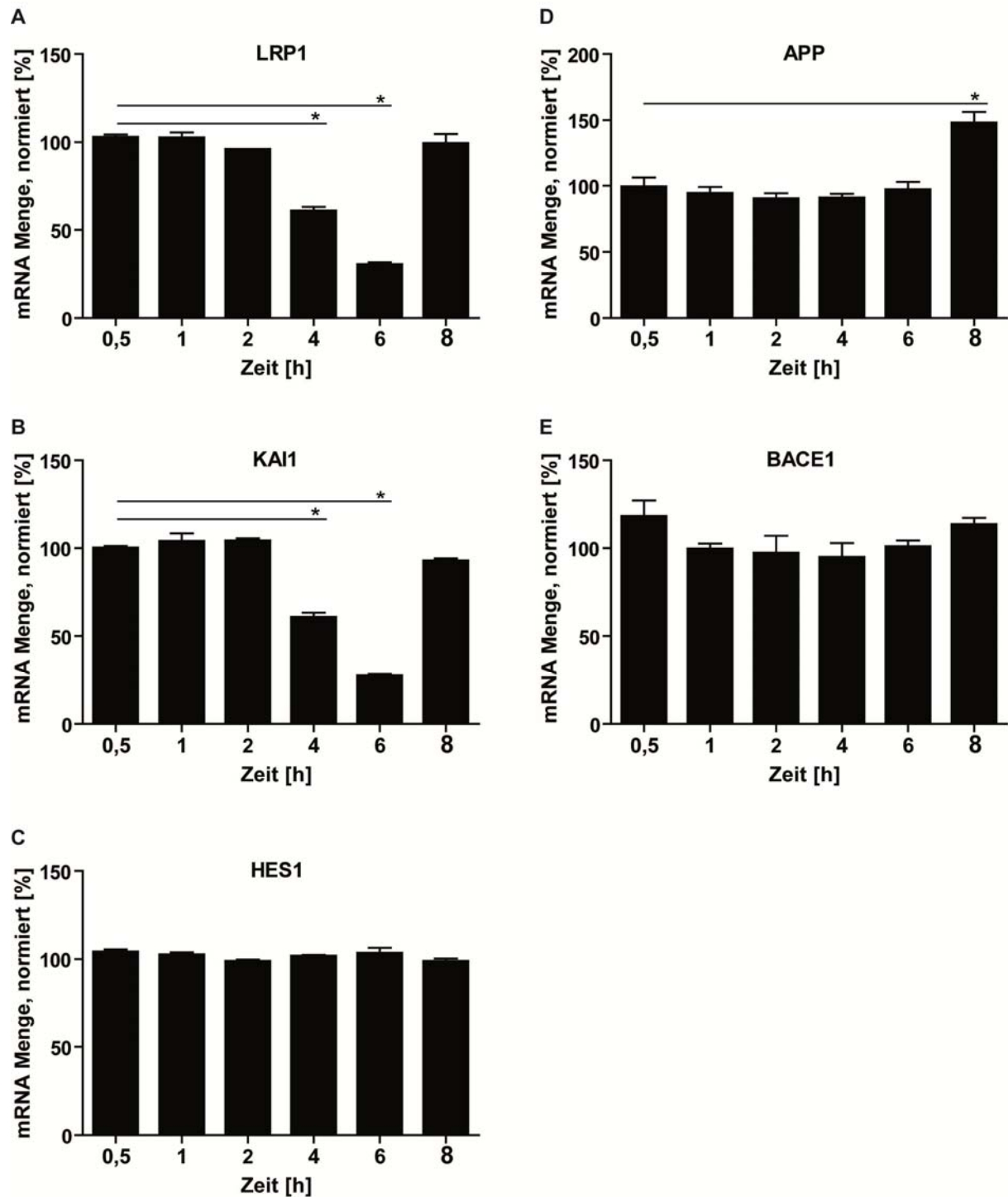


Abb. 13: Quantifizierung der mRNA Menge nach Inkubation mit A β 42 wt. Synchronisierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischem A β 42 wt (1 μ M) inkubiert, anschließend wurde mRNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde cDNA generiert und diese mittels qRT-PCR quantifiziert. Die mRNA-Menge von (A) LRP1 und (B) KAI1 zeigte eine signifikante Abnahme nach 4 und 6 h Inkubation der Zellen mit A β 42 wt. Nach 8 h Inkubation kam es zu einer signifikanten Zunahme von (D) APP. Die mRNA-Mengen von (C) HES1 und (E) BACE1 wurden nicht beeinflusst. Die Schwellenwerte (Ct) der Zielgene wurden gegen das Referenzgen β -Actin normalisiert und nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode ausgewertet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STABWN, n=4-7, *p<0,0001, 1 way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test.

3.7.3 Einfluss des GxxxG-Motives im A β 42 auf die Genregulation

In der Arbeit von Harmeier et al. 2009 wurden die Aggregation und die Toxizität der GxxxG-Mutationen untersucht. Es wurde gezeigt, dass A β 42 G33A keine neurotoxischen Eigenschaften besitzt im Vergleich zu A β 42 wt, das stark neurotoxisch ist.

Obwohl sich beide A β Spezies nur um eine Aminosäure an Position 33 unterscheiden, ist deren Verhalten im Hinblick auf Aggregation und Toxizität vollkommen verschieden.

Bisher konnte gezeigt werden, dass das neurotoxische A β 42 wt an der Regulation verschiedener Gene beteiligt ist. Im Folgenden wurde untersucht, ob auch das Peptid A β 42 G33A, eine nicht-neurotoxische Variante des Peptids, an der Regulation dieser Gene beteiligt ist.

In der Tat konnte gezeigt werden, dass A β 42 G33A, im Gegensatz zu A β 42 wt, keinen Einfluss auf die mRNA Menge von LPR1 (A), KAI1 (B), und APP (D) hat. Auch wurden HES1 (C) und BACE1 (D) nicht von dem Austauschpeptid beeinflusst (Abb. 14).

Damit konnte die aufgestellte Hypothese, dass A β Spezies an der Genregulation beteiligt sind, an dieser Stelle erweitert werden. Nur neurotoxische A β Spezies haben einen Einfluss auf die mRNA Menge von verschiedenen Genen. Nicht neurotoxische Formen von A β wie A β 42 G33A hingegen haben keinen Einfluss auf die Genregulation.

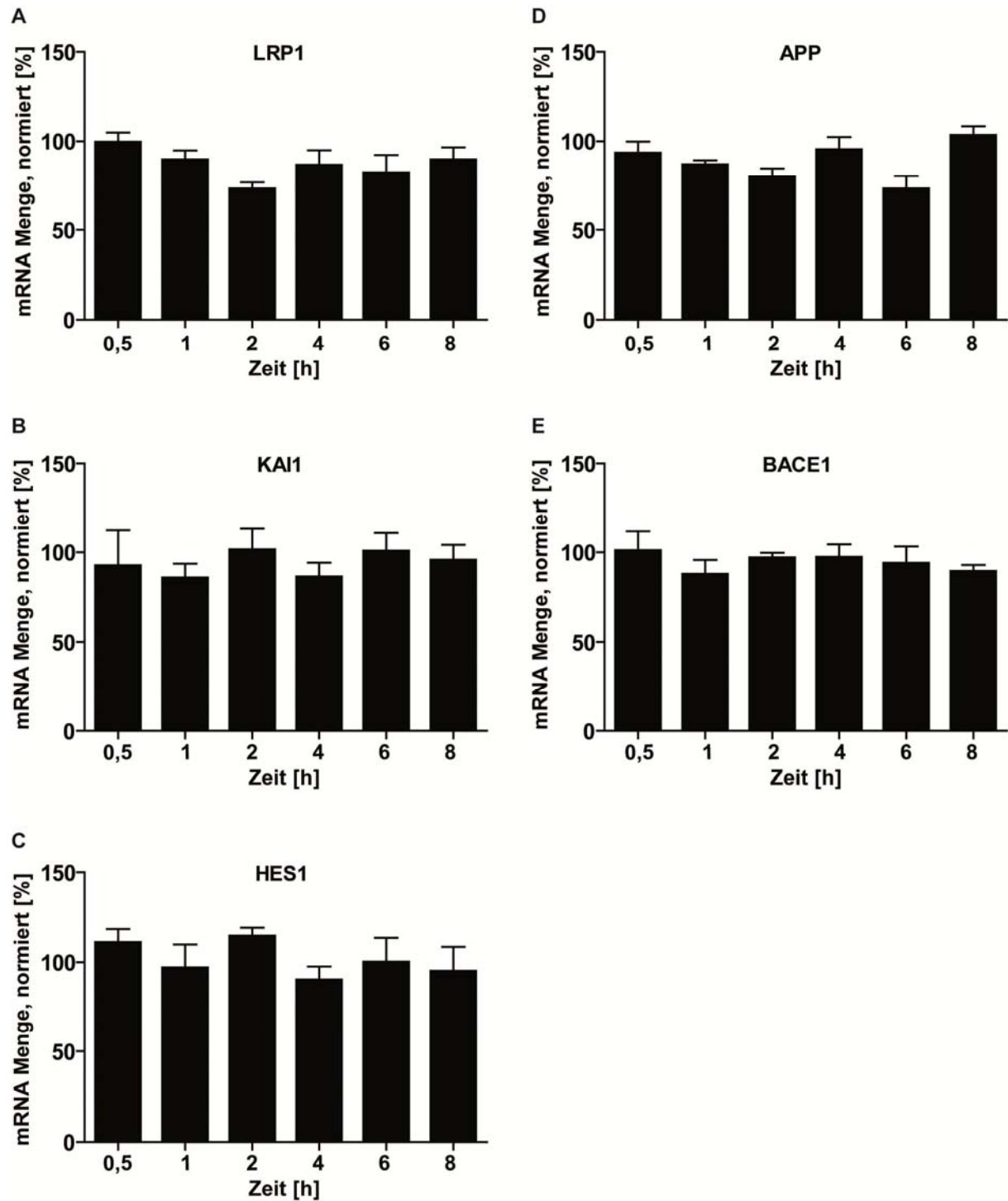


Abb. 14: Quantifizierung der mRNA Menge nach Inkubation mit Aβ42 G33A. Synchronisierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischem Aβ42 G33A (1 μM) inkubiert, anschließend wurde mRNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde cDNA generiert und diese mittels qRT-PCR quantifiziert. Die mRNA-Menge von (A) LRP1, (B) KAI1, (C) HES1, (D) APP und (E) BACE1 zeigte keine signifikante Änderung im untersuchten Zeitrahmen. Die Schwellenwerte (Ct) der Zielgene wurden gegen das Referenzgen β-Actin normalisiert und nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode ausgewertet. Gezeigt sind Mittelwerte ± STABWN, n=3-6, 1 way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test.

3.7.4 Einfluss von kürzeren und längeren A β Peptiden auf die Genregulation

Um die Hypothese zu verifizieren, dass nicht-neurotoxische A β Spezies keinen Einfluss auf die Genregulation haben, wurde im weiteren Verlauf die Wirkung von A β 38, welches aus der Produktlinie von A β 42 stammt, untersucht. Auch wurden das nicht-neurotoxische A β 40 und das leicht toxische A β 43, die beide aus der anderen Produktlinie stammen, analysiert (Vergl. Abb. 2/ 3).

Es wurden erneut die RNA Mengen von LRP1, KAI1, HES1, APP und BACE1 untersucht, die zuvor mit A β 42 wt und A β 42 G33A analysiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass weder A β 38 noch A β 40 und A β 43 die mRNA Mengen von LRP1 (A), KAI1 (B), HES1 (C), APP (D) und BACE1 (E) beeinflussen (Abb. 15). Das stärkt die Hypothese, dass nur das stark neurotoxische A β 42 wt Peptid einen spezifischen Einfluss auf die Genregulation hat.

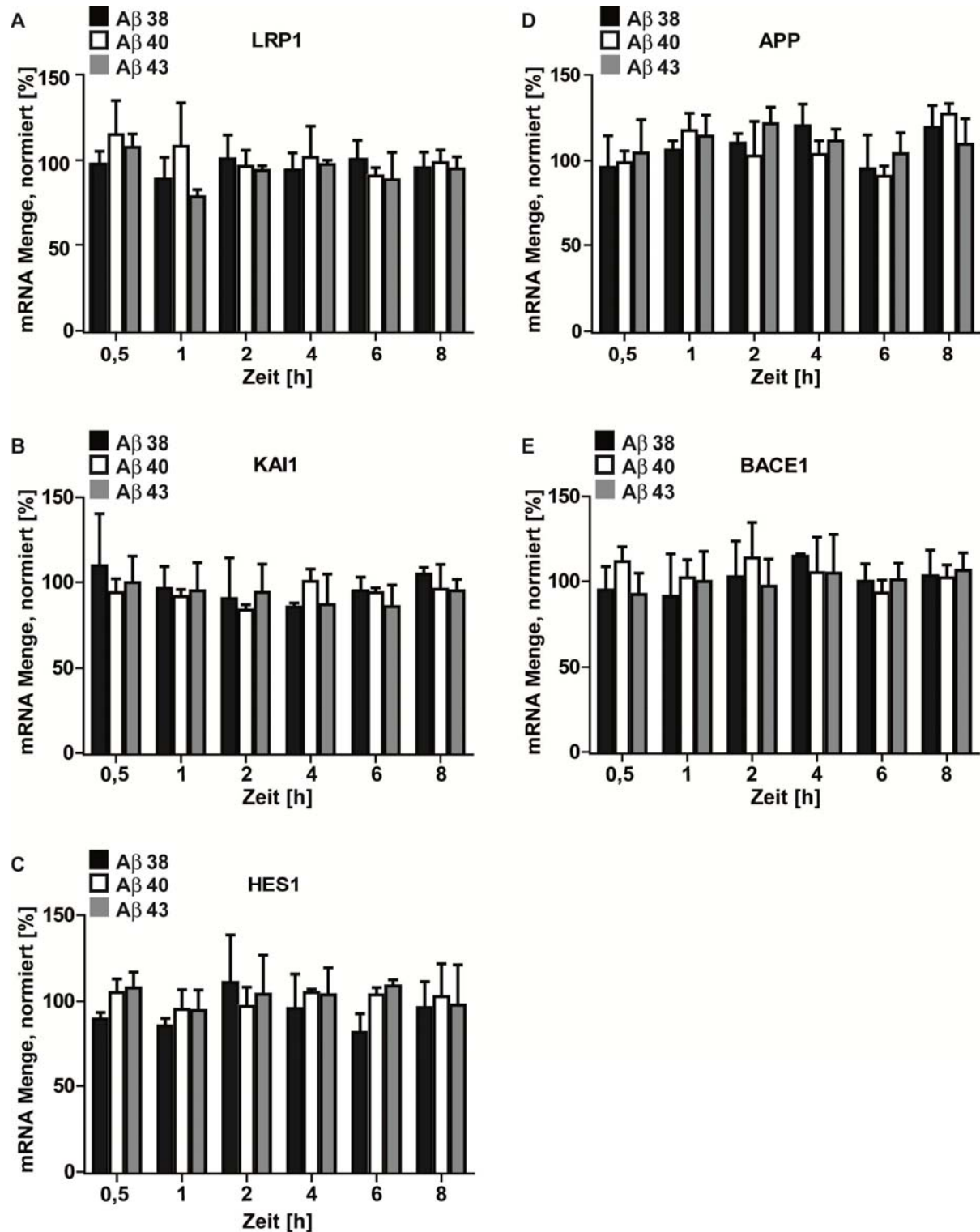


Abb. 15: Quantifizierung der mRNA Menge nach Inkubation mit Aβ38, Aβ40 und Aβ43. Synchronisierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischen Aβ Peptiden (1 μM) inkubiert, anschließend wurde mRNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde cDNA generiert und diese mittels qRT-PCR quantifiziert. Keines der verwendeten Peptide beeinflusst signifikant die mRNA-Menge von (A) LRP1, (B) KAI1, (C) HES1, (D) APP und (E) BACE1 im untersuchten Zeitrahmen. Die Schwellenwerte (Ct) der Zielgene wurden gegen das Referenzgen β-Actin normalisiert und nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode ausgewertet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STABWN, n=3-6, 1 way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test.

3.8 Quantifizierung der mRNA Menge mittels Illumina als Indikator für die Genexpression

In dieser Arbeit wurden Illumina Microarrays hybridisiert. Dazu wurde die RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und dann durch *in vitro* Transkription biotinylierte RNA in ausreichender Menge erzeugt. Um ein Fluoreszenzsignal auf dem Array zu erzeugen, wurde nach der Hybridisierung der biotinylierten RNA an das Biotin Streptavidin Cy3 gebunden und die Cy3-Fluoreszenz vom Laser angeregt und gemessen.

Das zu untersuchende genetische Material wurde aus Neuroblastom Zellen gewonnen. Diese wurden, nach Synchronisation mit Thymidin, mit A β 42 wt über einen Zeitraum von zwölf Stunden inkubiert. Vergleichend dazu wurden Zellen mit den nicht-toxischen Spezies A β 40 und A β 42 G33A behandelt. Bevor die isolierte RNA der Illumina-Analyse unterzogen wurde, wurde die Qualität der RNA bestimmt (Vergl. Abb. 12). Dies wurde zum Einen mittels NanoDrop und Bioanalyzer durchgeführt, zum Anderen wurden erneut qRT-PCRs für LRP1, KAI1, HES1, APP und BACE1 durchgeführt. Die Qualität der RNA wurde als „sehr gut“ eingestuft, da die Analyse mittels Bioanalyzer RIN Werte zwischen 9,1 und 9,9 lieferte (Vergl. 3.7.1). Auch nach Auswertung der qRT-PCR konnte die Qualität der isolierten RNA als „sehr gut“ betrachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass die bisher generierten Daten erneut reproduziert werden konnten. Für LRP1 und KAI1 konnte eine Herunterregulation der RNA Menge nach vier und sechs Stunden nachgewiesen werden, die Menge der APP RNA war nach acht Stunden signifikant erhöht. Auf HES1 und BACE1 hatte die Behandlung der Zellen mit A β 42 wt keinen Einfluss (Vergl. 3.7.2 (Abb. 13)).

Die Auswertung des Illumina HT-12v3 Chips ergab, dass die Vorergebnisse mittels qRT-PCR nur zum Teil bestätigt werden konnten. Nach Inkubation mit A β 42 wt konnten LRP1 und HES1 auf dem verwendeten Chip nicht detektiert werden. Für KAI1 waren die Ergebnisse sehr inhomogen und nicht auswertbar. Die Auswertung für APP und BACE1 ergab eine Bestätigung der qRT-PCR Daten. Die weitere Analyse zeigte, dass die nicht-toxischen Spezies A β 40 und A β 42 G33A die Markergene nicht beeinflusst hatten.

Die bioinformatische Auswertung ergab eine ganze Reihe von Genen, deren mRNA Mengen nach Behandlung mit A β 42 wt, jedoch nicht nach Behandlung mit den beiden nicht-toxischen Peptiden, verändert waren. Es konnte eine Liste von 225 Genen erstellt werden. Von diesen Genen wurden sechs näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei teilweise um Genfamilien gehandelt hat (ID1-3, IGFBP3/ 5 und LMO4). Bei der Betrachtung von Abb. 16 ist zu beachten, dass nur die dargestellten Säulen eines Zeitpunktes (jeweils eine Farbabstufung) miteinander vergleichbar sind. Auf der Ordinate ist die Signalintensität aufgetragen. Da es sich dabei um relative Werte handelt, ist diese Achse dimensionslos. Es konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation mit A β 42 wt die mRNA Mengen für ID1-3 nach

acht Stunden im Zellkultursystem erhöht sind. Die Proteine, die für die mRNA kodieren, gehören zur „inhibitor of DNA binding“ Familie. Diese Proteinfamilie agiert als Transkriptionsregulator und enthält eine Helix-Loop-Helix Domäne, jedoch keine basische Domäne, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist. ID1-3 inhibieren die Funktion von Helix-Loop-Helix Proteinen, die eine basische Domäne tragen, insbesondere von Transkriptionsfaktoren. Bei der Dimerisierung von ID1-3 mit intakten Helix-Loop-Helix-Proteinen resultieren Heterodimere, denen die Fähigkeit fehlt, an DNA fest zu binden. Liegen ID1-3 in der Zelle im Überschuss vor, können sie Homodimerisierung intakter Helix-Loop-Helix-Proteine blockieren und dadurch eine Bindung an die DNA verhindern. Somit bietet der Mechanismus der Heterodimerisierung von ID1-3 der Zelle einen Kontrollmechanismus zur Inaktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren (Murre et al., 1989; Kadesch, 1993; Perk et al., 2005).

Weiterhin wurden IGFBP3/ 5 „insulin-like growth factor-binding protein“ identifiziert. Auch hier wurde die mRNA im Zellkultursystem nach Inkubation mit A β 42 wt nach acht Stunden erhöht. IGFBP3/ 5 bildet zusammen mit „insulin-like growth factor acid-labile subunit“ (IGFALS) und dem „insulin-like growth factor“ IGF1/ 2 einen ternären Komplex. In dieser Form zirkuliert IGFBP3/ 5 im Plasma, verlängert die Halbwertszeit der IGFs und beeinflusst ihre Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren (Cubbage et al., 1990; Twigg and Baxter, 1998).

Ein weiterer interessanter Kandidat war LMO4 („LIM domain only 4“). Auch hier konnte nach acht-stündiger A β 42 wt Behandlung eine erhöhte Menge der mRNA detektiert werden. LMO4 enthält zwei LIM Domänen und hat transkriptionsregulatorische Funktionen. LIM Domänen sind Strukturdomänen in Proteinen mit cysteinreichen Sequenzen, die zwei Zinkfinger besitzen, welche durch einen kurzen hydrophoben Linker getrennt sind. LIM Domänen tragende Proteine sind bei der Organisation des Cytoskeletts und der Onkogenese beteiligt. LIM Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, welche kritisch für zelluläre Prozesse sein können (Kadmas and Beckerle, 2004; Li et al., 2011)

Es sei darauf hingewiesen, dass nur das neurotoxische A β 42 wt einen Einfluss auf die mRNA Mengen der vorgestellten Gene hatte. Diese Effekte haben jedoch einen transienten Charakter, da sie nur zum Zeitpunkt von acht Stunden zu detektieren waren. Interessant und von großer Relevanz ist jedoch, dass die nicht-toxischen Peptide A β 40 und A β 42 G33A keinen Einfluss auf die mRNA Menge hatte.

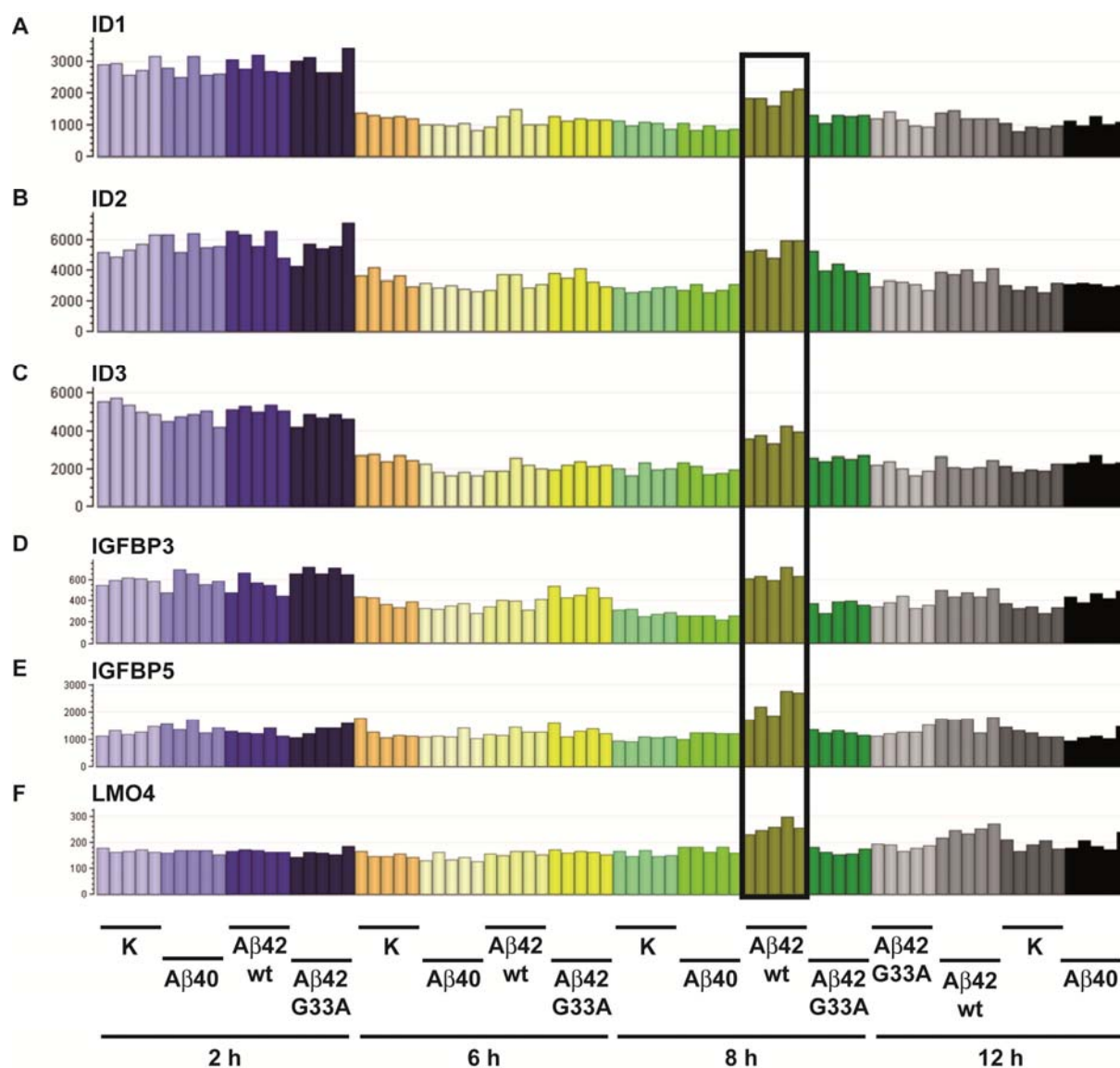


Abb. 16: Quantifizierung der mRNA Menge mittels Illumina als Indikator für die Genexpression nach Inkubation mit Aβ40, Aβ42 wt und Aβ G33A. Synchronisierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischen Peptiden (1 μM) inkubiert, anschließend wurde mRNA isoliert. Die Analyse erfolgte auf einem HT12-v3 Chip. Die Höhe der dargestellten Säulen ist für jeden Zeitpunkt (jeweils eine Farbabstufung) separat zu betrachten, da es sich bei der Ordinate um dimensionslose relative Werte handelt. Aβ42 wt hat einen Einfluss auf die mRNA Mengen von (A) ID1, (B) ID2, (C) ID3, (D) IGFBP3, (E) IGFBP5 und (F) LMO4. Gezeigt sind Einzeldaten, n=5.

3.8.1 Verifizierung der biostatistischen Microarray-Daten mittels qRT-PCR

Um die Ergebnisse des Illumina Microarrays zu verifizieren, wurden qRT-PCRs durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhten mRNA Mengen, von den im Illumina-Verfahren ermittelten Kandidaten, ebenfalls mittels qRT-PCR bestätigt werden konnten (Abb. 17). Erstaunlich ist, dass die Signifikanzen in der Abbildung 17A-C mit der Höhe der Signalintensität des Microarrays korrelieren. In Abb. 16B hat ID2 die höchste Signalintensität, verglichen mit ID1 und ID3 (Abb. 16A, 16C). Nach statistischer Auswertung der qRT-PCR spiegelt sich dieses Ergebnis in Form der Signifikanz in Abb. 17B wider.

Eine identische Beobachtung kann für IGFBP3/ 5 gemacht werden. Hier ist es jedoch nicht möglich, die Signalintensität aus Abb. 16D/ E mit der Signifikanz in Abb. 17D/E miteinander in Bezug zu bringen, da die Signalintensitäten im Illumina Microarray dieser beiden Kandidaten um eine Zehnerpotenz auseinander liegen. Auch für LMO4 konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden, dass die Behandlung von SH-SY5Y Zellen mit A β 42 wt die mRNA Menge nach acht Stunden erhöht.

Für alle untersuchten Kandidaten in Abb. 17A-F gilt, dass nur A β 42 wt, jedoch nicht A β 40 und A β 42 G33A, die mRNA Mengen beeinflusst hat.

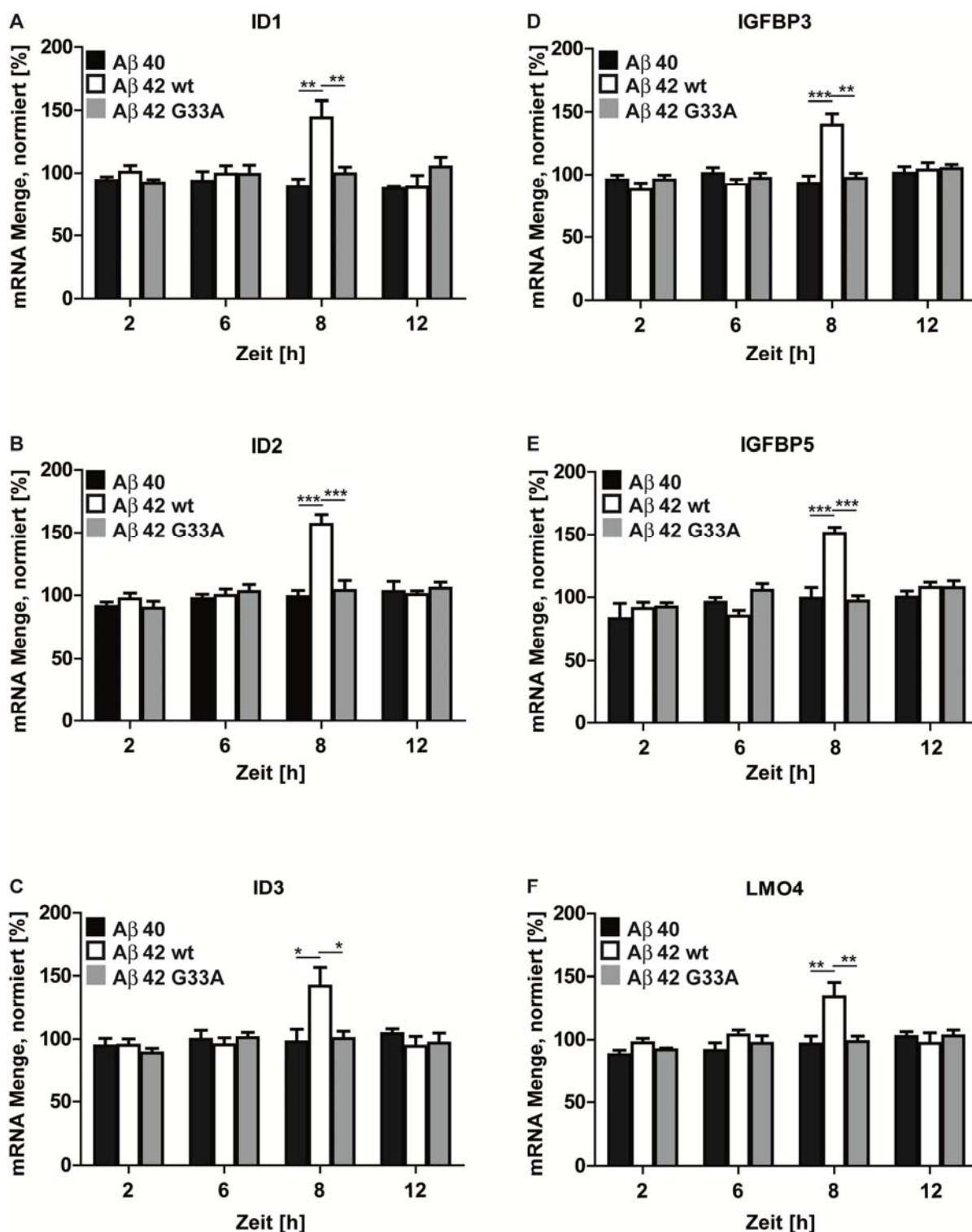


Abb. 17: Quantifizierung der mRNA Menge nach Inkubation mit Aβ40, Aβ42 wt und Aβ42 G33A. Synchronisierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischen Peptiden (1 μM) inkubiert, anschließend wurde mRNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde cDNA generiert und diese mittels qRT-PCR quantifiziert. Nach 8 h Inkubation war eine signifikante Zunahme der mRNA Mengen von (A) ID1, (B) ID2, (C) ID3, (D) IGFBP3, (E) IGFBP5 und (F) LMO4 zu beobachten. Die Schwellenwerte (Ct) der Zielgene wurden gegen das Referenzgen β-Actin normalisiert und nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode ausgewertet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STABWN, n=6-8, *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, 1 way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test.

3.9 Charakterisierung des Einflusses von A β 42 wt auf die Genregulation in Abhängigkeit von der Zeit

Mittels Illumina und qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit A β 42 wt nach acht Stunden im Zellkultursystem eine vermehrte mRNA Menge zur Folge hatte, die jedoch nach zwölf Stunden wieder auf den Ausgangswert gesunken ist. Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob die beobachteten transienten Effekte spezifisch für acht Stunden Inkubation sind oder zu anderen Zeitpunkten innerhalb von zwölf Stunden ebenfalls Effekte zu detektieren sind. Um diese Frage zu beantworten, wurden erneut Neuroblastom Zellen mit A β 42 wt bis zu zwölf Stunden inkubiert und mRNA isoliert. Von den sechs ermittelten Kandidaten wurden hierfür drei ausgewählt (ID2, IGFBP5, LMO4), bei denen der Effekt nach acht Stunden am stärksten gewesen ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Effekt nicht nur nach acht Stunden zu beobachten ist. Bereits nach sieben Stunden war bei den untersuchten Genen deren mRNA Menge erhöht (Abb. 18). Das Maximum lag dabei für ID2 bei neun Stunden. Im Falle von IGFBP5 und LMO4 lag das Maximum bei acht Stunden. Nach zwölf Stunden jedoch waren die RNA Mengen von ID2, IGFBP5 und LMO4 wieder vergleichbar mit den RNA Mengen, die zu Beginn der Inkubation beobachtet wurden.

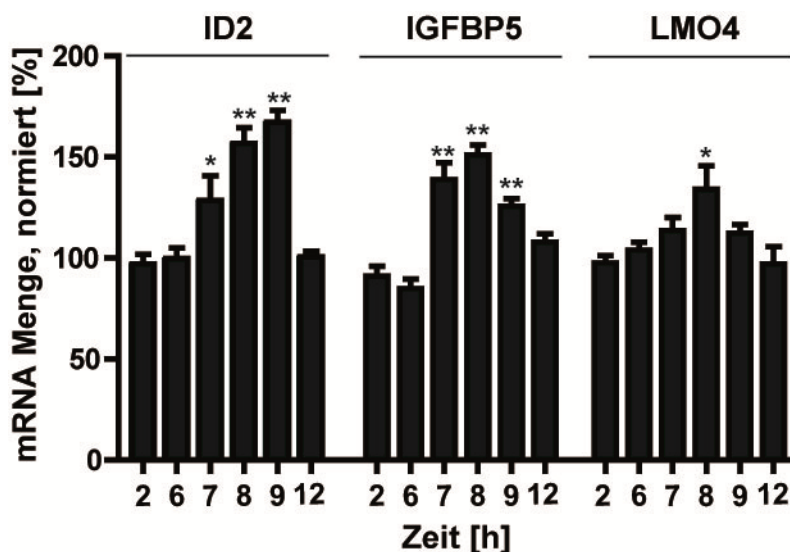


Abb. 18: Quantifizierung der mRNA Menge nach Inkubation mit A β 42 wt. Synchronisierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischem Peptid (1 μ M) inkubiert, anschließend wurde mRNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde cDNA generiert und diese mittels qRT-PCR quantifiziert. Untersucht wurden ID2, IGFBP5 und LMO4. Im Zeitraum von 7-9 h Inkubation ist ein signifikanter Anstieg der mRNA Menge von ID2 und IGFBP5 zu beobachten. LMO4 zeigt identische Effekte.

Die Schwellenwerte (Ct) der Zielgene wurden gegen das Referenzgen β -Actin normalisiert und nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode ausgewertet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STABWN, n=3-5. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Referenzwert (2 h) an mit *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, 1 way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test.

Für die mRNA Menge von APP konnte ein identischer Effekt beobachtet werden. Auch hier stellte sich die Frage, ob die Hochregulation der mRNA nur auf den Zeitpunkt von acht Stunden zurückzuführen ist (Abb. 19)

Es konnte gezeigt werden, dass A β 42 wt die mRNA von APP in SH-SY5Y Zellen bereits nach sieben Stunden Inkubation erhöht. Nach acht Stunden Inkubation war ein Maximum zu detektieren, was nach neun Stunden Gesamtinkubationszeit bereits wieder auf das Ausgangsniveau gesunken ist.

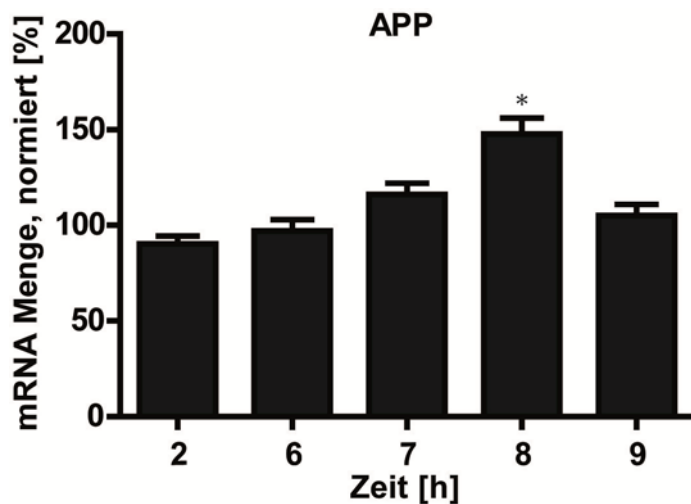


Abb. 19: Quantifizierung der mRNA Menge von APP nach Inkubation mit A β 42 wt. Synchronisierte SH-SY5Y Zellen wurden mit synthetischem Peptid (1 μ M) inkubiert, anschließend wurde mRNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde cDNA generiert und diese mittels qRT-PCR quantifiziert. Im Zeitraum von 7-9 h Inkubation ist ein Anstieg der mRNA Menge zu verzeichnen, signifikant ist nur der 8 h-Wert.

Die Schwellenwerte (Ct) des Zielgens wurden gegen das Referenzgen β -Actin normalisiert und nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode ausgewertet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm STABWN, n=3-5. Sterne zeigen einen signifikanten Unterschied zum Referenzwert (2 h) an mit *p<0,0005, 1 way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test.

3.10 Nachweis von A β 42 Peptiden in Neuronen- und Gliazellkernen im transgenen Mausmodell

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass A β Spezies zeitabhängig im Zellkern von SH-SY5Y Zellen akkumulieren. Dabei stellte sich heraus, dass nur das stark neurotoxische A β 42 wt *in vitro* einen Einfluss auf die Genregulation verschiedener Gene hat.

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob das von physiologischer Bedeutung ist. Dazu wurde ein transgenes Tiermodell herangezogen, um zu untersuchen, ob hier ebenfalls A β 42 im Zellkern nachgewiesen werden kann.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Hippocampi von transgenen APP/ PS1 Mäusen (Radde et al., 2006) (APPPS1-21 Mäuse, Alter: circa 12 Monate) präpariert und mittels Transmissionselektronenmikroskopie auf das Vorhandensein von A β 42 im Zellkern untersucht.

Für die Immungold-Reaktion wurde der A β 42 spezifische Antikörper G2-13 verwendet. Dieser wurde vor der Markierung mit colloidalem Gold 10 nm markiert. Die Markierung des Antikörpers wurde im Elektronenmikroskop überprüft. Gold-bzw. Antikörperaggregate wurden mittels Zentrifugation entfernt. Somit wurde sichergestellt, dass für die Immunreaktion keine Antikörper-Gold-Aggregate verwendet wurden, die falsch-positive Ergebnisse impliziert hätten. Vor der elektronenmikroskopischen Untersuchung des Gewebes wurden die Tiere mittels PCR genotypisiert (Daten nicht gezeigt). Nur in den transgenen APP/ PS1 Tieren konnten amyloide Plaques im Hippocampus nachgewiesen werden (Abb. 20), was noch einmal die Bestätigung der Genotypisierung zeigt. In der Vergrößerung konnte gezeigt werden, dass der Antikörper spezifisch an den fibrillären Strukturen im Plaque bindet.

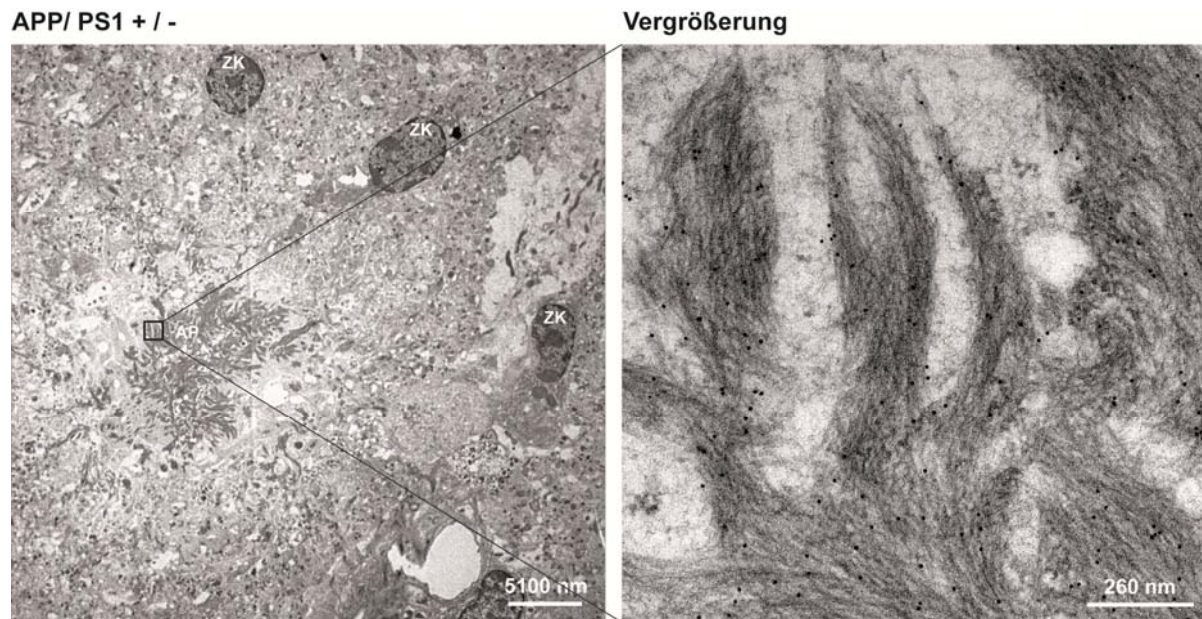


Abb. 20: Immungold-Markierung im Hippocampus transgener APP/ PS1 +/- Mäuse. Legende: ZK (Zellkern), AP (amyloider Plaque). Die Hippocampi zwölf Monate alter Mäuse wurden präpariert und in LR-Gold eingebettet. Die Immunreaktion wurde mit dem zuvor *in vitro* mit 10 nm Au markiertem A β 42 spezifischen Antikörper G2-13 durchgeführt. Gezeigt ist eine Übersichtsaufnahme eines transgenen Tieres. Mit zwölf Monaten hatten diese Tiere massive Plaques im Hippocampus ausgebildet. In der Vergrößerung ist eine Immungold-Markierung der Plaques für A β 42 dargestellt.

In dieser Arbeit ist es gelungen, sowohl in den Zellkernen von hippocampalen Neuronen als auch in den Zellkernen von Gliazellen A β 42 in transgenen APP/ PS1 Mäusen mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen nachzuweisen.

In Abb. 21 ist jeweils von transgen-negativem Gewebe und transgen-positivem Gewebe eine Übersichtsaufnahme eines Neuronenzellkerns gezeigt. In der Vergrößerung konnte gezeigt werden, dass im transgen-positiven Gewebematerial sehr viel mehr A β 42 im Zellkern lokalisiert ist, als im Vergleich zum transgen-negativen Hirngewebe.

Eine annähernd identische Verteilung von A β 42 war in den Zellkernen von Gliazellen im Hippocampus zu beobachten (Abb. 22).

Aufgrund des hier verwendeten Antikörpers konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei dem A β 42 in den Zellkernen der transgen-positiven Tiere um humanes oder endogenes Maus-A β handelt. Maus- und humanes A β 42 unterscheiden sich jedoch im C-terminalen Bereich in ihrer Sequenz nicht. Es kann aber zusammengefasst werden, dass die Expression von humanem APP und PS1, wie bereits von Radde et al. 2006 beschrieben, zur Bildung von amyloiden Plaques führt. Außerdem wirkt sich die Überexpression in diesem transgenen Tiermodell auch auf die Lokalisation von A β 42 in hippocampalen Neuronen- und Gliazellkernen aus.

Mit dieser Arbeit gelang erstmalig der Nachweis von A β 42 Peptiden in den Zellkernen in einem transgenen Mausmodell.

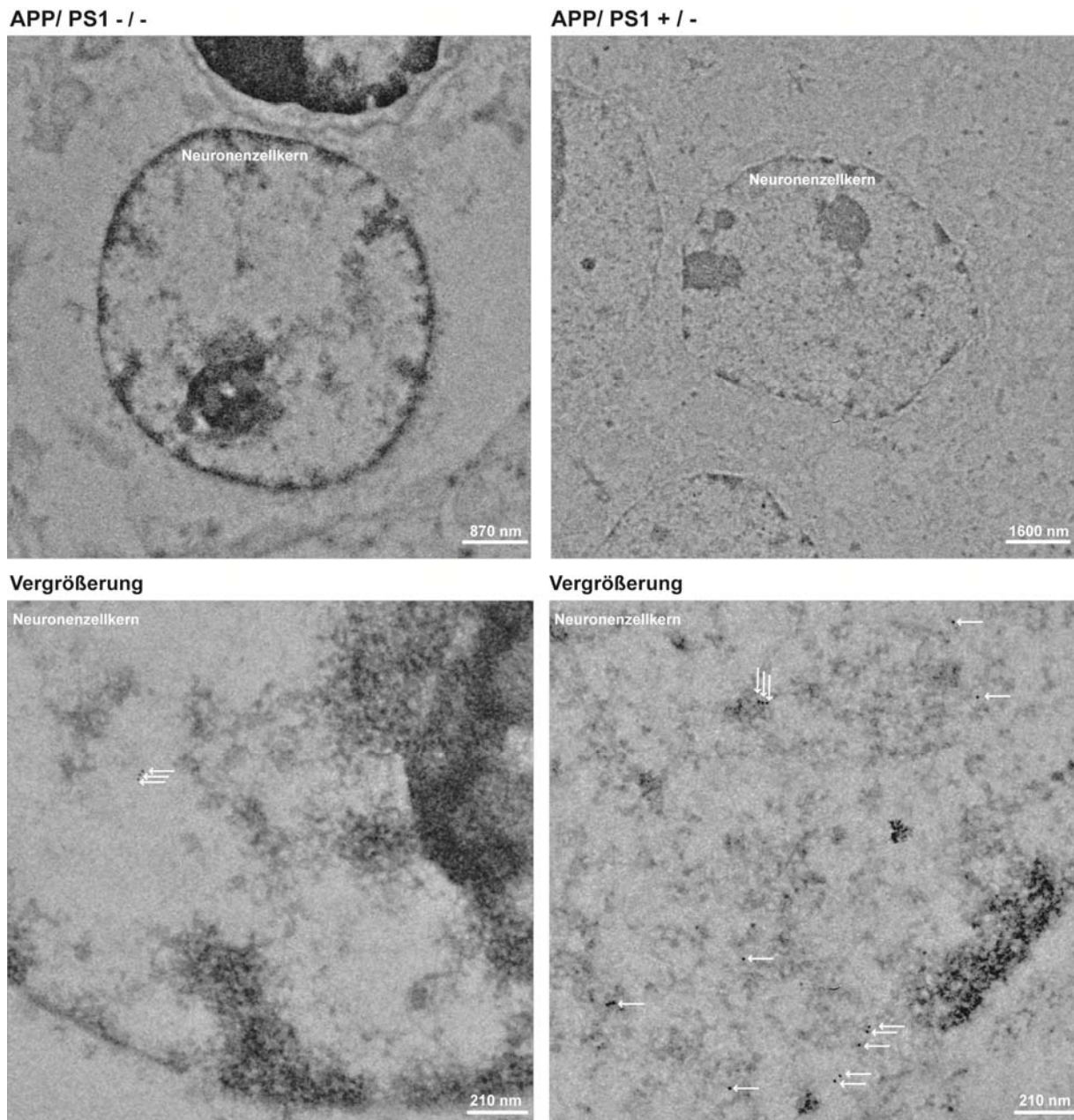
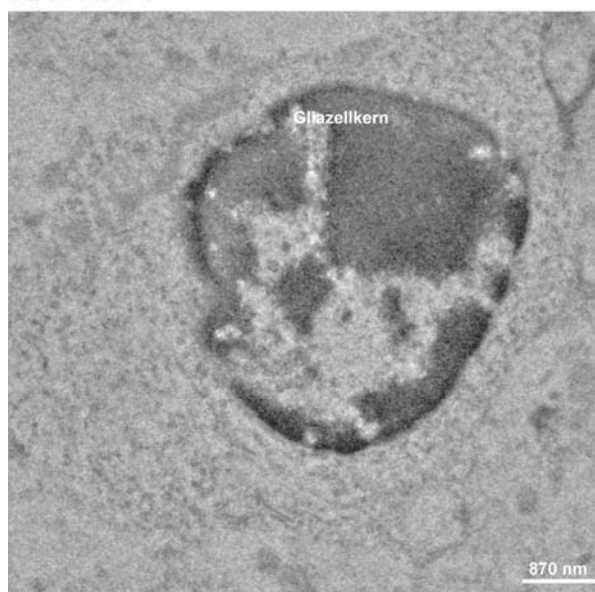
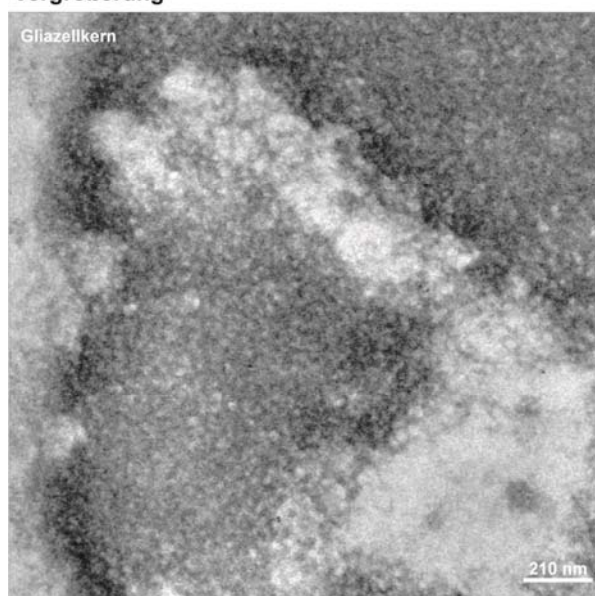


Abb. 21: Immunogold-Markierung zur Lokalisation von Aβ42 in hippocampalen Zellkernen transgener APP/PS1 +/- Mäuse im Vergleich zu transgen-negativen Tieren (APP/PS1 -/-). Die Hippocampi zwölf Monate alter Mäuse wurden präpariert und in LR-Gold eingebettet. Die Immunreaktion wurde mit dem zuvor *in vitro* mit 10 nm Au markiertem Aβ42 spezifischen Antikörper G2-13 durchgeführt. Gezeigt sind jeweils eine Übersichtsaufnahme eines Neuronenzellkerns und jeweils eine ausschnittsweise Vergrößerung. Aβ42 ist durch weiße Pfeile gekennzeichnet. In den tg negativen Tieren ist kaum endogenes Maus-Aβ detektiert worden. In den tg positiven Tieren wurde sehr viel mehr Aβ42 detektiert.

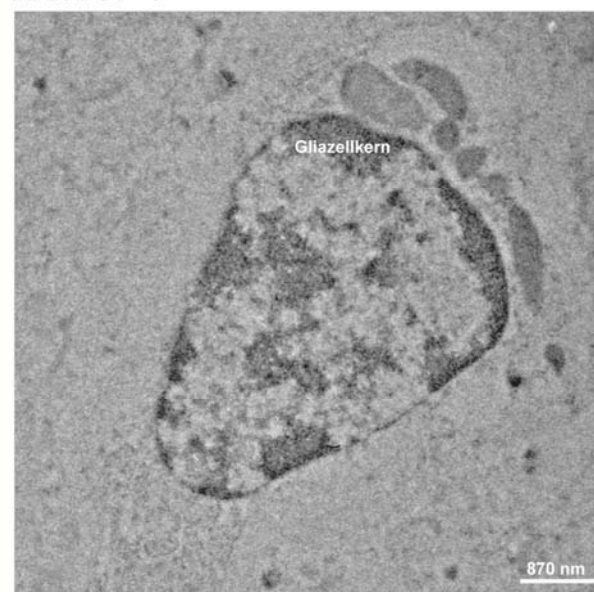
APP/ PS1 - / -



Vergrößerung



APP/ PS1 + / -



Vergrößerung

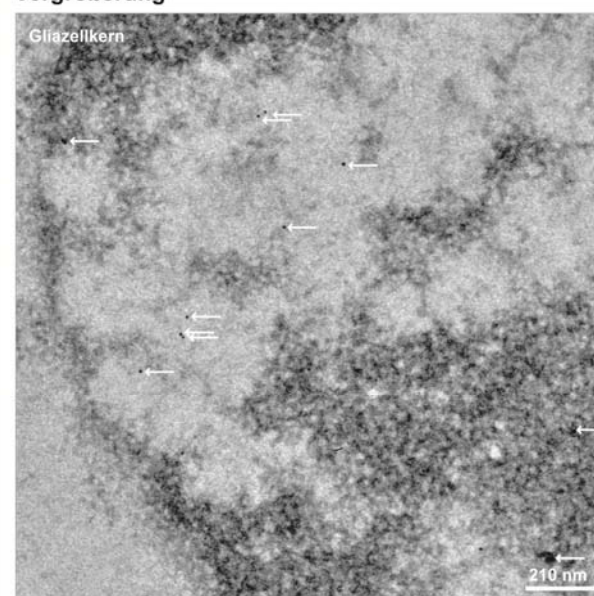


Abb. 22: Immungold-Markierung zur Lokalisation von A β 42 in hippocampalen Zellkernen transgener APP/ PS1 +/- Mäuse im Vergleich zu transgen-negativen Tieren (APP/ PS1 -/-). Die Hippocampi zwölf Monate alter Mäuse wurden präpariert und in LR-Gold eingebettet. Die Immunreaktion wurde mit dem zuvor *in vitro* mit 10 nm Au markiertem A β 42 spezifischen Antikörper G2-13 durchgeführt. Gezeigt sind jeweils eine Übersichtsaufnahme eines Gliazellkerns und jeweils eine ausschnittsweise Vergrößerung. A β 42 ist durch weiße Pfeile gekennzeichnet. In den tg negativen Tieren ist kaum endogenes Maus-A β detektiert worden. In den tg positiven Tieren wurde sehr viel mehr A β 42 detektiert.

4 Diskussion

Die Ablagerung von intraneuronalem A β 42 findet vorzugsweise im frühen Stadium der AD statt, das heißt vor der Bildung der amyloiden Plaques (Gouras et al., 2000; Shie et al., 2003). In diesem Stadium wurden pathologische Veränderungen der Synapsen beobachtet, die auf das Vorhandensein von neurotoxischen A β Aggregaten zurück geführt wurden. Der für die Neurotoxizität verantwortliche molekulare Mechanismus ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neurotoxische A β Spezies an der Genregulation beteiligt sind und somit ein weiterer möglicher Mechanismus der frühen A β Toxizität entdeckt wurde.

4.1 Möglicher Translokationsmechanismus von A β Peptiden in den Zellkern

Die zelluläre Aufnahme von A β Peptiden ist mehrfach gezeigt worden (Ida et al., 1996c; Yang et al., 1999; Saavedra et al., 2007; Kandimalla et al., 2009; Nygaard and Strittmatter, 2009), wobei in keiner Studie der Mechanismus abschließend aufgeklärt werden konnte. Es gibt Hinweise darauf, dass A β Peptide per Endozytose über den LRP Rezeptor in die Zelle aufgenommen werden (Grimm et al., 2007; Grimm et al., 2008). Ebenfalls wurde eine mögliche Internalisierung von A β durch AMPA und NMDA Rezeptoren beschrieben (Snyder et al., 2005; Hsieh et al., 2006). Es ist aber auch möglich, dass A β Peptide rezeptorunabhängig von der Zelle aufgenommen werden können.

Eine Publikation, die sich mit der Aufnahme von A β in den Zellkern auseinandersetzt, zeigte, dass Neuroblastom Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden, synthetisches A β 40 aufnehmen und dieses im Zellkern zu detektieren ist (Bailey et al., 2011).

In zwei anderen Arbeiten wurden A β Peptide mittels bildgebender Methoden ebenfalls im Zellkern nachgewiesen. Der Fokus lag in diesen Arbeiten jedoch nicht auf der Lokalisation von A β im Zellkern, so dass dieser Befund nicht diskutiert wurde (Capetillo-Zarate et al., 2011; Qiang et al., 2011)

In der vorliegenden Arbeit konnte die Internalisierung von unterschiedlichen A β Peptiden in den Zellkern beobachtet werden.

Davon ausgehend, dass die γ -Sekretase das β CTF konsekutiv spaltet und dabei zwei Produktlinien von A β Peptiden entstehen (Weidemann et al., 2002; Zhao et al., 2004; Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2005; Munter et al., 2007; Takami et al., 2009) (Einleitung

2.2.2), wurden aus der Produktlinie, in der das neurotoxische A β 42 entsteht, auch das nicht-neurotoxische A β 38 sowie die Mutante A β 42 G33A untersucht. Aus der anderen Linie, in der das nicht-neurotoxische A β 40 (Stephan et al., 2001; Harmeier, 2008; Welander et al., 2009) generiert wird, wurde außerdem auch A β 43 analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die A β Peptide unterschiedlich stark im Zellkern detektiert wurden, obwohl die Neuroblastom Zellen mit identischen Konzentrationen der Peptide inkubiert wurden.

Die Menge der A β Peptide im Zellkern nimmt mit zunehmender Länge der Peptide ab. Eine Ausnahme stellt dabei das Peptid A β 42 G33A dar. Es wurde angenommen, dass die Internalisierung der A β Peptide in den Zellkern mit der Hydrophobizität der Peptide in Verbindung stehen könnte. Um diese Frage näher beleuchten zu können, wurde in Kooperation mit Dr. Peter Hildebrand (Charité, Berlin) ein computergestütztes Modell der untersuchten A β Spezies erstellt, das auf der Basis der von Harmeier et al., 2009 vorgeschlagenen tetrameren Struktur der A β Peptide basiert. In dem hier vorgestellten Modell wurde die Oberflächenhydrophobizität für dimere Peptide berechnet und dargestellt. Die Western Blot Analysen zeigten, dass alle Peptide zwar als Dimer vorliegen können, jedoch nicht alle Peptide unter den gewählten Bedingungen Tetramere ausbilden.

Das Modell von A β 38 und A β 40 zeigt, dass die Oberfläche der Peptide im Vergleich zu A β 42 wt weniger hydrophob ist (Abb. 23A, B). Beide Peptide neigen nicht zur Aggregation (Harmeier, 2008), was in dieser Arbeit mittels Western Blot bestätigt wurde. Es wurden nur SDS stabile Monomere und Dimere detektiert. Im Gegensatz dazu besitzt A β 42 wt eine weitaus größere hydrophobe Oberfläche, die im Modell durch eine Graufärbung angezeigt wird (Abb. 23C). Dieses Peptid neigt verstärkt zur Aggregation. Die Substitution an Position G₃₃ zu einem Ala verstärkt den hydrophoben Faltungskern des Peptides und vergrößert leicht die hydrophobe Oberfläche des Peptids, verhindert jedoch im Gegensatz dazu die Fibrillenbildung (Harmeier et al., 2009). Auch die Berechnung für das dimere A β 42 G33A Peptid bestätigte diese Struktureigenschaften (Abb. 23D).

A β 43 trägt am C-Terminus ein Threonin (Abb. 23E). Dieser polare Rest bewirkt eine leichte Strukturänderung des Peptids, so dass die Region um G₃₇ hydrophober im Vergleich zu A β 42 wt ist. A β 43 hat eine ausgedehnte, abgeflachte, leicht negativ geladene Oberfläche am C-Terminus. Somit ist es nicht ausgeschlossen, dass T₄₃ die Struktur so modifiziert, dass die lokale Faltung leicht verändert und damit insgesamt die Fibrillenbildung begünstigt wird. Die Analysen des Peptids mittels Western Blot wiesen nur geringe Mengen Dimere und Trimere auf, Tetramere wurden gar nicht detektiert, dafür jedoch sehr große Oligomere.

Die Internalisierung der A β Peptide in die Zelle und schließlich in den Zellkern könnte wie folgt erklärt werden. Es wurde diskutiert, dass A β 42 sogenannte („beta barrel structures“) β -Fass-Strukturen in der Membran ausbilden könnte und somit Poren in der Membran formt

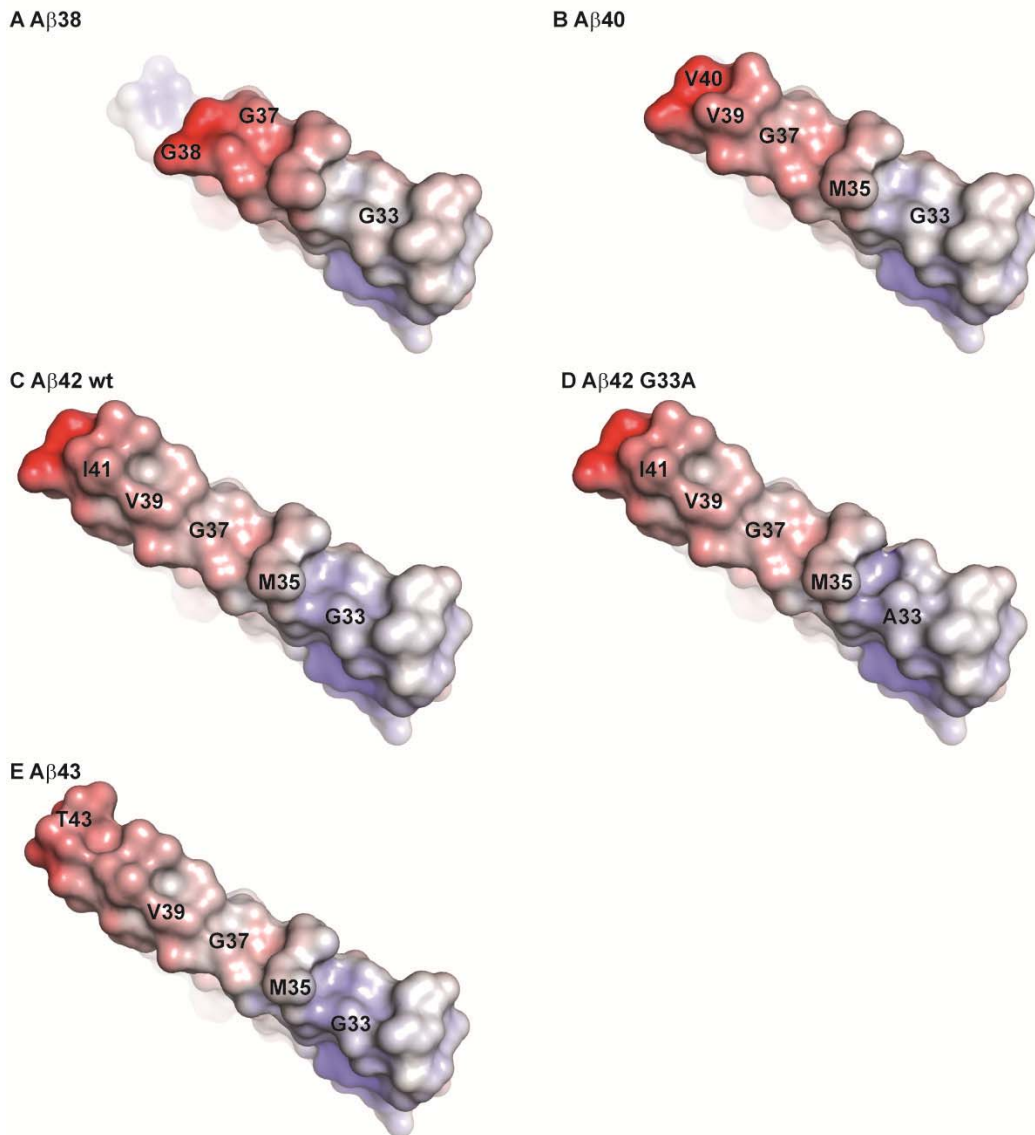


Abb. 23: Computergestütztes Modell von A β Dimeren, basierend auf den Modellen von Harmeier et al., 2009. A: A β 38, B:A β 40, C:A β 42 wt, D:A β 42 G33A, E:A β 43. Rot dargestellte Oberflächen sind negativ, blaue sind positiv geladen und graue kennzeichnen hydrophobe Oberflächen.

(Arispe et al., 2007; Jang et al., 2008; Jang et al., 2010). Wird die Porenbildung in der Zell- und Kernmembran als ein dynamischer Prozess angesehen, bei dem A β Peptide nicht rigide als angenommene β -Fass-ähnliche Struktur in der Membran verankert sind, sondern diese als solche nur durchqueren, so würde sich damit die vermehrte Detektion von A β 42 G33A im Vergleich zu A β 42 wt im Zellkern erklären lassen, da die Oberfläche von A β 42 G33A hydrophober ist als die von A β 42 wt und somit besser Wechselwirkungen mit der hydrophoben Membran eingehen kann.

Die Detektion mittels Immunfluoreszenz von A β 42 wt Peptiden zeigte, dass die Größe der intrazellulären Aggregate im Zeitverlauf zunimmt. Wird davon ausgegangen, dass die hohen Aggregate keine β -Fass-ähnlichen Strukturen in der Kernmembran ausbilden und auch nicht

die Fähigkeit besitzen die Kernporen zu passieren, so würde das die geringe Menge an detektiertem A β 43 im Zellkern erklären.

A β 38 und A β 40 sind aufgrund ihrer im Vergleich zu A β 42 wt weniger hydrophoben Oberfläche eventuell auch in der Lage, β -Fass-ähnliche Strukturen auszubilden. Das würde bedeuten, dass A β 38 und A β 40 auch über den dynamischen Prozess der β -Fass-ähnlichen Strukturen in den Zellkern gelangt, es hier aber länger dauert, bis sich eine solche Struktur in der Membran ausgebildet hat, da die beiden Peptide hauptsächlich als Mono- bzw. Dimer vorliegen.

Da nach dem Lösen des synthetischen A β alle Peptide unter anderem in monomerer und dimerer Form vorhanden sind, wäre es auch vorstellbar, dass die Peptide über einfache Diffusion die Kernporen passieren. Aggregieren die Peptide jedoch, können sie aufgrund der angenommenen Größe die Kernporen nicht mehr passieren. Das würde erklären, warum A β 38 und A β 40 vermehrt im Zellkern detektiert werden können, im Vergleich zu A β 42 wt. Mit dieser Hypothese können jedoch nicht die detektierten Mengen von A β 42 G33A im Zellkern erklärt werden. Ein großer Anteil von frisch gelöstem A β 42 G33A liegt in Form von höheren Oligomeren vor, jedoch aggregieren diese nicht weiter zu Fibrillen (Harmeier et al., 2009).

Werden beide Theorien miteinander kombiniert – Porenbildung aufgrund der hydrophoben Oberfläche und die limitierende Größe der Oligomere für die Kernporen – so ließe sich das Phänomen der unterschiedlich gut internalisierten A β Peptide erklären. A β 38 und A β 40 würden demnach bevorzugt als Mono- oder Dimer über die Kernporen in den Zellkern gelangen, zu einem geringeren Anteil über ausgebildete β -Fass-ähnliche Strukturen und Porenbildung in der Kernmembran. Niedere Oligomere von A β 42 wt und A β 42 G33A würden ebenfalls über die Kernporen aufgenommen werden. Beide Peptide sind aufgrund ihrer Hydrophobizität wahrscheinlich in der Lage, β -Fass-ähnliche Strukturen zu bilden, wobei A β 42 G33A aufgrund seiner hydrophoberen Oberfläche, verglichen zu A β 42 wt, verstärkt β -Fass-ähnliche Strukturen ausbilden kann, mit der Kernmembran vermehrt interagiert und somit besser in den Zellkern eindringen kann. Niedere Oligomere von A β 43 würden auch über die Kernporen in den Kern aufgenommen werden. Höhere Oligomere, von denen sehr viele vorhanden sind, da dieses Peptid sehr schnell und gut aggregiert (Welander et al., 2009; Saito et al. 2011) würden nicht über die Kernporen aufgenommen werden können, was die geringe Menge von A β 43 im Zellkern erklären würde.

Die Befunde der Arbeit von Harmeier et al., 2009 zeigten, dass Tetramere des Peptids A β 42 wt die toxischste oligomere Form darstellen. Dies gilt jedoch nicht für Tetramere oder andere Oligomere des Austauschpeptids A β 42 G33A.

Da in der vorliegenden Studie festgestellt werden konnte, dass alle analysierten A β Peptide in den Zellkern translozieren, jedoch nur das neurotoxische A β 42 wt einen Effekt auf die

Genregulation hat (Ergebnisse 3.7.2 ff. Diskussion 4.3, 4.4), ist zu vermuten, dass vor allem Tetramere des Peptids diese gefundenen Effekte auslösen.

4.2 Neurotoxisches Potential von A β 43

Die Untersuchung der neurotoxischen Wirkung von A β 42 Peptiden ist ein zentraler Bestandteil der AD Forschung (Gouras et al., 2000; Snyder et al., 2005; Harmeier et al., 2009; Tampellini et al., 2009; Tampellini and Gouras, 2010; Reed et al., 2011; Resenberger et al., 2011). Bislang wurden jedoch nur wenige Erkenntnisse zu dem Peptid A β 43 gewonnen. Es wurde gezeigt, dass A β 43 ein höheres neurotoxisches Potential ausübt als A β 40 (Stephan et al., 2001; Welander et al., 2009; Saito et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde das neurotoxische Potential von A β 42 und A β 43 miteinander verglichen.

Bei einer Konzentration von 2,5 μ M wirken beide Peptide signifikant toxisch. Der Unterschied zwischen den Peptiden ist ebenfalls signifikant, wobei das neurotoxische Potential von A β 43 geringer ist. Bei einer Verringerung der Peptidkonzentration auf 1 μ M konnte bei beiden A β Spezies keine neurotoxische Wirkung auf Neuroblastom Zellen festgestellt werden. Um zu gewährleisten, dass alle gewonnenen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit von lebenden Zellen stammen, wurde alle Experimente bei einer Peptidkonzentration von 1 μ M durchgeführt.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass A β 43 *in vitro* bei einer Konzentration von 1 μ M nicht neurotoxisch wirkt (Saito et al., 2011), was in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten steht. In der Arbeit von Saito wurde jedoch auch gezeigt, dass höhere Konzentrationen von A β 43 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* toxisch sind. Dennoch sollte dieses Ergebnis kritisch hinterfragt werden, da in dieser Arbeit das neurotoxische Potential von A β 42 kaum nachgewiesen werden konnte, was nicht in Übereinstimmung zu vielen anderen Arbeiten steht (Walsh et al., 2002; Harmeier et al., 2009; Nygaard and Strittmatter, 2009; Reed et al., 2011; Resenberger et al., 2011).

Die Injektion von A β 43 (2 mM) in den Gyrus dentatus von Ratten hatte eine Inhibition der LTP zur Folge (Stephan et al., 2001). Kritisch sollten bei dieser durchgeführten Studie in erster Linie die sehr hohen A β Konzentrationen betrachtet werden.

Die neurotoxischen oligomeren Formen von A β 42 beschränken sich auf Dimere, Trimere, Tetramere und niedere Oligomere, wobei höhere Oligomere und fibrilläre Strukturen der A β 42 Peptide kein toxisches Potential aufweisen (Walsh et al., 2002; Harmeier et al., 2009; Reed et al., 2011).

Untersuchungen belegen, dass A β 43 im Vergleich zu A β 42 die Eigenschaft besitzt, schneller zu aggregieren und hohe Oligomere bzw. Fibrillen zu bilden (Welander et al., 2009; Saito et al., 2011). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit dem Computermodell (Abb. 23), in dem gezeigt wurde, dass die Struktur von A β 43 die Fibrillenbildung begünstigt.

Zusammenfassend kann das neurotoxische Potential von A β 43 als gering eingestuft werden. Das Computermodell und die Arbeiten anderer Gruppen belegen, dass A β 43 vermehrt zur Fibrillenbildung neigt. Diese haben keine neurotoxische Wirkung. Die wenigen vorhandenen niederen Oligomere können Neurotoxizität bewirken, jedoch aggregieren diese schnell zu hohen Oligomeren bzw. Fibrillen, die nicht mehr neurotoxisch sind.

4.3 Charakterisierung der A β 42-DNA-Interaktion

Ein wichtiger Aspekt der neurotoxischen Wirkung von A β 42 in der Alzheimer Pathologie ist neben der LTP-Inhibition und des Neuronenverlustes die Schädigung von DNA.

In dieser Arbeit konnte mittels TEM gezeigt werden, dass intrazelluläres A β 42 nicht nur im Zellkern, sondern auch in den Mitochondrien nachzuweisen ist. Aufgrund dessen kann es zur Fehlfunktion der Mitochondrien und zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommen (Chen and Yan, 2007; Palacios et al., 2011). Durch die gebildeten ROS kommt es zu Schädigungen der Zellmembran und der DNA, was das Absterben der Zellen herbeiführen kann.

Jedoch bewirken nicht nur ROS Schädigungen der DNA, sondern A β 42 selbst besitzt die Fähigkeit DNA Doppelstrangbrüche zu induzieren (Narasingappa et al., 2010).

Ein DNA-Reparaturmechanismus der Zelle beruht auf der Acetylierung von Histonen. Diese Acetylierungen werden häufig durch Tip60 vermittelt. Es wurde gezeigt, dass die PTB1 Domäne von Fe65 mit Tip60 interagiert. In Fe65 KO-Zellen ist der DNA-Reparaturmechanismus inhibiert (Stante et al., 2009; Szumiel and Foray, 2011), was zu Chromosomenbrüchen und Schädigungen der Zelle führen kann.

In dieser Arbeit wurden drei Promotoren hinsichtlich der Bindung von A β 42 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass A β 42 Peptide mit dem LRP1 und dem KAI1 Promotor interagieren. Es lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage treffen, ob die beobachtete DNA Interaktion direkt oder indirekt ist. Auffällig ist, dass A β 42 an beiden Promotoren Fe65 und Tip60 rekrutiert. Geht man davon aus, dass A β 42 DNA Doppelstrangbrüche induziert und Tip60 und Fe65 am DNA Reparaturmechanismus beteiligt sind, würde das eine mögliche Erklärung für die Neurotoxizität von A β 42 sein. A β 42 bindet an Promotorregionen, induziert

Doppelstrangbrüche, was die Rekrutierung von Fe65 und Tip60 zur DNA Reparatur erklären würde.

Jedoch dissoziieren Fe65 und Tip60 bereits nach insgesamt vier Stunden Inkubationszeit, während A β 42 weiterhin mit den untersuchten Promotoren präzipitiert werden konnte. Möglich ist, dass der oligomere Zustand von A β 42 für die Induktion von DNA Schädigungen von entscheidender Bedeutung ist. Aus den Immunfluoreszenzaufnahmen ist ersichtlich, dass das Peptid im Zellkern akkumuliert und wahrscheinlich auch aggregiert, da die Fluoreszenzsignale über die Zeit an Größe zunehmen. Es wäre denkbar, dass A β 42 in einem bestimmten oligomeren Zustand an die DNA bindet, dort weiter aggregiert und einen oligomeren Zustand annimmt, in dem das Oligomer zwar weiterhin mit der DNA co-präzipitiert werden kann, jedoch keine DNA Schäden mehr induziert.

Im Rahmen dieser Überlegungen wurde aus SH-SY5Y Zellen nach Inkubation mit A β 42 Peptiden, genomische DNA isoliert und diese auf Agarosegelen auf Schädigungen untersucht. Aufgrund der induzierten Doppelstrangbrüche wären kürzere DNA Fragmente zu erwarten gewesen. Diese hätte sich im Agarosegel im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen durch ihr Laufverhalten deutlich unterschieden. Es konnten jedoch keine Unterschiede im Laufverhalten der genomischen DNA zwischen mit A β behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es ist aber möglich, dass für die Induktion der Doppelstrangbrüche eine bestimmte Menge von A β 42 Molekülen und eine entscheidende Konformation der A β Oligomere benötigt wird. In dieser Arbeit wurden die Ereignisse an den Promotoren über einen Zeitraum von acht Stunden betrachtet. Eventuell konnten Fe65 und Tip60 etwaige induzierte Doppelstrangbrüche reparieren, so dass diese nicht nachweisbar waren. Interessant wäre es, in einer längeren Zeitverlaufsstudie diese Ereignisse zu untersuchen. Möglich ist auch, dass Fe65 und Tip60 zu späteren Zeitpunkten erneut rekrutiert werden, da im Zellkern akkumuliertes A β 42 wt zu späteren Zeitpunkten Doppelstrangbrüche der DNA induzieren könnte. Möglich ist, dass nach einer bestimmten Zeit zu viel A β Peptide im Kern akkumulieren und Fe65 und Tip60 die DNA Reparatur nicht mehr bewältigen können. Überträgt man diesen Gedanken von *in vitro* Untersuchungen auf den Patienten, könnte erklärt werden, warum es viele Jahre dauert, bis erste Symptome bei der AD auftreten.

Es ist außerdem bekannt, dass es transiente Veränderungen der Chromatinstruktur in Bezug auf die kognitiven Fähigkeiten gibt (Levenson et al., 2004; Peleg et al., 2010). Die deregulierte Plastizität des Chromatins scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung von sporadisch auftretender AD zu haben (Abel and Zukin, 2008; Sananbenesi and Fischer, 2009). Die ChIP Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass A β 42 wt Tip60 rekrutiert. Tip60 acetyliert Histone, was eine Änderung der Chromatinstruktur dahingehend zur Folge hat, dass die DNA besser für Transkriptionsfaktoren erreichbar ist (Strahl and Allis,

2000; Winter and Fischle, 2010). Es wurde bereits häufig diskutiert, dass die Acetylierung von Histonen ein kritisches Ereignis für das LTP bei Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Rubinstein-Taybi Syndrom ist (Alarcon et al., 2004; Korzus et al., 2004; Chen et al., 2010; Valor et al., 2011).

Die in dieser Arbeit gezeigten Befunde deuten darauf hin, dass neurotoxisches A β 42 in einen direkten Zusammenhang mit DNA gebracht werden kann, auch wenn es sich um eine indirekte DNA-Interaktion handelt.

Es wurde vermutet, dass Fe65, Tip60 und A β 42 einen Komplex an den Promotoren bilden könnten, analog zu den beobachteten AICD-Fe56-Tip60 Komplexen (von Rotz et al., 2004). Es wurde versucht, diesen möglichen Komplex mittels Immunpräzipitationen im Western Blot nachzuweisen. Es konnte keine direkte Interaktion gezeigt werden, was jedoch nicht ausschließt, dass A β 42 nicht doch direkt mit Fe65 und Tip60 interagiert.

Mittels SPR-Technologie („surface plasmon resonance“) wurde versucht, eine direkte Interaktion von A β und DNA zu beweisen (Daten nicht gezeigt). Auch wurden radioaktive und nicht-radioaktive EMSA („electrophoretic mobility shift assay“) Studien durchgeführt. Mit keiner der verwendeten Methoden konnte eine direkte Interaktion zwischen der DNA und den A β 42 Peptiden nachgewiesen werden.

Indirekt wurde gezeigt, dass A β 42 mit dem Decamer (GGATTGGGGT) im „heat shock element“ von p53 interagiert (Ohyagi et al., 2005). Kürzlich wurde beschrieben, dass A β 42, bevorzugt der Aminosäurebereich A β 25-35, an dieses Decamer bindet. Dieser Sequenzbereich ist mit 80% Sequenzidentität auch in den Promotorbereichen von APP und BACE1 zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass A β 42 und in geringem Maße auch A β 40 an die Promotoren von APP und BACE1 binden (Maloney and Lahiri, 2011). Aufgrund dieser Befunde wurden die DNA Sequenzen von LRP1 und KAI1 untersucht und gefunden, dass innerhalb des gewählten Primerpaares von KAI1 ein Decamer identifiziert werden konnte, das zu 80% Sequenzidentität zu dem beschriebenen Decamer aufweist. Maloney und Lahiri zeigten auch, dass das Peptid A β 31-35 die Fähigkeit besitzt an das Decamer zu binden. Dieses kleine Peptid beinhaltet die Position G₃₃, die als Schlüsselaminosäure für die Toxizität von A β 42 identifiziert wurde (Harmer et al., 2009). An dieser Stelle sei die Hypothese aufgestellt, dass A β 42 G33A nicht an das Decamer bindet, was somit eventuell der Schlüsselmechanismus der Neurotoxizität sein könnte.

Auch wenn es in dieser Arbeit nicht gelungen ist, eine direkte Interaktion zwischen A β 42 und der DNA nachzuweisen, ist es nicht völlig ausgeschlossen, dass A β 42 wt direkt mit genomischer DNA im Zellkern interagiert. Andererseits wäre es auch denkbar, dass A β 42 wt an bislang noch nicht identifizierte Proteine bindet, zum Beispiel Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits eine direkte Interaktion mit bestimmten DNA Regionen eingehen. Es konnte gezeigt werden, dass A β 42 wt nicht an den HES1 Promotor bindet. Bei der nachgewiesenen

Bindung von A β 42 wt an den LRP1 und KAI1 Promotor - direkt oder indirekt – handelt es sich jedoch um eine spezifische Interaktion.

4.4 Neurotoxizität der A β Peptide korreliert mit der Genregulation

Aufgrund der Befunde dieser Arbeit konnte eine sehr interessante Korrelation zwischen neurotoxischen A β 42 wt Peptiden und der Genregulation hergestellt werden. Es wurde häufig beschrieben, dass intrazelluläres A β 42 den Verlust von Neuronen und die Degeneration von Synapsen zur Folge hat (Tampellini et al., 2009; Tampellini and Gouras, 2010). Auch wurde dem neurotoxischen A β 42 nachgewiesen, dass es LTP Inhibition induziert, indem es die NMDA Ströme blockiert (Selkoe, 2008; Harmeier et al., 2009; Yamin, 2009; Ondrejcek et al., 2010).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das neurotoxische A β 42 wt einen Einfluss auf die Mengen diverser mRNAs in der Zelle zur Folge hat. Interessanterweise korrelieren die mRNA Mengen von LRP1 und KAI1 mit den Promotorbindungsstudien. A β 42 wt wurde mit der DNA der Promotoren von LRP1 und KAI1 über den gesamten Inkubationszeitraum von acht Stunden co-präzipitiert. Die Analyse der mRNA mittels qRT-PCR zeigte, dass eine Reduktion der mRNA Mengen von LRP1 und KAI1 bis zu 70% nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu hatte das neurotoxische A β 42 wt keinen Einfluss auf die mRNA Mengen von HES1. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass A β 42 wt nicht an den HES1 Promotor bindet, an den das NICD im Notch Signalweg bindet (Kim et al., 2007; Zanotti and Canalis, 2010). Vergleicht man die Ergebnisse der ChIP Experimente mit den Daten der qRT-PCR, so kann festgestellt werden, dass die Bindungsereignisse von A β 42 wt an Promotoren mit den mRNA Mengen in Zusammenhang gebracht werden können. In der Arbeit von Maloney und Lahiri, 2011 wurde gezeigt, dass A β 42 wt an den APP Promotor bindet und eine Erhöhung der APP mRNA zur Folge hatte. In der vorliegenden Studie wurde die Bindung von A β 42 wt an den APP Promotor nicht untersucht, jedoch wurde festgestellt, dass die Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit A β 42 wt eine Erhöhung der APP mRNA Menge nach sich zieht.

Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der mRNA Mengen nur von den neurotoxischen A β 42 wt Peptiden induziert wird. Im Gegensatz dazu zeigten die nicht-neurotoxischen A β Spezies (A β 38, A β 40, A β 42 G33A und A β 43) keinen Einfluss auf die mRNA Mengen der untersuchten Gene, obgleich sie im Zellkern von Neuroblastom Zellen nachgewiesen wurden.

Es stellt sich die Frage, warum die nicht-toxischen A β Spezies keinen Einfluss auf die mRNA Mengen haben. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre auch hier wieder die Konformation der A β Peptide. A β 38 und A β 40 liegen nahezu vollständig nur als Monomer oder Dimer vor und aggregieren nicht. Im Gegensatz dazu bildet A β 42 wt neurotoxische Tetramere (Harmeier et al., 2009). Das Austauschpeptid A β 42 G33A bildet zwar ebenfalls Tetramere, diese sind jedoch nicht mehr neurotoxisch und haben aufgrund des stark hydrophoben Faltungskernes eine leicht veränderte Struktur gegenüber dem A β 42 wt (Harmeier et al., 2009) (Vergl. dazu Computermodell (4.1)). A β 43 neigt aufgrund seiner hydrophoben Oberfläche um den Bereich des G₃₇ verstärkt zur Aggregation und bildet keine Tetramere aus. An dieser Stelle wird postuliert, dass es vor allem die Tetramere des A β 42 wt sind, die die mRNA Mengen in der Zelle beeinflussen.

Mittels Illumina Microarray konnte gezeigt werden, dass nur das neurotoxische A β 42 wt, jedoch nicht die nicht-neurotoxischen A β Spezies A β 40 und A β 42 G33A einen Einfluss auf die mRNA Mengen bestimmter Gene in Neuroblastom Zellen hat. Es stellte sich heraus, dass hier und vergleichend in der qRT-PCR die mRNA Mengen von Transkriptionsregulatoren (ID1-3) und dem Transkriptionsfaktor LMO4 erhöht wurden.

Es wäre von großer Bedeutung in einer weiterführenden Studie alle beobachteten Effekte ebenfalls auf der Ebene der Proteine zu untersuchen. Besonders interessant ist, dass das neurotoxische A β 42 wt die mRNA Mengen seines Vorläufers, APP, erhöht. Wenn diese Beobachtung auf Proteinebene bestätigt werden kann und es zum Expressionsanstieg von APP kommt, könnte hier von einem negativen Rückkopplungsmechanismus gesprochen werden. Dieser hätte dramatische Folgen für die Entwicklung von AD, da bereits gebildetes A β 42 die Expression von APP erhöhen würde, was wiederum zu mehr A β 42 Peptiden führt. Die verstärkte Expression von Transkriptionsfaktoren könnte beispielsweise negative Effekte auf die Zelle haben. Bislang noch nicht aufgeklärte Signalwege könnten in der Zelle dahingehend beeinflusst sein, dass Proteine, die für das Lernen und Gedächtnis im Hippocampus von entscheidender Bedeutung sind, in ihrer Expression verändert werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass in transgenen Alzheimer-Mäusen die Proteinexpression von Arc reduziert ist (Palop et al., 2011). Arc „activity-regulated cytoskeleton-associated protein“ (auch als Arg3.1 bekannt) gehört zur Familie der „immediate-early genes“ (IEGs). Nach der Transkription im Zellkern wird die mRNA von Arc in die Dendriten transportiert. Nach dortiger Translation induziert Arc postsynaptisch die Endozytose von AMPA Rezeptoren, was eine Verringerung der synaptischen Plastizität im Hippocampus zur Folge hat und darüber hinaus auch die Lang-Zeit-Depression (LTD), also eine dauerhafte Abschwächung der synaptischen Transmission, induziert (Bramham et al., 2008). Dieses beschriebene Tiermodell erhärtet den Verdacht, dass A β 42 Peptide einen direkten Einfluss auf die Proteinexpression in Neuronen haben können, was über eine lange Exposition letztlich zum Neuronenverlust

führen könnte. In Abbildung 24 ist ein schematisches Modell der Aufnahme von A β Peptiden in den Zellkern und die daraus resultierenden Konsequenzen für die Zelle dargestellt.

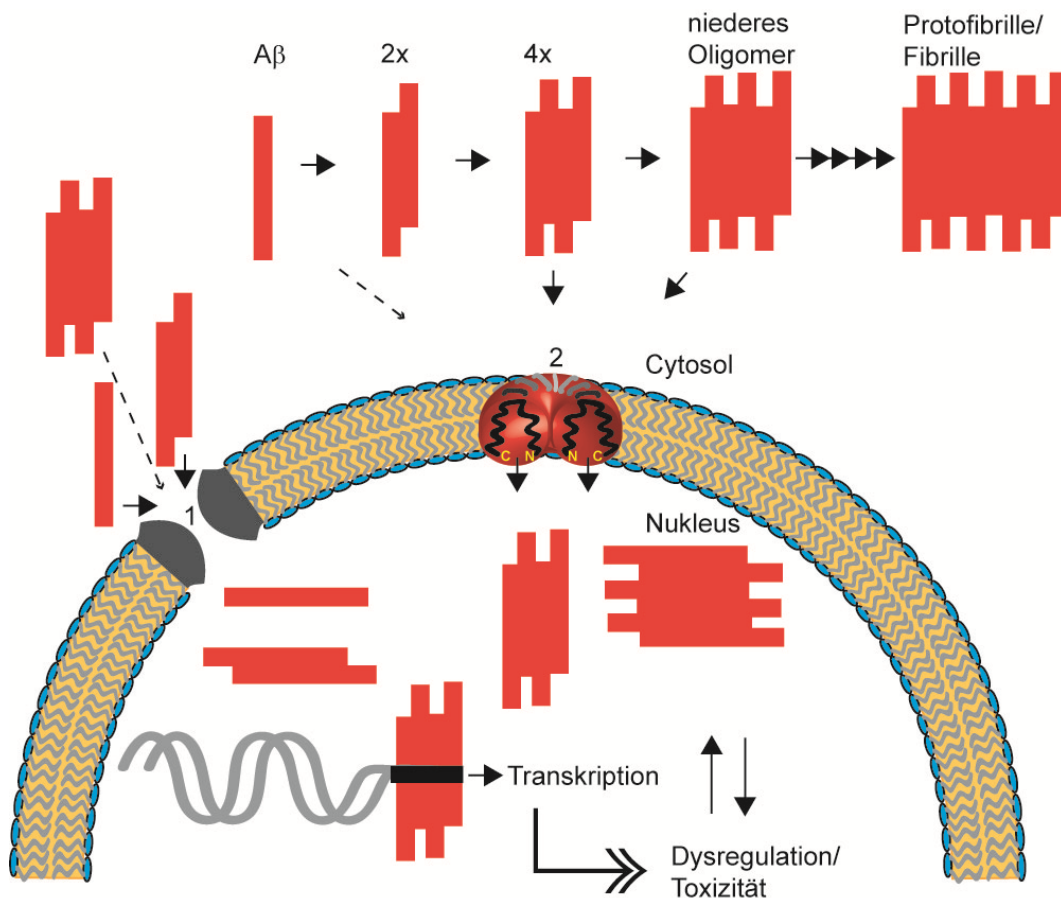


Abb. 24: Schematische Darstellung des möglichen Internalisierungsweges von A β 42 in den Zellkern und die Auslösung der Neurotoxizität. Möglicherweise werden niedere Oligomere verschiedener A β Spezies über Rezeptoren in die Zelle aufgenommen oder passieren die Zellmembran rezeptorunabhängig. Im Cytosol aggregieren die Peptide oder gelangen durch die Kernporen (1) oder durch Ausbildung von β -Fass-Strukturen (2) in der Kernmembran in den Zellkern. Im Zellkern bindet wahrscheinlich eine bestimmte oligomere Konformation des A β 42 spezifisch an Promotoren (schwarze Box). Aufgrund der Dysregulation dieser Zielgene werden die neurotoxischen Eigenschaften des A β 42 vermittelt.

Es gibt bereits erste Hinweise darauf, dass A β 42 wt, jedoch nicht A β 40, die Expression von BACE1 auf mRNA- und Proteinebene beeinflusst (Buggia-Prevot et al., 2008; Giliberto et al., 2009; Guglielmotto et al., 2011). In diesen Arbeiten wurde nicht direkt gezeigt, dass A β Peptide in den Zellkern translozieren und es aufgrund der Bindung an den BACE1 Promotor zu einer Expressionsänderung kommt. Vielmehr wurde hier angenommen, dass A β 42 wt einen Einfluss auf NF κ B bzw. auf den Signalweg von JNK/ c-jun nimmt und es deshalb zur Expressionserhöhung kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte nicht gezeigt werden, dass A β 42 wt einen Einfluss auf die mRNA Mengen von BACE1 hat, was aufgrund der vorliegenden Literatur nicht auszuschließen gewesen wäre. Das könnte darauf

zurückzuführen sein, dass in dieser Arbeit die Neuroblastom Zellen synchronisiert wurden. Zum Anderen wurden in den hier zitierten Arbeiten die verwendeten Zellkultursysteme bis zu 48 Stunden mit A β 42 Peptiden inkubiert, teilweise bei Konzentrationen bis zu 10 μ M A β 42. Im Vergleich dazu wurde gezeigt, dass 2,5 μ M A β 42 bereits nach 12 Stunden Inkubation die Lebenszellzahl um mindestens 50% reduziert (Harmeier et al., 2009).

In dieser Arbeit wurde versucht die Änderung der Proteinexpression von LRP1 und APP im Western Blot nachzuweisen. Mittels dieser Methode hätte der Einfluss von A β 42 wt Peptiden auf Translationsebene, ergänzend zu den generierten mRNA Daten, gezeigt werden können. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass LRP1 an dem Abtransport von A β Peptiden aus dem Gehirn an der Bluthirnschranke beteiligt ist (Zlokovic, 2008) und der Abbau der A β Peptide in der Peripherie in der Leber stattfindet (Kim et al., 2009). Im Gehirn ist LRP1 am Transport von A β Peptiden in Microgliazellen und Astrozyten involviert, in denen die Peptide Abgebaut werden können (Koistinaho et al., 2004; Jiang et al., 2008). Eine verminderte Proteinexpression von LRP1, aufgrund der genregulatorischen Wirkung von A β 42 wt, im Gehirn hätte aufgrund der Funktion von LRP1 zur Folge, dass weniger A β Peptide aus dem Gehirn entfernt oder gar direkt im Gehirn degradiert werden.

In dem gewählten Untersuchungszeitfenster von 24 h wurde jedoch keine Expressionsänderung nachgewiesen. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass auch auf Proteinebene nur transiente Effekte auftreten und der richtige Zeitpunkt nicht erfasst wurde.

Die Befunde aus der Literatur untermauern jedoch die Bedeutung der Untersuchung der Ergebnisse auf Proteinebene, um einen direkten Zusammenhang zwischen Neurotoxizität, Promotorbindung, mRNA Mengen und Proteinexpression herstellen zu können.

Interessanterweise lassen sich hier gewisse Parallelen zu der Demenzerkrankung Chorea Huntington (Huntington's disease, HD) ziehen. Bei HD handelt es sich ebenfalls um eine Aggregationserkrankung bei der das Protein Huntingtin mit poly-Q Ketten versehen wird, aufgrund dessen aggregiert und eine neurotoxische Wirkung ausübt (Kubota et al., 2011). Auch bei dieser Erkrankung ist die Lokalisation des Proteins in der Zelle und der genaue Mechanismus der Toxizitätsauslösung noch umstritten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Huntingtin aufgrund eines NLS („nuclear localization signal“) in den Zellkern gelangt. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen Neurotoxizität und der Lokalisation im Kern gezeigt werden (Iwata et al., 2009). Im Zellkern bindet Huntingtin direkt an DNA oder Transkriptionsfaktoren und beeinflusst die Transkription diverser Gene (Shoulson and Young, 2011). Wird die Translokation in den Zellkern durch die Entfernung des NLS unterbunden, wird auch die Neurotoxizität des Proteins abgeschwächt (Ju et al., 2011).

A β Peptide haben kein NLS, gelangen jedoch über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen in den Zellkern. Da die oben beschriebenen Mechanismen für HD ähnlich zu denen in dieser Arbeit untersuchten Befunde sind – Translokation in den Zellkern,

Veränderung der Transkription in Korrelation mit der Neurotoxizität – unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung dieses neu gefundenen möglichen Toxizitätsmechanismus in der AD.

4.5 Charakterisierung der Lokalisation von A β 42 Peptiden in Zellkernen im transgenen Mausmodell

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmalig mittels TEM gelungen, A β 42 in hippocampalen Neuronenzellkernen von transgenen APPPS1/2 Mäusen nachzuweisen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in stabil transfizierten APP SH-SY5Y Zellen sowohl A β 42 wt als auch A β 42 G33A im Zellkern detektiert werden können. Darüber hinaus wurde in diesen stabilen Zelllinien auch gezeigt, dass A β 42 wt direkt oder indirekt an den KA11 Promotor bindet (Barucker, 2008).

Neben hippocampalen Neuronenzellkernen wurde A β 42 auch in den Zellkernen von hippocampalen Gliazellen nachgewiesen. Aufgrund der verwendeten Einbettungstechnik für die Untersuchung am TEM ist es nicht möglich gewesen, die Gliazellen näher zu charakterisieren. Es konnte keine Differenzierung zwischen Astrozyten und Mikroglia getroffen werden. Gliazellen können als die Makrophagen des Gehirns angesehen werden (Lee and Landreth, 2010). In Mikroglia ist LRP1 an der Aufnahme von löslichem A β (Monomere bis hin zu niederen Oligomeren) und somit für den Abbau aus dem Hirngewebe beteiligt (Narita et al., 1997).

In den durchgeführten *in vitro* Studien konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die mRNA Mengen von LRP1, in Folge der Behandlung mit neurotoxischem A β 42 wt, verringert werden. Es wäre sehr interessant zu untersuchen, ob A β 42 wt im Zellkern von Mikroglia ebenfalls diesen Effekt verursacht. Das hätte zur Folge, dass weniger A β aus dem Gehirn entfernt würde und folglich weniger A β durch Neprilysin oder IDE („insulin degrading enzyme“) in Gliazellen abgebaut werden könnte. Auch würde dadurch der Abbau von A β in der Leber vermindert werden (Jiang et al., 2008; Terwel et al., 2011).

Ein anderer interessanter Aspekt ist, dass die Metalloendopeptidase Neprilysin, welche auch extrazelluläres A β abbaut, aufgrund der Signalwirkung des AICD sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene vermindert exprimiert wird. Dadurch wird der Abbau von extrazellulärem A β reduziert (Bauer et al., 2011), was eine Erhöhung von intrazellulärem A β in Neuronen und Mikroglia zur Folge haben könnte. Es gibt Hinweise darauf, dass die mRNA Mengen von SR-A, CD36 und RAGE in Mikrogliazellen in Alzheimer-Mäusen (B6C3-Tg(APP^{swe}, PSEN1dE9)) verringert sind (Hickman et al., 2008).

In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass fibrilläres A β 42 in Mikrogliazellen die mRNA Mengen von CD36, CD47 und Integrin β 1 erhöht. Interessanterweise verringert oligomeres A β 42 in Mikrogliazellen die mRNA Mengen von CD36, CD47 und Integrin β 1 (Pan et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass oligomeres A β 42 stärker toxisch auf Mikrogliazellen wirkt als fibrilläres A β 42. Darüber hinaus aktiviert oligomeres A β 42 in Mikrogliazellen den Signalweg von c JNK/ c-jun und NF κ B (Michelucci et al., 2009; Pan et al., 2009; Heurtaux et al., 2010), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es transkriptionsregulatorische Funktionen in Gliazellen übernimmt.

Für die Aufklärung des zellulären Mechanismus der durch A β 42 verursachten Neurotoxizität ist es von großer Bedeutung, in einer weiterführenden Studie die mRNA Mengen der in dieser Arbeit identifizierten Gene im transgenen Alzheimer-Mausmodell zu untersuchen. Um die Bedeutung des GxxxG-Motives näher zu beleuchten wäre es vorstellbar, eine Mauslinie zu generieren, die die Mutation G33A trägt. Im Folgenden müssten drei Mauslinien miteinander verglichen werden: i) A β 42 wt; ii) A β 42 G33A; iii) transgen negative Mäuse. Mit diesen Mauslinien könnten zum Einen Verhaltensstudien durchgeführt werden, um *in vivo* zu zeigen, dass A β 42 G33A nicht neurotoxisch wirkt. Zum anderen wäre der Nachweis von A β 42 Peptiden im Zellkern von Bedeutung. Eine vergleichende Analyse von Promotoren, mRNA Mengen gefolgt von der Untersuchung auf Proteinebene, könnte Aufschluss über den Wirkungsmechanismus von A β 42 Peptiden in der Alzheimer Pathologie geben.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen sollten in den oben vorgeschlagenen Mausmodellen (4.5) überprüft werden. Könnten die Analysen der Promotorbindungsstudien, mRNA Mengen und entsprechender Proteine *in vivo* bestätigt werden, so wäre dies die Möglichkeit eine Frühdiagnostik zu entwickeln.

Bis heute basiert die Diagnose der AD nur auf kognitiven Tests bzw. auf bildgebenden Verfahren wie zum Beispiel PET (Positronen-Emissions-Tomographie) oder erfolgt *post mortem*. Die Diagnose mittels PET erfolgt über die Detektion von diffusen Plaques (Rowe and Villemagne, 2011). Die löslichen niederen Oligomere, insbesondere die Tetramere, stellen die toxischen Spezies von A β dar (Walsh et al., 2002; Shankar et al., 2008; Harmeier et al., 2009). Deshalb kann bei dem Einsatz von PET eigentlich nicht von einer Frühdiagnostik gesprochen werden, da hier das neurotoxische Potential der löslichen niederen Oligomere bereits lange vor der Diagnose zur Wirkung kam.

Es wäre vorstellbar eine Frühdiagnostik dahingehend zu entwickeln, dass die Untersuchung der in dieser Arbeit gefundenen Gene, die spezifisch durch A β 42 wt reguliert werden, in Betracht gezogen wird. Es wäre möglich, diese auf mRNA- oder Proteinebene im Patienten zu analysieren. Diese könnten möglicherweise frühe Marker für das Vorhandensein von neurotoxischen A β 42 Peptiden sein. Darüber hinaus sollte in Betracht gezogen werden, dass die mittels Illumina identifizierten Gene transkriptionsregulatorische Funktionen haben oder gar Transkriptionsfaktoren sind und somit einen Einfluss auf die Proteinexpression von potentiellen Markerproteinen haben könnten. In weiterführenden Experimenten könnten Zielgene dieser Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Es ist vorstellbar, dass die Proteinexpression dieser Zielgene verändert ist. Somit bietet die Analyse dieser weiteren Proteine die Möglichkeit, diese als Markerproteine für eine Frühdiagnostik in Betracht zu ziehen.

In Kombination mit einer geeigneten Therapie, möglicherweise durch rechtzeitige Behandlung mit NSAIDs oder Aggregationsinhibitoren, könnte somit der Ausbruch der Krankheit um mehrere Jahre verschoben oder vielleicht sogar ganz unterbunden werden.

Es wurden einige NSAIDs identifiziert, die an das GxxxG Motiv in der TMS des APP binden und die Prozessierung dahingehend beeinflussen, dass signifikant weniger neurotoxisches A β 42 gebildet wird (Richter et al., 2010). In diesem Zusammenhang wäre es sehr interessant zu überprüfen, ob NSAIDs nicht nur die Generierung von A β 42 Peptiden durch Bindung an die α -helikale TMS des APP verringern, sondern ob sie auch an lösliches A β 42 binden (Monomere, Dimere, Trimere, Tetramere und niedere Oligomere) und über diesen Weg, durch Inhibierung der Aggregation, eventuell die Toxizität von A β 42 inhibieren.

Einen weiteren potentiellen Therapieansatz bieten Aggregationsinhibitoren (sogenannte Inhibitorpeptide, Einleitung 2.3.3). Es konnte gezeigt werden, dass das Inhibitorpeptid mit der Sequenz RGTFFEGKF die Aggregation von A β 42 inhibiert und somit niedere Oligomere stabilisiert werden. Interessanterweise haben diese, durch das Inhibitorpeptid stabilisierten Oligomere, keine neurotoxische Wirkung auf primäre Neuronen (Harmeier et al., 2011) (Manuskript in Vorbereitung). Dieses Phänomen ist eventuell auf eine Strukturänderung der niederen Oligomere, an die der Inhibitor bindet, zurückzuführen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass für die Bindung des Inhibitorpeptids an A β 42 Peptide die Position G₃₃ von entscheidender Bedeutung ist (Harmeier et al., 2011). Das Inhibitorpeptid weist ebenfalls ein GxxxG-Motiv auf, welches möglicherweise mit dem GxxxG-Motiv im A β Peptid interagiert. Ein weiterführender experimenteller Ansatz wäre, die stabilisierten niederen Oligomere auf ihre Funktion im Zellkern hin zu untersuchen. Erste Ergebnisse zeigten, dass mit dem Inhibitorpeptid co-inkubierte A β 42 Peptide im Zellkern nachzuweisen sind.

Sowohl die Analyse der mRNA Menge von Zellen, die mit co-inkubierten A β 42 wt-NSAIDs behandelt wurden, als auch von co-inkubierten A β 42 wt-Inhibitorpeptid, könnte Aufschluss über einen möglichen Toxizitätsmechanismus in der Zelle geben. Würde dieser Komplexe keine veränderten mRNA Mengen hervorrufen und Toxizitätstests (MTT-Test) nur vitale Zellen zeigen, würde dies ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die Neurotoxizität im Zellkern durch die Dysregulation verschiedener Gene vermittelt wird und NSAIDs oder Aggregationsinhibitoren geeignete Therapeutika darstellen.

Darüber hinaus gibt es erste Hinweise darauf, dass das Inhibitorpeptid nicht nur an die β -Faltblattstruktur des A β 42 Peptids bindet, sondern auch an die α -Helix in der TMS des APP und somit die Dimerisierung schwächt. Durch die Schwächung der Dimerisierung in der TMS könnte es zu einer Verschiebung der APP Prozessierung kommen, so dass weniger neurotoxisches A β 42, aber dafür mehr nicht-neurotoxisches A β 38 gebildet wird. Somit wäre der Einsatz von Inhibitorpeptiden ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt. Es bleibt jedoch zu untersuchen, ob diese Moleküle die Bluthirnschranke passieren können (Deli et al., 2005; Nakagawa et al., 2009; Kuo and Lu, 2011).

5 Material

5.1 Geräte

- Autoklav: Varioklav 135S (H+P, Oberschleißheim)
- Begasungsbrutschrank für eukaryotische Zellkultur: HERA cell 240 (Heraeus, USA)
- Brutschrank für bakterielle Zellkultur: Modell 600 (Memmert, Schwabach)
- CASY® Model DT Cell Counter (Roche, Schweiz)
- Dot-Blot-Apparatur (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Einfrierdose: Nalgene Cryo 1C Freezing Container (Nalge Nunc, USA)
- Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham, USA), SDS-PAGE
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Schrobenhausen)
- Fast Real Time PCR System 7500 (Applied Biosystem)
- Feinwaage MC1 AC120S (Sartorius, Göttingen)
- Geldokumentation Alphamager 2200 (Biozym, Hamburg)
- Grobwaage L2200P (Sartorius, Göttingen)
- Heizblock UBD2 (Grant, UK)
- Konfokales „laser scanning“ Mikroskop LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen)
- Kühlzentrifuge Centrifuge 5417 R (Eppendorf, Hamburg)
- Küvettenphotometer SmartSpec 3000 (Biorad, München)
- Lichtmikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena)
- Mikrowelle R-937 (Sharp, Hamburg)
- Mikrozentrifuge FugeOne (StarLab, UK)
- Millipore water purification systems, Q Gard 1 (Millipore, USA)
- Mini-Protean Tetra Cell (Biorad, München)
- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (PEQLAB, Erlangen)
- PCR-Maschine Mastercycler (Eppendorff, Hamburg)
- Pipetten: Pipetman P2, P10, P20, P200 & P1000 (Gilson, USA)
- Plattenphotometer Anthos HT2 (Anthos, Krefeld)
- Power Supply 2000/200 (Biorad, München), Agarosegelelektrophorese
- Schütteltisch ST5 (CAT Zipperer GmbH)
- Sterilwerkbank Herasafe (Heraeus, USA)
- Thermomixer Comfort (Eppendorff, Hamburg)
- Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, USA)
- Transblot-Apparatur, (Bio-Rad, München)
- Ultrazentrifuge J2-MC (Beckman, München) für ≤ 10.000 rpm: JA-10 Festwinkelrotor

(Beckman, München) für > 10.000 rpm: F13B-14x50cy mL Festwinkelrotor (FiberLite, USA)

- Überkopfschüttler Reax 2 (Heidolph, Schwabach)
- Vakuumpumpe CVC2 vacuubrand (ABM, Marktredwitz)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA)
- Wasserbad U3 (Julabo, Seelbach)
- Wasserkocher (Severin, Stundern)
- Zählkammer Neubauer improved bright-line (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
- Zellzentrifuge Megafuge 1.0 (Heraeus, USA)

5.2 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern und Reaktionslösungen wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Roth GmbH, Karlsruhe, Merck, Darmstadt oder Fluka, Schweiz in der pro analysis Qualitätsstufe bezogen.

- Agarose (Invitrogen, Karlsruhe)
- BCA Protein Assay (Pierce, USA)
- Fluoromount-G (Southern Biotech, USA)
- Proteaseinhibitor Complete (Roche, Schweiz)
- Protein A/ G Sepharose (Amersham, GB)
- Transfektin-Reagenz (Bio-Rad, München)
- DAPI (Roche, Mannheim)

5.2.1 Enzyme & Standards

- 1kb Plus DNA Ladder, 0,1 µg/ µl (Invitrogen, Karlsruhe)
- BSA, 1 µg/µl (NEB, USA)
- Dual Color Precision Plus Protein Standards (Biorad, München)
- Paq5000 Polymerase (Agilent Technologies, Deutschland)
- Proteinase K (Invitrogen, Karlsruhe)
- RNase A (Invitrogen, Karlsruhe)
- See blue®Plus2 Prestained (Invitrogen, Karlsruhe)

5.3 Antiseren & Antikörper

| | |
|---------------------|--|
| W02: | monoklonaler Maus-Antikörper (The Genetics Company (TGC)); Epitop A β 5–8, humanspezifisch (Ida et al., 1996a) WB: 0,03 mg/ml, EM: 1:80 |
| G2-13: | monoklonaler Maus-Antikörper (TGC); Epitop: C-Terminus von A β 42 ELISA nach Angaben TGC, EM: 1:300 |
| G2-13 Au10nm: | monoklonaler Maus-Antikörper (TGC); selbst mit Gold markiert, EM: 1:50 |
| 4G8: | monoklonaler Mausantikörper (Covance) |
| Anti-Actin: | monoklonaler Maus-Antikörper (Chemikon, MAB1501) WB: 1:2000 |
| Anti-Biotin: | monoklonaler Mausantikörper (Sigma, Clone: BN-34) IF: 1:500 |
| Anti-Calnexin: | monoklonaler Maus-Antikörper (Chemikon, MAB3126) WB: 1:2000 |
| Anti-Fe65: | monoklonaler Mausantikörper (Millipore, Clone 3H6) |
| Anti-Flotillin: | monoklonaler Maus-Antikörper (BD Transduction Laboratories), WB: 1:2000 |
| Anti-GAP-DH: | monoklonaler Maus-Antikörper (Chemikon, MAB374) WB: 1:2000 |
| Anti-Histon: | monoklonaler Maus-Antikörper (Chemikon, MAB052) WB: 1:500 |
| Anti-LaminA/ C: | monoklonaler Maus-Antikörper WB: 1: 1000 |
| Anti-N-CoR: | polyklonaler Ziegenantikörper (Santa Cruz, C-20) |
| Anti-p50: | polyklonaler Kaninchenantikörper (Santa Cruz, H-119) |
| Anti-Tip60: | monoklonaler Mausantikörper (Millipore, Cat. 07-038) |
| Normal Maus IgG: | Santa Cruz, (sc-2025) |
| Anti-Maus-HRP: | mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper zur Chemilumineszenz-Detektion muriner Erstantikörper im WB (Promega, USA), WB: 1:10000 |
| Anti-Maus-Alexa488: | Alexa Fluor 488,(Invitrogen, A11029), IF: 1:2000 |
| Anti-Maus Au15nm: | konjugierter Antikörper zur Detektion muriner Erstantikörper im EM (BritishBioCell), EM: 1:100 |

5.4 Puffer

Alle nicht im Methodenteil gesondert angegebenen Puffer wurden nach Sambrook et al. hergestellt (Sambrook, 1989).

5.5 Zellkultur-Medien

Medien, Zusätze, Waschpuffer (PBS) und Trypsin/ EDTA für die Zellkultur wurden von den Firmen PAA, Österreich oder Biochrom, Berlin und die Antibiotika Hygromycin bei Invitrogen, Karlsruhe und Penicillin/Streptomycin über PAA, Österreich bezogen.

5.6 Verbrauchsmaterial

- Cryo-Röhrchen: CryoTube Vials (Nunc, Wiesbaden)
- ELISA-Platten: C96 Maxisorp Nunc Immuno-Plates (Nunc, Dänemark)
- Fast optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystem)
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystem)
- Filterpapier Whatman 3MM (Whatman Int. Ltd., GB)
- Gradientengele (Anamed, Darmstadt)
- Mikrotiterplatten (Greiner, Österreich)
- Nitrocellulosemembran porablot NCP (Macherey-Nagel, Düren)
- Phase Lock Gel Light 1,5 ml (5Prime, Hamburg)
- Petri-Schalen (Greiner, Österreich)
- Pipettenspitzen (Steinbrenner, Wiesenbach)
- Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)
- Röntgenfilme Hyperfilm ECL (Amersham, GB)
- Schraubdeckelröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht & BD, USA)
- Zellkulturtestplatten (TPP, Schweiz)
- Zellkulturschalen (TPP, Schweiz)

5.7 Software

Adobe Creative Suite 4 (Adobe, USA)

EM-Menu 4 (TVIPS, Gauting)

EndNote X3 (EndNote, USA)

GraphPad Prism 5, (GraphPad Software Inc., UAS)

ImageJ (Scion Image for Windows, USA)

LSM Image Browser (Zeiss, Jena)

Microsoft Office 2007 (Microsoft, USA)

SDS 1.4 (Applied Biosystem, USA)

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

6.1.1 Phenol/ Chloroformextraktion von DNA

Um Proteine und andere Verunreinigungen aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurde diese in einem 1,5 ml „Phase Lock Gel Light“ (5Prime, Hamburg) mit einem gleichen Volumen Phenol versetzt und vollständig vermischt. Die Zentrifugation erfolgte nach Herstellerangaben. Anschließend wurde ein äquivalentes Volumen Chloroform hinzugefügt, und wiederholt nach Herstellerangaben zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt.

6.1.1.1 Ethanol-Präzipitation

Die Ethanol-Präzipitation dient zur Fällung und Konzentrierung von DNA aus wässrigen Lösungen. Die wässrige DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Kaliumacetatlösung pH 5,5 und 5 µg Glycogen versetzt und vermischt. Abschließend wurden 2,5 Volumen eiskalter (-20°C), absoluter Ethanol hinzugegeben, vermischt und mindestens 60 min bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde sedimentiert (20.000 g, 4°C, 20 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Präzipitat mit eiskaltem (-20°C) Ethanol (70%) gewaschen. Es wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Präzipitat wurde getrocknet (37°C, 20 min) und in 20-50 µl MilliQ Wasser oder TE Puffer resuspendiert.

6.1.2 Isolierung von RNA

Die Präparation der total RNA aus eukaryotischen SH-SY5Y Zellen erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben.

6.1.2.1 Qualitätsbestimmung der RNA

Die Reinheit der RNA und die Konzentration wurde mit einem NanoDrop1000 oder alternativ im Bioanalytiker2100 auf einem RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Waldbronn) bestimmt.

6.1.3 RT-PCR & Real Time PCR

Für die Quantifizierung von mRNA wurde zunächst eine RT-PCR durchgeführt, wobei das Enzym Reverse Transkriptase die einzelsträngige mRNA abliest und doppelsträngige cDNA synthetisiert.

Die RT-PCR erfolgte mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ von Applied Biosystems nach Herstellerangaben. Es wurden 2 µg mRNA in 40 µl Reaktionsvolumen eingesetzt.

Nach der erfolgten reversen Transkription wird die erhaltene cDNA in der quantitativen „real time“ PCR (qRT-PCR) in mehreren Zyklen amplifiziert. Die qRT-PCR wurde mit dem „TaqMan Gene Expression Assay“ von Applied Biosystem nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 2 µl cDNA in 20 µl Reaktionsvolumen eingesetzt.

Folgende „TaqMan Gene Expression Assay“ wurden verwendet:

HS01552282_m1 (*app*), HS00201573_m1 (*bace1*), HS00172878_m1 (*hes-1*), HS00704053_s1 (*id1*), HS00747379_m1 (*id2*), HS00171409_m1 (*id3*), HS00426287_m1 (*igfbp3*), HS01052296_m1 (*igfbp5*) HS00174463_m1 (*kai-1*), HS00232488_m1 (*lmo4*), HS01059295_m1 (*lrp1*), humanes beta actin VIC/ TAMRA 4310881E

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001).

6.2 Illumina

Mit Hilfe der Illumina-Technik ist es möglich, das Genom zu analysieren. Hierfür können verschiedene Techniken verwendet werden. Mittels der Illumina-Sequenzierungsmethode kann das humane Genom vergleichend untersucht werden. Dieses Verfahren kann angewendet werden, wenn eine Referenzsequenz (z. B. das humane Genom) als Vorlage zum Zuordnen der kurzen Sequenzabschnitte zur Verfügung steht. Die Leseweite dieser Methode liegt bei circa 75-100 Nukleotiden. Die DNA-Moleküle werden auf einem soliden Trägermaterial durch Brücken-PCRs amplifiziert. Die Art der Sequenzierung verfeinert die Sanger-Methode. An einzelsträngiger DNA wird ein komplementärer Strang repliziert und dabei ein Terminator-Nukleotid eingebaut. Durch den Terminator wird die DNA-Synthese gestoppt und die Fluoreszenzmarkierung (vier unterschiedliche Farben für die vier Nukleotide) wird aufgenommen. Danach werden der Terminator und die Fluoreszenz am Ende des entstehenden Strangs entfernt, die Synthese und damit der nächste Sequenzierzyklus können beginnen (Metzker, 2010).

In dieser Arbeit wurden in Kooperation mit Bayer HealthCare Illumina Microarrays hybridisiert. Dazu wurde aus SH-SH5Y Zellen isolierte RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und dann durch *in vitro* Transkription biotinylierte RNA in ausreichender Menge erzeugt. Um ein Fluoreszenzsignal auf dem Array zu erzeugen, wurde nach der Hybridisierung der biotinylierten RNA das Biotin mit Streptavidin-Cy3 (Amersham Biosciences) markiert und die Cy3-Fluoreszenz vom Laser angeregt und gemessen.

Die Markierung der RNA erfolgte mit dem Illumina Total Prep-96 RNA Amplification Kit von Ambion (Applied Biosystems) auf einem Hamilton Star Roboter (Hamilton, Bonaduz, Schweiz).

Ausgehend von 500 ng RNA wurden der erste und zweite Strang der cDNA synthetisiert. Die cDNA wurde mit dem „Agencourt Magnetic Beads CleanKit“ (Beckman Coulter) gereinigt. Nach *in vitro* Transkription wurde die biotinylierte cRNA mit dem „Agencourt Magnetic Beads CleanKit“ gereinigt. Die Konzentration der cRNA wurde mit Quant-iT RiboGreen (R-11490, Invitrogen) bestimmt. 1,5 µg cRNA wurden mit dem Hybridisierungsreagenz gemischt und auf Illumina Human HT-12 v3 BeadChips hybridisiert. Alle Wasch- und Färbeschritte wurden mit einem „Little Dipper Processor for Illumina BeadChips“ von Scigene (Sunnyvale, USA) durchgeführt.

6.3 Proteinbiochemische Methoden

6.3.1 Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde nach der BCA-Methode (Smith et al., 1985) durchgeführt. Diese beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , dabei bildet Bicinchoninsäure (BCA) spezifisch mit Cu^+ einen Farbkomplex, der kalorimetrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm nachgewiesen werden kann. Die zu bestimmenden Proteinlösungen sowie bovines Serumalbumin (BSA) als Eichprotein wurden in verschiedenen Verdünnungen (Volumen 50 µl) in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Die BCA-Lösung wurde 1:40 mit einer 4%igen CuSO_4 versetzt und davon je 50 µl zu den Proteinlösungen pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C sowie 15 min bei RT wurde die Wellenlänge bei 562 nm gemessen. Anhand der BSA-Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt und die Konzentration der Protein-Lösung entsprechend berechnet.

Alternativ wurden Proteinkonzentrationen am NanoDrop1000 bestimmt. Hierzu musste der Extinktionskoeffizient und das Molekulargewicht bekannt sein.

6.3.4.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Freie Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden mit einer 10%igen Magermilchlösung für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers in PBS in der entsprechenden Verdünnung für 1 h auf dem Blot. Durch dreimaliges Waschen wurden nicht gebundene Antikörper wahlweise mit PBS oder PBS-T entfernt. Der Primärantikörper wurde von einem Maus- oder Kaninchen-spezifischen Sekundärantikörper detektiert, der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist und in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt wurde. Danach wurde auch der Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen wahlweise mit PBS oder PBS-T entfernt. Die gebundenen Antikörper und damit indirekt das Protein, das vom Primärantikörper erkannt wird, werden nach Zugabe der ECL-Entwicklerlösung mittels Chemolumineszenz auf Röntgenfilmen detektiert.

| | |
|-----------------------|--|
| ECL-Lösung A: | 0,25 mg/ ml Luminol in 0,1 M Tris/ HCl; pH 8,6 |
| ECL-Lösung B: | 1,1 mg/ ml p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO |
| ECL-Entwicklerlösung: | 1 ml ECL-Lösung A; 100 µl ECL-Lösung B; 0,3 µl H ₂ O ₂ (30% v/v) |

6.3.5 Herstellen von Zelllysaten

Der Zellkulturüberstand kultivierter eukaryotischer Zellen wurde abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Es wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte 250 µl Lysepuffer zugesetzt und die Zellen bei 4°C für 1 h auf einem Schütteltisch inkubiert. Zellreste wurden bei 10.000 g, 4°C für 10 min mittels Zentrifugation sedimentiert, das Pellet verworfen und mit dem Überstand weitergearbeitet.

| | |
|-------------|--|
| Lysepuffer: | 50 mM Hepes NaOH pH 7,5; 150 mM NaCl; 10% (v/v) Glycerin; 1% (v/v) Triton X-100; 1,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1x PI |
|-------------|--|

6.3.6 Immunpräzipitationen

Zur Präzipitation von Proteinen aus Zellkulturüberständen wurde 1 ml des Überstandes (gewöhnlich für 24 h konditioniert) mit 30 µl Protein-A- oder Protein-G-Sepharose und einem geeigneten Antikörper versetzt. Zur Präzipitation von Proteinen aus Zelllysaten wurde das Lysat mit PBS verdünnt, Complete-Protease-Inhibitor zugesetzt und ebenfalls Protein-A- oder Protein-G-Sepharose und ein geeigneter Antikörper gemischt. Die Ansätze wurden entweder für 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach

wurde die Sepharose durch Zentrifugation bei 2000 g für 2 min sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Sepharose dreimal mit PBS gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden eluiert, indem auf das trockene Sepharosematerial 20 µl 2 x SDS-Protein-Probenpuffer wahlweise mit oder ohne β-Mercaptoethanol gegeben wurden. Die Proben wurden bei 95°C denaturiert und der Überstand für die SDS-PAGE verwendet.

6.3.7 Synthetische Aβ Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Peptide (Aβ1-38, Aβ1-40, Aβ1-42 wt, Aβ1-42 G33A, Aβ1-43 und N-terminal biotinyliertes Aβ1-42 wt) wurden von der Firma PSL, Heidelberg, Deutschland bezogen. Die Reinheit der Peptide wurde mittels MALDI-MS analysiert.

6.3.7.1 Monomerisieren und Lösen synthetischer Peptide

Das synthetische Aβ Peptid wurde stets nach dem einwiegen mit 98% Ameisensäure gelöst, um dadurch den Hauptteil des Peptids in monomerer Form zu erhalten. Das Verhältnis von Monomer:Dimer:Trimer stellt sich als 55:30:15 dar (Roher et al., 1996). Die Ameisensäure wurde im Vakuumkonzentrator abgezogen. Das lyophilisierte Peptid wird bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wurde das Peptid auf RT äquilibriert, um dann zu einer Konzentration von 1 mg/ ml in H₂O mit 0,12% NH₃ gelöst (Schmechel et al., 2003) und sofort für die unterschiedlichen Untersuchungen weiterverwendet zu werden.

6.3.8 Kernpräparation

Die Kernpräparation erfolgte mit dem Nuclei EZ Prep Nuclei Isolation Kit (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Das Protokoll des Herstellers wurde modifiziert.

Für die Kernpräparation wurden die Zellen von jeweils zwei Vertiefungen einer 6-Loch-Platte (5×10^5 SH-SY5Y Zellen pro Vertiefung) verwendet. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen pro Vertiefung mit 1 ml PBS gewaschen und mit 500 ml Trypsin/ EDTA 5 min inkubiert. Die Zellen zweier Vertiefungen wurden in einem Reagiergefäß vereinigt und durch Zentrifugation bei 550 g, 4°C, 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 400 µl „Nuclei Lysis Buffer“ aufgenommen, 5 min bei 4°C inkubiert und anschließend erneut sedimentiert. Das im Überstand befindliche Cytosol und die darin enthaltenen Zellmembranen wurden abgenommen. Das Pellet wurde mit 400 µl „Nuclei Lysis Buffer“

versetzt, inkubiert und sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Die im Pellet befindlichen Zellkerne wurden in 50 µl PBS aufgenommen und 3 min sonifiziert, anschließend 3 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Kernmembranen und daran befindliche Organellen bei 20.000 g, 4°C, 5 min sedimentiert. Im Überstand befanden sich die Kernlumenproteine. Diese wurden neben dem Medium und dem Cytosol für weitere Untersuchungen verwendet.

6.3.9 Chromatinimmunpräzipitation ChIP

ChIP wird genutzt um Protein-DNA-Interaktionen nachzuweisen. Hierfür wurden die Zellen einer *in vitro* Kultur fixiert, die DNA fragmentiert und eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen potentiell an DNA gebundene Proteine durchgeführt. Mit Hilfe spezifischer PCR-Primer wurde die Anreicherung bestimmter DNA Fragmente nachgewiesen. Folgende Schritte wurden durchgeführt:

1) Fixierung der Zellen

Fünf konfluent gewachsene 10 cm Schalen mit SH-SY5Y Zellen wurden mit 20 mM DSG (in DMSO/ PBS) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1% Formaldehyd (in PBS) fixiert. Nach mehreren Waschschritten wurde das überflüssige Formaldehyd mit 125 mM Glycin in PBS abgesättigt.

2) Lyse der Zellen

Jede Zellschale wurde mit 1 ml Lysepuffer versetzt (5 mM Pipes, pH 8,0; 85 mM KCl, 0,5% Nonidet P-40, 1x PI). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Kulturschalen gelöst und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach Sedimentierung wurde der Überstand entfernt und das erhaltene Pellet in 2 ml PIPA Puffer resuspendiert (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP40; 0,5 % Na-Desoxycholsäure, 1x PI). Anschließend wurde das Volumen in 0,5 ml Reaktionsgefäßen auf je 200-300 µl aliquotiert.

3) Fragmentierung der DNA

Die chromosomale DNA wurde nach Ultraschallbehandlung mit 3 x 20 sec Pulsen Ultraschall auf Cycle 0.5, Amplitude 50%, (Gerät: Dr Hielscher UP 50H) fragmentiert. Zwischen den einzelnen Pulsen wurden die Proben mindestens 1 min auf Eis gestellt, um eine stärkere Erwärmung zu vermeiden. Die Fragmentierbedingungen erzeugten DNA Fragmente mit einer Größe zwischen 50-1000 bp.

4) Bestimmung der DNA Konzentration

Ein Aliquot von 50 µl wurde für 30 min bei 95°C inkubiert, um die Kreuzvernetzung aufzuheben. Im Anschluss daran wurden die Proteine mittels Phenol/ Chloroformextraktion entfernt (6.1.1). Die DNA wurde mittels Ethanol-Präzipitation (6.1.1.1) gefällt und anschließend in 50 µl Wasser aufgenommen. Die Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt.

5) Chromatinimmunpräzipitation

Anhand der Konzentrationsbestimmung der DNA wurde so viel Lysat eingesetzt, dass 25-50 µg DNA in einem 250 µl Ansatz enthalten waren. Mit RIPA Puffer wurden die Ansätze auf 250 µl aufgefüllt und 2 µg Antikörper pro Ansatz zugegeben. Die Bindung des Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler. Anschließend wurden 35 µl Protein A-Sepharose zu den Ansätzen gegeben und für weitere 60 min inkubiert.

6) Waschen der Ansätze

Zwischen jedem Waschschrift wurde die Protein A-Sepharose sedimentiert und der Überstand verworfen. Folgenden Waschschrift wurden durchgeführt:

3x 300 µl RIPA Puffer

3x 300 µl LiCl Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM LiCl, 1% NP40, 1% Na-Desoxycholsäure, 1x PI)

2x 300 µl TE Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1x PI)

7) RNase A und Proteinase K Behandlung

Zur Spaltung der RNA wurden 200 µl TE Puffer mit 50 ng/ µl RNase A auf die Sepharose gegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Spaltung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 µl 5x Proteinase K Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM EDTA, 1,25% SDS) und Proteinase K (Endkonzentration 50 ng/ µl) über Nacht bei 65°C.

8) Aufarbeitung der präzipitierten DNA

Nach dem Proteinase K Verdau wurde die DNA mittels einer Phenol/ Chloroformextraktion und anschließender Ethanol-Präzipitation gefällt, bei 37°C für 20 min getrocknet und schließlich in 50 µl MilliQ Wasser resuspendiert.

Mittels PCR wurde der Nachweis der Anreicherung bestimmter DNA Fragmente überprüft. Hierfür wurde die Paq5000 Polymerase verwendet. Es wurden jeweils 2 µl DNA eingesetzt, je 2 µl Primer (10 pmol/ µl), 1 µl dNTPs (à 2,5 mM), 0,2 µl Polymerase. Der Ansatz hatte ein Volumen von 50 µl.

Es wurden für die jeweiligen Primerpaare angepasste PCT Bedingungen verwendet.

Primer zur Detektion der Promotorregion von LRP1:

„Forward“ 5`-GGG AGC CTG AAA TCC TAG AG-3`

„Reverse“ 5`-GGA AAG CGG TCC AAG AGT G-3`

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------------------|------------|--------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94°C | 2 min | 1x |
| Denaturierung | 94°C | 15 sec | |
| Primer Anlagerung | 60°C | 30 sec | 30x |
| Elongation | 72°C | 45 sec | |
| Finale Elongation | 72°C | 3 min | 1x |
| Lagerung | 4°C | ∞ | 1x |

Primer zur Detektion der Promotorregion von KAI1:

„Forward“ 5`- ACC GTT AGG CAG CGC CGT GAG -3`

„Reverse“ 5`- CTT GGG AAG GCG GTG CGC TC -3`

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------------------|------------|--------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94°C | 2 min | 1x |
| Denaturierung | 94°C | 15 sec | |
| Primer Anlagerung | 69°C | 30 sec | 32x |
| Elongation | 72°C | 45 sec | |
| Finale Elongation | 72°C | 3 min | 1x |
| Lagerung | 4°C | ∞ | 1x |

Primer zur Detektion der Promotorregion von HES1:

„Forward“ 5`- CTC CCA TTG GCT GAA AGT TAC -3`

„Reverse“ 5`- TGG CTA CTT GGT GAT CAG TAG -3`

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|------------------------|------------|--------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94°C | 2 min | 1x |
| Denaturierung | 94°C | 15 sec | |
| Primer Anlagerung | 57°C | 30 sec | 28x |
| Elongation | 72°C | 45 sec | |
| Finale Elongation | 72°C | 3 min | 1x |
| Lagerung | 4°C | ∞ | 1x |

Die Amplifikate wurde auf einem Polyacrylamidgel (8%) mit TBE als Laufpuffer aufgetrennt, mit 0,005% (v/v) Ethidiumbromid gefärbt und unter UV Licht analysiert und dokumentiert.

6x DNA-Probenpuffer: 0.025% Bromphenol Blau, 0.025% Xylene Cyanol FF, 30% Glycerol.

6.3.10 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) wurde von The Genetics Company (TGC, Schweiz) bezogen und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

A β 42 wurde mit dem Erstantikörper G2-13 (8 μ g/ ml, von TGC) und gesamt-A β mit 4G8 (1 μ g/ ml, Covance) auf den Maxisorp-Platten fixiert. Es wurden jeweils 50 μ l Probe aufgetragen. Das Medium der mit A β inkubierten Zellen wurde 1:2500 verdünnt, das Cytosol 1:5, die Kernlumenproteine 1:10. Die Messungen der Proben wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Detektion des Signals wurde Poly-Streptavidin-HRP (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet.

6.4 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Experimente wurden an der Sterilwerkbank durchgeführt. Alle verwendeten Reagenzien und Materialien waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung durch Autoklavieren bei 120°C mit Wasserdampf oder trocken bei 165°C sterilisiert.

6.4.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank unter Zusatz von 5% CO₂ bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

SH-SY5Y Zellen: humane Neuroblastomzelllinie, ATCC-Nummer: CRL-2266 (ATCC, Rockville, USA)

Nährmedium: 50% „Dulbecco's minimal essential medium“

50% HAM's F12

10% FCS

20 mM Glutamin

20 mM Natriumpyruvat

1 x Nicht-essentielle Aminosäuren

Selektionsmedium: Nährmedium, 125 mg/ml Hygromycin

HEK293, Humane Nierenzelllinie, („human embryonic kidney“) ATCC-Nummer: CRL-1573 (ATCC, Rockville, USA)

Nährmedium: „Dulbecco's minimal essential medium“

10% FCS

20 mM Glutamin

1 x Nicht-essentielle Aminosäuren

MEF PS1/ 2 KO Zelllinie: murine Fibroblastenzelllinie („mouse embryonic fibroblast“) (Presenilin 1/ 2 „knock out“) aus dem Labor von Prof. Paul Saftig (Universität Kiel, Germany)

Nährmedium: „Dulbecco's minimal essential medium“ high Glucose (4,5 g/ l)

20 mM Glutamin

10% FCS

6.4.1.1 Subkultivierung eukaryotischer Zellen

Die 80-100% konfluenten Zellen einer 10 cm Schale wurden mit 3 ml 1x PBS gewaschen und anschließend für 2 min mit 1 ml Trypsin/ EDTA abgelöst. Die Trypsinwirkung wurde mit 9 ml Medium abgestoppt. Die Zellen wurden mit einer Glaspipette vereinzelt. 500-3000 µl dieser Zellsuspension wurden auf eine frische Schale verteilt und auf 10 ml mit Medium aufgefüllt. Je nach Dichte der Zellen erfolgte diese Prozedur alle 3-5 Tage.

Sollte eine bestimmte Zellzahl ausgesät werden, wurde die Trypsinwirkung mit 9 ml Medium abgestoppt und mit der Glaspipette vereinzelt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines CASY® Cell Counter Systems (Modell DT, Schärfe System, Reutlingen) bestimmt.

6.4.1.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen befanden sich in Cryo-Röhrchen, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden. Die Cryo-Röhrchen wurden aus dem Stickstoff im Wasserbad bei 37°C vollständig aufgetaut. Die Zellen wurden anschließend langsam in 5 ml vorgewärmtes entsprechendes Medium überführt und 5 min bei 500 rpm sedimentiert, um restliches DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in mit 5 ml dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in 10 cm Kulturschalen auf 10 ml aufgefüllt.

6.4.1.3 Kryogene Lagerung

Kryomedium: Kulturmedium; 20% (v/v) FCS; 10% (v/v) DMSO

Wenn Zellkulturen schonend eingefroren werden, können sie über einen längeren Zeitraum aufbewahrt und anschließend wieder aufgetaut werden. Nachdem die Zellen trypsinisiert und in Medium aufgenommen wurden, erfolgte die Sedimentation der Zellen bei 500 rpm für 5 min. Das Pellet einer 100% konfluenten 10 cm Schale wurde in 3 ml Einfrierlösung aufgenommen und auf zwei Cryo-Röhrchen verteilt. Die Cryo-Röhrchen wurden sofort in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox (vorgekühlt 4°C) gebracht. Diese wurde 48 Stunden auf -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

6.4.2 Erzeugung stabiler Zelllinien

Um Zelllinien über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, ist es von Vorteil, die gewünschten Proteine stabil zu exprimieren. Je nach Linie kann das Protein bis zu 10 Passagen in gleichbleibender Höhe exprimiert werden. Etwa 5×10^5 SH-SY5Y-Zellen wurden pro Vertiefung in einer 6-Loch-Platte verteilt, so dass am nächsten Tag die Zelldichte eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hat. Zur Transfektion wurde das Transfektin-Reagenz nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden 2 µg DNA und 7 µl Transfektin-Reagenz eingesetzt. 48h nach der Transfektion wurde das Wildtyp-Medium gegen das Hygromycin-enhaltende Selektionsmedium ausgetauscht. Nach etwa 4 Tagen waren die Zellen selektioniert und konnten für weitere Experimente eingesetzt werden.

6.4.2.1 Transiente Transfektion

Es wurden 5×10^5 SH-SY5Y-Zellen pro Vertiefung in einer 6-Loch-Platte oder $1,5 \times 10^6$ SH-SY5Y-Zellen auf einer 10 cm Schale verteilt, so dass am nächsten Tag die Zelldichte etwa 80%ige Konfluenz erreicht hat. Es wurden pro Vertiefung 1 µg DNA und 4 µl Transfektin-Reagenz nach Angaben des Herstellers verwendet.

Nach 18 h konnten die Zellen für weitere Analysen, wie ChIP, verwendet werden. Um eine erfolgreiche Transfektion nachzuweisen, wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse überprüft.

6.4.3 Synchronisation von SH-SY5Y Zellen

Normalmedium: Kulturmedium, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Thymidinblock: Kulturmedium, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin,
2mM Thymidin

Es wurden 4×10^5 SH-SY5Y-Zellen pro Vertiefung in einer 6-Loch-Platte oder 2×10^6 SH-SY5Y-Zellen auf einer 10 cm Schale verteilt. Nach 72 h wurden die Zellen durch einen Doppelthymidinblock für jeweils 18 h in der G1/ S-Phase synchronisiert (Mannioui et al., 2004). Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen für 8 h mit Normalmedium inkubiert (Fang et al., 1998). Nach dem zweiten Thymidinblock wurden die Zellen 2 h in Medium mit 20% FCS inkubiert. Anschließend wurden sie für Experimente verwendet.

6.4.4 Inkubation von SH-SY5Y Zellen mit synthetischen Peptiden

Die verwendeten Zelllinien wurden bis zu 12 h mit synthetischen A β Peptiden in einer Konzentration von 1 - 2,5 µM (5 - 12,5 mg/ ml) inkubiert.

6.4.5 *In vitro* Toxizitätstest

Um die Toxizität von A β Peptiden zu ermitteln, wurden SH-SY5Y Zellen verwendet. Zum Testen der Toxizität wurden diese in 96-well Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro well in 100µl ausgezählt. Nach 48 h wurde das Medium ersetzt durch A β enthaltendes Medium, und für 12 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde durch Verwendung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid oder Tetrazoliumsalz (MTT)-Test bestimmt, indem die MTT Lösung (5 mg/ ml), nach der Inkubation mit den A β Peptiden, 1:10 im Medium verdünnt wurde und die Zellen weitere 1-3 Std bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert wurden. Das gelblich gefärbte Tetrazoliumsalz wird dabei von lebenden Zellen aufgenommen und in intakten Mitochondrien durch die mitochondriale Dehydrogenase in das blau-violette Formazan umgesetzt. Nach der Lyse der Zellen durch 100% DMSO konnte dieser Farbstoff bei 562 nm photometrisch gemessen und daraufhin quantifiziert werden. Zur Kontrolle wurden immer unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und mit 10% DMSO behandelte Zellen als Positivkontrolle mitgeführt.

6.5 Bildgebende Verfahren

6.5.1 Konfokale Mikroskopie

Für konfokale Mikroskopieaufnahmen wurde ein invertiertes konfokales „laser scanning“ Mikroskop LSM 50 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen) mit Plan-Apochromat Objektiven, 63x/1,4, verwendet.

Es wurden 5×10^5 SH-SY5Y-Zellen pro Vertiefung in einer 6-Loch-Platte auf zwei Glasplättchen verteilt. Die Zellen wurden synchronisiert und anschließend mit synthetischen biotinylierten A β 42 wt Peptiden (1 μ M) inkubiert. Die Zellen wurden für 20 min bei RT mit 3,3% Formaldehyd, 0,3% TritonX-100 fixiert. Das Quenchen erfolgte mit 125 mM Glycin. Die Inkubationszeit des Primär- bzw. Sekundäntikörpers betrug 30 min. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (5 μ g/ml in PBS, Endkonzentration) für 10 min bei RT. Zwischen jedem Arbeitsschritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen wurden mit Fluoromount-G auf Objektträgern immobilisiert.

Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden folgende Anregungswellenlängen und Detektionsfilter verwendet: DAPI - Anregung bei 405 nm, Detektion mit 420-480 nm Breitbandfilter. Fluor Alexa488 - Anregung bei 488 nm, Detektion bei 505-530 nm Breitbandfilter.

6.5.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

6.5.2.1 TEM - SH-SY5Y Zellen

Es wurden 5×10^5 SH-SY5Y-Zellen pro Vertiefung in einer 6-Loch-Platte auf zwei „Thermanox“ Plastikplättchen (Nalgene Nunc International, Rochester, NY), verteilt. Die Zellen wurden mit synthetischen A β 42 Peptiden inkubiert und anschließend mit 2,5% Glutaraldehyd im 50 mM Natriumcacodylat pH 7,4 über Nacht bei 4°C fixiert. 1 h wurden die Proben mit 0,5% Osmiumtetroxid bei RT nachfixiert, anschließend für 1 h in 0,1% Tanninsäure und 1,5 h in 2% Uranylacetat inkubiert. Die Entwässerung erfolgte in einer steigenden Ethanolkonzentrationsreihe. Die Proben wurden in Spurr's resin (Low Viscosity Spurr Kit, Ted Pella, CA, USA) eingebettet und bei 60°C polymerisiert. Ultradünnschnitte (85 nm) wurden mit dem Ultramicrotom (Reichert Ultracut E, Leica) angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kohlenstoff-beschichtete Elektronenmikroskopie Gold Grids (200 Maschen) aufgebracht.

Das "Antigen Retrieval" erfolgte durch Erhitzen in 0.01 M Citratpuffer, pH 6. Blockiert wurden die Grids in 20 mM Tris in 0,9% NaCl + 0,4%BSA-c (Aurion) pH 8 Puffer. Die Primärantikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für 1 h. Die Aufnahmen erfolgten an einem Philips CM100 Elektronenmikroskop mit einer 1K CCD Kamera (Fastscan, TVIPS).

6.5.2.2 TEM - Gewebe

Transgene APPPS1^{+/-} and APPPS1 tg ^{-/-} Mäuse (Radde et al., 2006) wurden in Alter von circa 12 Monaten nach Radde et al., 2006 genotypisiert. Nach der Tötung mittels CO₂ wurden die Tiere mit PBS perfundiert. Anschließend erfolgte die Perfusion mit 4% Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in 50 mM Natriumcacodylat pH 7,4. Die Hippocampi wurden präpariert, in circa 1,5x 1,5x 1,5x mm große Gewebestücke geschnitten und für 1 h bei RT nachfixiert. Anschließend wurde das Gewebe in 50 mM Natriumcacodylat, 50 mM NaCl gewaschen. Die Entwässerung erfolgte in einer steigenden Ethanolkonzentrationsreihe, die anschließende Einbettung in LR-Gold Resin (Science Services GmbH, München). Polymerisiert wurde über Nacht bei 4°C unter einer 360W Quecksilberlampe. Die Ultradünnschnitte und das Blockieren wurden wie in 6.5.2.1 beschrieben durchgeführt.

Die Immunreaktion wurde mit dem A β 42 spezifischen AK G2-13, der zuvor mit Gold markiert wurde (6.5.2.2.2), über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Anschließend wurden die Grids mit 20 mM Tris in 0,9% NaCl gewaschen, mit Wasser gespült und getrocknet. Die Kontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und Citrat.

Die Aufnahmen erfolgten an einem Philips CM100 Elektronenmikroskop mit einer 1K CCD Kamera (Fastscan, TVIPS) und an einem FEI Tecnai Spirit TEM bei 120kV.

6.5.2.2.1 Reinigung von kolloidalem Gold

Bevor Antikörper mit kolloidalem Gold (Au10 nm) markiert werden können, muss das Gold gereinigt werden, um Goldaggregate zu entfernen, die nach einer Immunreaktion ein falsch-positives Ergebnis vortäuschen könnten. Au10 nm (BBInternational, Cardiff, UK) wurde 10 min bei 6700 g sedimentiert. Der Überstand wurde im TEM mittels „Negativstain“ (Kontrastierung mit Uranylacetat) analysiert. Im Vergleich zur Stammlösung konnten nach der Zentrifugation keine Aggregate nachgewiesen werden.

6.5.2.2 Goldmarkierung von Antikörpern

500 µg Antikörper (G2-13) wurden auf ein Volumen von 500 µl mit 2 mM Natriumtetraborat (Boraxpuffer, $B_4Na_2O_7$) aufgefüllt und in einem „Amicon Ultra-0,5 ml Centrifugal Filter“ (Millipore, Schwalbach) 4x dialysiert. Die Zentrifugation erfolgte nach Herstellerangaben.

Nach der Dialyse wurde eine serielle Verdünnungsreihe des Antikörpers in Boraxpuffer erstellt. Ein äquivalentes Volumen von gereinigtem kolloidalem Gold 10 nm (6.5.2.2.1) wurde hinzu pipettiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von einem 1/10 Volumen 10% NaCl konnte das optimale Verhältnis von Protein zu Gold mittels Farbumschlag bestimmt werden. Nach Ermittlung der optimalen Proteinkonzentration konnte der Ansatz in einem beliebig großen Volumen wiederholt werden. Hierfür war es jedoch notwendig die Goldlösung mit 0,1 M K_2CO_3 auf pH 9,0 einzustellen. Die Antikörper-Gold-Mischung wurde mit 1% BSA stabilisiert und 20 min bei RT inkubiert. Mittels Zentrifugation bei 6700 g wurden die Antikörper-Gold-Komplexe sedimentiert. Das Pellet wurde in 20 mM TBS, 1% BSA, 0,05 % NaN_3 , pH 8,2 resuspendiert. Zum Entfernen von ungelösten Goldpartikeln und größeren Goldaggregaten wurde die resuspendierte Lösung 5 min bei 6700 g zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die mit Au 10 nm markierten Antikörper.

6.6 Computergestütztes Modell

Zur Berechnung der Oberflächenhydrophobizität der verwendeten A β Spezies wurde in Anlehnung an Harmeier et al., 2009 in Kooperation mit Dr. P. Hildebrand (Charité, Berlin) ein computergestütztes Modell erstellt. Dabei wurde als Grundlage die Fibrillenstruktur (pdb-entry: 2beg) verwendet (Luhrs et al., 2005). Die Peptide wurden energetisch durch GROMOS 43B1 force field (200 cycles of Steepest Descent) minimiert, um gestörte Geometrien zu vermeiden (Christensen et al., 1990). Elektrostatische Oberflächenpotentiale wurden mit dem APBS Programm (Sanner et al., 1996) errechnet und mit nicht-linearen Poisson-Boltzmann Gleichungen bei $\pm 5kT/e$ umrissen (Baker et al., 2001)

7 Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| A β | Amyloid- β -Peptid |
| A β 40/ 42 | 40 bzw. 42 Aminosäuren langes Amyloid β -Peptid |
| α CTF: | C83; membranständiges Fragment nach α -Sekretase-Spaltung |
| AD: | „Alzheimer’s Disease“ |
| AICD: | „APP intracellular C-terminal domain“ |
| AK: | Antikörper |
| APH-1: | „anterio-pharynx-defective“ |
| APP: | Amyloide Vorläuferprotein („amyloid precursor protein“) |
| AS | Aminosäure/n |
| BACE: | β -Sekretase; „site APP cleaving enzyme“ |
| β CTF: | C99; membranständiges Fragment nach β -Sekretase-Spaltung |
| bp: | Basenpaare |
| BSA: | Bovines Serum Albumin |
| ChIP: | Chromatinimmunpräzipitation |
| DAPI: | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DMSO: | Dimethylsulfoxid |
| DNA: | Desoxyribonukleinsäure |
| DSG: | Disuccinimidyl Glutarat |
| EDTA: | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA: | „enzyme-linked immunosorbent assay“ |
| FCS: | fetales Kälberserum |
| FELASA: | Federation of European Laboratory Animal Science Associations |
| HRP: | Meerrettich-Peroxidase |
| kDa: | kilo Dalton |
| LRP: | Lipoprotein-Rezeptor |
| LSM: | konfokale Laser scanning Mikroskopie |
| LTP: | Lang-Zeit Potentierung |
| mRNA: | Boten-RNA (messenger RNA) |
| PBS: | Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline) |
| PCR: | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PEN-2: | „presenillin enhacer“ |
| PI: | Proteaseinhibitor (Complete) |

| | |
|-----------------|---|
| PK: | Positivkontrolle |
| PS: | Presenilin |
| RNA: | Ribonucleinsäure |
| ROS: | Reaktive Sauerstoffspezies |
| RT: | Raumtemperatur |
| RT-PCR: | Reverse Transkriptions-PCR |
| sAPP α : | lösliche APP-Ektodomäne nach α -Sekretase-Spaltung |
| sAPP β : | lösliche APP-Ektodomäne nach β -Sekretase-Spaltung |
| SDS-PAGE: | Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SDS-PA-Gel: | Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gel |
| STABWN: | Standardabweichung mit Normalverteilung |
| TBE: | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TEM: | Transmissionselektronenmikroskopie |
| tg: | transgen |
| TMS: | Transmembransequenz |
| U: | Einheiten (units) |
| Vergl.: | Vergleich |
| WB: | Western Blot |
| wt: | Wildtyp |
| w/v: | Gewichtsprozent |
| v/v: | Volumenprozent |

Aminosäuren:

| | | | | | |
|---|-----|----------------|---|-----------------|------------|
| A | Ala | Alanin | N | Asn | Asparagin |
| C | Cys | Cystein | P | Pro | Prolin |
| D | Asp | Asparaginsäure | Q | Gln | Glutamin |
| E | Glu | Glutaminsäure | R | Arg | Arginin |
| F | Phe | Phenylalanin | S | Ser | Serin |
| G | Gly | Glycin | T | Thr | Threonin |
| H | His | Histidin | V | Val | Valin |
| I | Ile | Isoleucin | W | Trp | Tryptophan |
| K | Lys | Lysin | Y | Tyr | Tyrosin |
| L | Leu | Leucin | X | alle AS außer P | |
| M | Met | Methionin | | | |

8 Literaturverzeichnis

- Abel T, Zukin RS. 2008. Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 8:57-64.
- Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A. 2004. Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42:947-959.
- Alzheimer A. 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. . *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64:46-48.
- Annaert W, De Strooper B. 2002. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:25-51.
- Arispe N, Diaz JC, Simakova O. 2007. Abeta ion channels. Prospects for treating Alzheimer's disease with Abeta channel blockers. *Biochim Biophys Acta* 1768:1952-1965.
- Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG. 2002. Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110:55-67.
- Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK. 2011. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid beta-peptide interacting domain (AbetaID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene*.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10037-10041.
- Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H. 2005. Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95:834-847.
- Barucker C. 2008. Physiologische und pathophysiologische Funktion von Amyloid beta (A β) in neuronalen Zellen. Diplomarbeit.
- Bate C, Williams A. 2011. Amyloid- (beta) -induced synapse damage is mediated via cross-linkage of the cellular prion protein. *J Biol Chem*.
- Bauer C, Pardossi-Piquard R, Dunys J, Roy M, Checler F. 2011. gamma-Secretase-Mediated Regulation of Neprilysin: Influence of Cell Density and Aging and Modulation by Imatinib. *J Alzheimers Dis*.

- Beher D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G. 1996. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem* 271:1613-1620.
- Bramham CR, Worley PF, Moore MJ, Guzowski JF. 2008. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:11760-11767.
- Breen KC, Bruce M, Anderton BH. 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J Neurosci Res* 28:90-100.
- Buggia-Prevot V, Sevalle J, Rossner S, Checler F. 2008. NFkappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by A β 42. *J Biol Chem* 283:10037-10047.
- Buoso E, Lanni C, Schettini G, Govoni S, Racchi M. 2010. beta-Amyloid precursor protein metabolism: focus on the functions and degradation of its intracellular domain. *Pharmacol Res* 62:308-317.
- Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, Pollwein P, Beyreuther K, Masters CL. 1993. A novel zinc (II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 268:16109-16112.
- Cao X, Sudhof TC. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120.
- Cao X, Sudhof TC. 2004a. Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *The Journal of biological chemistry* 279:24601-24611.
- Cao X, Sudhof TC. 2004b. Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279:24601-24611.
- Capetillo-Zarate E, Gracia L, Yu F, Banfelder JR, Lin MT, Tampellini D, Gouras GK. 2011. High-Resolution 3D Reconstruction Reveals Intra-Synaptic Amyloid Fibrils. *Am J Pathol*.
- Chen G, Zou X, Watanabe H, van Deursen JM, Shen J. 2010. CREB binding protein is required for both short-term and long-term memory formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:13066-13077.
- Chen JX, Yan SD. 2007. Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *J Alzheimers Dis* 12:177-184.
- Chen M, Yankner BA. 1991. An antibody to beta amyloid and the amyloid precursor protein inhibits cell-substratum adhesion in many mammalian cell types. *Neurosci Lett* 125:223-226.
- Christensen KJ, Multhaup KS, Nordstrom S, Voss K. 1990. Cognitive test profile analysis for the identification of dementia of the Alzheimer type. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 4:96-109.

- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.
- Cubbage ML, Suwanichkul A, Powell DR. 1990. Insulin-like growth factor binding protein-3. Organization of the human chromosomal gene and demonstration of promoter activity. *J Biol Chem* 265:12642-12649.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL. 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282:11590-11601.
- De Strooper B, Annaert W. 2000. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113 (Pt 11) :1857-1870.
- Deli MA, Abraham CS, Kataoka Y, Niwa M. 2005. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 25:59-127.
- Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG. 2005. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* 280:17294-17300.
- Di Fede G, Catania M, Morbin M, Rossi G, Suardi S, Mazzoleni G, Merlin M, Giovagnoli AR, Prioni S, Erbetta A, Falcone C, Gobbi M, Colombo L, Bastone A, Beeg M, Manzoni C, Francescucci B, Spagnoli A, Cantu L, Del Favero E, Levy E, Salmona M, Tagliavini F. 2009. A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science* 323:1473-1477.
- Dong JT, Rinker-Schaeffer CW, Ichikawa T, Barrett JC, Isaacs JT. 1996. Prostate cancer--biology of metastasis and its clinical implications. *World J Urol* 14:182-189.
- Dovey HF, Suomensari-Chrysler S, Lieberburg I, Sinha S, Keim PS. 1993. Cells with a familial Alzheimer's disease mutation produce authentic beta-peptide. *Neuroreport* 4:1039-1042.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. 2003. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5:486-488.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248:1122-1124.
- Fang G, Yu H, Kirschner MW. 1998. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* 2:163-171.

- Ferrer I, Boada Rovira M, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F. 2004. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 14:11-20.
- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP. 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67:1882-1896.
- Giliberto L, Borghi R, Piccini A, Mangerini R, Sorbi S, Cirmena G, Garuti A, Ghetti B, Tagliavini F, Mughal MR, Mattson MP, Zhu X, Wang X, Guglielmotto M, Tamagno E, Tabaton M. 2009. Mutant presenilin 1 increases the expression and activity of BACE1. *J Biol Chem* 284:9027-9038.
- Glennner GG, Wong CW. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
- Goedert M, Spillantini MG. 2000. Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502:110-121.
- Goedert M, Spillantini MG. 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-781.
- Golde TE, Kukar TL. 2009. Medicine. Avoiding unintended toxicity. *Science* 324:603-604.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. 1987. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235:877-880.
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR. 2000. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol* 156:15-20.
- Grimm MO, Grimm HS, Hartmann T. 2007. Amyloid beta as a regulator of lipid homeostasis. *Trends Mol Med* 13:337-344.
- Grimm MO, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C. 2008. Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem* 283:11302-11311.
- Guglielmotto M, Monteleone D, Giliberto L, Fornaro M, Borghi R, Tamagno E, Tabaton M. 2011. Amyloid-beta42 Activates the Expression of BACE1 Through the JNK Pathway. *J Alzheimers Dis*.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ. 1993. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268:3021-3024.
- Harmeier. 2008. Dissertation: Aggregation, Struktur und pathologische Wirkung des Amyloid- β Peptides: die Rolle des GxxxG-Motivs.

- Harmeier A, Barucker C, Gensler M, Rost BR, Zhuang W, Beyermann M, Hildebrand PW, Schmitz D, Lurz R, Rabe JP, Multhaup G. 2011. Aggregation of A β 42 is strongly influenced by the GxxxG motif and an inhibitor peptide which mimics Gly 33 substitution. Manuscript in preparation.
- Harmeier A, Wozny C, Rost BR, Munter L-M, Hua H, Georgiev O, Beyermann M, Hildebrand PW, Weise C, Schaffner W, Schmitz D, Multhaup G. 2009. Role of amyloid-beta glycine 33 in oligomerization, toxicity, and neuronal plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:7582-7590.
- Herz J, Chen Y. 2006. Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 7:850-859.
- Heurtaux T, Michelucci A, Losciuto S, Gallotti C, Felten P, Dorban G, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. 2010. Microglial activation depends on beta-amyloid conformation: role of the formylpeptide receptor 2. *J Neurochem* 114:576-586.
- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. 2008. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:8354-8360.
- Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Malenka RC, Nicoll RA, Mucke L. 1999. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3228-3233.
- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R. 2006. AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. *Neuron* 52:831-843.
- Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schroder J, Zerfass R, Forstl H, Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. 1996a. Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* 271:22908-22914.
- Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schroder J, Zerfass R, Forstl H, Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K. 1996b. Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *The Journal of biological chemistry* 271:22908-22914.
- Ida N, Masters CL, Beyreuther K. 1996c. Rapid cellular uptake of Alzheimer amyloid betaA4 peptide by cultured human neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 394:174-178.
- Ingram WJ, McCue KI, Tran TH, Hallahan AR, Wainwright BJ. 2008. Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. *Oncogene* 27:1489-1500.

- Iwata A, Nagashima Y, Matsumoto L, Suzuki T, Yamanaka T, Date H, Deoka K, Nukina N, Tsuji S. 2009. Intranuclear degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* 284:9796-9803.
- Jang H, Arce FT, Ramachandran S, Capone R, Lal R, Nussinov R. 2010. beta-Barrel topology of Alzheimer's beta-amyloid ion channels. *J Mol Biol* 404:917-934.
- Jang H, Zheng J, Lal R, Nussinov R. 2008. New structures help the modeling of toxic amyloidbeta ion channels. *Trends Biochem Sci* 33:91-100.
- Jang H, Zheng J, Nussinov R. 2007. Models of beta-amyloid ion channels in the membrane suggest that channel formation in the bilayer is a dynamic process. *Biophys J* 93:1938-1949.
- Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL, Richardson JC, Smith JD, Comery TA, Riddell D, Holtzman DM, Tontonoz P, Landreth GE. 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58:681-693.
- Ju TC, Chen HM, Lin JT, Chang CP, Chang WC, Kang JJ, Sun CP, Tao MH, Tu PH, Chang C, Dickson DW, Chern Y. 2011. Nuclear translocation of AMPK-alpha1 potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Cell Biol* 194:209-227.
- Kaden D, Munter LM, Joshi M, Treiber C, Weise C, Bethge T, Voigt P, Schaefer M, Beyermann M, Reif B, Multhaup G. 2008. Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. *J Biol Chem* 283:7271-7279.
- Kaden D, Munter LM, Reif B, Multhaup G. 2011. The amyloid precursor protein and its homologues: Structural and functional aspects of native and pathogenic oligomerization. *Eur J Cell Biol*.
- Kaden D, Voigt P, Munter LM, Bobowski KD, Schaefer M, Multhaup G. 2009. Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2. *J Cell Sci* 122:368-377.
- Kadesch T. 1993. Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ* 4:49-55.
- Kadmas JL, Beckerle MC. 2004. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:920-931.
- Kandimalla KK, Scott OG, Fulzele S, Davidson MW, Poduslo JF. 2009. Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein. *PLoS One* 4:e4627.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736.

- Kang J, Muller-Hill B. 1990. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4 (695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 166:1192-1200.
- Khachaturian ZS. 1989. Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Ann N Y Acad Sci* 568:1-4.
- Kim J, Basak JM, Holtzman DM. 2009. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63:287-303.
- Kim JH, Kim B, Cai L, Choi HJ, Ohgi KA, Tran C, Chen C, Chung CH, Huber O, Rose DW, Sawyers CL, Rosenfeld MG, Baek SH. 2005. Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes. *Nature* 434:921-926.
- Kim SY, Kim MY, Mo JS, Park HS. 2007. Notch1 intracellular domain suppresses APP intracellular domain-Tip60-Fe65 complex mediated signaling through physical interaction. *Biochim Biophys Acta* 1773:736-746.
- Knauer MF, Soreghan B, Burdick D, Kosmoski J, Glabe CG. 1992. Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7437-7441.
- Koistinaho M, Lin S, Wu X, Esterman M, Koger D, Hanson J, Higgs R, Liu F, Malkani S, Bales KR, Paul SM. 2004. Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med* 10:719-726.
- Koo EH, Squazzo SL, Selkoe DJ, Koo CH. 1996. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci* 109 (Pt 5) :991-998.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M. 2004. CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42:961-972.
- Kubota H, Kitamura A, Nagata K. 2011. Analyzing the aggregation of polyglutamine-expansion proteins and its modulation by molecular chaperones. *Methods* 53:267-274.
- Kuo YC, Lu CH. 2011. Effect of human astrocytes on the characteristics of human brain-microvascular endothelial cells in the blood-brain barrier. *Colloids Surf B Biointerfaces* 86:225-231.
- LaFerla FM. 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 3:862-872.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927.

- LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT, Wolfe MS, Selkoe DJ. 2003. Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem* 278:37213-37222.
- LeBlanc AC, Chen HY, Autilio-Gambetti L, Gambetti P. 1991. Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures. *FEBS Lett* 292:171-178.
- Lee CY, Landreth GE. 2010. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* 117:949-960.
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. 2004. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279:40545-40559.
- Levine H, 3rd. 1995. Soluble multimeric Alzheimer beta (1-40) pre-amyloid complexes in dilute solution. *Neurobiol Aging* 16:755-764.
- Li JY, Shen XJ, Deng H. 2011. [Involvement of LMO4 in tumorigenesis associated epithelial-mesenchymal transition]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 40:107-111.
- Lin H, Zhu YJ, Lal R. 1999. Amyloid beta protein (1-40) forms calcium-permeable, Zn²⁺-sensitive channel in reconstituted lipid vesicles. *Biochemistry* 38:11189-11196.
- Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, Herz J, Muglia L, Bu G. 2007. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56:66-78.
- Liu W, Crocker E, Zhang W, Elliott JI, Luy B, Li H, Aimoto S, Smith SO. 2005. Structural role of glycine in amyloid fibrils formed from transmembrane alpha-helices. *Biochemistry* 44:3591-3597.
- Luhrs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, Dobeli H, Schubert D, Riek R. 2005. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta (1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17342-17347.
- Maloney B, Lahiri DK. 2011. The Alzheimer's amyloid beta-peptide (Aβ) binds a specific DNA Aβ-interacting domain (AβID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: Characterizing a new regulatory motif. *Gene*.
- Mannioui A, Schiffer C, Felix N, Nelson E, Brussel A, Sonigo P, Gluckman JC, Canque B. 2004. Cell cycle regulation of human immunodeficiency virus type 1 integration in T cells: antagonistic effects of nuclear envelope breakdown and chromatin condensation. *Virology* 329:77-88.
- Marquer C, Devauges V, Cossec JC, Liot G, Lecart S, Saudou F, Duyckaerts C, Leveque-Fort S, Potier MC. 2011. Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J* 25:1295-1305.

- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. 1985. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249.
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31-46.
- Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. 2009. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol* 210:3-12.
- Michikawa M. 2004. Neurodegenerative disorders and cholesterol. *Curr Alzheimer Res* 1:271-275.
- Millucci L, Ghezzi L, Bernardini G, Santucci A. 2010. Conformations and biological activities of amyloid beta peptide 25-35. *Curr Protein Pept Sci* 11:54-67.
- Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguch H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA. 2002. Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid* 9:88-102.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L. 2000. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:4050-4058.
- Multhaup G. 1994. Identification and regulation of the high affinity binding site of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor (APP) to glycosaminoglycans. *Biochimie* 76:304-311.
- Multhaup G, Schlicksupp A, Hesse L, Behr D, Ruppert T, Masters CL, Beyreuther K. 1996. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (II) to copper (I). *Science* 271:1406-1409.
- Munter LM, Voigt P, Harmeier A, Kaden D, Gottschalk KE, Weise C, Pipkorn R, Schaefer M, Langosch D, Multhaup G. 2007. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *EMBO J* 26:1702-1712.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, et al. 1989. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
- Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M. 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 54:253-263.

- Narasingappa RB, Prahalad RK, Mannar SS, Sathyanarayana RT, Hanumanthappa BK, Jagannatha RK. 2010. Molecular studies on Abeta (42) induced genomic instability in aged rabbit brain. *Neurochem Int* 56:655-662.
- Narita M, Holtzman DM, Schwartz AL, Bu G. 1997. Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J Neurochem* 69:1904-1911.
- Naslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J, Gandy SE, Winblad B, Greengard P, et al. 1994. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8378-8382.
- Nygaard HB, Strittmatter SM. 2009. Cellular prion protein mediates the toxicity of beta-amyloid oligomers: implications for Alzheimer disease. *Arch Neurol* 66:1325-1328.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Oddo S, Caccamo A, Smith IF, Green KN, LaFerla FM. 2006. A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of Abeta. *Am J Pathol* 168:184-194.
- Ohyagi Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, Yamada T, Kikuchi H, Taniwaki T, Murai H, Ikezoe K, Furuya H, Kawarabayashi T, Shoji M, Checler F, Iwaki T, Makifuchi T, Takeda K, Kira J, Tabira T. 2005. Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 19:255-257.
- Ondrejčák T, Klyubin I, Hu NW, Barry AE, Cullen WK, Rowan MJ. 2010. Alzheimer's disease amyloid beta-protein and synaptic function. *Neuromolecular Med* 12:13-26.
- Ono K, Yamada M. 2011. Low-n oligomers as therapeutic targets of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 117:19-28.
- Palacios HH, Yendluri BB, Parvathaneni K, Shadlinski VB, Obrenovich ME, Leszek J, Gokhman D, Gasiorowski K, Bragin V, Aliev G. 2011. Mitochondrion-specific antioxidants as drug treatments for Alzheimer disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:149-162.
- Palop JJ, Mucke L, Roberson ED. 2011. Quantifying biomarkers of cognitive dysfunction and neuronal network hyperexcitability in mouse models of Alzheimer's disease: depletion of calcium-dependent proteins and inhibitory hippocampal remodeling. *Methods Mol Biol* 670:245-262.

- Pan XD, Chen XC, Zhu YG, Chen LM, Zhang J, Huang TW, Ye QY, Huang HP. 2009. Tripchlorolide protects neuronal cells from microglia-mediated beta-amyloid neurotoxicity through inhibiting NF-kappaB and JNK signaling. *Glia* 57:1227-1238.
- Pan XD, Zhu YG, Lin N, Zhang J, Ye QY, Huang HP, Chen XC. 2011. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6:45.
- Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Muller U, St George Hyslop P, Checler F. 2005. Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46:541-554.
- Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis-Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A. 2010. Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* 328:753-756.
- Perk J, Iavarone A, Benezra R. 2005. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 5:603-614.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M. 2002. Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. *Science* 298:1379.
- Podlisny MB, Ostaszewski BL, Squazzo SL, Koo EH, Rydell RE, Teplow DB, Selkoe DJ. 1995. Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J Biol Chem* 270:9564-9570.
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. 1993. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342:697-699.
- Portelius E, Bogdanovic N, Gustavsson MK, Volkman I, Brinkmalm G, Zetterberg H, Winblad B, Blennow K. 2010. Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 120:185-193.
- Pul R, Dodel R, Stangel M. 2011. Antibody-based therapy in Alzheimer's disease. *Expert Opin Biol Ther* 11:343-357.
- Puzzo D, Arancio O. 2006. Fibrillar beta-amyloid impairs the late phase of long term potentiation. *Curr Alzheimer Res* 3:179-183.
- Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotsu N, Horikoshi Y, Kametani F, Maeda M, Saido TC, Wang R, Ihara Y. 2005. Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-

- secretase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:436-445.
- Qiang L, Fujita R, Yamashita T, Angulo S, Rhinn H, Rhee D, Doege C, Chau L, Aubry L, Vanti WB, Moreno H, Abeliovich A. 2011. Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell* 146:359-371.
- Racke MM, Boone LI, Hepburn DL, Parsadainian M, Bryan MT, Ness DK, Piroozi KS, Jordan WH, Brown DD, Hoffman WP, Holtzman DM, Bales KR, Gitter BD, May PC, Paul SM, DeMattos RB. 2005. Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:629-636.
- Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jaggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Holscher C, Mathews PM, Jucker M. 2006. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7:940-946.
- Rangachari V, Reed DK, Moore BD, Rosenberry TL. 2006. Secondary structure and interfacial aggregation of amyloid-beta (1-40) on sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 45:8639-8648.
- Reed MN, Hofmeister JJ, Jungbauer L, Welzel AT, Yu C, Sherman MA, Lesne S, Ladu MJ, Walsh DM, Ashe KH, Cleary JP. 2011. Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived Abeta oligomers. *Neurobiol Aging* 32:1784-1794.
- Resenberger UK, Harmeier A, Woerner AC, Goodman JL, Muller V, Krishnan R, Vabulas RM, Kretschmar HA, Lindquist S, Hartl FU, Multhaup G, Winklhofer KF, Tatzelt J. 2011. The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *EMBO J* 30:2057-2070.
- Richter L, Munter LM, Ness J, Hildebrand PW, Dasari M, Unterreitmeier S, Bulic B, Beyermann M, Gust R, Reif B, Weggen S, Langosch D, Multhaup G. 2010. Amyloid beta 42 peptide (Abeta42) -lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14597-14602.
- Robakis NK, Wisniewski HM, Jenkins EC, Devine-Gage EA, Houck GE, Yao XL, Ramakrishna N, Wolfe G, Silverman WP, Brown WT. 1987. Chromosome 21q21 sublocalisation of gene encoding beta-amyloid peptide in cerebral vessels and neuritic (senile) plaques of people with Alzheimer disease and Down syndrome. *Lancet* 1:384-385.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, et al. 1995. Familial Alzheimer's disease in kindreds with

- missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775-778.
- Roher AE, Chaney MO, Kuo YM, Webster SD, Stine WB, Haverkamp LJ, Woods AS, Cotter RJ, Tuohy JM, Krafft GA, Bonnell BS, Emmerling MR. 1996. Morphology and toxicity of A β - (1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 271:20631-20635.
- Rowe CC, Villemagne VL. 2011. Brain Amyloid Imaging. *J Nucl Med*.
- Ryan KA, Pimplikar SW. 2005. Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J Cell Biol* 171:327-335.
- Saavedra L, Mohamed A, Ma V, Kar S, de Chaves EP. 2007. Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E. *J Biol Chem* 282:35722-35732.
- Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Sleegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC. 2011. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat Neurosci* 14:1023-1032.
- Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sananbenesi F, Fischer A. 2009. The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases. *Biol Chem* 390:1145-1153.
- Sandberg A, Luheshi LM, Sollvander S, Pereira de Barros T, Macao B, Knowles TP, Biverstal H, Lendel C, Ekholm-Petterson F, Dubnovitsky A, Lannfelt L, Dobson CM, Hard T. 2010. Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid-beta oligomers by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15595-15600.
- Sanner MF, Olson AJ, Spohner JC. 1996. Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers* 38:305-320.
- Sato T, Kienlen-Campard P, Ahmed M, Liu W, Li H, Elliott JI, Aimoto S, Constantinescu SN, Octave JN, Smith SO. 2006. Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of A β 40 and A β 42. *Biochemistry* 45:5503-5516.
- Schagger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
- Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G. 2001. Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:33923-33929.

- Schmechel A, Zentgraf H, Scheuermann S, Fritz G, Pipkorn R, Reed J, Beyreuther K, Bayer TA, Multhaup G. 2003. Alzheimer beta-amyloid homodimers facilitate A beta fibrillization and the generation of conformational antibodies. *J Biol Chem* 278:35317-35324.
- Selkoe DJ. 2004. Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann Intern Med* 140:627-638.
- Selkoe DJ. 2008. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192:106-113.
- Senes A, Engel DE, DeGrado WF. 2004. Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* 14:465-479.
- Senes A, Ubarretxena-Belandia I, Engelman DM. 2001. The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9056-9061.
- Shah S, Federoff HJ. 2011. Therapeutic potential of vaccines for Alzheimer's disease. *Immunotherapy* 3:287-298.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-842.
- Shie FS, LeBoeuf RC, Jin LW. 2003. Early intraneuronal Abeta deposition in the hippocampus of APP transgenic mice. *Neuroreport* 14:123-129.
- Shioi J, Pangalos MN, Ripellino JA, Vassilacopoulou D, Mytilineou C, Margolis RU, Robakis NK. 1995. The Alzheimer amyloid precursor proteoglycan (appican) is present in brain and is produced by astrocytes but not by neurons in primary neural cultures. *J Biol Chem* 270:11839-11844.
- Shoulson I, Young AB. 2011. Milestones in huntington disease. *Mov Disord* 26:1127-1133.
- Siemes C, Quast T, Kummer C, Wehner S, Kirfel G, Muller U, Herzog V. 2006. Keratinocytes from APP/APLP2-deficient mice are impaired in proliferation, adhesion and migration in vitro. *Exp Cell Res* 312:1939-1949.
- Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS, Brigham EF, Wright S, Lieberburg I, Becker GW, Brems DN, et al. 1994. Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 45:373-379.
- Small DH, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters CL. 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:2117-2127.

- Smith P, Al Hashimi A, Girard J, Delay C, Hebert SS. 2011. In vivo regulation of amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs. *J Neurochem* 116:240-247.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Smith SO, Jonas R, Braiman M, Bormann BJ. 1994. Structure and orientation of the transmembrane domain of glycophorin A in lipid bilayers. *Biochemistry* 33:6334-6341.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P. 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8:1051-1058.
- St George-Hyslop PH. 2000. Genetic factors in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 924:1-7.
- Stante M, Minopoli G, Passaro F, Raia M, Vecchio LD, Russo T. 2009. Fe65 is required for Tip60-directed histone H4 acetylation at DNA strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5093-5098.
- Stephan A, Laroche S, Davis S. 2001. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:5703-5714.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45.
- Struhl G, Adachi A. 2000. Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell* 6:625-636.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG. 1994. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336-1340.
- Szumiel I, Foray N. 2011. Chromatin acetylation, beta-amyloid precursor protein and its binding partner FE65 in DNA double strand break repair. *Acta Biochim Pol* 58:11-18.
- Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y. 2009. gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:13042-13052.
- Tampellini D, Gouras GK. 2010. Synapses, synaptic activity and intraneuronal Abeta in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2.
- Tampellini D, Rahman N, Gallo EF, Huang Z, Dumont M, Capetillo-Zarate E, Ma T, Zheng R, Lu B, Nanus DM, Lin MT, Gouras GK. 2009. Synaptic activity reduces intraneuronal Abeta, promotes APP transport to synapses, and protects against Abeta-related

- synaptic alterations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:9704-9713.
- Tang K, Wang C, Shen C, Sheng S, Ravid R, Jing N. 2003. Identification of a novel alternative splicing isoform of human amyloid precursor protein gene, APP639. *Eur J Neurosci* 18:102-108.
- Tanzi RE, Bertram L. 2001. New frontiers in Alzheimer's disease genetics. *Neuron* 32:181-184.
- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF, Neve RL. 1988. Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature* 331:528-530.
- Telese F, Bruni P, Donizetti A, Gianni D, D'Ambrosio C, Scaloni A, Zambrano N, Rosenfeld MG, Russo T. 2005. Transcription regulation by the adaptor protein Fe65 and the nucleosome assembly factor SET. *EMBO Rep* 6:77-82.
- Terwel D, Steffensen KR, Verghese PB, Kummer MP, Gustafsson JA, Holtzman DM, Heneka MT. 2011. Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor-alpha expression for microglial Abeta phagocytosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:7049-7059.
- Thinakaran G, Koo EH. 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615-29619.
- Thinakaran G, Regard JB, Bouton CM, Harris CL, Price DL, Borchelt DR, Sisodia SS. 1998. Stable association of presenilin derivatives and absence of presenilin interactions with APP. *Neurobiol Dis* 4:438-453.
- Treiber C, Simons A, Strauss M, Hafner M, Cappai R, Bayer TA, Multhaup G. 2004. Cloquinol mediates copper uptake and counteracts copper efflux activities of the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279:51958-51964.
- Twigg SM, Baxter RC. 1998. Insulin-like growth factor (IGF) -binding protein 5 forms an alternative ternary complex with IGFs and the acid-labile subunit. *J Biol Chem* 273:6074-6079.
- Valor LM, Pulpulos MM, Jimenez-Minchan M, Olivares R, Lutz B, Barco A. 2011. Ablation of CBP in forebrain principal neurons causes modest memory and transcriptional defects and a dramatic reduction of histone acetylation but does not affect cell viability. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:1652-1663.
- Van Broeckhoven CL. 1989. Molecular genetic analysis of early onset familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 10:437-438; discussion 446-438.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA,

- Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
- Vigo-Pelfrey C, Lee D, Keim P, Lieberburg I, Schenk DB. 1993. Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 61:1965-1968.
- von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U. 2004. The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117:4435-4448.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
- Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH. 2001. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414:212-216.
- Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, Pietrzik CU, Ozols V, Fauq A, Golde TE, Koo EH. 2003. Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity. *J Biol Chem* 278:31831-31837.
- Weidemann A, Eggert S, Reinhard FB, Vogel M, Paliga K, Baier G, Masters CL, Beyreuther K, Evin G. 2002. A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41:2825-2835.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57:115-126.
- Welander H, Franberg J, Graff C, Sundstrom E, Winblad B, Tjernberg LO. 2009. Abeta43 is more frequent than Abeta40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J Neurochem* 110:697-706.
- Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D. 2004. Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflammation* 1:24.
- Wiltfang J, Esselmann H, Cupers P, Neumann M, Kretschmar H, Beyermann M, Schleuder D, Jahn H, Ruther E, Kornhuber J, Annaert W, De Strooper B, Saftig P. 2001. Elevation of beta-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *J Biol Chem* 276:42645-42657.

- Winter S, Fischle W. 2010. Epigenetic markers and their cross-talk. *Essays Biochem* 48:45-61.
- Wirhns O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA. 2001. Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 306:116-120.
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, Sue LI, Wolfe J, Xu H, Stanimirovic DB, Zhang W. 2008. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29:422-437.
- Xu Y, Shen J, Luo X, Zhu W, Chen K, Ma J, Jiang H. 2005. Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5403-5407.
- Yamin G. 2009. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *J Neurosci Res* 87:1729-1736.
- Yang AJ, Chandswangbhuvana D, Shu T, Henschen A, Glabe CG. 1999. Intracellular accumulation of insoluble, newly synthesized abeta-42 in amyloid precursor protein-transfected cells that have been treated with Abeta1-42. *J Biol Chem* 274:20650-20656.
- Younkin SG. 1998. The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 92:289-292.
- Zanotti S, Canalis E. 2010. Notch and the skeleton. *Mol Cell Biol* 30:886-896.
- Zettl H, Weggen S, Schneider P, Schneider G. 2010. Exploring the chemical space of gamma-secretase modulators. *Trends Pharmacol Sci* 31:402-410.
- Zhao G, Cui MZ, Mao G, Dong Y, Tan J, Sun L, Xu X. 2005. gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain. *J Biol Chem* 280:37689-37697.
- Zhao G, Mao G, Tan J, Dong Y, Cui MZ, Kim SH, Xu X. 2004. Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 279:50647-50650.
- Zhou L, Brouwers N, Benilova I, Vandersteen A, Mercken M, Van Laere K, Van Damme P, Demedts D, Van Leuven F, Sleegers K, Broersen K, Van Broeckhoven C, Vandenberghe R, De Strooper B. 2011. Amyloid precursor protein mutation E682K at the alternative beta-secretase cleavage beta'-site increases Abeta generation. *EMBO Mol Med* 3:291-302.
- Zlokovic BV. 2008. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178-201.

9 Anhang

9.1 Veröffentlichungen

Eingereichte Artikel:

T. Bethge, S. Scolari, P. W. Hildebrand, H. Bittner, H. Sieg, **C. Barucker**, A. Harmeier, D. Kaden, L.M. Munter, U. Abram, A. Herrmann, G. Multhaup. „BACE1 oligomers are stabilized through the transmembrane sequence“

Artikel in Vorbereitung:

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, B. Fauler, K. F. Albring, S. Prokopp, F.L. Heppner, R. Lurz, O. Huber, G. Multhaup, „A novel function of A β in gene regulation as an alternative pathway of toxicity“

A. Harmeier, **C. Barucker**, M. Gensler, B. R. Rost, W. Zhuang, M. Beyermann, P. W. Hildebrand, D. Schmitz, R. Lurz, J. P. Rabe, G. Multhaup. „Aggregation of A β 42 is strongly influenced by the GxxxG motif and an inhibitor peptide which mimics Gly 33 substitution“

Tagungen & Konferenzen

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, B. Fauler, K. F. Albring, S. Prokopp, F.L. Heppner, R. Lurz, O. Huber, G. Multhaup; „Neurotoxic A β 42 peptides of Alzheimer’s Disease are found in the nucleus and influence gene regulation“

7th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology: Regulated Intramembrane Proteolysis in Cancer Development and Neurodegenerative Diseases
Potsdam, 05.10.-07.10.2011, orale Präsentation

P. Dembny, **C. Barucker**, G. Multhaup; „A small aggregation inhibitor arrests A β 42 aggregation at low –n oligomeres and neutralizes neurotoxicity“

7th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology: Regulated Intramembrane Proteolysis in Cancer Development and Neurodegenerative Diseases
Potsdam, 05.10.-07.10.2011, Poster Präsentation

C. Schaefer, C. Barucker, G. Multhaup; „Amyloid β in the Parallel Artificial Membrane Assay (PAMPA)”

The McGill University Integrated Program in Neuroscience Retreat, Montreal, Canada, 20.-21.09.2011, Poster Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, B. Fauler, K. F. Albring, S. Prokopp, F.L. Heppner, R. Lurz, O. Huber, G. Multhaup; „Neurotoxic A β 42 peptides of Alzheimer’s Disease are found in the nucleus and influence gene regulation”

The McGill University Integrated Program in Neuroscience Retreat, Montreal, Canada, 20.-21.09.2011, Poster Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, M. Gensler, B. R. Rost, W. Zhuang, M. Beyermann, P. W. Hildebrand, D. Schmitz, R. Lurz, J. P. Rabe, G. Multhaup; „Aggregation of A β 42 is strongly influenced by Gly33 of the GxxxG motif and an inhibitor peptide which mimics Gly33 substitutions”

14th international conference on Alzheimer’s Disease, Paris, Frankreich, 16.-21.07.2011, Poster Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, K. F. Albring, B. Fauler, R. Lurz, O. Huber, G. Multhaup; „A novel function of A β in gene regulation as an alternative pathway of toxicity”

10th international conference on Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease, Barcelona, Spanien, 09.-13.03. 2011, orale Präsentation

C. Barucker, G. Multhaup; Neurodegenerative Diseases – Alzheimer’s research - new approaches for diagnosis and therapy

Wissenschaft bei Humboldt’s, Humboldt-Gymnasium Potsdam, Deutschland, 10.02.2011, orale Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, K. F. Albring, B. Fauler, R. Lurz, O. Huber, G. Multhaup; „Alzheimer’s disease and gene regulation: A possible role of A β in the nucleus”

Berlin Brain Days 01.-03.11.2010, Berlin, Germany, Poster Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, K. F. Albring, B. Fauler, R. Lurz, O. Huber, G. Multhaup; „Alzheimer’s disease and gene regulation: A possible role of A β in the nucleus”

13th international conference on Alzheimer’s Disease, Honolulu, USA, 10.-15.07.2010, Poster Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, J. Doersing, K. Albring, O. Huber, G. Multhaup; „Toxicity of the amyloid A β peptide: a possible role in the nucleus”
9th Eibsee Meeting "CELLULAR MECHANISMS OF ALZHEIMER'S DISEASE", Grainau, Deutschland, 11.–14.11.2009, Poster Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, J. Doersing, K. Albring, O. Huber, G. Multhaup; „The β -amyloid peptide (A β) in processes of learning and memory: a possible role in the nucleus”
Berlin Brain Days 9.-11.12.2009, Berlin, Deutschland, orale Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, J. Doersing, K. Albring, O. Huber, G. Multhaup; „The β -amyloid peptide (A β) in processes of learning and memory: a possible role in the nucleus”
6th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology Enzymes in physiology and pathogenesis: Signaling by Secretases. Berlin, Deutschland, 24.-26. 09.2009
Poster Präsentation

C. Barucker, A. Harmeier, J. Weiske, J. Doersing, K. Albring, O. Huber, G. Multhaup; „The β -amyloid peptide (A β) in processes of learning and memory: a possible role in the nucleus”
GRK1123 Fall Symposium, Berlin, Deutschland, 11.-12.09.2009, orale Präsentation

9.2 Lebenslauf

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten**

9.3 Danksagung

Mit der Fertigstellung der Dissertationsschrift ist es an der Zeit denjenigen zu danken, die mich begleitet und unterstützt haben. Mein erster großer Dank gebührt Prof. Dr. Gerd Multhaupt, der mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe an diesem sehr spannenden Projekt zu forschen. Die permanente konstruktive Diskussionsbereitschaft, die Freiheit in der Forschung – all das habe ich sehr genossen.

Prof. Dr. Otmar Huber danke ich nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens. Die Kooperation mit seinem Labor hat diesem Projekt aufgrund des Einsatzes von Dr. Jörg Weiske zu den ChIP Daten verholfen. Vielen Dank! Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei Dr. Kai Albring bedanken, der mir beim Umgang mit dem LSM stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meiner ehemaligen Kollegin Dr. Anja Harmeier, die schon meine Diplomarbeit betreut hat, danke ich ganz besonders herzlich für die anfängliche Betreuung dieser Arbeit, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur beim Auf- und Abbau von „little Manhattan“ und die Freundschaft über die Landesgrenzen hinaus. Auch Dr. Tobias Bethge, ein ehemaliges Mitglied der Arbeitsgruppe, danke ich sehr für die zahlreichen Hilfestellungen bei verschiedensten experimentellen Fragestellungen und den Humor, der das Arbeiten oft erleichtert hat. Dr. Daniela Kaden danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Sowohl ihr als auch Dr. Lisa Münter danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen nützlichen Tipps für den praktischen Laboralltag.

Johanna Dörsing danke ich für ihre Unterstützung an diesem Projekt als studentische Hilfskraft und für unzählige Erklärungen von Illustrator. Auch Paul Dembny danke ich für die Arbeit an diesem Projekt - erst als studentische Hilfskraft und jetzt als Diplomand. Meinem Mitarbeitersstudenten Filip Liebsch danke ich ebenfalls für den experimentellen Einsatz. Andrea Senge danke ich für zahlreiche Einsätze in der Zellkultur, viele Gele und diverse Liter verschiedenster Puffer.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Rudi Lurz und Beatrix Fauler, die mich in die Geheimnisse der Elektronenmikroskopie Einblick gewähren ließen und sich mit unermüdlicher Geduld immer wieder auf neue Experimente eingelassen haben.

Auch möchte ich meinen Kooperationspartnern von Bayer Healthcare, Dr. Anette Sommer, Martina Sperling, Dr. Georg Beckmann und Dr. Damian Brockschnieder danken. Ohne diese Kooperation hätte es die Illuminadaten nicht gegeben.

Meinen anderen Kooperationspartnern Dr. Stefan Prokop aus dem Labor von Prof. Dr. Frank Heppner und Dr. Peter Hildebrand möchte ich auch für die fruchtbare Zusammenarbeit herzlich danken.

Meinen Kollegen Lydia Alnajjar, Veit Althoff, Hermann Bayer, Dr. Anne Botev, Gerd Buchlow, Dr. Vivienne Engelschalt, Susanne Fehse, Sarah Hampe, Magnus Mayer, Luise Richter, Clara Schäfer, Linda Schauenburg, Holger Sieg, Draginia Wagner und Dr. Christoph Weise danke ich für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Dem Graduiertenkolleg GRK1123 „learning and memory“ danke ich für die Finanzierung.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und Klaus für die selbstlose Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Großzügigkeit und unermüdliches Verständnis bedanken.

9.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Berlin, 14.10.2011

Christian Barucker