

# Die Interaktion zwischen dem zellulären Prion-Protein und A $\beta$ -Oligomeren in der Alzheimer-Erkrankung

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und  
Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Frank Dohler  
aus Saarlouis

Hamburg, im April 2014

# DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen Personen bedanken, die mich auf dem Weg meiner Dissertation begleitet, unterstützt und motiviert haben. Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Glatzel, der mit sehr viel Engagement und guten Ideen meine Doktorarbeit unterstützt hat. Ebenso danke ich Prof. Dr. Christian Lohr für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Der gesamten Arbeitsgruppe der Neuropathologie am UKE möchte ich für die schönen Jahre, das tolle Arbeitsklima und die anregenden Diskussionen danken. Meiner Familie danke ich für die jahrelange Unterstützung und Motivation, ohne die es niemals möglich gewesen wäre diesen Weg bis zum Ende zu gehen. Danke, dass es euch gibt! Nicht zu vergessen ein großes Dankeschön an K.H. für die Unterstützung und das Verständnis, das mir entgegengebracht wurde. Danke auch an meine Freunde innerhalb und ausserhalb der Laborwelt. Jeder hat seinen Teil dazu beigetragen, dass ich letztendlich diese Arbeit fertigstellen konnte.

Danke!

**Tag der Disputation:** 27.06.2014

**Erstgutachter:** Prof. Dr. Markus Glatzel

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. Christian Lohr

**Meiner Familie**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Alzheimer Erkrankung</b>	<b>1</b>
1.1.1 Neuropathologie	3
1.1.2 Risikofaktoren	4
<b>1.2 Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Pathologie</b>	<b>5</b>
1.2.1 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins	6
1.2.2 Amyloid- $\beta$	8
1.2.3 Amyloid- $\beta$ und Aggregation	9
1.2.4 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	12
1.2.5 A $\beta$ -vermittelte Toxizitätsmechanismen	13
<b>1.3 PrP<sup>C</sup> und die Alzheimer-Erkrankung</b>	<b>15</b>
1.3.1 Das zelluläre Prion-Protein (PrP <sup>C</sup> )	15
1.3.2 Pathophysiologische Rolle von PrP <sup>C</sup>	17
1.3.3 Physiologische Rolle von PrP <sup>C</sup>	18
1.3.4 Die Verbindung zwischen PrP <sup>C</sup> und der Alzheimer-Erkrankung	19
1.3.5 Molekulare Grundlagen der PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -Interaktion	19
1.3.6 Auswirkungen der PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -Interaktion	20
1.3.7 Signaltransduktion der PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -Interaktion	21
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>24</b>
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	25
2.1.2.1 Chemikalien	25
2.1.2.2 Enzyme	26
2.1.3 Verwendete Kits	27
2.1.4 Weitere Verbrauchsmaterialien	27
2.1.5 Bakterienanzucht	28
2.1.6 Antibiotika und andere Medienzusätze	28
2.1.7 Mikroorganismen	29
2.1.8 Vektorplasmide	29
2.1.9 Oligodesoxynukleotide (Primer)	30

2.1.10	Synthetische Peptide	30
2.1.11	Fluoreszenzfarbstoffe	30
2.1.12	Antikörper	31
2.1.13	Software	31
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>32</b>
2.2.1	Arbeiten mit Bakterienkulturen	32
2.2.1.1	Wachstumsbedingungen für <i>E. coli</i>	32
2.2.1.2	Stammhaltung und Lagerung	32
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	32
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.2.4	Agarosegelelektrophorese	33
2.2.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	35
2.2.5.1	Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.5.2	PCR zur Modifizierung von Gensequenzen	35
2.2.5.3	Aufreinigungen von PCR-Produkten	36
2.2.5.4	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.2.5.5	Transformation von Bakterienzellen	38
2.2.5.6	Restriktionsanalysen von Plasmid-DNA	39
2.2.5.7	Transfer proteincodierender Sequenzabschnitte	40
2.2.5.8	Sequenzierung von Plasmiden	40
2.2.6	Expression der Fusionsproteine	40
2.2.7	Aufschluss von Bakterienzellen durch Ultraschall	42
2.2.8	Arbeit mit humanem Hirngewebe	43
2.2.8.1	Charakterisierung der Patientenkohorte	43
2.2.8.2	Herstellung von Hirnhomogenaten	44
2.2.8.2.1	Präparationen von Hirnhomogenaten für SEC-Experimente	44
2.2.8.3	Immunohistochemie (IHC)	45
2.2.8.4	Polymorphismen	45
2.2.8.5	Co-Immunopräzipitation (Co-IP)	46
2.2.8.6	Amyloid- $\beta$ 40 und Amyloid- $\beta$ 42 ELISA	47
2.2.8.7	PrP <sup>C</sup> -ELISA	47
2.2.9	APIA	47
2.2.9.1	Präparation der synthetischen A $\beta$ 42 (sA $\beta$ 42)-Peptide	47
2.2.9.2	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	48
2.2.9.2.1	Nachweis und Detektion fluoreszenzmarkierter Fusionsproteine	49
2.2.9.3	Dot-Blot-Analysen	49
2.2.9.4	APIA mit immobilisierten rPrP <sup>C</sup>	51
2.2.9.5	SDS-PAGE in 4-12% Bis-Tris Gradientengelen	53
2.2.9.6	Proteintransfer durch Western-Blot	54
2.2.9.7	Detektion der Bandenmuster im Western-Blot	54
2.2.9.8	Quantitative Proteinbestimmung	55
2.2.9.9	Lyophilisierung von Peptid- und Homogenatfraktionen	56
2.2.9.10	Größenausschlusschromatographie (SEC)	56
2.2.9.10.1	SEC mit humanen Proben	57
2.2.9.10.2	SEC mit sA $\beta$ 42	57
2.2.10	Statistik	57

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
<b>3.1.</b>	<b><i>In vivo</i> Nachweis und Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A<math>\beta</math> Interaktion</b>	<b>58</b>
3.1.1	Beschreibung der Patientenkohorte	58
3.1.2	Die PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -Interaktion kann nur bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden	60
3.1.3	Die PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -Interaktion ist eine direkte Funktion der A $\beta$ -Konzentration	62
<b>3.2.</b>	<b>Rekombinante Fusionsproteine bilden die Grundlage zur Bestätigung und Charakterisierung der Interaktion <i>in vitro</i></b>	<b>64</b>
3.2.1	Amplifikation und Modifizierung der huPrP <sup>C</sup> cDNA ist Voraussetzung zur gerichteten Klonierung in das Flexi <sup>®</sup> - Vektorsystem	66
3.2.2	Gerichtete Klonierung in das N-terminale Vektorsystem (pFN18A)	68
3.2.3	Transfer der proteincodierenden Prion-Sequenzen in das C-terminale Vektorsystem	70
3.2.4	Detektierte Fluoreszenz-Signale in der SDS-PAGE bestätigen den Erfolg der Expression	73
3.2.5	Die Verwendung von sA $\beta$ 42-Peptiden in Interaktionsstudien erfordert die spezielle Vorbehandlung des Peptids	74
<b>3.3</b>	<b>APIA bietet verschiedene Möglichkeiten zum Nachweis und zur Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A<math>\beta</math>-Interaktion</b>	<b>76</b>
3.3.1	APIA ermöglicht qualitative und semiquantitative Analysen	76
3.3.2	Qualitative Experimente bestätigen die PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -Interaktion	77
3.3.3	Sondenproteine ermöglichen die semi-quantitative Analyse der Interaktion zwischen PrP <sup>C</sup> und A $\beta$	79
3.3.4	Die detektierten Signale der PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -Interaktion sind spezifisch	79
3.3.5	APIA im Dot-Blot-Format eignet sich nicht zur Analyse von humanen Homogenaten	81
<b>3.4</b>	<b>Nachweis der Interaktion zwischen rPrP<sup>C</sup> und A<math>\beta</math>-Oligomeren via APIA mit immobilisierten Fängerproteinen</b>	<b>82</b>
3.4.1	Funktionelle Überprüfung von APIA mit immobilisierten rPrP <sup>C</sup>	83
3.4.2	Die stärkste Interaktion zwischen rPrP <sup>C</sup> und A $\beta$ ist in P2-Fractionen von Alzheimer-Patienten detektierbar	84
3.4.3	Die rPrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -Interaktion ist spezifisch und kann durch den A11-Antikörper inhibiert werden	86
3.4.4	A $\beta$ liegt in Western-Blot-Analysen der P2-Fractionen von Alzheimer-Patienten hauptsächlich in monomerer Form vor	87

<b>3.5</b>	<b>Identifizierung der bindenden A<math>\beta</math>42-Oligomer Spezies</b>	<b>89</b>
3.5.1	rPrP <sup>C</sup> bindet ausschließlich an sA $\beta$ 42o.	89
3.5.2	Niedermolekulare sA $\beta$ 42-Oligomere binden hurPrP <sup>C</sup>	90
3.5.3	Hochmolekulare A $\beta$ -Aggregate binden rPrP <sup>C</sup> in AD	92
3.5.4	LRP1 und Fyn1 können mit APIA nicht als potentielle <i>scaffold</i> -Protein-Komplexpартner bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden	94
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A<math>\beta</math>-Interaktion in vivo</b>	<b>98</b>
4.1.1	Der Nachweis der Interaktion in vivo	98
4.1.2	Die Interaktion ist eine Funktion der A $\beta$ 42-Konzentration und unabhängig von genetischen Risikofaktoren	100
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A<math>\beta</math>-Interaktion in vitro</b>	<b>102</b>
4.2.1	Klonierungen und Expression im Flexi <sup>®</sup> -Vektorsystem. Probleme und Vorteile.	103
4.2.2	APIA im Dot-Blot Format: Möglichkeiten zur quantitativen und semi-qualitativen Charakterisierung der Interaktion in vitro	104
4.2.3	Unlösliche P2-Fractionen zeigen die stärkste Interaktion in APIA.	106
4.2.4	Die rPrP <sup>C</sup> -A $\beta$ Interaktion ist spezifisch und selektiv	106
4.2.5	Niedermolekulare Aggregate von sA $\beta$ 42o binden rPrP <sup>C</sup>	107
4.2.6	Hochmolekulare A $\beta$ -Aggregate binden rPrP <sup>C</sup> in Alzheimer-Patienten	108
<b>4.3</b>	<b>Relevanz der Ergebnisse</b>	<b>110</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>Anhang</b>		<b>VII</b>
<b>Erklärung an Eides statt</b>		<b>VIII</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b>	Pathologische Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung.	3
<b>Abb. 1.2:</b>	Die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins.	7
<b>Abb. 1.3:</b>	Der $\gamma$ -Sekretase-Komplex.	8
<b>Abb. 1.4:</b>	Strukturmodelle des humanen A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42-Peptids.	10
<b>Abb. 1.5:</b>	Modell der nukleations-abhängigen A $\beta$ -Polymerisation.	11
<b>Abb. 1.6:</b>	Schematische Darstellung des humanen PrP <sup>C</sup> .	16
<b>Abb. 1.7:</b>	Strukturmodelle des PrP <sup>C</sup> und PrP <sup>Sc</sup> .	17
<b>Abb. 1.8:</b>	Modell der PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ -vermittelten Signaltransduktion.	22
<b>Abb. 3.1:</b>	Histologie, Plaque-Belastung und Morphologie der Patientenkohorte.	59
<b>Abb. 3.2:</b>	<i>In vivo</i> Nachweis der PrP <sup>C</sup> -A $\beta$ Interaktion.	61
<b>Abb. 3.3:</b>	Graphische Darstellung der ELISA Ergebnisse.	62
<b>Abb. 3.4:</b>	Graphische Darstellung der A $\beta$ 42-PrP <sup>C</sup> Korrelation.	63
<b>Abb. 3.5:</b>	Schematische Darstellung verwendeter PrP <sup>C</sup> Teilabschnitte.	65
<b>Abb. 3.6:</b>	<i>In silico</i> Restriktionsanalyse huPrP <sup>C</sup> -cDNA (23-230).	66
<b>Abb. 3.7:</b>	Überprüfung der Amplifikation von huPrP <sup>C</sup> Abschnitten.	67
<b>Abb. 3.8:</b>	Aufbau des N-terminalen pFN18A HaloTag <sup>®</sup> T7 Flexi <sup>®</sup> Vektors.	68
<b>Abb. 3.9:</b>	Vektorkarten und Restriktionsanalyse N-terminaler Plasmid-Konstrukte.	69
<b>Abb. 3.10:</b>	Molekulare Grundlagen des Transfers proteincodierender Sequenzen.	70
<b>Abb. 3.11:</b>	Aufbau des C-terminalen pFC20K HaloTag <sup>®</sup> T7 SP6 Flexi <sup>®</sup> -Vektors.	71
<b>Abb. 3.12:</b>	Vektorkarten und Restriktionsanalyse C-terminaler Plasmid-Konstrukte.	72
<b>Abb. 3.13:</b>	Überprüfung der Expression durch Fluoreszenzsignale.	74
<b>Abb. 3.14:</b>	Charakterisierung der sA $\beta$ 42-Oligomer-Präparationen.	75
<b>Abb. 3.15:</b>	Funktionsprinzip von APIA im Versuchsaufbau.	77
<b>Abb. 3.16:</b>	Qualitativer Nachweis der Interaktion via APIA im Dot-Blot-Format.	78
<b>Abb. 3.17:</b>	Semiquantitativer Nachweis der Interaktion durch APIA.	79
<b>Abb. 3.18:</b>	Nachweis der Spezifität detektierter Fluoreszenzsignale.	80
<b>Abb. 3.19:</b>	APIA mit humanen S1-, S2- und P2-Fractionen.	81
<b>Abb. 3.20:</b>	Funktionsprinzip mit immobilisierten rPrP <sup>C</sup> -Fängerproteinen.	82
<b>Abb. 3.21:</b>	Funktionelle Überprüfung des Assays mit immobilisiertem rPrP <sup>C</sup> .	83
<b>Abb. 3.22:</b>	Analyse von S1-, S2- und P2-Fractionen der Kohorte via APIA.	85
<b>Abb. 3.23:</b>	Nachweis der Spezifität detektierter Signale im APIA Bindeassay.	87
<b>Abb. 3.24:</b>	Vergleich der A $\beta$ -Spezies in Gehirnen von Alzheimer- und Kontrollpatienten.	89
<b>Abb. 3.25:</b>	Nachweis der Spezifität der Interaktion zwischen rPrP <sup>C</sup> mit sA $\beta$ 42.	90
<b>Abb. 3.26:</b>	LMWo von sA $\beta$ 42o binden humanes rPrP <sup>C</sup> .	92
<b>Abb. 3.27:</b>	Identifizierung der interagierenden A $\beta$ -Spezies in Alzheimer-Patienten.	94
<b>Abb. 3.28:</b>	Identifizierung potentieller <i>scaffold</i> -Proteine via APIA.	96

<b>Abb. VII.I:</b>	Isolierung humaner PrP <sup>C</sup> -cDNA aus pBK-CMV.	II
<b>Abb. VII.II:</b>	Histologie der Patientenkohorte.	III
<b>Abb. VII.III:</b>	Normierung der sA $\beta$ 42o-Fraktionen im APIA.	VII
<b>Abb. VII.IV:</b>	Einfluss von Einfrier-/ Abtauzyklen auf die Interaktion.	VIII
<b>Abb. VII.V:</b>	Co-Immunopräzipitation mit 3F4 von S2-Fraktionen.	IX

### Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.1:</b>	Übersicht löslicher A $\beta$ -Oligomere.	12
<b>Tab. 2.1:</b>	Verwendete Geräte.	24
<b>Tab. 2.2:</b>	Verwendete Chemikalien.	25
<b>Tab. 2.3:</b>	Verwendete Restriktionsenzyme.	26
<b>Tab. 2.4:</b>	Sonstige Enzyme.	27
<b>Tab. 2.5:</b>	Verwendete Kits.	27
<b>Tab. 2.6:</b>	Weitere Verbrauchsmaterialien.	27
<b>Tab. 2.7:</b>	Antibiotika und sonstige Medienzusätze.	28
<b>Tab. 2.8:</b>	Verwendete Primer.	30
<b>Tab. 2.9:</b>	Verwendete synthetische Peptide.	30
<b>Tab. 2.10:</b>	Verwendeter Fluorophor.	31
<b>Tab. 2.11:</b>	Verwendete Antikörper.	31
<b>Tab. 1.12:</b>	PCR-Bedingungen..	36
<b>Tab. 1.13:</b>	Expressionsbedingungen der HaloTag <sup>®</sup> -Fusionsproteine.	41
<b>Tab. 1.14:</b>	Demographische und klinische Daten.	43

### Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
1°AK	Primärantikörper
2°AK	Sekundärantikörper
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
A $\beta$ o	A $\beta$ -Oligomer
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i> , Angiotensin-konvertierendes Enzym
AD	<i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimer
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain</i> -Familie
ADDLs	<i>A<math>\beta</math>-derived diffusible ligands</i> , A $\beta$ -Oligomere
AICD	intrazelluläre APP-Domäne
$\alpha$	Alpha
$\alpha$ 7nAChR	<i><math>\alpha</math>7 nicotinic acetylcholine receptor</i> , nikotinischer Acetylcholinrezeptor $\alpha$ 7
$\alpha$ CTF	C-terminales Fragment des APP nach $\alpha$ -Spaltung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat

ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> , Amyloid-Vorläufer-Protein
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
a.u.	<i>arbitrary units</i> , willkürliche Einheiten
BACE1	<i>beta-site APP-cleaving enzyme 1</i>
$\beta$	Beta
$\beta$ CTF	C-terminales Fragment des APP nach $\beta$ -Spaltung
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
C83	C-terminales Fragment des APP nach $\alpha$ -Spaltung
C99	C-terminales Fragment des APP nach $\beta$ -Spaltung
CAA	Amyloidangiopathie
cAMP	Cyclisches 3'5'-Adenosinmonophosphat
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
Co-IP	zur Co-Immunopräzipitation
CREB	<i>cAMP-Responsive Element Binding Protein</i>
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> , Cerebrospinalflüssigkeit
CT	Computer-Tomographie
delta, $\Delta$	Differenz
delta NT, $\Delta$ NT	Deletion des N-Terminus
Da, kDa	Dalton, Kilo Dalton
DemTect	Demenz-Detektion
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig ( <i>double-stranded</i> )
DTT	Dithiothreitol
ECE	<i>endothelin-converting enzyme</i> , Endothelin-konvertierendes Enzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno-sorbent assay</i>
Elong.	Elongation
em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-TOF	<i>electrospray ionization-time of flight</i> -Massenspektrometrie
EtBr	Ethidiumbromid
ex	Extinktion
FAD	Familiäre Alzheimer-Demenz
FI	Fluoreszenzintensität
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Bidestilliertes Wasser

HC	<i>hydrophobic core</i> hydrophober Kern,
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HMWo	<i>high molecular weight oligomers</i> , hochmolekulare Oligomere
hu	human
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IDE	<i>insulin-degrading enzyme</i> , Insulin-abbauendes Enzym
IDPs	<i>intrinsically disordered peptides</i> , intrinsisch ungeordnete Peptide
IgG Hc	<i>immunoglobulin heavy chain</i> , schwere Proteinkette von Immunglobulin
IgG Lc	<i>immunoglobulin light chain</i> , leichte Proteinkette von Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
Inst.	Institut
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
Ktrl.	Kontrollpatienten
l	Liter
λ	Wellenlänge (lambda)
LB	Luria-Bertani
LMWo	<i>Low molecular weight oligomers</i> , niedermolekulare Oligomere
LRP1	<i>Low-Density-Lipoprotein Receptor related Protein 1</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i> , Langzeit-Potenzierung
m	Milli
μ	Mikro
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning size</i>
mGluR5	metabotroper Glutamatrezeptor 5
Min	Minute
MMST	<i>Mini-Mental-Status-Test</i>
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
N-	Amino-
NaAc	Natriumacetat
NCM	Nitrocellulose-Membran
NCT	Nicastrin
ND	neurotoxische Domäne
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i> , Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
OR	<i>Octarepeat-Region</i>
p	pico
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung

Pen-2	<i>presenilin enhancer protein 2</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIB	Pittsburgh compound B
PRNP	Prion-Protein-Gen
PrP <sup>C</sup>	zelluläres Prion-Protein
PrP <sup>Sc</sup>	pathologische Isoform des PrP <sup>C</sup> ; „Sc“ steht für die <i>Scrapie</i> -Erkrankung
PS1	Präsenilin 1
PS2	Präsenilin 2
PSD	<i>postsynaptic density</i> , postsynaptischen Dichte
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
rel.	relative
RIP	Intramembranproteolyse
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffradikale
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rPrP <sup>C</sup>	rekombinantes, zelluläres Prion-Protein
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sA $\beta$ 42	synthetisches A $\beta$ 42
SAD	Sporadische Alzheimer-Demenz
sAPP $\alpha$	<i>soluble alpha APP ectodomain</i> , lösliche APP alpha Ektodomäne,
sAPP $\beta$	<i>soluble beta APP ectodomain</i> , lösliche APP beta Ektodomäne
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
Sek	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SorLa/LR11	<i>Sortilin-related receptor with low-density lipoprotein receptor class A repeats</i>
T	Tween20
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathien
U	Unit, Einheit
ün	über Nacht
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
vgl.	Vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralen Nervensystem

# 1 Einleitung

Proteinfehlfaltungserkrankungen stellen eine neue Herausforderung an Proteinchemie und molekulare Medizin dar. Obwohl unterschiedliche Krankheitsbilder wie z.B. Parkinson, Huntington, Prionerkrankungen und auch Alzheimer (AD, *alzheimer's disease*, Alzheimer-Erkrankung) auf einer vermehrten Aggregation unterschiedlicher pathologischer Proteinkonformere beruhen (Lyubchenko *et al.*, 2009; Sim und Caughey, 2010), verdichten sich die Hinweise auf einen gemeinsamen molekularen Mechanismus zur Vermittlung der toxischen Effekte. Eine besondere Rolle spielt hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit die Ausbildung von  $\beta$ -Faltblattreichen Strukturen sowie die Oligomerisierung und toxische Interaktion mit bestimmten Zielstrukturen der Zelle. Trotz großer Bemühungen in Forschung und Medizin sind alle neurodegenerativen Erkrankungen bis heute unheilbar. Ein Verständnis der Mechanismen und Interaktionen von fehlgefalteten Proteinen auf molekularer Ebene ist deshalb unbedingt erforderlich, um Anknüpfungspunkte für neuartige Therapieansätze zu finden.

## 1.1 Die Alzheimer-Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankung wurde bereits vor über einem Jahrhundert beschrieben und ist heute die häufigste Form der Demenz (Ballard *et al.*, 2011). Neuesten Hochrechnungen zur Folge sind weltweit 44 Millionen Menschen an Demenz erkrankt. Durch die demografische Wandlung der Gesellschaft mit kontinuierlich steigender Lebenserwartung und der somit immer weiter wachsenden Bevölkerungsgruppe der über 65-Jährigen, gewinnen die Demenzerkrankungen zunehmend an klinischer, sozialer und sozioökonomischer Bedeutung. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Zahl der an Demenz erkrankten Menschen durch die demographische Entwicklung bis zum Jahr 2050 auf 135 Millionen Menschen erhöhen wird (Thies *et al.*, 2013). Die Erkrankung entwickelt sich sehr langsam und ist schon Jahrzehnte vor dem Auftreten der ersten Symptome nachweisbar (Nelson *et al.*, 2009, 2012). Gerade im Frühstadium wird die erhöhte Vergesslichkeit durch die zunehmende Beeinflussung des Kurzzeitgedächtnisses mit dem normalen Alterungsprozess in Verbindung gebracht. Allerdings liegen bereits massive pathologische Veränderungen im Gehirn der Betroffenen vor, wenn die ersten dementiellen Symptome auftreten, die im Verlauf der Erkrankung kontinuierlich zunehmen und schließlich zum Verlust des semantischen und prozeduralen Gedächtnisses führen, so dass es nicht nur zu einer Veränderung der Persönlichkeit

kommt, sondern auch zum Verlust des Sprachverständnisses sowie 24 stündiger Pflegebedürftigkeit. (Jakob-Roetne und Jacobsen 2009). Nach der Diagnosestellung beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung noch sieben Jahre.

Grundsätzlich kann man bei der Alzheimer-Erkrankung zwischen einer sporadischen (SAD, sporadische Alzheimer-Erkrankung) und einer familiären (FAD, familiäre Alzheimer-Erkrankung) Form unterscheiden.

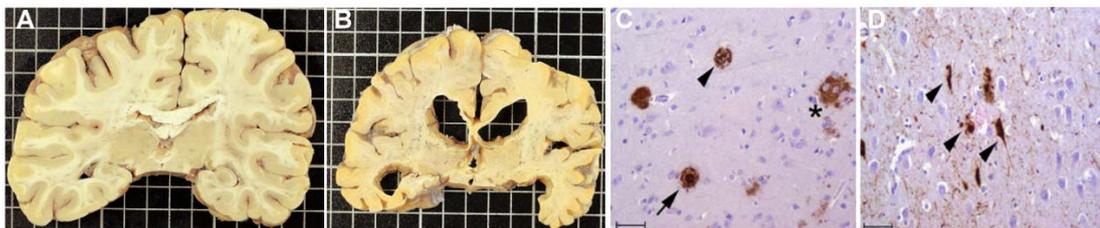
Obwohl SAD die häufigste Form der Erkrankung darstellt, ist eine eindeutige Ursache ihrer Entstehung bislang unbekannt. Bei SAD treten die typischen Symptome der Erkrankung erst im fortgeschrittenen Lebensalter auf. Bei der seltenen FAD kommt die Krankheit in der Regel schon weit vor dem 65. Lebensjahr zum Ausbruch. Diese familiäre Form der Erkrankung ist erblich, liegt aber nur bei weniger als 5 % der Erkrankten vor. Als Ursache der FAD sind verschiedene Mutationen des Präsenilin-1-Gens auf Chromosom 14, des Präsenilin-2-Gens auf Chromosom 1 oder des APP (*amyloid precursor protein*; Amyloid-Vorläuferprotein) -Gens auf Chromosom 21 identifiziert worden (Selkoe, 2001; Bekris *et al.*, 2010).

Die Diagnose einer Alzheimer-Erkrankung konnte nach den früheren Diagnosekriterien nur *post mortem* gestellt werden. Für die Diagnose waren der klinische Phänotyp einer progressiven Demenz sowie der Nachweis spezifischer neuropathologischer Veränderungen des Gehirns notwendig (McKhann *et al.*, 2011). Aufgrund des aktuellen Fortschritts in der Entwicklung von Biomarkern für die Alzheimer-Erkrankung, die es erlauben Nachweise für die Erkrankung *in vivo* zu erbringen, ist die frühe Diagnose der Alzheimer-Erkrankung noch vor dem Auftreten einer demenziellen Symptomatik möglich (Dubois *et al.*, 2010). Ausführliche neuropsychologische Tests zur Beurteilung geistiger Fähigkeiten (z.B. MMST, DemTect, Uhren-Test, CERAD-Testsammlung) können erste Hinweise auf das Vorliegen einer beginnenden Demenz geben und bilden oft die Grundlage einer ausführlichen Diagnostik bei bestehendem Verdacht auf das Vorliegen einer Alzheimer-Erkrankung (Morris *et al.*, 1989; Kalbe *et al.*, 2004). Die spezifischen pathophysiologischen Biomarker beruhen auf charakteristischen degenerativen Prozessen der Erkrankung, der Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ )-Plaques-Bildung und der pathologischen Ablagerung von Tau. Hierbei werden im Liquor erniedrigte Werte für die A $\beta$ 42-Konzentration, erhöhtes Gesamt-Tau sowie erhöhtes Phospho-Tau gemessen (Handels *et al.*, 2012). Durch die Kombination dieser drei Werte ist eine Abgrenzung der an Alzheimer Erkrankten gegenüber gesunden Personen mit einer Sensitivität von 86-92 % und einer Spezifität von 89 % möglich (Sunderland *et al.*, 2003; Engelborghs *et al.*, 2008). Bildgebende Verfahren wie Magnet-Resonanz-

Tomographie (MRT) oder Computer-Tomographie (CT) werden bei Erstdiagnose einer Demenz zum Ausschluss potenziell behandelbarer bzw. reversibler Ursachen einer demenziellen Symptomatik angewendet (Gifford *et al.*, 2000; Hejl *et al.*, 2002). Eine weitere diagnostische Möglichkeit bietet die Amyloid Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit Hilfe der Pittsburgh compound B (PIB) bzw. anderen Radioliganden (Klunk *et al.*, 2004; Landau *et al.*, 2013).

### 1.1.1 Neuropathologie

Bei der Alzheimer-Erkrankung können unterschiedliche Veränderungen des Gehirns beobachtet werden. Als ein typischer Vertreter neurodegenerativer Erkrankungen, zeichnet sie sich durch einen verstärkten Untergang von Synapsen und Neuronen aus. Die daraus resultierende kortikale Atrophie führt zu einer Erweiterung der inneren und äußeren Liquorräume (Abb. 1.1-B). Betroffen sind hierbei vor allem die Hippocampi sowie Bereiche des fronto-temporalen und parieto-okzipitalen Cortex (Terry, 1979; Du *et al.*, 2007). In den betroffenen Gehirnarealen können vermehrt extrazelluläre Proteinablagerungen in Form von senilen Amyloid-Plaques beobachtet werden (Abb. 1.1-C). Senile Plaques bestehen zum größten Anteil aus dem Amyloid- $\beta$ -Peptid. Die pathologische Ablagerung des A $\beta$ -Peptids ist das Resultat einer fehlerhaften Prozessierung von APP. Des Weiteren sind intrazelluläre Proteinablagerungen ein pathognomonisches Merkmal der Erkrankung (Abb. 1.1-D). Sie bestehen hauptsächlich aus dem Tau-Protein. Tau reguliert unter physiologischen Bedingungen den Zusammenbau der Mikrotubuli. Kommt es unter pathologischen Bedingungen zur Tau-Hyperphosphorylierung, wird seine Tendenz zur Aggregation erhöht. Solche Tau-Aggregate werden als Neurofibrillen im Zellkörper und als Neuropilfäden in Axonen abgelagert.



**Abb. 1.1:** Pathologische Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung.

**A** Dargestellt ist das normal alternde Gehirn eines Menschen ohne pathologische Auffälligkeiten im direkten Vergleich mit **B** dem Gehirn eines Alzheimer-Patienten mit deutlicher Atrophie des Hippocampus und Erweiterungen der Sulci und Ventrikel. **C** Extrazelluläre senile A $\beta$ -Plaques **D** Intrazelluläre Neurofibrillen. Maßstabsbalken: 50 $\mu$ m. (mit freundlicher Genehmigung von Dr. J. Matschke, Inst. für Neuropathologie, UKE)

Die von Alois Alzheimer beschriebenen Kennzeichen der Erkrankung werden bis heute zusammen mit zerebraler Inflammation, dystrophischen Neuriten, aktivierter Mikroglia und Astrozyten sowie zerebraler Amyloidangiopathie (CAA) mit der Neuropathologie der Krankheit assoziiert. Für sich allein betrachtet sind die abnormen Proteinablagerungen zwar charakteristisch, aber nicht spezifisch für die Erkrankung. Sie können in geringerem Ausmaß auch im normal alternden Gehirn gefunden werden. Aus diesem Grund wird zur postmortalen Diagnosestellung die Dichte und Verteilung der Ablagerungen unter Berücksichtigung des Patientenalters analysiert. Durch die Beurteilung seniler Plaques gemäß CERAD-Klassifikation (Morris *et al.*, 1989; Fillenbaum *et al.*, 2008) sowie der Verteilung der Neurofibrillen und Neuropilfäden und Bestimmung des Braak-Stadiums (Braak und Braak, 1991) kann eine Alzheimer-Erkrankung diagnostiziert werden.

### 1.1.2 Risikofaktoren

Obwohl eine Reihe von Risikofaktoren für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung identifiziert worden sind, ist die genaue Ursache weiterhin nicht bekannt. Es handelt sich wahrscheinlich um eine multifaktorielle Erkrankung, bei der ein gleichzeitiger Einfluss genetischer Varianzen und Umweltfaktoren zur Entstehung der Krankheit beitragen (Buzill *et al.*, 2009). Das Alter ist ohne Zweifel der größte Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung. Über 95 % der Erkrankten sind jenseits des 65. Lebensjahres. Man geht davon aus, dass es bei der Bevölkerung über 65 alle fünf Jahre zu einer Verdopplung der Inzidenz der Alzheimer-Erkrankungen kommt. So ist mindestens jeder vierte Mensch über 85 Jahren von dieser Krankheit betroffen. In einer finnischen Studie wurde bei 33 % der mit 85 Jahren oder älter Verstorbenen eine Alzheimer-Erkrankung festgestellt (Alzheimer Forschung Initiative, 2013).

Genetische Faktoren spielen bei der Ätiologie der Alzheimer-Erkrankung eine Rolle. Verwandte ersten Grades haben im Durchschnitt ein vierfach erhöhtes Risiko auch an Alzheimer zu erkranken (Gatz *et al.*, 2006). Von allen möglichen genetischen Risikofaktoren, die untersucht wurden, ist die E4-Variante bei einem Polymorphismus des Gens für das Apolipoprotein E (ApoE) auf Chromosom 19 am besten beschrieben. Das E4-Allel wird mit dem Risiko, früher an Alzheimer zu erkranken, in Verbindung gebracht (Corder *et al.*, 1993) und erhöht bei Heterozygotie 3-fach, bei Homozygotie sogar 10-fach das Risiko im höheren Alter an Alzheimer zu erkranken. Fast 60 % der Alzheimer-Patienten sind hetero- oder homozygot für das E4-Allel (Grimmer *et al.*, 2010; Förstl *et al.*, 2011). Träger des E2-Allels hingegen besitzen ein vermindertes Risiko eine Alzheimer-Erkrankung zu entwickeln (Corder *et al.*, 1994).

Für E3, die als normale Variante bezeichnet wird, sind etwa über 70 % der Bevölkerung homozygot (AlzGene, 2014). Das ApoE-Protein findet sich in senilen Plaques (Uchihara *et al.*, 1996), kann dort aber erst nach A $\beta$ -Ablagerungen detektiert werden und ist somit keine Voraussetzung ihrer Entstehung (Lemere *et al.*, 1996).

Bestimmte Einzelnukleotid-Polymorphismen im *SorLA*-Gen werden aktuell als zweiter genetischer Risikofaktor und neuer Biomarker zur Früherkennung der Alzheimer-Erkrankung diskutiert (Dodson *et al.*, 2006; Rogaeva *et al.*, 2007; Willnow und Andersen, 2013). Der neuronale ApoE-Rezeptor SorLa/LR11 kann das A $\beta$ -Vorläuferprotein APP binden und einen direkten Einfluss auf die differentielle Sortierung und Prozessierung von APP ausüben. Bei SorLa-Mangel kommt es zur Freisetzung von APP aus dem Trans-Golgi-Netzwerk in den amyloidogenen Weg der Prozessierung und somit zu einer erhöhten Produktion von A $\beta$  (Schmidt *et al.*, 2007).

Auch traumatische Kopfverletzungen (DeKosky *et al.*, 2013), Depression (Leonard *et al.*, 2007), Fettleibigkeit, ein hoher Cholesterinspiegel (Granic und Potter *et al.*, 2013), Diabetes mellitus Typ-2 (Irie *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2013), Rauchen (Cataldo und Glantz, 2010), Pestizide (Hayden *et al.*, 2010), Quecksilber (Mutter *et al.*, 2010) und ein niedriges Bildungsniveau (Amieva *et al.*, 2014) werden mit einem erhöhten Risiko an der Alzheimer-Demenz zu erkranken in Verbindung gebracht. Antioxidantien, Omega-3-Fettsäuren und moderater Kaffee Genuss werden unter anderem gegenwärtig als Faktoren diskutiert, die das Alzheimer Risiko senken können (Barberger-Gateau *et al.*, 2013).

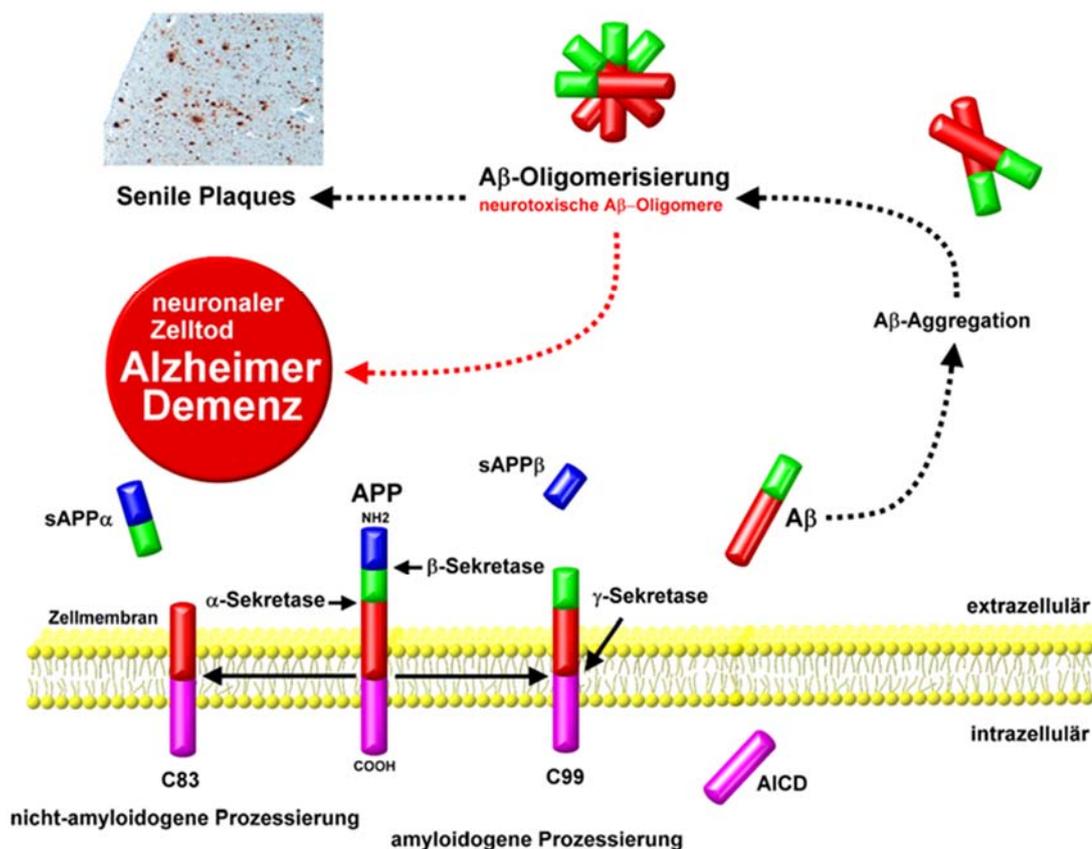
## 1.2 Molekulare Grundlagen der Alzheimer-Pathologie

Erst im Jahr 1984, fast 80 Jahre nach der Entdeckung der senilen Plaques durch Alois Alzheimer, gelang es Glenner und Wong an der Universität von Kalifornien in San Diego erstmalig das A $\beta$ -Peptid aus einem von einer zerebralen Amyloidangiopathie betroffenen Gehirn zu isolieren (Glenner und Wong, 1984). Bereits ein Jahr später wurde es als ein Hauptbestandteil von Plaques bei der Alzheimer-Erkrankung sowie beim Down-Syndrom charakterisiert (Masters *et al.*, 1985).

### 1.2.1 Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins

A $\beta$  wird im Organismus durch die proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) generiert (Busciglio *et al.*, 1993; De Strooper und Annaert, 2000). APP ist ein ubiquitär exprimiertes Typ-I-Transmembranprotein mit einer ausgeprägten extrazellulären Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil. Im Gehirn findet es sich in neuronalen Zellen, Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen und nicht-neuronalen Zellen. Eine Beteiligung von APP wird unter anderem an Prozessen der Zelladhäsion, Zellmigration, Synaptogenese sowie neuroprotektiven Prozessen beschrieben (Priller *et al.*, 2006; Thinakaran und Koo, 2008). Es wird im Organismus auf zwei unterschiedliche Arten prozessiert. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung ( $\alpha$ -sekretorische Prozessierung; Abb.1.2) wird das APP an seiner N-terminalen Domäne durch eine  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der A $\beta$ -Sequenz gespalten und es entstehen zwei unterschiedliche Fragmente. Während ein 83 Aminosäuren (AS) großes, C-terminales Fragment (C83;  $\alpha$ CTF) in der Membran verankert bleibt, wird der sezernierbare Teil der APP-Ektodomäne als sAPP $\alpha$  (*soluble* APP, sAPP) in den extrazellulären Raum entlassen. Für das sAPP $\alpha$  ist eine positive Wirkung auf das Wachstum von Axonen und Neuriten beschrieben. Verschiedene Mitglieder der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase domain*)-Familie (ADAM10 und ADAM17) sind als Proteasen mit  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität beschrieben worden (Vincent *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2009). Die Rolle von ADAM10 in diesem Zusammenhang wird derzeit kontrovers diskutiert (Altmeyen *et al.*, 2011). Das Fragment C83 wird anschließend im Rahmen einer regulierten Intramembranproteolyse (RIP) durch die  $\gamma$ -Sekretase in das nicht-amyloidogene p3 (Esch *et al.*, 1990; Wilquet und De Strooper, 2004) und das zytoplasmatische AICD (*APP intracellular domain*) gespalten (Haass *et al.*, 1993). AICD kann im Komplex mit anderen Proteinen in den Zellkern gelangen und Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen sowie direkt als Transkriptionsfaktor wirken (Cao und Südhof, 2001). Alle Spaltprodukte des  $\alpha$ -sekretorischen Weges sind löslich und nicht pathogen. Der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -sekretorische Abbauweg konkurrieren miteinander um die Prozessierung des APP. Bei der amyloidogenen Prozessierung ( $\beta$ -sekretorische Prozessierung) wird APP an der N-Terminal lokalisierten Schnittstelle für  $\beta$ -Sekretasen von der Aspartylprotease BACE1 (*beta-site APP-cleaving enzyme 1*) geschnitten (Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Haass, 2004; Vassar, 2005). Infolgedessen wird sAPP $\beta$  in den extrazellulären Raum sekretiert. In der Mitte der Transmembrandomäne des APP kommt es zur Spaltung der Sequenz durch die  $\gamma$ -Sekretase. Aufgrund der relativ

niedrigen Sequenzspezifität der  $\gamma$ -Sekretase entstehen unterschiedlich große A $\beta$ -Spaltprodukte sowie das C-terminale AICD Fragment, das in das Zytosol freigesetzt wird. Die A $\beta$ -Spaltprodukte gelangen in den extrazellulären Raum (Haass *et al.*, 2012). Es entsteht ein relativ breites Spektrum an A $\beta$ -Spezies unterschiedlicher Länge, das aber durch A $\beta$ 40 mit ca. 90 % aller A $\beta$ -Peptide dominiert wird. Danach folgt das A $\beta$ 42 mit einem Anteil von 5-10 % und der Restanteil wird durch kürzere Peptide wie A $\beta$ 37 und A $\beta$ 38 gebildet. Das A $\beta$ 42 hat eine große Aggregationsneigung und bildet unterschiedliche Aggregationsformen aus, die für die Alzheimer-Erkrankung verantwortlich sind (Jakob-Roetne und Jacobsen, 2009).

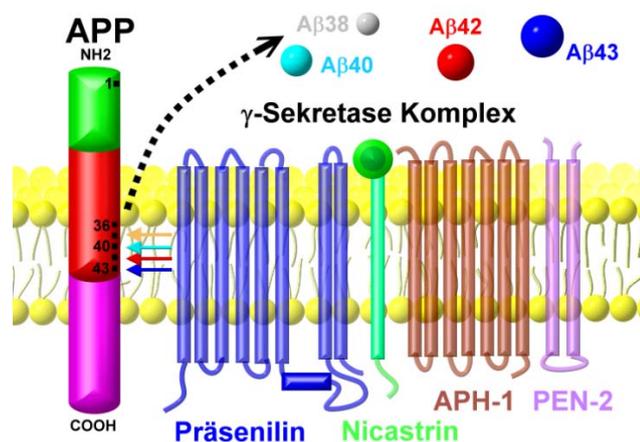


**Abb. 1.2: Die Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins.**

Schematische Darstellung der APP-Prozessierung unter Berücksichtigung beteiligter Enzyme und Prozesse. Bei der nicht amyloidogenen APP-Prozessierung (durchgezogener Pfeil nach links) durch die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase entstehen ausschließlich nicht-toxische Spaltprodukte wie z.B. das lösliche sAPP $\alpha$ . Bei der amyloidogenen Prozessierung (durchgezogener Pfeil nach rechts), wird APP an seiner extrazellulären Domäne zunächst von der  $\beta$ -Sekretase BACE1 unter Freisetzung von sAPP $\beta$  in den extrazellulären Raum gespalten. Das in der Membran verbliebene C99-Fragment wird unter Freisetzung von A $\beta$ -Peptiden unterschiedlicher Länge sowie der intrazellulären APP-Domäne (AICD) durch die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten. Die A $\beta$ -Peptide besitzen eine starke Tendenz zur Aggregation unter Ausbildung von löslichen A $\beta$ -Oligomeren zur Vermittlung von toxischen Effekten, die schließlich die Entstehung und Progression der Alzheimer-Demenz durch neuronalen Untergang begünstigen. Hochmolekulare Aggregate der A $\beta$ -Oligomere finden sich schließlich in den senilen Plaques von Alzheimer-Patienten wieder als charakteristisches Merkmal der Erkrankung. (Angelehnt an Gandy, 2005)

## 1.2.2 Amyloid- $\beta$

Für die Generierung der A $\beta$ -Peptide ist letztlich die  $\gamma$ -Sekretase verantwortlich. Dabei handelt es sich um einen Proteinkomplex integraler Membranproteine, der aus vier Untereinheiten mit unterschiedlichen Funktionen besteht. Nicastrin (NCT) dient der Substraterkennung (Shah *et al.*, 2005) während APH-1 (*anterior pharynx-defective phenotype 1*) stabilisiert. Die Aktivierung des katalytischen Zentrums erfolgt durch PEN-2 (*presenilin enhancer-2*) (La Voie *et al.*, 2003). Enzymatische Aktivität besitzt das PS1- bzw. PS2 (Präsenilin 1 bzw. 2)-Homodimer (Thinakaran *et al.*, 1996; Kimberly *et al.*, 2000; Edbauer *et al.*, 2003). Bei der amyloidogenen Prozessierung können durch unterschiedliche Schnittstellen der  $\gamma$ -Sekretase in der Transmembrandomäne von APP verschiedene monomere A $\beta$ -Spezies mit einer Länge von 36 (A $\beta$ 36) bis 43 Aminosäuren (A $\beta$ 43) entstehen (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex.**

Der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex besteht aus vier Untereinheiten. Das Präsenilin-Homodimer besitzt die enzymatische Aktivität im Komplex und kann das Amyloid-Vorläuferprotein APP innerhalb der Plasmamembran an unterschiedlichen Stellen prozessieren. Je nach Schnittstelle entstehen A $\beta$ -Peptidfragmente unterschiedlicher Längen und Eigenschaften.

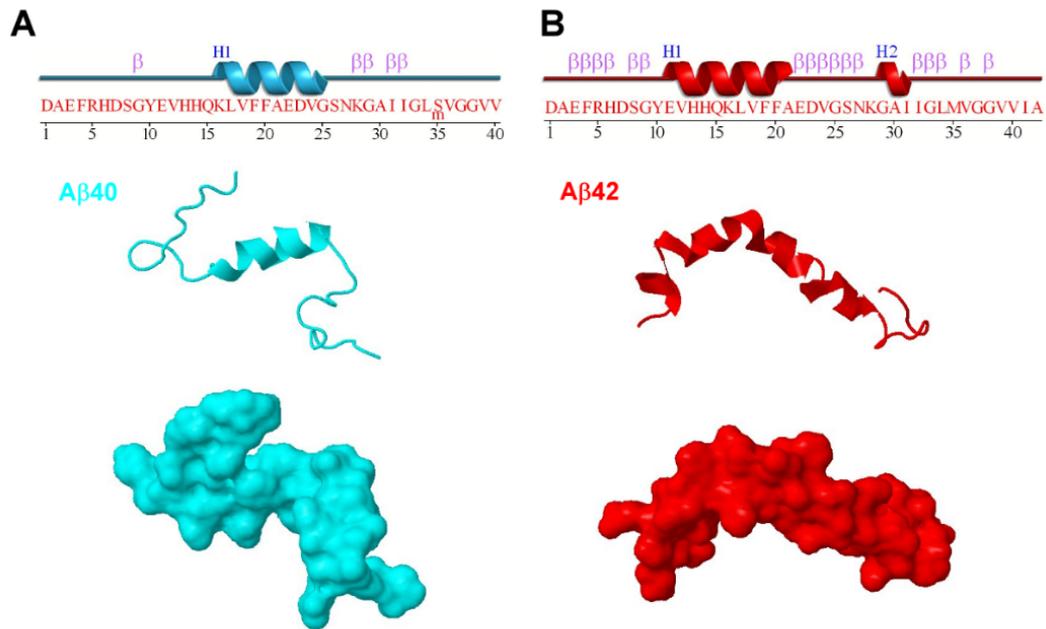
Oligomere des A $\beta$ 42-Peptids (A $\beta$ 42<sub>o</sub>) werden als die notwendige neurotoxische Spezies zur Entstehung und Progression der Alzheimer-Erkrankung angesehen. Lösliche A $\beta$ 40-Ablagerungen finden sich vorwiegend in cerebraler Amyloidangiopathie (CAA). A $\beta$ 42 ist die dominant auftretende Spezies in den parenchymalen Plaques von Alzheimer Gehirnen (Suzuki *et al.*, 1994; Iwatsubo *et al.*, 1994) und die erste A $\beta$ -Spezies, die sich in diffusen Plaques ablagert. Diese werden als Vorläufer reifer, seniler Plaques angesehen (Lemere *et al.*, 1996). Eine schwedische Studie aus dem Jahr 2009 konnte zeigen, dass in Plaques des frontalen- und okzipitalen Kortex von Alzheimer-Patienten abgelagertes A $\beta$ 43 in

größerer Menge als A $\beta$ 40 vorliegt. Auch konnten bisher keine größeren Spaltprodukte als A $\beta$ 43 gefunden werden (Welander *et al.*, 2009). Der nicht-amyloidogene Weg ist die häufigste Form der APP-Prozessierung, trotzdem wird die Menge an A $\beta$ 42, die im Laufe einer Lebensspanne von 70 Jahren gebildet wird, auf 1 bis 3 kg geschätzt (Bateman *et al.*, 2006). Die Halbwertszeit von A $\beta$ 40 in Gehirnen transgener Mausmodelle für die Alzheimer-Erkrankung beträgt 0,7 für A $\beta$ 42 1,7 Stunden. Auch im Mausmodell beginnen die A $\beta$ -Ablagerungen in Plaques mit A $\beta$ 42, während A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40 weiterhin dem normalen Protein-*turnover* unterliegen (Abramowski *et al.*, 2008). Der Abbau von A $\beta$ 42 im Gehirn wird durch verschiedene Proteasen bewerkstelligt wie z.B. Nepilysin, IDE (*insulin-degrading enzyme*), ECE (*endothelin-converting enzyme*) und ACE (*angiotensin-converting enzyme*) (Eckmann *et al.*, 2003; Kanemitsu *et al.*, 2003; Caccamo *et al.*, 2005; Hemming und Selkoe, 2005). Es ist offensichtlich, dass ein Ungleichgewicht zwischen A $\beta$ 42-Produktion und Abbau die Entstehung einer Alzheimer-Demenz begünstigt. Unterschiedliche Studien sprechen für einen konzentrationsabhängigen, dualen Effekt von A $\beta$ . Liegt A $\beta$ 42 in geringer Konzentration im picomolaren Bereich vor, stimuliert es die synaptische Plastizität und hat einen positiven Einfluss auf die Informationsübertragung bei Neuronen (Puzzo *et al.*, 2008; Abramov *et al.*, 2009). Auch die Erhöhung der A $\beta$ -Konzentration in der interstitiellen Flüssigkeit nach akuter Gehirnverletzung spricht für eine weitere physiologische Funktion des Peptids (Brody *et al.*, 2008). Bei der Alzheimer-Erkrankung kommt es jedoch zu den im Folgenden beschriebenen negativen Effekten.

### 1.2.3 Amyloid- $\beta$ und Aggregation

Obwohl sich A $\beta$ 42 nur in der Existenz der Aminosäuren Ile-41 und Ala-42 an seinem C-terminalen Ende von A $\beta$ 40 unterscheidet, besitzen beide Peptide deutlich unterschiedliche, physiologische und biophysikalische Eigenschaften. So zeigt A $\beta$ 42 im direkten Vergleich mit A $\beta$ 40 einen stärkeren neurotoxischen Effekt auf neuronale Zellen, findet sich als die dominante Spezies der unlöslichen Plaques in Gehirnen von Alzheimer-Patienten und besitzt eine stärkere Tendenz zur Selbstaggregation unter Ausbildung von Fibrillen *in vitro* (Roher *et al.*, 1993; Gravina *et al.*, 1995; Hasegawa *et al.*, 1999; Dahlgren *et al.* 2002). Es ist offensichtlich, dass strukturelle Informationen wichtig für das Verständnis dieses Moleküls sind. Da monomere A $\beta$ -Moleküle in Lösung keine einheitliche Tertiärstruktur einnehmen, sondern eher eine heterogene Population an unterschiedlich gefalteten Proteinen repräsentieren, wird

angenommen, dass es sich um intrinsisch ungeordnete Peptide (IDPs, *intrinsically disordered peptides*) handelt (Hou *et al.*, 2004; Uversky *et al.*, 2009; Ball *et al.*, 2011). Somit mangelt es bis heute an einer hochauflösenden Kristallstruktur des A $\beta$ -Peptids. Hinweise auf Konformation und dynamische Prozesse des Peptids wurden mittels CD-Spektroskopie (Circulardichroismus) und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) gewonnen (Abb. 1.4).

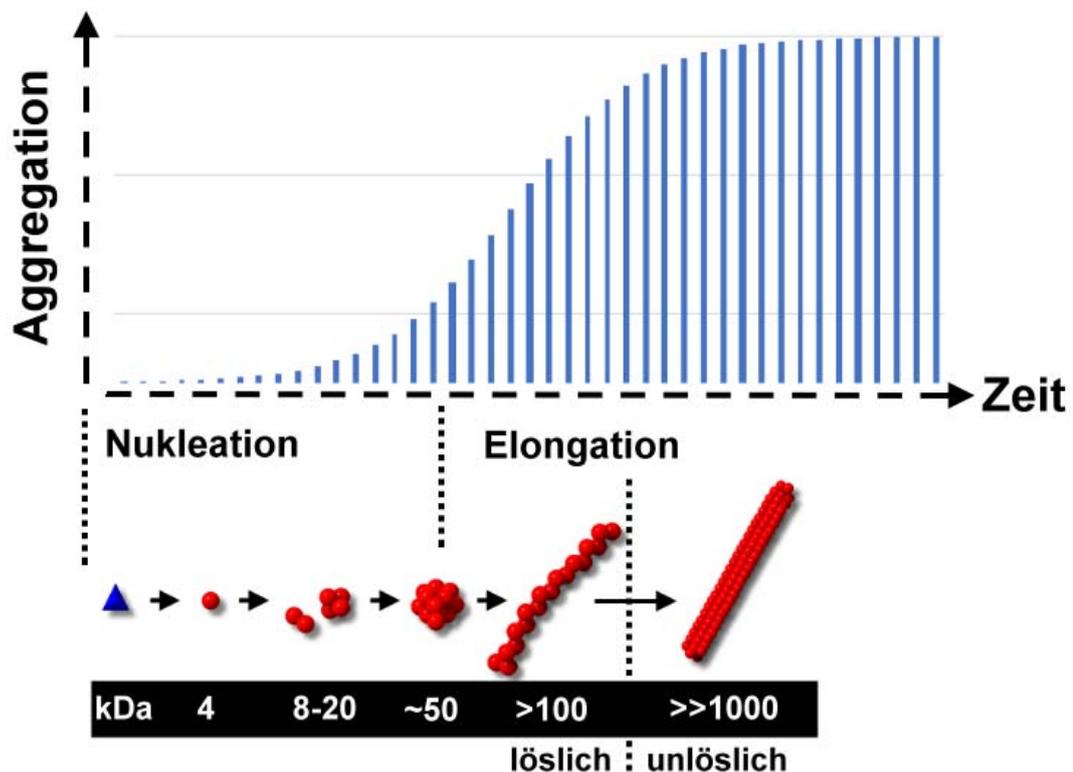


**Abb. 1.4: Strukturmodelle des humanen A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Peptids.**

Dargestellt sind Primärstruktur, Sekundärstruktur und Moleküloberfläche des humanen A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 Peptids. **A** Das 40 AS große-A $\beta$ 40 Peptid liegt über weite Abschnitte ungeordnet vor. Als besondere Struktur motive zeigt es eine zentral gelegene  $\alpha$ -Helix sowie fünf  $\beta$ -Schleifen. **B** A $\beta$ 42 beinhaltet in diesem Modell zwei  $\alpha$ -Helices und 17  $\beta$ -Schleifen in den ungeordneten Abschnitten [Die Abbildung wurde mit der Software Jmol erstellt und basiert auf publizierten NMR- und CD-Spektroskopie Datensätzen von Watson *et al.* (1998; A $\beta$ 40) und Tomaselli *et al.* (2006; A $\beta$ 42)].

Monomere A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Peptide zeigen ungeordnete Molekülabschnitte sowie Bereiche mit Elementen definierter Sekundärstrukturen wie Schleifen,  $\alpha$ -Helices, parallelen und antiparallelen  $\beta$ -Strängen. In verschiedenen Studien wird belegt, dass die Hydrophobizität, vermittelt durch die C-terminalen Aminosäuren Ile-41 und Ala-42, ausschlaggebend für die Unterschiede im Aggregationsverhalten sowie der Toxizität ist (Bitan *et al.*, 2003; Kim und Hecht, 2005; Ball *et al.*, 2013). Der Aggregationsprozess von A $\beta$  wurde bislang hauptsächlich *in vitro* mit synthetischen Peptiden erforscht. Diese Peptide können spontan Fibrillen ausbilden, die den natürlichen Formen in Plaques von Alzheimer-Patienten ähneln. Die nukleations-

abhängige Polymerisation ist ein gängiges Modell zur Entstehung von Amyloid-Fibrillen (Jarret *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1997; Naiki *et al.*, 1999), das man in unterschiedliche Phasen unterteilen kann. In der Nukleations- und Latenzphase, die energetisch ungünstig sind und daher langsam verlaufen, unterzieht sich das  $\beta$ -Amyloid einer Konformationsänderung. Durch die Fehlfaltung erlangt das Peptid die Fähigkeit zur Selbstaggregation unter Ausbildung  $\beta$ -faltblattreicher  $A\beta$ -Oligomere ( $A\beta_0$ ). Darauf folgt die schnell ablaufende Elongationsphase, in der unterschiedliche Intermediate löslicher  $A\beta_0$  als Keim für weitere Aggregationsvorgänge dienen und die Entstehung von Protofibrillen und unlöslichen Amyloid-Fibrillen als Endpunkt begünstigen. Die Ausbildung des Nukleus stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Aggregationsprozess dar. Durch Zugabe von *seeds* (Aggregationskeimen) kann die Latenzphase verkürzt werden. Somit lässt sich die Kinetik des Prozesses als sigmoidale Kurve beschreiben (Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Modell der nukleations-abhängigen  $A\beta$ -Polymerisation.**

Der Aggregationsprozess zur Entstehung von unlöslichen, fibrillären Proteinaggregaten kann in verschiedene Phasen unterteilt werden. In der Nukleations- und Latenzphase findet eine Konformationsänderung/Fehlfaltung von monomeren  $A\beta$  statt, die sich dann zu löslichen oligomeren  $A\beta$ -Nuklei zusammenlagern. In der Elongationsphase wachsen die Nuklei durch zusätzliche Anlagerungen von Monomeren bis zur Ausbildung von Protofibrillen und schließlich unlöslichen Fibrillen in der Sättigungsphase weiter an. (Modifiziert nach Englund, 2009).

Viele unterschiedliche Aggregationszustände von A $\beta$ , in einer Größenordnung von Dimeren (8 kDa) bis hin zu Protofibrillen mit einer Größe von über 100 kDa, sind beschrieben. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Vertreter der A $\beta$ .

**Tab. 1.1:** Übersicht löslicher A $\beta$ -Oligomere.

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
<b>Dimer bis Tetramer</b>	8-20 kDa; SDS-stabil; inhibieren LTP; in menschlichem Gehirn und CSF	(Walsh <i>et al.</i> , 2002) (Cleary <i>et al.</i> , 2005) (Shankar <i>et al.</i> , 2008)
<b>ADDLs</b>	~10-20mer; >40 kDa; kugelförmig; inhibieren LTP; in menschlichem Gehirn und CSF; induzieren Tau-Phosphorylierung	(Lambert <i>et al.</i> , 1998) (Wang <i>et al.</i> , 2002) (Gong <i>et al.</i> , 2003)
<b>Oligomere</b>	15-20mer; >40 kDa; kugelförmig; neurotoxisch; in menschlichem Gehirn	(Kayed <i>et al.</i> , 2003) (Deshpande <i>et al.</i> , 2006) (Glabe und Kaye, 2006)
<b>A<math>\beta</math>*56</b>	56 kDa; korreliert mit Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung in tg-Mäusen; beeinträchtigt räumliche Orientierung bei Ratten	(Lesné <i>et al.</i> , 2006, 2008) (Chiang <i>et al.</i> , 2008) (Zahs und Ashe, 2013)
<b>Globulomere</b>	~60 kDa; kugelförmig; inhibieren LTP; in menschlichem Gehirn	(Barghorn <i>et al.</i> , 2005) (Gellerman <i>et al.</i> , 2008) (Yu und Zheng, 2011)
<b>Protofibrillen</b>	>20mer; >100 kDa; langgestreckte Erscheinung; neurotoxisch; beeinflusst LTP; in Zellkultur-Medium, tg-Maus-Gehirnen; korreliert mit Gedächtnisdefiziten in tg-Mäusen	(Harper <i>et al.</i> , 1997) (Hartley <i>et al.</i> , 1999) (Walsh <i>et al.</i> , 1999)

Kleinere Aggregationsformen sind vorwiegend kugelförmig, Protofibrillen zeigen ein langgestrecktes Erscheinungsbild. Globulomere und ADDLs (*amyloid-derived diffusible ligands*) werden eher als endgültige Aggregationsform und nicht als Intermediate angesehen. Das liegt möglicherweise an strukturellen Unterschieden in der Anordnung ihrer  $\beta$ -Faltblätter. Der Oligomerisierungsprozess *in vivo* ist aufgrund schlechter experimenteller Zugänglichkeit bisher noch ungeklärt (Englund, 2009).

#### 1.2.4 Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese spielt seit ihrer ersten Formulierung durch Hardy und Higgins im Jahr 1992 eine wichtige Rolle bei dem Versuch, Ätiologie und

Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung zu erklären (Hardy und Higgins; 1992). Im Mittelpunkt der Theorie stehen Ablagerungen von fibrillärem A $\beta$  in senilen Plaques als die grundlegende Ursache von neurodegenerativen Prozessen und dem Ausbruch der Alzheimer-Erkrankung. Da aber bei Alzheimer-Patienten der Verlust von Neuronen und das Ausmaß der kognitiven Beeinträchtigungen nur bedingt mit der Menge an A $\beta$ -Plaques korrelieren, entstanden Zweifel an der Hypothese von Hardy und Higgins (Terry *et al.*, 1991; Arriagada *et al.*, 1992; Cummings *et al.*, 1996). Auch können bei älteren, nicht dementen Personen Plaques beobachtet werden (Hulette *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 2001; Price *et al.*, 2001). In einem transgenen Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung wird zudem eine Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung lange vor dem Auftreten von Plaques beobachtet (Lesne *et al.*, 2008). Die Menge an löslichem A $\beta$  korreliert weitaus besser mit dem Fortschreiten der Krankheit als die Menge der Plaques (Lue *et al.*, 1999; Mc Lean *et al.*, 1999; Nälsund *et al.*, 2000). Deshalb wird mittlerweile angenommen, dass Aggregate löslicher A $\beta$  den Untergang von Synapsen und Neuronen verursachen und so den Auslöser der Alzheimer Pathologie darstellen (Hardy und Selkoe, 2002; Koffie *et al.*, 2009).

### 1.2.5 A $\beta$ -vermittelte Toxizitätsmechanismen

Der neurotoxische Effekt von synthetischem A $\beta$  (sA $\beta$ ) auf Zellen in Kultur wurde schon kurz nach seiner Entdeckung in den späten 80er Jahren beschrieben und es stellte sich früh heraus, dass Lösungen mit „gealtertem“ (also partiell aggregiertem), sA $\beta$  viele unterschiedliche A $\beta$ -Spezies enthalten und den stärksten toxischen Effekt zeigen (Pike *et al.*, 1991). In einer Studie von Ward und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass nach Fraktionierung von A $\beta$  dessen Aggregate toxisch wirken, nicht jedoch monomeres A $\beta$  (Ward *et al.*, 2000).

In der Literatur finden sich viele Beschreibungen von unterschiedlichen Formen der löslichen A $\beta$  als Vermittler von toxischen Effekten in Zellkultur-Experimenten (Lambert *et al.*, 1998; Hartley *et al.*, 1999; Bucciantini *et al.*, 2002; Hoshi *et al.*, 2003). Nicht nur dadurch wurde die Amyloid-Kaskaden-Hypothese untermauert, sondern auch durch unterschiedliche Studien, die den inhibierenden Effekt von A $\beta$ -Aggregaten auf LTP (*long-term potentiation*, LTP) nachweisen konnten (Wang *et al.*, 2002; Klyubin *et al.*, 2004).

Allerdings sind Beobachtungen unter Verwendung von sA $\beta$  stark von der Präparation des Experimentators abhängig und bringen oft Probleme in Reproduzierbarkeit und in der Art der beobachteten Effekte mit sich. Deshalb wurden A $\beta$ -Aggregate zusätzlich aus biologischem Material isoliert und getestet. Auch unterschiedliche niedermolekulare A $\beta$ -Aggregationsformen, die aus Zellkultur-Medien, menschlichem CSF (*cerebrospinal fluid*, CSF) und Gehirnen von Alzheimer-Patienten gewonnen wurden, zeigten einen inhibierenden Effekt auf die Langzeitpotenzierung (Walsh *et al.*, 2002; Cleary *et al.*, 2005; Shankar *et al.*, 2007). Es existieren mehrere Theorien und Erklärungsversuche, wie A $\beta$  seine zahlreichen toxischen Effekte vermittelt.

Die intrazelluläre Akkumulation von A $\beta$  ist für viele pathologische Effekte der Alzheimer-Erkrankung verantwortlich. A $\beta$  wird entweder intrazellulär gebildet oder durch Endozytose extrazellulärer A $\beta$  über die Bindung an spezifische Rezeptoren wie z.B. RAGE (*receptor for advanced glycation end products*),  $\alpha$ 7nAChR ( *$\alpha$ 7 nicotinic acetylcholine receptor*) und dem ApoE (*apolipoprotein E*)-Rezeptor in die Zelle aufgenommen. Durch die intrazelluläre Akkumulation von A $\beta$  kommt es schließlich zu einer Beeinflussung des Proteasoms, mitochondrialer Dysfunktion und Störungen der Autophagie.

Die erhöhte Permeabilität der Zellmembran und der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Spiegel werden schon seit langem mit der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht (Mattson *et al.*, 1992; 1994). Dabei wird von der Entstehung A $\beta$ -spezifischer Ionenkanäle und einer daraus resultierenden Störung der Homöostase von Ca<sup>2+</sup> und anderen Ionen ausgegangen (Arispe *et al.*, 1993; Kawahra und Kuroda, 2000). Die Störungen im Ionenhaushalt der Zelle begünstigen weitere degenerative Prozesse wie die Entstehung freier Radikale und die Phosphorylierung von Tau (Yatin *et al.*, 1998). Auch die Bindung von A $\beta$  an verschiedene Rezeptoren der Zelloberfläche wird mit synaptischer Fehlfunktion und Neurodegeneration in Verbindung gebracht. Durch die Interaktion von A $\beta$  und verschiedenen Rezeptoren kommt es zu einer abnormen Aktivierung von Signalwegen in der Zelle, die schließlich zum Zelltod führen. Unterschiedliche Rezeptoren wie NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor), NGFR (*nerve growth factor receptor*), Insulin-Rezeptor und der Frizzled-Rezeptor sind in diesem Zusammenhang in der Literatur beschrieben (Snyder *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008; Magdesian *et al.*, 2008).

Interessanterweise wurde im Jahr 2009 auch das zelluläre Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>) als hochspezifischer Rezeptor für ADDLs identifiziert (Laurén *et al.*, 2009). Entsprechend der Relevanz für die vorliegende Arbeit wird dieser Aspekt im folgenden Abschnitt ausführlicher vorgestellt. Aufgrund der zahlreichen toxischen Effekte, die im Zusammenhang mit A $\beta$  zu beobachten sind, wird angenommen, dass diese, abhängig von der Konformation der Oligomere, über jeweils unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden (Deshpande *et al.*, 2006; Glabe *et al.*, 2008, Lasagna-Reeves *et al.*, 2011).

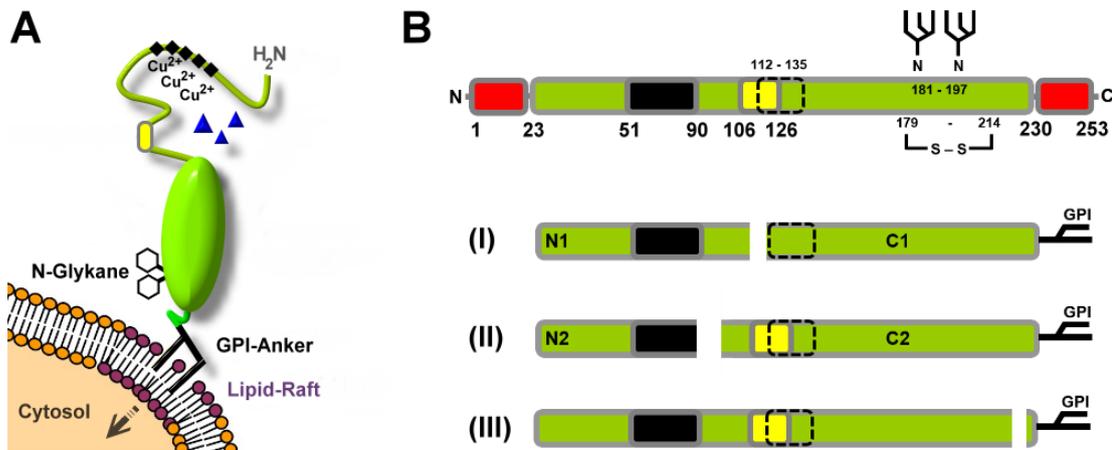
## 1.3 PrP<sup>C</sup> und die Alzheimer-Erkrankung

Das zelluläre Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>) ist ein im Gehirn stark exprimiertes Glykoprotein und bekannt durch seine Rolle bei Prionerkrankungen. Diese sind einzigartige, neurodegenerative Erkrankungen, die durch die Bildung und Ablagerung einer fehlgefalteten, pathologischen Isoform (PrP<sup>Sc</sup>) des Proteins im Gehirn charakterisiert sind (Prusiner, 1998). Die Interpretation neuer und auch älterer Beobachtungen lässt eine direkte Beteiligung des PrP<sup>C</sup> in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung vermuten (Gunther und Strittmatter, 2010).

### 1.3.1 Das zelluläre Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>)

Das reife PrP<sup>C</sup> ist ein körpereigenes, membranassoziiertes Glykoprotein mit einer Länge von 208 AS und einem Molekulargewicht von ~35 kDa, das vorwiegend auf der Oberfläche von Neuronen, jedoch auch auf Astrozyten und einer Vielzahl von anderen Zellen exprimiert wird (Kretzschmar *et al.* 1986; Cashmann *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1998; Altmeyen *et al.*, 2012). PrP<sup>C</sup> wird vom *PRNP*-Gen auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 20 codiert und zeigt eine einfache genomische Struktur aus zwei Exons und einem 13 kb großen Intron. Der gesamte proteinkodierende Teil ist auf Exon 2 lokalisiert (Puckett *et al.*, 1991). PrP<sup>C</sup> besteht aus zwei deutlich unterscheidbaren Molekülhälften, die jeweils ca. 50 % des Proteins ausmachen. Die stark flexible, unstrukturierte, N-terminale Hälfte des Proteins beherbergt charakteristische Domänen wie die *Octarepeat*-Region (OR), die neurotoxische Domäne (ND) und eine Sequenz hydrophober AS (HC, *hydrophobic core*) (Abb. 1.6). Die globuläre C-terminale Hälfte hingegen ist stärker strukturiert und weist drei  $\alpha$ -Helices, zwei  $\beta$ -Faltblatt-Stränge, Schleifendomänen, zwei variabel besetzte N-Glykosylierungsstellen, eine Disulfidbrücke sowie einen

Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker zur Anheftung an das äußere Blatt der Plasmamembran auf (Riek *et al.*, 1997; Biasini *et al.*, 2012) (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6:** Schematische Darstellung des humanen PrP<sup>C</sup>.

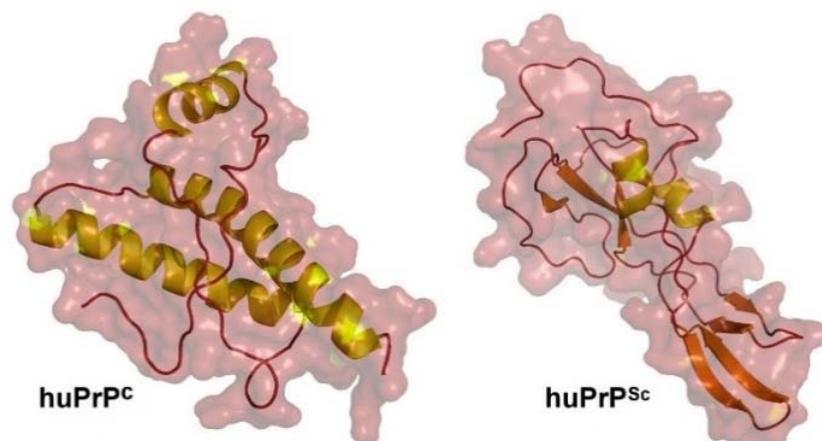
**A** PrP<sup>C</sup> ist in Lipid-Rafts (Cholesterin-reiche Bereiche der Plasmamembran) lokalisiert und über einen GPI-Anker in der äußeren Schicht der Plasmamembran befestigt. Der flexible N-Terminus beinhaltet eine neurotoxische Domäne (gelbe Box), kann über seine *Octarepeat*-Region (schwarze Boxen) Cu<sup>2+</sup> (sowie auch Zink) binden und die Interaktion mit β-Faltblattreichen Bindepartnern wie z.B. Aβ-Oligomere (blaue Dreiecke) vermitteln. Der C-Terminus besitzt eine kugelförmige Gestalt und zeigt bis zu zwei N-Glykan-Seitenketten. Zur Signaltransduktion (Pfeil) in das Zytosol benötigt PrP<sup>C</sup> vermutlich zusätzliche Proteine (nicht gezeigt), da es die Membran selbst nicht durchspannt. **B** Lineare Darstellung der Primärsequenz des humanen PrP<sup>C</sup>. Nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz (AS 1-22; rote Box) durch Signalpeptidasen im ER und der C-terminalen Signalsequenz zur Anheftung des GPI-Ankers (AS 231-253) besitzt das gereifte PrP<sup>C</sup> eine *Octarepeat*-Region (AS 51-90; schwarze Box), eine neurotoxische Domäne (AS 106-126; gelbe Box), einen hydrophoben Kern (AS 112-135; gestrichelte Box), eine Disulfid-Brücke (zwischen AS 179 und AS 214) sowie zwei variabel besetzte N-Glykosylierungsstellen (AS 181 und AS 197). Die unter physiologischen Bedingungen stattfindende proteolytische Prozessierung von PrP<sup>C</sup> liefert Spaltprodukte unterschiedlicher Länge und Funktion. (I) Die α-Spaltung zerstört die neurotoxische Domäne und liefert ein lösliches N1-Fragment (11 kDa) sowie das membrangebundene C1-Fragment (18 kDa). (II) Die β-Spaltung liefert ein N2- (9 kDa) und C2-Fragment (20 kDa). (III) Die Spaltung in der Nähe des GPI-Ankers (*Shedding*) führt zur Freisetzung des Prion-Proteins von der Zellmembran.

Die hochkonservierte proteolytische Prozessierung (Abb. 1.6-B) ist vermutlich ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der vielfältigen, vorgeschlagenen Proteinfunktionen von PrP<sup>C</sup> sowie zur Generierung von biologisch aktiven Fragmenten unterschiedlicher Funktion (Altmeyen *et al.*, 2012). Die α-Spaltung ist die häufigste Form der Prozessierung unter physiologischen Bedingungen. Dabei spalten α-PrPasen das Prion-Protein in ein 11 kDa großes, lösliches N1-Fragment und ein membrangebundenes C1-Fragment von 18 kDa. Die β-Spaltung wird vermutlich vermittelt durch Calpaine und Ca<sup>2+</sup>-regulierte Cystein-Proteasen sowie direkt durch reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*; ROS) und findet am Ende der OR statt. Dadurch entsteht das 9 kDa große N2- und das 20 kDa große

C2-Fragment. Für die N2- und C2-Fragmente sind keine physiologischen Funktionen beschrieben. Das N2-Fragment wird jedoch vermehrt unter pathophysiologischen Bedingungen, wie in Prionerkrankungen oder oxidativem Stress, gebildet (Chen *et al.*, 1995; Mangé *et al.*, 2004). Die membrannahe Abspaltung (*shedding*) des Proteins durch die PrP<sup>C</sup>-Sheddase ADAM10 führt zur Freisetzung von PrP<sup>C</sup> von der Zellmembran (Taylor *et al.*, 2009; Altmeyen *et al.*, 2011). Die Identität der beteiligten Proteasen, insbesondere der  $\alpha$ -PrPase(n), sowie das Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Relevanz der unterschiedlichen Fragmente werden aktuell kontrovers diskutiert. Es wird angenommen, dass vor allem die Fragmente der  $\alpha$ -Spaltung und das *shedding* von PrP<sup>C</sup> neuroprotektive Funktionen bei neurodegenerativen Erkrankungen besitzen (Altmeyen *et al.*, 2012).

### 1.3.2 Pathophysiologische Rolle von PrP<sup>C</sup>.

Entdeckt und berühmt wurde das Prion-Protein durch die Fähigkeit sich in einen Krankheitserreger umzuwandeln, der sich sowohl im betroffenen Körper „ausbreiten“ als auch auf weitere Individuen „übertragen“ werden kann, ohne im Besitz einer eigenen Nukleinsäure als Träger der Erbinformation zu sein (Prusiner, 1982). Ein zentrales Ereignis ist dabei die Umfaltung von PrP<sup>C</sup> in seine  $\beta$ -Faltblattreiche, pathologische Isoform PrP<sup>Sc</sup> („Sc“ steht dabei für die mit der *Scrapie*-Erkrankung von Schafen und Ziegen assoziierte Isoform von PrP<sup>C</sup>, wird aber bei sämtlichen Prionerkrankungen anderer Säuger synonym für die fehlgefaltete, pathologische Isoform des Prion-Proteins verwendet) (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7: Strukturmodelle des PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>.**

Die normale Konformation des humanen PrP<sup>C</sup> besteht zu ungefähr 42 % aus  $\alpha$ -Helices und 3 % aus  $\beta$ -Faltblättern. Im Gegensatz dazu weist die pathologische PrP<sup>Sc</sup>-Konformation ca. 30 %  $\alpha$ -Helices und 43 %  $\beta$ -Faltblattstruktur auf. (Angelehnt an: [www.intheochem.fc.ul.pt](http://www.intheochem.fc.ul.pt), 2014).

PrP<sup>C</sup> liegt als lösliches Monomer vor und unterliegt einem raschen Protein-*turnover*. Das falsch gefaltete PrP<sup>Sc</sup> hingegen ist stabil und neigt, ähnlich den zuvor beschriebenen A $\beta$ -Peptiden (siehe 1.2.2 ff.), zur Aggregation mit weiteren PrP<sup>Sc</sup>-Molekülen. Die resultierenden Amyloid-Fibrillen sind für die Pathologie der Krankheit verantwortlich. Prionerkrankungen, oder transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE), sind übertragbare, neurodegenerative Krankheiten bei Menschen und zahlreichen weiteren Säugetieren (Prusiner, 1998). Diese Krankheit kann spontan auftreten (sporadisch), übertragen werden (infektiös) oder hereditären (familiär) Ursprungs sein. Klinisch gesehen, gehen die Prionerkrankungen meist mit einer stark ausgeprägten Demenz und unterschiedlichen neurologischen Symptomen wie Ataxien, Myoklonien und Erblindung einher. Der Verlauf ist immer letal. Als pathologische Merkmale finden sich PrP-Plaquelagerungen im Zentralen Nervensystem (ZNS), spongiöse Gewebedegeneration, Neuronenverlust und Gliose (Kretzschmar *et al.*, 1996).

### 1.3.3 Physiologische Rolle von PrP<sup>C</sup>

Es werden verschiedene physiologische Rollen des Proteins diskutiert. Diese reichen von einer Beteiligung des Proteins an Prozessen der Neuro-, Synapto-, und Neuritogenese und neuronalen Differenzierung (Graner *et al.*, 2000; Steele *et al.*, 2006; Hajj *et al.*, 2007) über eine Rolle bei der Zelladhäsion (Mangé *et al.*, 2002; Malaga-Trillo *et al.*, 2009), Neuroprotektion (Chiarini *et al.*, 2002; Rambold *et al.*, 2008) und Kupfer-Homöostase (Brown, 2003) bis hin zu Rezeptoreigenschaften (Laurén *et al.*, 2009) mit Beteiligung an Prozessen der Signaltransduktion. Hierbei wird PrP<sup>C</sup> entweder eine zentrale Rolle (Mouillet-Richard *et al.*, 2000; Resenberger *et al.*, 2011) oder die Funktion als Cofaktor zur Signalweiterleitung zugeschrieben (You *et al.*, 2012). Da PrP<sup>C</sup> nicht die Plasmamembran durchspannt, benötigen beide Szenarien zusätzliche Helfermoleküle, die das Signal in das Zellinnere weiterleiten können. So wurde z.B. vor über 10 Jahren gezeigt, dass die Kreuzvernetzung von PrP<sup>C</sup> auf gereiften Neuronen in einer Aktivierung der Tyrosinkinase Fyn resultiert. Die Signifikanz dieser Entdeckung wurde jedoch lange Zeit nicht verstanden (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). Auch konnte gezeigt werden, dass PrP<sup>C</sup> an der Regulation von BACE1 beteiligt ist und somit einen direkten Einfluss auf die A $\beta$ -Produktion hat (Parkin *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2011).

### 1.3.4 Die Verbindung zwischen PrP<sup>C</sup> und Alzheimer

Auf neuropathologischer und genetischer Ebene sind viele Hinweise auf mechanistische Zusammenhänge zwischen Prionerkrankungen und der Alzheimer-Erkrankung beschrieben. So spielt in beiden Krankheiten wie bereits beschrieben die Fehlfaltung von Proteinen eine zentrale Rolle. Interessanterweise kolokalisiert PrP<sup>C</sup> in A $\beta$ -Plaques bei der Alzheimer-Erkrankung (Voigtländer *et al.*, 2001) und hat einen Einfluss auf die Entstehung von A $\beta$ -Plaques (Schwarze-Eicker *et al.*, 2005). Zudem wurde der PRNP-M129V-Polymorphismus von PrP<sup>C</sup> als Risikofaktor für den frühen Ausbruch der Alzheimer-Erkrankung beschrieben und er moduliert sogar die Menge der A $\beta$ -Plaques (Del Bo *et al.*, 2006; Berr *et al.*, 2003). Auch bei der APP-Prozessierung übt PrP<sup>C</sup> einen direkten Einfluss auf die Menge von gebildetem A $\beta$  über die Regulierung der  $\beta$ -Sekretase BACE1 aus (Parkin *et al.*, 2007). Die Expression von PrP<sup>C</sup> wird im Gegenzug durch die intrazelluläre APP-Domäne (AICD) reguliert. Im Jahr 2009 wurde PrP<sup>C</sup> von Laurén und Mitarbeitern als hochspezifischer Rezeptor für A $\beta$  identifiziert. In einem großangelegten, genomumfassenden Screening sollten cDNA-Klone identifiziert werden, die bei Expression in nicht-neuronalen COS-7-Zellen für Proteine codieren, die ADDL-Präparationen von synthetischem A $\beta$ 42 (sA $\beta$ 42) binden können. Von den anfänglich eingesetzten 225.000 cDNA-Klonen wurden schließlich zwei positive Klone ermittelt, die für PrP<sup>C</sup> kodierten. Bei Neuronen des Hippocampus zeigte sich nach der Inkubation mit sA $\beta$ 42 ein punktuell Bindemuster an Dendriten. Dieses synaptische Bindemuster konnte teilweise durch die genetische Depletion von *PRNP* eliminiert werden. Auch die beobachtete Inhibierung der Langzeitpotenzierung (LTP) durch A $\beta$  benötigte die Anwesenheit von PrP<sup>C</sup> (Laurén *et al.*, 2009). Viele Studien untersuchen seit dieser Entdeckung die Rolle von PrP<sup>C</sup> bei der Alzheimer-Erkrankung. Obwohl es eigentlich keinen Zweifel mehr an der hochspezifischen Interaktion von PrP<sup>C</sup> mit A $\beta$  gibt, ist der Effekt der Interaktion weiterhin ein hochkontroverses Thema aktueller Wissenschaft.

### 1.3.5 Molekulare Grundlagen der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion

Die molekularen Grundlagen und die Effekte der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion wurden durch zahlreiche Studien unter Verwendung von biochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht und beschrieben. Zur Vermittlung der Interaktion ist der unstrukturierte N-terminale Teil von PrP<sup>C</sup> ausschlaggebend. Laurén zeigte durch die

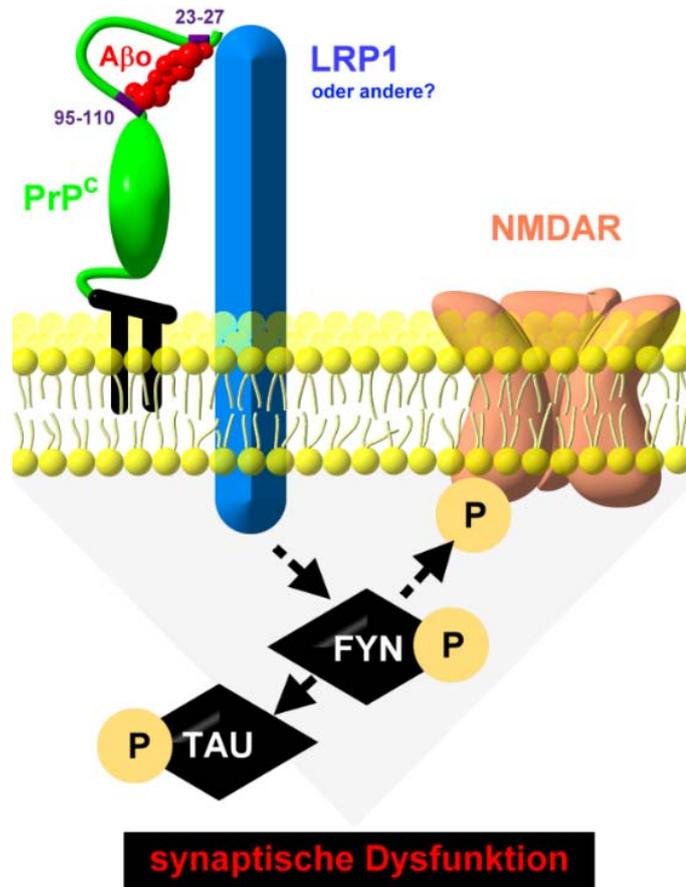
Verwendung verschiedener PrP<sup>C</sup>-Trunkierungen und PrP<sup>C</sup>-spezifischer Antikörper, dass die Vermittlung der Interaktion von den AS 95-100 am N-Terminus von murinem PrP<sup>C</sup> abhängig ist (Laurén *et al.*, 2009). Chen und Mitarbeiter konnten durch biophysikalische Experimente Lauréns Ergebnisse bestätigen und identifizierten ein zusätzliches Cluster an basischen Aminosäuren am äußersten N-Terminus (AS 23-27) als weitere Bindestelle für A $\beta$  (Chen *et al.*, 2010). Wie bereits beschrieben, wird PrP<sup>C</sup> proteolytisch prozessiert (s. Abschnitt 1.3.1). Wie zu erwarten, ist das durch die  $\alpha$ -Spaltung freigesetzte N1-Fragment dazu fähig, A $\beta$  extrazellulär hochaffin zu binden (Fluharty *et al.*, 2013; Guillot-Sestier *et al.*, 2012). Auch das von der Membran gesheddete PrP<sup>C</sup> besitzt beide Bindestellen für A $\beta$ . Die physiologische und pathologische Rolle der löslichen PrP<sup>C</sup>-Fragmente in Bezug auf A $\beta$  sind aber noch nicht geklärt. Zusätzlich zur Bildung löslicher Fragmente, reduzieren sowohl die  $\alpha$ -Spaltung (durch Abspaltung des N-Terminus) als auch das *shedding* von PrP<sup>C</sup> den Rezeptor für die neurotoxischen A $\beta$  an der neuronalen Plasmamembran. Die Bindung von A $\beta$  an PrP<sup>C</sup> ist hochspezifisch, die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) wurde mit  $K_d = 50-100$  nM (Monomer-Äquivalente) bestimmt. Aufgrund des hohen Molekulargewichts von Oligomeren kann sogar von einer  $K_d$  im subnanomolaren Bereich ausgegangen werden (Laurén *et al.*, 2009; Balducci *et al.*, 2010; Fluharty *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2010; Freir *et al.*, 2011).

### 1.3.6 Auswirkungen der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion

Viele unterschiedliche Effekte der Bindung von A $\beta$  an PrP<sup>C</sup> auf neuronalen Zellen, wie beispielsweise der Einfluss auf Lokalisierung und Endozytose von PrP<sup>C</sup> (Caetano *et al.*, 2011; Rusworth *et al.*, 2013), die LTP-Inhibition (Laurén *et al.*, 2009; Kessels *et al.*, 2010), synaptische Dysfunktion und Retraktion dendritischer Dornenfortsätze (Bate and Williams, 2011; Um *et al.*, 2012), die Veränderung der ionischen Leitfähigkeit (Alier *et al.*, 2011) und schließlich dem Absterben von Neuronen (Resenberger *et al.*, 2011; Hyeon *et al.*, 2012; Kudo *et al.*, 2012), sind beschrieben. Es soll vermerkt sein, dass in vielen Fällen trotz eines vergleichbaren experimentellen Aufbaus deutlich unterschiedliche Ergebnisse publiziert wurden. Die verschiedenen Ergebnisse resultieren oft durch geringgradige Unterschiede in der Handhabung des sA $\beta$ -Peptids (Lesné, 2013).

### 1.3.7 Signaltransduktion der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion

Da PrP<sup>C</sup> über seinen GPI-Anker an das äußere Blatt der Plasmamembran gebunden ist und nicht die Membran durchspannt, kann davon ausgegangen werden, dass es zusätzliche Proteine als Cofaktoren zur Vermittlung der toxischen Effekte ins Zytosol benötigt. Das *Low-Density-Lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1) ist ein zellulärer Membranrezeptor der LDL-Rezeptorfamilie und wurde in diesem Zusammenhang als potentieller Kandidat zur Ausbildung ternärer PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Komplexe beschrieben (Rushworth *et al.*, 2013). Metabotrope Glutamat-Rezeptoren können mit PrP<sup>C</sup> interagieren und bei der Vermittlung von Signalen in das Zellinnere eine Rolle spielen. So ist der metabotrope Glutamat-Rezeptor 5 (mGluR5) bekannt durch seine wichtige Rolle bei der Vermittlung von A $\beta$ -induzierten Schäden (Renner *et al.*, 2010). Auch von der Beteiligung der Tyrosinkinase Fyn in einem Signalkomplex wird ausgegangen. Dieses Enzym besitzt die Fähigkeit zur funktionellen Assoziation mit PrP<sup>C</sup>, N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) sowie Tau und kann neurotoxische Effekte von A $\beta$  vermitteln (Yang *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass A $\beta$ , isoliert aus postmortalen Gehirnen von Alzheimer-Patienten, Fyn in dendritischen *Spines*, abhängig von PrP<sup>C</sup>, aktivieren können (Um *et al.*, 2012). Weiterhin beschreibt Um, dass die durch den PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Rezeptorkomplex ausgesendeten Signale zu einer Phosphorylierung von Tyrosin an der Stelle 1472 des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors Typ 2B (NR2B) führen. Diese Phosphorylierung führt letztendlich zur vermehrten Expression von NR2B an der Zelloberfläche und gesteigerter Ca<sup>2+</sup>-Signalübertragung. Eine Deletion von *PRNP* reduziert die Fyn-Aktivierung als auch Tau-Hyperphosphorylierung, die normalerweise in älteren Tieren des APP/PS1-Mausmodells der Alzheimer-Krankheit beobachtet werden kann (Larson *et al.*, 2012). Das gegenwärtige Modell zur Signaltransduktion beruht im Wesentlichen auf diesen Beobachtungen und ist in Abbildung 1.8 schematisch zusammengestellt.



**Abb. 1.8: Modell der PrP<sup>C</sup>-Aβ-vermittelten Signaltransduktion.**

Dargestellt ist der aktuell vorgeschlagene Mechanismus zur Signaltransduktion nach Bindung von Aβ-Oligomeren an die N-terminalen Bindestellen (AS 23-27 und AS 95-110) von PrP<sup>C</sup> in der postsynaptischen Dichte (*postsynaptic density*; PSD) von dendritischen Dornfortsätzen. Details im Text. P = Phosphorylierung (Modifiziert nach Laurén, 2014).

Ein anderes Modell geht von der Cofaktor-unabhängigen Signalweiterleitung des Prion-Proteins aus. Durch die Interaktion mit Aβ kommt es in diesem Szenario zur Konformationsänderung und Clusterbildung von PrP<sup>C</sup> in Lipid-Rafts. Durch die Clusterbildung wird die Lipid- und Protein-Komposition der Mikrodomänen auf der zytosolischen Seite der Membran so stark verändert, dass eine veränderte Signaltransduktion die direkte Folge ist. Dieser Mechanismus ist z.B. für das GPI-verankerte Protein CD59 beschrieben, das über Lyn, einem anderen Vertreter der Tyrosinkinase, seine Effekte vermittelt (Suzuki *et al.*, 2007).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ein Großteil der bisher publizierten Studien zur PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion basiert auf der Verwendung von synthetischem A $\beta$  in Zellkulturmodellen oder transgenen Mausmodellen der Alzheimer-Erkrankung. Ausgesprochen wenig ist bisweilen über diese Interaktion und seine pathologische Relevanz *in vivo* bekannt. In der vorliegenden Arbeit soll die Interaktion unter Verwendung biochemischer, molekularbiologischer und analytischer Methoden *in vitro*, insbesondere aber auch *in vivo* weiter charakterisiert werden. Im ersten Teil der Arbeit soll mittels biochemischer Methoden der Nachweis der Interaktion an postmortalen Gehirnproben des frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollkohorte *in vivo* erbracht werden. Ebenso werden genetische Risikofaktoren der Alzheimer-Erkrankung in die Analyse einbezogen. Der zweite Teil der Arbeit beschreibt die Etablierung und Anwendung eines geeigneten Interaktionsassays (APIA) zur molekularbiologischen Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion. Der Assay soll die Verwendung von rekombinant exprimiertem, humanen PrP<sup>C</sup> zur Bindung von synthetischen A $\beta$ -Oligomeren sowie aus humanem Frontalkortex isolierten A $\beta$ -Oligomeren ermöglichen. Dabei soll die Interaktion sowie die Rolle des PrP<sup>C</sup>-N-Terminus zur Vermittlung der Interaktion bestätigt werden. Analytische Gelfiltration in Kombination mit APIA soll letztendlich zur Identifizierung der mit PrP<sup>C</sup>-interagierenden A $\beta$ -Oligomer-Spezies führen. Dabei sollen eventuelle Unterschiede bei der Verwendung von gealterten Präparationen des synthetischen A $\beta$ 42-Peptides und A $\beta$ -Oligomeren aus biologischen Quellen offengelegt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Verwendete Geräte.

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Bezugsquelle, Standort</b>
Block-Heizgerät	Thermo-Mixer C	Eppendorf, Hamburg
Autoklav	Technoclav50	Technorama, Fernwald
Blotting Modul	Mini Protean	BioRad, München
Blotting Modul	Mini Trans	BioRad, München
Dot-Blot Apparatur	96- Well Transfer Unit	Roth, Karlsruhe
Drucker	P93D	Mitsubishi, Ratingen
Feinwaage	CP3202S	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenz-Imager	Typhoon™ 9210	GE-Healthcare, Hamburg
Gel Imaging System	Chemi Doc™	BioRad, München
Gelkammer (DNA)	Mini-Sub Cell GT	BioRad, München
Inkubator	Heraeus	Thermo Scientific, Schwerte
Invers-Mikroskop	Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5804R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	DMD 108	Zeiss, Oberkochen
Magnetthermorührer	RCT basic IKAMAG	IKA-Werke GmbH, Staufen
Microplate Reader	Safire <sup>2</sup>	TECAN, Männedorf
Mikrowelle	Micromat	AEG, Frankfurt am Main
Netzgerät (DNA-Gele)	EPS200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Netzgerät (Proteingele)	Power Pac Basis	BioRad, München
PCR Cycler	MyCycler Thermal	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	CG 840	Schott, Mainz
Photometer	Biophotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference	100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference	10-100 µl	Eppendorf, Hamburg

Pipette reference	1-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Rührheizgerät	IKA RCT basic	IKA-Labortechnik, Staufen
Speed Vac	Savant™ SPD121P	Thermo Scientific, Schwerte
Tischzentrifuge	Mini MC 6	Sarstedt, Nümbrecht
Ultraschall	Sonifier 250	Branson, Dietzenbach
Ultrazentrifuge	L-60, Rotor SW40	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Flächenstrahler	N90	Benda, Wiesloch
Vakuumpumpe	Laboport®	Roth, Karlsruhe
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	WB-6	PCE, Meschede
Zentrifuge (gekühlt)	5415R; F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler	Rotator	LabMarket, Mannheim

## 2.1.2 Chemikalien und Enzyme

### 2.1.2.1 Chemikalien

Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller/Quelle</b>
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumpersulfat)	Roth, Karlsruhe
Autoklaviertes Aqua bidest.	UKE, Hamburg
Bacto-Agar	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinder Albumin Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Complete Mini, EDTA-frei (Proteaseinhibitor)	Roche, Mannheim
DNA-Molekulargewichtsmarker	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP Mix	Sigma-Aldrich, Hamburg
EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat)	Sigma-Aldrich, Hamburg
EtBr (Ethidumbromid)	Invitrogen, Karlsruhe
EtOH (Ethanol)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich, Hamburg

Glycerin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycin	Roth, Karlsruhe
HaloTag® Alexa Fluor® 488	Promega, Heidelberg
IPTG (Isopropylthio-β-Galaktosid)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kalibrierungsstandard	BioRad, München
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Griesheim
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma-Aldrich, Hamburg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteinmarker, PageRuler™	Fermentas, St. Leon-Rot
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosin)	Sigma-Aldrich, Hamburg
SDS (Sodiumdodecylsulfate)	Sigma-Aldrich, Hamburg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Roth, Karlsruhe

### 2.1.2.2 Enzyme

Tab. 2.3: Verwendete Restriktionsenzyme.

Enzym	Organismus	Erkennungssequenz	Bezugsquelle
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'...G <sup>*</sup> GATCC...3' 3'...CCTAG <sup>*</sup> G...5'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> ICRI	<i>Escherichia coli</i>	5'...GAG <sup>*</sup> CTC...3' 3'...CTC <sup>*</sup> GAG...5'	Promega, Heidelberg
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae Rd.</i>	3'...A <sup>*</sup> AGCTT...5' 5'...TTCGA <sup>*</sup> A...3'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pvu</i> I	<i>Proteus vulgaris</i>	5'...CGAT <sup>*</sup> CG...3' 3'...GCTA <sup>*</sup> GC...5'	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pme</i> I	<i>Pseudomonas mendocina</i>	5'...GTTT <sup>*</sup> AAAC...3' 3'...CAA <sup>*</sup> TTTG...5'	Promega, Heidelberg
<i>Sgf</i> I	<i>Streptomyces griseoruber</i>	5'...GCGATC <sup>*</sup> GC...3' 3'...CGC <sup>*</sup> TAGCG...5'	Promega, Heidelberg
<i>Xba</i> I	<i>Xanthomonas badrii</i>	5'...T <sup>*</sup> CTAGA...3' 3'...AGATC <sup>*</sup> T...5'	Fermentas, St. Leon-Rot

Tab. 2.4: Sonstige Enzyme.

<i>Enzym</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Hifi-Polymerase	PCR	QIAGEN, Hilden
T4 DNA-Ligase	Ligation	Promega, Heidelberg

### 2.1.3 Verwendete Kits

Tab. 2.5: Verwendete Kits.

<i>Name des Kits</i>	<i>Anwendung</i>	<i>Bezugsquelle</i>
QIAprep® Miniprep Kit	Plasmidisolierung	QIAGEN, Hilden
QIAprep® Midiprep Kit	Plasmidisolierung	QIAGEN, Hilden
Wizard® PCR DNA Clean Up Kit	Aufreinigung PCR-Produkte	Promega, Heidelberg
Flexi® System, Entry	Klonierung in N-term. Vektor	Promega, Heidelberg
Flexi® System, Transfer	Transfer in C-term. Vektor	Promega, Heidelberg
DNeasy Blood & Tissue Kit	Isolierung genomischer DNA	QIAGEN, Hilden

### 2.1.4 Weitere Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.6: Weitere Verbrauchsmaterialien.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
96 Micro Well Optical Bottom Plates	Nunc, Wiesbaden
Nitrocellulose-Membran	BioRad, München
Novex® Bis-Tris Gele (4-12 %)	Life Technologies, Eggstein
PVDF-Membran	BioRad, München
Reaktionsgefäße (1.5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Whatman-3 MM Papier	Whatman, Maidstone/UK

### 2.1.5 Bakterienanzucht

Bakterienanzucht und Proteinexpression (s. 2.2.6) findet im Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium) nach Angaben in Sambrook *et al.*, 2001 statt. Flüssige LB-Nährmedien und Medien mit Agarzusatz werden vor Gebrauch für 30 min bei 121 °C und 1,3 bar autoklaviert. Zum Gießen von Agarplatten wird das Medium auf 60 °C abgekühlt und in sterile Plastik-Einwegpetrischalen (Ø 100 mm) gegossen.

#### LB-Medium (pH 7,0)

Pepton	1 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1 l
für <u>LB-Agar</u> :	
Agar	12,5 g

### 2.1.6 Antibiotika und andere Medienzusätze

Antibiotika-Resistenzgene auf Plasmiden dienen der Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien. Durch Aufnahme des Plasmids haben sie gegenüber anderen Bakterien im Medium einen Selektionsvorteil erlangt. Nur Bakterien die erfolgreich durch das Plasmid transformiert wurden, wachsen im antibiotikahaltigen Medium. Antibiotika werden nach Abkühlen des Mediums auf ~55 °C in der benötigten Konzentration zugegeben (Tabelle 2.7). Bei der Proteinexpression wird Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), ein nicht metabolisierbares Analogon der Lactose, als Induktor zugegeben (2.2.6)

**Tab. 2.7: Antibiotika und sonstige Medienzusätze.**

<b>Medienzusatz</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Arbeitslösung</b>
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml H <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml H <sub>2</sub> O	25 µg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	100 mM	1 mM

## 2.1.7 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Bakterienstämme sind unter Angabe der Verwendung und des Genotyps aufgelistet.

### *E. coli* XL-10 Gold (Stratagene)

Ultrakompetente *E. coli*-Zellen, die aufgrund ihrer hohen Transformationseffizienz bei Klonierungen als Plasmid-Host verwendet wurden.

endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet<sup>R</sup> F'[proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Cm<sup>R</sup>)]

### *E. coli* Tuner™ (DE3) (Novagen)

Dies ist eine *lacZY* Deletionsmutante des *E. coli*-Stammes BL21. Durch die Mutation der *lac Permease (lacY)* gelangt IPTG gleichmäßig in alle Zellen einer Expressionskultur und erlaubt die Kontrolle des Expressionslevels über die Menge an IPTG. Die Deletionsmutante wurde als Expressions-Host bei Herstellung der Fusionsproteine verwendet.

F– ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm lacY1 (DE3) pLacI (CamR) (DE3)

## 2.1.8 Vektorplasmide

### pFN18A (HaloTag® 7) T7 Flexi® Vektor (Promega)

Der pFN18A-Flexi® Vektor (Abb. 3.8) wird zur gerichteten Klonierung proteincodierender DNA-Sequenzen und Expression von N-Terminal-getaggten HaloTag®-Fusionsproteinen verwendet. Das Plasmid trägt ein toxisches Barnase-Gen, welches durch die proteincodierende Sequenz ersetzt werden kann sowie ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion. Der T7 RNA Polymerase Promotor ermöglicht die Proteinexpression in *E. coli*.

### pFC20K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vektor (Promega)

Der pFC20K-Flexi® Vektor (Abb. 3.11) dient als Akzeptor-Vektor beim Transfer proteincodierender Sequenzen aus dem N-terminalen System. Das Plasmid trägt ebenfalls ein toxisches Barnase-Gen, das durch die proteincodierende Sequenz ersetzt wird, und ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion. Der T7-RNA-Polymerase-Promotor ermöglicht die Proteinexpression in *E. coli*.

### 2.1.9 Oligodesoxynukleotide (Primer)

Primer wurden von Sigma-Aldrich synthetisiert und bezogen. Diese wurden entsprechend den Anforderungen bei Verwendung des Flexi®-Vektorsystems entworfen. Die in dieser Arbeit erforderlichen proteincodierenden Sequenzen des zellulären Prion-Proteins (PrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 und PrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT) müssen in der PCR amplifiziert und gleichzeitig mit *Sgf*- und *Pme*I-Schnittstellen flankiert werden.

**Tab. 2.8: Verwendete Primer.**

<b>Name</b>	<b>Vorwärts Primer</b>	<b>Rückwärts Primer</b>
[Annealing Temp.; MgCl <sub>2</sub> Konz.]		
PrP <sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 [55°C; 4 mM]	5'AGGAGCGATCGCCATGAAGAAG CGCCCGAAGCCTGGAGG3'	5'AACTGTTTAACTCCCCTACTA TCAGGAAGATGAGGAAAGAG ATCAGG3'
PrP <sup>C</sup> $\Delta$ NT [50°C; 2 mM]	5'GCGTGCGATCGCCACATGGCT GGTGCTGCAGCAGCT3'	5'AACTGTTTAACTCCCCTACTA TCAGGAAGATGAGGAAAGAG ATCAGG3'

### 2.1.10 Synthetische Peptide

**Tab. 2.9 Verwendete synthetische Peptide.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
A $\beta$ 38	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGG	Bachem, Heidelberg
A $\beta$ 40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVV	Bachem, Heidelberg
A $\beta$ 42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVIA	GenicBio, China
A $\beta$ 42 <sub>scrambled</sub>	AIAEGDShVLKEGAYMEIFDVQGHVFG GKIFRVVDLGSNVA	GenicBio, China

### 2.1.11 Fluoreszenzfarbstoffe

HaloTag®-Fusionsproteine werden kovalent an den Alexa Fluor® 488-Ligand gekoppelt und als Sonde zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen verwendet.

Tab. 2.10: Verwendeter Fluorophor.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Extinktions- maximum</b>	<b>Emissions- maximum</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Alexa Fluor® 488	499 nm	514 nm	Promega, Heidelberg

### 2.1.12 Antikörper

Tab. 2.11: Verwendete Antikörper.

<b>1°Ak</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konz.</b>	<b>2°Ak</b>	<b>Konz.</b>
3F4	Bait in Co-IP	Covance	1:250	α Maus	s.2.2.8.5
6E10	Aβ	Covance	1:2000	α Maus	1:2500
6E10	Aβ (IHC)	DBS Emergo	1:100	α Maus	s.2.2.8.3
8G1	LRP1	Abcam	1:10000	α Kaninchen	1:2500
A11	Oligomere	Invitrogen	1:1000	α Kaninchen	1:2500
Fyn	Fyn1	Cell Signalling	1:1000	α Kaninchen	1:2500
Pom-1	PrP <sup>C</sup>	Prionatus	1:1000	αMaus	1:2500
Tau	Tau (IHC)	Thermo	1:500	α Maus	s.2.2.8.3

**Abkürzungen:** 1°Ak=Primärantikörper; 2°AK=Sekundärantikörper, Konz.= Konzentration. IHC= zur Immunhistochemie verwendet.; Co-IP= zur Co-Immunopräzipitation verwendet. α= anti-

### 2.1.13 Software

Zur Erstellung der Arbeit wurde folgende Software verwendet:

- AxioVision (Zeiss)
- Excel 2013 (Microsoft)
- Image Quant TL (GE Healthcare)
- Jmol (Internet Freeware)
- pDRAW32 (AcaSoft)
- PhotoImpact 12 (Ulead)
- Powerpoint 2013 (Microsoft)
- Prism5 (GraphPad)
- Quantity One (BioRad)
- SigmaPlot 11.0 (Systat)
- Word 2013 (Microsoft)
- Zotero (*Center for History and New Media, George Mason University, USA*)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Arbeiten mit Bakterienkulturen**

#### **2.2.1.1 Wachstumsbedingungen für *E. coli***

Transformierte *E. coli*-Zellen werden auf LB-Agarplatten (s. **2.1.5**) in Gegenwart des benötigten Antibiotikums (s. **2.1.6**) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag werden gewachsene Kolonien gepickt und das LB-Medium angeimpft. Dieses wird über Nacht bei 37 °C und 185-225 rpm unter aeroben Bedingungen kultiviert. Als Anzuchtgefäße für Volumina bis 3 ml dienen sterile 15 ml Falcongefäße. Für Volumina bis 250 ml werden sterile Erlenmeyerkolben verwendet. Anzuchtgefäße werden bis maximal 1/5 ihres Gesamtvolumens mit dem Flüssigmedium befüllt.

#### **2.2.1.2 Stammhaltung und Lagerung**

Zur kurzfristigen Aufbewahrung von bis zu 4 Wochen, werden LB-Agarplatten mit angewachsenen Kolonien bei 4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien werden Glycerin-Kulturen angelegt. Hierzu wird die Bakterienkultur (0,4 ml) mit 70 %igem Glycerin (0,6 ml) gemischt und der Ansatz bei -80 °C gelagert. Das Glycerin verhindert die Bildung von Kristallen innerhalb der Bakterien und somit mögliche Frostschäden. Die Bakterien können so für viele Jahre aufbewahrt werden.

### **2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im Mini- oder Midi-Maßstab aus *E. Coli* wurde das QIAprep® Miniprep-Kit (QIAGEN) und QIAprep® Midiprep-Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet. DNA-Ausbeute und -Qualität waren auch bei Verwendung des Miniprep-Kits ausreichend, um die anschließende Überprüfung der DNA durch Restriktionsenzymanalyse oder Sequenzierung problemlos bewerkstelligen zu können.

### 2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Absorptionsspektroskopie erlaubt die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung. Dabei ist zu beachten, dass Nukleinsäuren in Lösung ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen. Bei dieser Wellenlänge absorbiert einzelsträngige DNA aufgrund des Hyperchromizitätseffektes stärker als doppelsträngige DNA. Eine gemessene optische Dichte bei 260 nm von 1.0 (Schichtdicke der Küvette: 1 cm) entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 2001). Proteine, die als Verunreinigung in DNA-Lösungen auftreten, besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  ermöglicht es, den Reinheitsgrad einer nukleinsäurehaltigen Lösung einzuschätzen. Bei einer reinen DNA-Lösung wird ein Wert zwischen 1,65 und 1,85 erreicht. Höhere Werte sind auf RNA-Verunreinigungen, niedrigere Werte auf Proteinverunreinigung und Phenolreste zurückzuführen.

- *Durchführung:*

Die photometrischen Bestimmungen der DNA-Konzentration werden in Einmal-Quarzküvetten am BioPhotometer plus (Eppendorf) in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. Der Nullabgleich erfolgt mit 100 µl des reinen DNA-Lösungsmittels. Je 2 µl der zu bestimmenden DNA-Proben werden in 98 µl des Lösungsmittels verdünnt. Die Absorption wird bei  $OD_{260/280}$  gemessen. Der Absorptionswert bei 260 nm wird notiert und die DNA Konzentration nach Formel (1) berechnet:

$$c = OD_{260} \times V \times F \quad (1)$$

wobei:            c = Konzentration der Ausgangslösung [µg/ml]  
                     $OD_{260}$  = Absorption bei 260 nm  
                    V = Verdünnungsfaktor  
                    F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA )

### 2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten basiert auf der Wanderung negativ geladener DNA-Moleküle im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA ist antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Meyers *et al.*, 1976). Nach Färbung mit

Ethidiumbromid, das in GC-Basenpaare der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter Anregung mit UV-Licht detektiert werden.

- *Puffer und Reagenzien:*

#### TE-Puffer

Tris-HCl	10 mM
Na <sub>3</sub> -EDTA	1 mM

#### 5x Probenpuffer

EDTA	50 mM
Glycerin	50 % (v/v)
Bromphenolblau	150 mM

#### Ethidiumbromid-Lösung (EtBr)

2 µg/ml EtBr pro ml 1x TE-Puffer

- *Durchführung:*

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt in 1 %igen Agarosegelen. Hierzu wird eine entsprechende Menge Agarose in TE-Puffer durch Aufkochen in Lösung gebracht. Nach Abkühlen der Agarose auf ~60 °C wird sie in die horizontale Gelvorrichtung gegossen und ein Kamm zur Formung der Probenaschen eingebracht. Das erstarrte Gel wird in die Elektrophoresekammer gelegt, mit TE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die zu testende DNA wird mit einer entsprechenden Menge an 5x Probenpuffer versetzt. Als Referenz wird ein geeigneter DNA-Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente findet bei einer konstanten Stromstärke von 65 bis 95 V (4 V/cm Gellänge) für 45-65 Minuten statt. Im Anschluss werden die Gele für 20 min in einer EtBr-Lösung inkubiert. Die Detektion der Banden wird durch UV-Anregung mit Durchlicht bei einer Wellenlänge von 314 nm erreicht. Die DNA-Bandenmuster werden mit einer Digitalkamera dokumentiert.

## 2.2.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

### 2.2.5.1 Grundlagen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine sensitive molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung definierter Genabschnitte (Saiki *et al.*, 1988). DNA-Polymerasen können einzelsträngige DNA zu einem Doppelstrang polymerisieren, sobald sie einen kurzen doppelsträngigen Bereich als Primer zur Verfügung haben. Die Zugabe von zwei Oligonukleotidprimern (sense und antisense), die zum 5'- bzw. 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, sowie die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen ermöglicht den automatisierten Prozess der PCR in speziellen, programmierbaren Thermoblöcken (PCR-Cycler). Eine PCR-Reaktion besteht aus 20 bis 30 Zyklen. Jeder Zyklus lässt sich dabei in drei eigenständige Reaktionsprozesse unterteilen. Diese umfassen die Denaturierung von DNA-Doppelsträngen bei 90 °C, die Hybridisierung (Annealing) bei 50 °C und die Kettenverlängerung (Elongation) bei einer Temperatur von 72 °C. Der durch Primer definierte Genabschnitt wird dabei exponentiell vermehrt. Eine sorgfältige Optimierung von kritischen Reaktionsparametern wie z.B. der Hybridisierungstemperatur, Mg<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration, Anzahl der Zyklen und Dauer der einzelnen Reaktionsprozesse ist wichtig, weil nur so der bestmögliche Wirkungsgrad der PCR und damit höchste Ausbeute und Spezifität erreicht werden kann.

### 2.2.5.2 PCR zur Modifizierung von Gensequenzen

Die PCR ist eine vielfältig einsetzbare Methode. Durch geschicktes Primerdesign können Veränderungen/Mutationen in die DNA-Sequenz eingebracht werden. Um PCR-Amplifikate in Zielvektoren einzubringen, kann die PCR die zu klonierenden Sequenzen an ihren Enden mit Schnittstellen flankieren, die das Einbringen der DNA-Sequenz in die MCS (*multiple cloning site*) des Zielvektors ermöglichen. Im Rahmen der Arbeit werden zwei unterschiedliche Sequenzabschnitte des humanen, zellulären Prion-Proteins (PrP<sup>C</sup>) amplifiziert und mit Restriktionsschnittstellen für die Endonukleasen *SgfI* und *PmeI* flankiert. Tabelle 2.12 zeigt die PCR-Bedingungen im Eppendorf MyCycler Thermo.

Reaktionsansatz (20  $\mu$ l Volumen)

x $\mu$ l	Plasmid-Midi DNA (~50 ng)
2 $\mu$ l	10x Polymerase Puffer (+ MgCl <sub>2</sub> )
1 $\mu$ l	dNTP-Mix (20 mM)
1 $\mu$ l	Primer (vorwärts) (10 pMol/ $\mu$ l)
1 $\mu$ l	Primer (rückwärts) (10 pMol/ $\mu$ l)
0.5 $\mu$ l	<i>Hifi</i> -Polymerase
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ad. 20 $\mu$ l

**Tab. 2.12: PCR-Bedingungen.**

<i>Ablauf</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeitdauer</i>	<i>Zyklenzahl</i>
Heißstart	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	35
Annealing	50 – 55 °C	30 sek	35
Elongation	72 °C	1 min	35
Finale Elong.	72 °C	10 min	1
Stop	4 °C	unendlich	1

Abhängig des zu amplifizierenden Genabschnitts (PrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 oder PrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT) in der PCR und der eingesetzten Primerpaare werden die Reaktionsparameter des Reaktionsansatzes hinsichtlich eingesetzter Mg<sup>2+</sup>-Konzentration und Annealing-Temperatur optimiert. Die experimentell ermittelten MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen und Annealing-Temperaturen zu den unterschiedlichen Primerpaaren sind in Tab. 2.8 aufgelistet.

**2.2.5.3 Aufreinigungen von PCR-Produkten**

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus den PCR-Reaktionen wird das „Wizard® PCR Prep DNA Purification System“ (Promega) verwendet. Bei dieser Methode absorbieren Nukleinsäuren ab einer Größe von ca. 100 bp in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze und bei einem pH-Wert <7.5 an das Säulenmaterial, während unerwünschte Rückstände aus den PCR Reaktionen, wie z.B. Oligonukleotide und Enzyme oder Salze abzentrifugiert werden können. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der DNA-Konzentration können die PCR-Produkte zur Ligation eingesetzt werden.

- *Reagenzien:*

Alle benötigte Reagenzien sind im „Wizard® PCR Prep DNA Purification System“ der Firma Promega enthalten.

- *Durchführung:* Nach Herstellerangaben.

#### 2.2.5.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation wird die verdaut und aufgereinigte Insert-DNA (PCR-Produkt) zusammen mit dem linearisierten N-terminalen Zielvektor in Anwesenheit einer Ligase inkubiert. Komplementäre Enden von Insert-DNA und Vektor-DNA, die durch den Restriktionsverdau entstanden sind, lagern sich aneinander. Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert in Gegenwart von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen unmittelbar benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA. Am Ende des Prozesses liegen Vektor-DNA und Insert-DNA als einzelnes, ringförmiges Plasmid vor.

- *Puffer und Reagenzien:*

Das Flexi® System Entry Kit enthält alle notwendigen Puffer und Enzyme

- *Durchführung:*

#### Restriktionsverdau der PCR Produkte und Akzeptorvektor (pFN18A)

Um PCR-Produkte gerichtet in den Vektor zu klonieren, werden zunächst Insert- und Vektor-DNA in getrennten Reaktionsansätzen mit *SgfI* und *PmeI* bei 37 °C für 30 min verdaut. Die Konzentration der PCR-Produkte wird zuvor photometrisch bestimmt (s. 2.2.3).

#### Reaktionsansatz (Insert-DNA)

- 4 µl 5x Flexi® Puffer
- x µl PCR-Produkt (~200 ng)
- 4 µl Flexi® *SgfI/PmeI* Mix
- Nuklease-freies H<sub>2</sub>O ad. 20 µl

---

Σ: 20 µl

#### Reaktionsansatz (Vektor-DNA)

- 4 µl 5x Flexi® Puffer
- 2 µl Vektor-DNA (~200 ng)
- 2 µl Flexi® *SgfI/PmeI* Mix
- 12 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O

---

Σ: 20 µl

### Vorbehandlung der Vektor-DNA

Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wird die Vektor-DNA nach dem Verdau für 20 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert und anschließend über eine Säule aufgereinigt (s. **2.2.5.3**).

### Vorbehandlung der Insert-DNA zur Ligation

Nach dem Restriktionsverdau wird die Insert-DNA über eine Säule aufgereinigt (s. **2.2.5.3**).

### Ligation von Insert- und Vektor-DNA

Der Ligationsansatz in dieser Arbeit besteht aus:

#### Ligationsansatz (20 µl Volumen)

- 5 µl Vektor-DNA (~50 ng)
- 10 µl 2x Ligase Puffer
- 1 µl T4 DNA Ligase (20 u/µl)
- x µl Insert-DNA (x ng)\*
- Nuklease-freies H<sub>2</sub>O ad. 20 µl

\*Die PrP<sup>c</sup>Δ1-22-Insert-DNA (721 bp, nach *Sgf1/Pme1* Doppelverdau) wird nach Herstellerempfehlung (~100 ng) in die Ligation eingesetzt. Die PrP<sup>c</sup>ΔNT DNA (439 bp nach *Sgf1/Pme1* Doppelverdau; ~50ng in Ligation) wird in einem molaren Verhältnis von 1:10 (Vektor-DNA zu Insert-DNA) eingesetzt. Das molare Verhältnis berechnet sich nach Gleichung **(2)**:

$$\text{Größe von Insert (kb)} / \text{Größe von Vektor (kb)} \times \text{ng Vektor} = \text{ng Insert} \quad \mathbf{(2)}$$

Das Ergebnis dieser Gleichung repräsentiert die notwendige Menge an Insert-DNA in ng, die bei der Ligation eingesetzt werden muss, damit ein molares Verhältnis von 1:1 (Vektor zu Insert) in der Reaktion vorliegt.

### **2.2.5.5 Transformation von Bakterienzellen**

Der Begriff Transformation bezeichnet in diesem Zusammenhang die Aufnahme von Fremd-DNA in kompetente *E. coli*-Bakterien.

### LB-Medium

s. 2.1.5

### SOC-Medium

Bacto-Trypton	20 g
Bacto-Hefeextrakt	5 g
NaCl	500 mg
1 M KCl	2 ml
2 M Glucose	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 1 l

Der pH-Wert wird mit 10 N NaOH auf 7,0 eingestellt; nach dem Autoklavieren wird Glucose zugeben.

Zur Transformation werden 100 µl Aliquots der chemokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit der Hälfte eines Ligationsansatzes (5 µl) bzw. mit 1 ng Plasmid-DNA vermischt. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten. Nach Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C in einem Wasserbad, werden 250 µl vorgewärmtes SOC-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 195 rpm inkubiert. Hierbei vermehren sich die Bakterien und das Resistenzplasmid kann regenerieren. Die transformierten Bakterien werden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Plasmid-DNA der angewachsenen Kolonien kann am Folgetag durch Restriktionsanalyse und Auftrennung der Restriktionsfragmente auf einem Agarosegel kontrolliert werden.

### **2.2.5.6 Restriktionsanalysen von Plasmid-DNA**

Ligationen, Transformationen und Subklonierungen von DNA-Sequenzen werden durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen überprüft. Nach Isolation der zu testenden Plasmid-DNA wird diese mit Restriktionsenzymen verdaut. Die Restriktionsenzyme erlauben aufgrund ihrer spezifischen Schnittmuster Rückschlüsse auf den Erfolg einer Transformation. Restriktionsfragmente werden auf einem 1 %igem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Bandenmuster werden nach Anfärbung mit EtBr unter UV-Licht analysiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert. Restriktionsenzyme werden nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.5.7 Transfer proteincodierender Sequenzabschnitte

Der Transfer von PrP<sup>C</sup>-Sequenzabschnitten zwischen dem N-terminalen (pFN18A) und C-terminalen Flexi<sup>®</sup>-Vektorsystem (pFC20K) wird nach Herstellerempfehlung durchgeführt. Die Verwendung des C-terminalen Vektors erlaubt die Expression von Fusionsproteinen, die das HaloTag<sup>®</sup> an ihrem C-terminalen Ende tragen.

### 2.2.5.8 Sequenzierung von Plasmiden

Die Kontrolle der Insert-DNA fand durch Restriktionsanalyse statt. Um Mutationen und Verschiebungen im Leseraster der proteincodierenden Sequenzen auszuschließen, wurde die Plasmid-DNA im Midi-Maßstab aus den zuvor positiv getesteten Kulturen isoliert und sequenziert. Die Sequenzierungsreaktionen wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) durchgeführt.

### 2.2.6 Expression der Fusionsproteine

Fusionsproteine werden in *E. coli* Tuner<sup>™</sup> (DE3) exprimiert. Für die Expression von Genen und deren Kontrolle wird in dieser Arbeit nur das C-terminale Vektorsystem pFC20K verwendet. Dieser Vektor besitzt sowohl die strukturellen Voraussetzungen für die Klonierung und die Vermehrung der rekombinanten DNA (Polylinker, Markergen für die Selektion, Replikationsorigin) als auch für die Translation der aktiven mRNA in das gewünschte Protein. Um eine möglichst effiziente Expression heterologer Gene in *E. coli* zu gewährleisten, ist zu berücksichtigen, dass die Initiation der Transkription von speziellen RNA-Polymerasebindungsstellen (Promotoren) gesteuert wird und die Translation von geeigneten ribosomalen Bindungsstellen (Shine-Dalgarno-Sequenz) abhängt. Bei dem verwendeten Vektorsystem kann die Expression der PrP<sup>C</sup>-Fusionsproteine durch eine Anreicherung des LB-Flüssigmediums mit IPTG erreicht werden. Bei Translationsfusionen stammen die notwendigen 5'- und 3'-Kontrollsignale inklusive des Startcodons und eventuell ein Teil der N-terminalen Bereiche des zu bildenden Proteins vom Vektor. Das vom heterologen Gen codierte Protein wird als Hybridprotein exprimiert.

### Expression von N- und C-terminalen HaloTag®-Fusionsproteinen

Zur Expression von HaloTag®-Fusionsproteinen wurde die proteincodierende Sequenz in das entsprechende Flexi®-Vektorsystem inkloniert. Die Expression der Fusionsproteine steht unter der Kontrolle eines T7-RNA-Polymerase-Promotors und findet nach Transformation der Plasmid-DNA im *E. coli*-Expressionsstamm Tuner™ (DE3) statt. Die Induktion der Expression erfolgt durch eine Anreicherung des Mediums mit IPTG bei einer definierten Bakteriendichte.

- *Medien und Lösungen*

LB-Medium (+ Antibiotikum) (s. **2.1.5**)

100 mM IPTG-Stammlösung (s. **2.1.6**)

- *Durchführung*

Bakterienkulturen, die durch Restriktionsverdau der Plasmid-DNA positiv auf das Vorhandensein des Inserts getestet werden konnten, werden zum Animpfen der 2,5 ml Vorkulturen im LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotikum verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 195 rpm im Schüttelinkubator unter aeroben Bedingungen, wird am nächsten Tag die Hauptkultur (25 ml) inokuliert. Das Bakterienwachstum wird in regelmäßigen Abständen über Bestimmung der OD<sub>600</sub> photometrisch verfolgt. Die Expression der Zielproteine erfolgt unter folgenden Bedingungen (Tab. 2.13)

**Tab. 2.13: Expressionsbedingungen der HaloTag®-Fusionsproteine.**

<b>Plasmid</b>	<b>Expressionsstamm</b>	<b>OD<sub>600</sub></b>	<b>IPTG-Konzentration</b>	<b>Dauer der Expression</b>
pFN18A	<i>E. coli</i> Tuner™	0,5	1 mM	4,5 h
pFC20K	<i>E. coli</i> Tuner™	0,5	1 mM	4,5 h

Vor Induktion mit IPTG wird ein 5 ml Aliquot entnommen und pelletiert. Die Expression erfolgt bei 37 °C und 195 rpm im Schüttelinkubator. Die Bakterienkulturen werden nach der Expression durch Zentrifugation (5000 x g, 4 °C) in einer Kühlzentrifuge pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Pellets werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur Erfolgskontrolle der Expression werden die PrP<sup>C</sup>-Fusionsproteine nach Zellaufschluss mit dem Alexa Fluor® 488 Reporterfluorophor gekoppelt und nach Auftrennung auf 4-12 % Novex® Bis-Tris Gelen am Typhoon Imager detektiert (s. **2.2.9.2.1**).

## 2.2.7      **Aufschluss von Bakterienzellen durch Ultraschall**

Mikroorganismen müssen zur Ernte des exprimierten Proteins aufgebrochen werden. Ultraschall mit hoher Amplitude ist sehr energiereich und führt in Flüssigkeiten zur Bildung von Bläschen. Diese werden zunächst größer, bevor sie schließlich implodieren. Die Membranen und Zellwände von Bakterienzellen zerreißen aufgrund der entstehenden raschen Druckänderungen in der beschallten Flüssigkeit. Bei dieser Methode werden die Proben permanent auf Eis gelagert um einer Denaturierung der Proteine durch die freigesetzte Wärme entgegenzuwirken. Die Zugabe von Protease-Inhibitoren wirkt der proteolytischen Degeneration von Proteinen durch freigesetzte endogene Hydrolasen entgegen.

- *Puffer:*

### PBS

KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM
NaCl	137 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10,1 mM

*sonstiges:* Protease-Inhibitor (Roche)

- *Durchführung:*

Der Zellaufschluss erfolgt bei einer Amplitude von 60 %. Die auf Eis gelagerten Zellen werden in kleinen Volumina (bis 400 µl) für 2 x 5 Sekunden sonifiziert. Für größere Volumina wird die Sonifizierungszeit bei gleicher Amplitude auf 3 x 15 Sekunden erhöht. Bei Zellaufschluss in 5x SDS-Puffer wird auf die Verwendung von Proteaseinhibitoren verzichtet. Bei Zellaufschluss in physiologischen Lösungen wie z.B. bei PBS wurde vor der Sonifizierung ein Gemisch von Protease-Inhibitoren (Roche) nach Herstellerangaben zugefügt.

## 2.2.8. Arbeit mit humanem Hirngewebe

### 2.2.8.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

Tiefgefrorenes Gewebe (frontaler Kortex) von 15 Alzheimer Patienten (Altersspanne 70 – 88 Jahre; Durchschnittsalter 79,9 Jahre; SD 7,3 Jahre) und 10 Kontroll-Patienten, die bis zum Zeitpunkt des Todes keine klinischen Zeichen einer Demenz zeigten (Altersspanne 56 – 75 Jahre; Durchschnittsalter 66,4 Jahre; SD 5,1 Jahre) sind aus dem neuropathologischen Archiv des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf ausgewählt worden (Tab. 2.14). Die Alzheimer-Erkrankung wurde zu Lebzeiten der Patienten klinisch bestätigt. Die endgültige, neuropathologische *post mortem*-Diagnose der Erkrankung erfolgte nach Anwendung der CERAD-Richtlinien. Die Verwendung von patientenbezogenen Daten und des Gewebes entsprachen den Bestimmungen und ethischen Voraussetzungen des Klinikums. Schriftliche Bewilligungen der Patienten oder Angehörigen zur Verwendung der Proben lagen vor.

**Tab. 2.14: Demographische und klinische Daten.**

Alzheimer	Todesalter	Geschlecht	CERAD	Braak	ApoE Genotyp	Prnp M129V
1	79	M	B	V	E3/E4	MM
2	85	F	C	VI	E3/E4	MM
3	83	M	C	V	E4/E4	MV
4	83	F	B	III	E3/E4	MV
5	81	M	B	III	E2/E3	MV
6	88	F	B	IV	E3/E4	MM
7	80	F	C	III	E3/E4	MM
8	74	M	C	I	E3/E3	MV
9	82	M	B	IV	E3/E3	VV
10	68	M	C	II	E3/E4	MM
11	85	F	C	IV	E3/E3	MM
12	80	F	C	V	E3/E4	MV
13	63	M	C	IV-V	E3/E3	MM
14	88	M	C	IV-V	E3/E4	MV
15	70	F	C	IV-V	E3/E4	MV
<b>AM (SD) oder %</b>	79.9 ± 7.3	F = 46.6	C = 66.6	IV-VI = 60	E4 = 66.6	MM = 46.7 VV = 6.6 MV = 46.7
Kontrollen	Todesalter	Geschlecht	CERAD	Braak	ApoE Genotyp	Prnp M129V
A	75	F	0	0	E3/E3	MV
B	61	M	0	0	E3/E4	VV
C	68	M	0	0	E2/E3	MV
D	69	F	0	0	E3/E3	MM
E	56	M	0	0	E3/E3	MM
F	65	M	0	I-II	E3/E3	MM
G	70	M	A	I	E3/E3	MV
H	68	M	0	0	E3/E3	MV
I	66	M	0	0	E2/E3	MM
J	66	F	0	0	E3/E3	VV
<b>AM (SD) oder %</b>	66.4 ± 5.1	F = 30	C = 0	IV-VI = 0	E4 = 10	MM = 40 VV = 20 MV = 40

CERAD = Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; F = weiblich (*female*); M = männlich (*male*).  
AM=Arithmetisches Mittel, SD=Standardabweichung (*Standard Deviation*).

## 2.2.8.2 Herstellung von Hirnhomogenaten

Die Vorbereitung der Homogenate für SEC-Experimente unterscheidet sich geringfügig von der Standardmethode und ist in Abschnitt 2.2.8.2.1 erläutert.

- *Puffer und Reagenzien:*

### Lysepuffer (pH 7,4)

Tris-Base	10 mM
NaCL	150 mM
EDTA	5 mM
NP40	0,5 %
Deoxycholate	0,5 %
Protease Inhibitor Mix (Roche)	

- *Durchführung:*

Alle Arbeitsschritte werden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wird die graue von der weißen Substanz getrennt. 250 mg der grauen Substanz werden abgewogen und in einem Volumen von 1 ml Lysepuffer aufgenommen. Die Homogenisierung des Hirngewebes wurde durch 25 Schläge mit einem Dounce-Homogenisator erreicht. Im Anschluss werden die Homogenate für 30 min auf Eis inkubiert. Um zellulären Debris und verbleibende weiße Substanz im Homogenat zu entfernen, wird das Homogenat bei 7.500 x g für 10 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand (S1-Fraktion, Totalhomogenat) wird in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Ultrazentrifugation der S1-Fraktion bei 100.000 x g für 60 min wird der Überstand (S2-Fraktion, Detergenz-lösliche Fraktion) in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt. Das verbleibende Pellet (P2-Fraktion, Detergenz-unlösliche Fraktion) wird 2x mit einem Volumen von 0,5 ml Lysepuffer vorsichtig gewaschen, um verbleibende Proteine der S2-Fraktion auf dem Pellet zu entfernen. Im Anschluss wird das Pellet in 1 ml Lysepuffer (+Proteaseinhibitor) resuspendiert. Die unterschiedlichen Fraktionen werden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.8.2.1 Präparationen von Hirnhomogenaten für SEC-Experimente

S1-Fractionen (in 1 ml Lysepuffer) von AD und Kontrollpatienten werden wie in Abschnitt 2.2.8.2 beschrieben hergestellt. Dem Homogenat wird 1 ml einer 2 %igen

N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz-Lösung in H<sub>2</sub>O (Sarkosyl, Fluka) beigemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Herstellung von S2- und P2-Fractionen durch Ultrazentrifugation erfolgt wie beschrieben. P2 wird in 0,5 ml Lysepuffer mit 0,5 ml 2 %iger Sarkosyl-Lösung resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung in SEC-Experimenten werden die Proben bei -80 °C gelagert.

### **2.2.8.3 Immunohistochemie (IHC)**

Gehirne werden in 4 % Formalin fixiert. In Paraffin eingebettete Gewebeproben aus dem frontalen Kortex werden in Serienschnitten mit einer Dicke von 3 µm geschnitten und auf einen Glasobjektträger aufgezogen. Die Proben werden gemäß publizierter Protokolle weiterverarbeitet (Glatzel *et al.*, 2003). Die immunohistochemische Färbung von Amyloid-β erfolgt durch die Verwendung von 6E10 (1:100, DBS Emergo) (Weidemann *et al.*, 1989). Zur Färbung von neurofibrillären Bündeln wird der AK Tau in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt (Thermo). Die Visualisierung der Primärantikörper erfolgt über die Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Methode gemäß den Herstellerangaben (Ventana/ Roche). Die Quantifizierung entsprechender Immunosignale erfolgt gemäß publizierter Protokolle (Sepulveda-Falla *et al.*, 2011). Zur Quantifizierung von diffusen bzw. neuritischen Aβ-Plaques und neurofibrillären Bündeln wird an einem Zeiss DMD 108 Mikroskop die Anzahl positiver Signale (Plaque, Bündel) in einem repräsentativen Abschnitt der Probe (min. 1 mm<sup>2</sup>) ausgezählt. Zur Quantifizierung immunopositiver Areale (Amyloid-β, Tau) werden 15 zufällig ausgewählte Regionen (0,2 mm) mit einem Zeiss Axiovert S100 Mikroskop dokumentiert. Die Quantifizierung erfolgt mit der Axiovert-Software.

### **2.2.8.4 Polymorphismen**

Zur Bestimmung der Polymorphismen wird die genomische DNA aus tiefgefrorenen Gewebeproben des Frontalkortex von Alzheimer- und Kontrollpatienten mit Hilfe des DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Bestimmung des *PRNP*-Codon129 sowie der ApoE-Status der Alzheimer- und Kontrollpatienten erfolgt nach publizierten Protokollen (Debatin *et al.*, 2008) in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum für die Surveillance Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien der Universität Göttingen.

### 2.2.8.5 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

In dieser Arbeit soll mittels Co-IP die PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion *in vivo* untersucht werden. Die Co-IP ist eine biochemische Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Ein Antikörper liegt gekoppelt an einer stationären Phase vor und kann in der zu testenden Lösung spezifisch sein Antigen erkennen und binden. Das Antigen kann mit seinen Interaktionspartnern (Co-Präzipitate) aus der Lösung präzipitiert und analysiert werden.

- *Puffer und Reagenzien:*

Lysepuffer (siehe **2.2.8.2**)

5x SDS Probenpuffer (s. **2.2.9.5**)

- *Durchführung:*

Co-Immunopräzipitationen werden an P2-Fractionen (s. **2.2.8.2**) von AD- und Kontrollpatienten unter Verwendung des PrP<sup>C</sup>-spezifischen Antikörpers 3F4 (Covance) durchgeführt. Als stationäre Phase dient Protein G-Sepharose (GE Healthcare). Um unspezifische Interaktionen von Proteinen mit den Protein G-Sepharose-Beads zu minimieren wird ein *Precleaning* der Homogenate durchgeführt. Dazu werden 50  $\mu$ l Beads für 1 Minute bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Beads im gleichen Volumen Lysepuffer aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend werden zu 500  $\mu$ l der P2-Fractionen jeweils 50  $\mu$ l der Beads zugegeben. Nach Inkubation für 1 h bei 4 °C auf einem Rotator wird der *Precleaning*-Ansatz wie zuvor beschrieben zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 3F4 (1:250 Verdünnung) werden P2-Fractionen bei 4 °C über Nacht unter Rotation inkubiert. Am Folgetag wird eine ausreichende Menge an Beads in Lysepuffer wie oben beschrieben vorbereitet. Je 50  $\mu$ l werden zu den P2-Fractionen gegeben und für 60 min auf dem Rotator inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1000 x g für 1 min bei 4 °C wird der Überstand verworfen und die Beads in 25  $\mu$ l 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min gekocht. Die Proben werden auf Gradientengelen aufgetrennt (s. **2.2.9.5**) und in Western-Blot-Analysen mit 6E10 für positive A $\beta$ -Signale getestet (s. **2.2.9.7**).

### 2.2.8.6 Amyloid- $\beta$ 40 und Amyloid- $\beta$ 42 ELISA

Die Sandwich ELISA-Kits zur Bestimmung der A $\beta$ 40- und A $\beta$ 42-Konzentration in S2- und P2-Fraktionen (s. 2.2.8.2) von AD- und Kontrollpatienten werden von der Firma Invitrogen bezogen. Im Vorfeld wird die Proteinmenge in den Fraktionen der Patientenproben bestimmt (s. 2.2.9.8).

- *Durchführung:* nach Herstellerangabe

### 2.2.8.7 PrP<sup>C</sup>-ELISA

Um den relativen Gehalt an zellulärem Prion-Protein in den S2- und P2-Fraktionen (s. 2.2.8.2) der Patientenkohorte zu bestimmen wird das PrP<sup>C</sup>-ELISA-Kit von SPI-Bio nach Herstellerangaben verwendet. Im Vorfeld wird die Proteinmenge in den Fraktionen der Patienten bestimmt (s. 2.2.9.8).

- *Durchführung:* nach Herstellerangaben

## 2.2.9 APIA

### 2.2.9.1 Präparation der synthetischen A $\beta$ 42 (sA $\beta$ 42)-Peptide

Für die Präparation der sA $\beta$ 42-Spezies wird lyophilisiertes Pulver in 1mg Aliquots von GenicBio verwendet. Da es bei der Peptidsynthese und Handhabung der Peptide vor der Lyophilisierung bereits zu unterschiedlich starker Aggregation des Peptids kommen kann, ist es wichtig, dass sA $\beta$ 42 bei jedem Experiment die gleichen Eigenschaften zeigt. Die Zerstörung der A $\beta$ 42-Aggregate wird durch Resuspendierung des lyophilisierten A $\beta$ 42-Peptids in einem Volumen von 1 ml Hexafluoroisopropanol (HFIP) erreicht. Anschließend erfolgt Inkubation auf einem Schüttler für 1.5 h auf maximaler Stufe bei 4°C. Es folgt eine Ultraschallbehandlung der A $\beta$ 42-Peptide auf Eis für 3 x 10 sek bei einer Amplitude von 50% mit 30 sek. Pause zwischen den einzelnen Sonifizierungsschritten. Anschließend wird das Lösemittel vollständig in einer Speed Vac verdampft. Die gefriergetrockneten Peptidfilme werden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Wird monomeres sA $\beta$ 42 in Versuchen benötigt, so wird der Peptidfilm in einer

Endkonzentration von 10 nM mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> mit 0,1 % NH<sub>4</sub> resuspendiert. Mittels Zentrifugation bei 16.000 x g für 15 min bei 4 °C werden verbleibende Aggregate in der Lösung entfernt. Werden sAβ42-Oligomere benötigt, so wird der Peptidfilm in einer Endkonzentration von 1 mg/ml in PBS + 0,1 % NH<sub>4</sub> resuspendiert und für 12 h bei RT inkubiert.

### 2.2.9.2 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Bei der IPTG-induzierten Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* unter Verwendung der Flexi®-Plasmide entstehen abhängig vom verwendeten Vektorsystem, N- oder C-Terminal-getaggte Fusionsproteine. Das an die exprimierten Proteine fusionierte HaloTag® kann kovalent an verschiedene HaloTag®-Liganden gekoppelt werden. In dieser Arbeit wird der Alexa Fluor® 488 Fluoreszenz-Farbstoff als Ligand verwendet. Die Bindung von HaloTag® und Alexa Fluor® 488 ist spezifisch, kovalent und unter denaturierenden Bedingungen wie in der SDS-PAGE stabil.

- *Puffer und Reagenzien:*

#### PBS

s. 2.2.7

#### Alexa Fluor® 488-Ligand (Promega)

Stammlösung: 1 mM

Arbeitslösung: 5 µM

#### sonstiges

Protease-Inhibitor (Roche)

- *Durchführung:*

5 ml-Aliquots der nach Induktion pelletierten Bakterienkulturen werden in 100 µl PBS resuspendiert und mit Protease-Inhibitor (Roche) gemäß Herstellerempfehlung versetzt. Nach Zellaufschluss (s. 2.2.7) erfolgt die Kopplung des Fusionsproteins an den Alexa Fluor® 488- Liganden. Zunächst wird die 1 mM Alexa Fluor® 488-Stammlösung mit PBS im Verhältnis 1:200 verdünnt. Die 100 µl Aliquots der aufgeschlossenen Bakterienlysate werden mit 7 µM Alexa Fluor® 488 versetzt und

durch anschnipsen des lichtgeschützten Eppendorf-Gefäßes durchmischt. Die gemeinsame Inkubation findet bei 4 °C über Nacht statt. Die Kontrolle der erfolgreichen Kopplung erfolgt nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel durch Detektion einer spezifischen, fluoreszierenden Proteinbande am Typhoon-Fluoreszenz-Imager (s. 2.2.9.2.1).

#### **2.2.9.2.1 Nachweis und Detektion fluoreszenzmarkierter Fusionsproteine**

Der Erfolg der Kopplung des Alexa Fluor® 488-Liganden an die Fusionsproteine erfolgt nach Auftrennung der Proteine in 4-12 % Bis-Tris Gradientengelen (s. 2.2.11) durch Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm an einem Laserscanner (Typhoon™ 9210, Amersham). Um ein Ausbleichen des Fluorophors zu vermeiden, wird die Gelelektrophoresekammer für die Dauer der Proteinauftrennung mit Alufolie abgedunkelt.

- *Durchführung:*

Die bei 4 °C gelagerten und an den Liganden gekoppelten Fusionsproteine werden durch Anschnipsen des Eppendorf-Reaktionsgefäßes vollständig in Lösung gebracht. 10 µl des Proteinlysates werden in ein UV-geschütztes 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 15 µl 5x SDS-Probenpuffer und Denaturierung der Proteine für 3 Minuten bei 95 °C werden 10 µl Aliquots zur Auftrennung in der SDS-PAGE eingesetzt. Nach Auftrennung der Proteine erfolgt die Detektion fluoreszierender Banden am Typhoon-Fluoreszenz-Imager.

#### **2.2.9.3 Dot-Blot-Analysen**

Die Dot-Blot-Analyse ist eine einfache und schnelle molekularbiologische Methode zur Analyse von Proteinen oder Nukleinsäuren. Im Unterschied zur Western-Blot-Analyse müssen die Proteingemische nicht in der SDS-PAGE aufgetrennt werden. Die zu testenden Proben werden bei der Dot-Blot-Analyse an einer Membran immobilisiert und mit geeigneten Antikörpern untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden unterschiedliche Präparationen des sAβ42 im Dot-Blot-Assay kontrolliert. Zusätzlich wird ein neuartiger, modifizierter Dot-Blot-Assay etabliert, der es ermöglicht die PrP<sup>C</sup>-Aβ-Interaktion durch die Verwendung von fluoreszierenden rPrP<sup>C</sup>-Reporter-molekülen quantitativ und semi-qualitativ zu erfassen.

- *Lösungen und Reagenzien:*

#### 1x TBS

Tris                                20 mM

NaCl                                500 mM

pH von 7,5 mit HCl einstellen

#### TBS-T

1x TBS mit 0,05 % Tween20

#### Blockierlösung

1x TBS-T mit 5 % Magermilchpulver

#### Inkubationslösung

1x TBS-T mit 5 % Magermilchpulver

#### Waschlösung:

1x TBS-T bzw. 1x TBS

- *Durchführung:*

#### *Dot-Blot Analyse von sA $\beta$ 42-Präparationen*

Das sA $\beta$ 42 wird wie in **2.2.9.1** beschrieben hergestellt. Je 500 ng (in 100  $\mu$ l PBS) der monomeren- und oligomerisierten Peptide werden mit der 96 Well Dot-Blot-Apparatur (Roth) durch Vakuum an einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Dazu werden 100  $\mu$ l in die Wells der Dot-Blot Apparatur gegeben und nach kurzer Inkubationszeit von 10 min mit Hilfe eines Vakuums von 600 mBar abgesaugt. Anschließend werden durch 60 min Inkubation der Membran in Blockierlösung freie Bindestellen abgesättigt. Es folgen drei Waschschrte zu je 5 min mit TBS-T. Zur Analyse der Peptide wird der oligomer-spezifische Antikörper A11 (1:1000, Invitrogen) verwendet.

#### *APIA im Dot-Blot-Format*

Im Dot-Blot-Overlay-Assay können intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen nachgewiesen werden. Die an der Membran immobilisierten Proteine werden zusammen mit einem (meist durch radioaktive Isotope) markierten

Interaktionspartner in den Wells der Dot-Blot-Apparatur inkubiert. Auch nach exzessivem Waschen der Membran nach der gemeinsamen Inkubation, ist im Fall einer Interaktion das Signal auch weiterhin detektierbar und bestätigt die Interaktion. In dieser Arbeit wird Alexa Fluor® 488 (Promega) an rekombinant-exprimiertes PrP<sup>C</sup> gekoppelt und als Sonde zum Nachweis der Bindung an A $\beta$ -Oligomere verwendet. Nach Expression der Fusionsproteine (s. **2.2.6**) und Zellaufschluss der Bakterien (s. **2.2.7**) erfolgt die Kopplung von PrP<sup>C</sup> an den Alexa Fluor® 488-Liganden (s. **2.2.9.2**). Der Erfolg der Kopplung wird nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE am Typhoon-Laserscanner (Amersham) bestätigt (s. **2.2.9.7**). Die detektierten Emissionswerte bei einer Wellenlänge von 514 nm werden zur Normierung der beiden Sonden verwendet. Die fluoreszierenden Prion-Sonden werden mit sA $\beta$ 42 und humanen P2-Fraktionen (s. **2.2.8.2**; **2.2.9.1**) getestet. Waschschritte sowie die Inkubation der Sonde mit dem immobilisierten Bindepartner können entweder in den *wells* der Dot-Blot-Maschine selbst oder in geeigneten Behältern bzw. in Folientaschen durchgeführt werden. Um saubere Spots zu erhalten, empfiehlt sich die Durchführung der Arbeitsschritte in den *wells* der Dot-Blot-Apparatur. Nach Zusammenbau (96 well Dot-Blot-Apparatur, Roth) wird die zu untersuchende Probe durch Vakuum auf die Membran überführt. Der Transfer kann durch Färbung der Membran mit Ponceau-Rot überprüft werden. Anschließend werden freie Bindungsstellen durch Inkubation der Membran mit Blockierlösung für 60 min blockiert. Es folgt ein Waschschritt für 5 min in 1x TBS-T, bevor die Membran mit der fluoreszenzmarkierten Sonde für die Dauer von 30-45 min inkubiert wird. Um den Photobleaching-Effekt des Fluorophors zu vermeiden erfolgt die Inkubation mit der Sonde im Dunkeln. Vor Analyse der Membran am Typhoon-Fluoreszenz-Scanner wird die Membran für 3 x 5 min in TBS-T und für 1 x 10 min in TBS gewaschen. Der letzte Waschschritt entfernt das an der Membran verbleibende Tween20.

#### **2.2.9.4 APiA mit immobilisierten rPrP<sup>C</sup>**

Wie bereits unter Punkt 2.2.13 konnte das rekombinant exprimierte PrP<sup>C</sup> über den HaloTag® an unterschiedliche Liganden gekoppelt werden, die unterschiedliche *downstream*-Applikationen zur Analyse der Protein-Protein-Interaktion erlauben. In dieser Abwandlung des Bindeassays, werden beide Formen des humanen rPrP<sup>C</sup> über das C-Terminal fusionierte Tag an einer stationären Phase immobilisiert und nach gemeinsamer Inkubation mit synthetischen- oder humanen A $\beta$ -Oligomeren im Western Blot analysiert. Da die Menge an exprimierten rPrP<sup>C</sup> sehr stark schwankte, wurde das vom Hersteller vorgeschlagene Protokoll modifiziert.

- *Lösungen und Reagenzien*

<u>Waschpuffer</u>		<u>Bindepuffer</u>	
Tris Base	100 mM	Tris Base	100 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
NP40	0,05 %	NP40	0,05 %
		BSA	1 mg/ml
ad. 500 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>			

sonstiges: HaloLink™ Resin (Promega)

- *Durchführung:*

Gerichtete Immobilisierung von rPrP<sup>C</sup> an der stationären Phase:

Die bei -20 °C aufbewahrten Pellets der rPrP<sup>C</sup>-Expressionskultur werden in 2,5 ml PBS (+ Proteaseinhibitor, Roche) durch vortexen in Lösung gebracht. Resuspendierte Bakterienzellen werden durch Ultraschall aufgeschlossen und auf Eis aufbewahrt. Die Vorbereitung der stationären Resin-Phase erfolgt nach Herstellerangaben. Jeweils 75 µl des geernteten Fusionsproteins werden zu 100 µl des vorbereiteten Resins gegeben und gemeinsam auf einem Rotator für 30-45 min inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 800 x g für 1 min wird der bakterielle Überstand verworfen und der Resin in 1 ml Bindepuffer gewaschen. Der gesamte Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt, damit der vorliegende Resin vollständig mit rPrP<sup>C</sup> gekoppelt ist. Die letzten drei Waschschrte werden mit jeweils 1 ml Waschpuffer durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wird der Überstand verworfen. Für anschließende Interaktionsstudien wird der Resin in 100 µl Bindepuffer aufgenommen.

Interaktionsstudien mit immobilisiertem rPrP<sup>C</sup> und sAβ-Oligomeren:

Präparationen von sAβ42 wurden wie in 2.2.9.1 beschrieben hergestellt. Zu dem immobilisierten rPrP<sup>C</sup> werden 100 nM gealtertes sAβ42 gegeben und für 60 min bei RT auf einem Rotator gemeinsam inkubiert. Anschließende Waschschrte erfolgen nach Empfehlungen des Herstellers. Die Interaktionskomplexe werden auf NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gradientengelen (Novex®) aufgetrennt und in Western-Blot-Analysen mit dem Aβ-spezifischen Antikörper 6E10 untersucht. Die sAβ42-Aggregate, die

durch Größenausschlusschromatographie aufgetrennt werden (s. **2.2.9.10**), werden nach zusammenfassen von drei benachbarten Elutionsfraktionen zu einem gemeinsamen Pool in einer Speed Vac verdampft und in 100 µl PBS resuspendiert. In APIA Experimenten werden 50 µl der A $\beta$ -Pools verwendet.

Interaktionsstudien mit immobilisierten rPrP<sup>C</sup> und humanen Proben:

Die Herstellung von S1-, S2- und P2-Fractionen ist in Abschnitt **2.2.8.2** erläutert. Zu dem am Resin immobilisierten rPrP<sup>C</sup> werden 75 µl der Homogenat-Fractionen hinzugegeben und über Nacht bei 4°C gemeinsam inkubiert. Waschschritte erfolgen nach Empfehlungen des Herstellers. Die Interaktionskomplexe werden auf NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gradientengelen (Novex®) aufgetrennt und in Western-Blot-Analysen mit dem A $\beta$ -spezifischen Antikörper 6E10 untersucht. Homogenat-Fractionen, die durch Größenausschlusschromatographie aufgetrennt werden, werden nach zusammenfassen von zwei benachbarten Elutionsfraktionen zu einem gemeinsamen Pool in einer Speed Vac verdampft und in 100 µl PBS resuspendiert. In APIA Experimenten werden 80 µl der Homogenat-Pools verwendet.

### **2.2.9.5 SDS-PAGE in 4-12 % Bis-Tris- Gradientengelen**

A $\beta$  liegt in Homogenaten und in Präparationen von sA $\beta$  in unterschiedlichen Größen vor. Vor allem die Detektion von monomerem A $\beta$  erweist sich aufgrund seiner geringen Größe (4 kDa) oft als sehr schwierig bei Auftrennung in standardmäßigen SDS-Gelen. Um den Auftrennungsbereich für A $\beta$  optimal abzudecken wurden in dieser Arbeit 4-12 % Bis-Tris-Gradientengele der Firma Novex® verwendet. In Kombination mit MES/ SDS-Laufpuffer können Proteine im Größenbereich zwischen 3,5–160 kDa aufgetrennt werden. Vor dem Auftragen der Proben in Geltaschen, werden die Proben mit der entsprechenden Menge an 5x SDS-Probenpuffer verdünnt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 200 V für 35 min in der mit Laufpuffer gefüllten Gelkammer.

- *Puffer und Reagenzien:*

<u>MES/ SDS (20x)</u>		<u>SDS-Probenpuffer (5x)</u>	
MES	1 M	Tris-HCL (pH 6,8)	10 mM
Tris Base	1 M	SDS	2 %
SDS	69,3 mM	Glycerol	10 %

EDTA	20,5 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol	5 %
Deoxycholate	0,5 %	Bromphenolblau	0,01 %

ad. 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>; pH 7,3.

### 2.2.9.6 Proteintransfer durch Western Blot

Beim Western-Blot-Verfahren (WB) werden Proteine nach ihrer Auftrennung in der SDS-PAGE durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen und mit immunochemischen Methoden detektiert (Towbin *et al.*, 1979).

- *Puffer und Reagenzien:*

#### Transferpuffer (1x)

Tris-Base	5,8 g
Glycine	2,9 g
SDS	0,37 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad. 800 ml
Methanol	200 ml

- *Durchführung:*

Nach Auftrennung der zu analysierenden Proben im Gradientengel wird das Bandenmuster der Proteine durch das Tankblot-Verfahren in einem vertikalen Puffertank auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wird 5 min in Transferpuffer aktiviert. Wird später die Detektion A $\beta$ -spezifischer Banden gewünscht, erfolgt der Transfer bei 250 mA für 70 min in den mit Transferpuffer gefüllten Tanks. Alle anderen Proteine werden unter Standardbedingungen bei 400 mA über einen Zeitraum von 60 min geblottet.

### 2.2.9.7 Detektion der Bandenmuster im Western-Blot

- *Puffer und Reagenzien:*

#### 5 % Blockierlösung (1x)

Magermilchpulver	2,5 g
Tween 20	0,05 %

TBS ad.10 ml

#### HRP-ECL Entwicklerlösungen

SuperSignal West *Pico* Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)

SuperSignal West *Femto* Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)

- *Durchführung:*

Um die Detektion von monomerem A $\beta$  an der Membran zu erleichtern, wird die Membran nach dem Blotten für 3 min in kochendem PBS inkubiert. So werden kleine Peptide an der Membran fixiert und zudem die Bindeepitope ausgerichtet. Diese werden so vom Primärantikörper besser erkannt. Die Membranen werden zur Absättigung der freien Bindestellen für 60 min in 5 % Blockierlösung inkubiert. Anschließend folgt die Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4 °C über Nacht. Tabelle 2.14 gibt einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper, entsprechende Sekundärantikörper und die eingesetzten Konzentrationen. Alle Antikörper werden zur Inkubation in 5 % Blockierlösung verdünnt. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wird die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und dann für eine Stunde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min mit TBS-T werden die beiden Entwicklerlösungen im Verhältnis 4:1 (Pico:Femto) gemischt und für 3 min auf die Membran gegeben. Detektion und Quantifizierung der Signale erfolgt an der Universal Hood II unter Verwendung der Quantity One 4.6.2 Software.

#### **2.2.9.8 Quantitative Proteinbestimmung**

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgt mit der Bicinchoninsäure-Methode (BCA) nach Pierce (Smith et. al, 1985; Wiechelmann et al., 1988). Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass die in Proteinen enthaltenen Aminosäurereste (hierbei vor allem Cystein-, Tryptophan- und Tyrosinreste) mit BCA und Cu<sup>2+</sup>-Ionen einen stabilen, violetten Farbkomplex ausbilden, der bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch detektiert werden kann.

- *Durchführung:*

Es wird das Pierce™ BCA™ Protein Assay-Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. S1-, S2- und P2-Fractionen der Gewebepuben

werden im Vorfeld 1:50 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  verdünnt. Nach Eichung mit einer Konzentrationsreihe des Albumin-Standards (Thermo Scientific) wird die Extinktion der verdünnten Homogenate bei einer Wellenlänge von 562 nm am Safire<sup>2</sup> (Tecan) gemessen.

### **2.2.9.9 Lyophilisierung von Peptid- und Homogenatfraktionen**

Die Lyophilisierung erfolgt nach der „Speed Vac“-Methode und dient der Aufkonzentrierung von Proben. In dieser Arbeit werden in der Größenausschlusschromatographie eluierte Fraktionen des synthetischen A $\beta$ 42, bzw. der Hirn-Homogenate, bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend unter hohem Vakuum in einer Speed Vac (Savant™ SPD121P, Thermo Scientific) zentrifugiert. Dabei verdampft die Flüssigkeit in der Probe vollständig und die gefriergetrockneten Peptide bzw. Proteine können in einem geeigneten Volumen an Pufferlösung resuspendiert werden.

### **2.2.9.10 Größenausschlusschromatographie (SEC)**

Die Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) ist eine Flüssigchromatographie-Methode, die Proteine aufgrund ihrer Größe bzw. ihres hydrodynamischen Radius auftrennt. Das Trennungsprinzip beruht auf der Nutzung von Säulen, die mit porösen Partikeln gepackt sind. Proteine unterschiedlicher Größe wandern so mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Säule und werden zu unterschiedlichen Zeiten eluiert. Große Proteine verlassen die Säule zuerst, kleine Proteine werden erst zu einem späteren Zeitpunkt eluiert. Sie können in die porösen Partikel eindringen und werden so länger in der Säule zurückgehalten. Durch Standardproteine mit bekanntem Molekulargewicht kann eine Kalibrierungskurve erstellt werden, die Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der unbekannt Proteine in den eluierten Fraktionen zulässt. Um Hinweise auf die Größe der Pr<sup>PC</sup>-bindenden A $\beta$ -Spezies zu erhalten, wurden Oligomer-Präparationen von sA $\beta$ 42, sowie S2- und P2-Fraktionen von AD- und Kontrollpatienten auf einer Superose TM12 10/ 300 GL Säule am Äkta-Explorer System (GE Healthcare) aufgetrennt. Eluierte Fraktionen wurden gepoolt, verdampft und via APIA (s. **2.2.9.4**) getestet. Die Kalibrierung der Säule erfolgte mit einem Mix von Proteinen bekannter Größe im Bereich von 1.3 kDa bis 670 kDa (Kalibrierungsstandard, BioRad).

### **2.2.9.10.1 SEC mit humanen Proben**

Homogenate aus **2.2.8.2.1** werden bei 10000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. 1 ml des resultierenden Überstandes wird in die Superose TM12 10/300 GL Säule injiziert. Die Proteinauftrennung erfolgt bei einer Flussrate von 0,25 ml/min. PBS + 1 % Sarkosyl wird Elutionspuffer genutzt. Eluierte Fraktionen werden in einem Volumen von 0,5 ml gesammelt. Die Detektion der Proteine findet bei einer Wellenlänge von 280 nm statt. Je drei benachbarte Fraktionen werden nach Beendigung des Laufs zu einem Pool zusammengefasst und in einer Speed Vac verdampft. Nach Resuspendieren in 0,1 ml PBS stehen die Pools für APIA-Experimente bereit (s. **2.2.9.4**).

### **2.2.9.10.2 SEC mit sA $\beta$ 42**

A $\beta$ 42-Oligomer-Präparationen werden aus **2.2.9.1** verwendet. 500  $\mu$ l der 1 mg/ml Peptidlösung werden in die Superose TM12 10/300 GL-Säule injiziert. Die Auftrennung der Peptide erfolgt bei einer Flussrate von 0,25 ml/min. PBS wird als Elutionspuffer genutzt. Eluierte Fraktionen werden in einem Volumen von 0,5 ml gesammelt. Die Detektion der Peptide findet bei einer Wellenlänge von 214 nm statt. Je drei benachbarte Fraktionen werden nach Beendigung des Laufs zu einem Pool zusammengefasst und in der Speed Vac verdampft. Nach Resuspendieren in 0,1 ml PBS stehen die Pools für APIA-Experimente bereit (s. **2.2.9.4**).

## **2.2.10 Statistik**

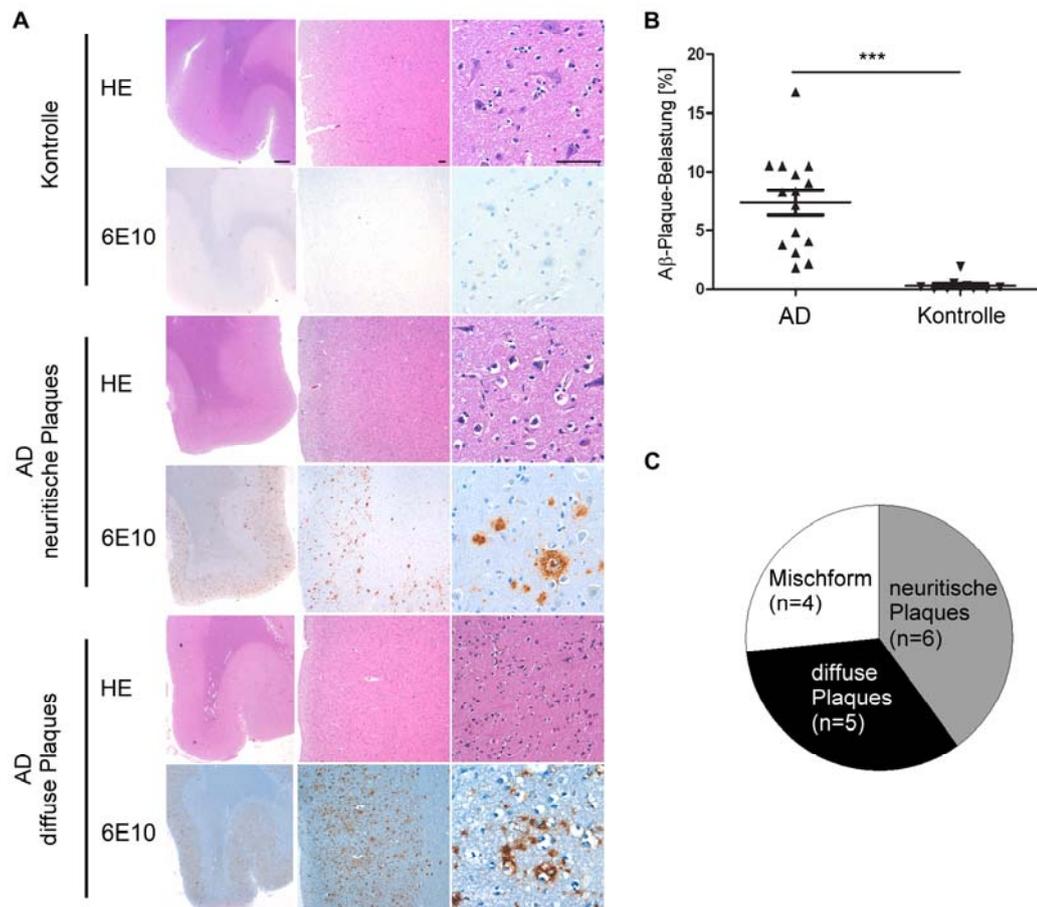
Die statistische Auswertung der Western-Blot-Analysen und der ELISA-Ergebnisse beim Vergleich der AD- und Kontrollpatienten erfolgt mit dem t-Test unter der Annahme einer statistischen Signifikanz bei P-Werten von  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,0001$  (\*\*\*). Für Dot-Blot-Analysen wird die logistische Regression berechnet, wenn Konzentrationsgradienten von sA $\beta$ 42o an der Nitrocellulosemembran immobilisiert vorliegen und mit der rPrP $\Delta$ 1-22\*\*-Sonde getestet werden.

## 3 Ergebnisse

### 3.1. *In vivo* Nachweis und Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion

#### 3.1.1 Beschreibung der Patientenkohorte

Alle Experimente und Interaktionsstudien zur PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Bindung wurden in der vorliegenden Arbeit an postmortalem Gehirngewebe des frontalen Kortex von Patienten mit diagnostizierter Alzheimer-Demenz (AD) und neuropathologisch unauffälligen Kontrollpatienten (Ktrl.) durchgeführt. Details zur Demographie und Klinik der Patientenkohorte sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Alle Patienten der Alzheimer-Gruppe [sieben weibliche, acht männliche, Durchschnittsalter: 79,2 Jahre, Standardabweichung (SD): 7,3 Jahre] zeigten typische klinische Zeichen und Symptome der Alzheimer-Erkrankung mit starken Defiziten der Gedächtnisleistung. In der Kontrollgruppe [drei weibliche, sieben männliche, Durchschnittsalter: 66,4 Jahre, SD: 5,4 Jahre] waren keine offensichtlichen Anzeichen einer Demenz dokumentiert. Beide Patientengruppen wurden neuropathologisch untersucht. Hierzu wurden Schnitte von Kryoblöcken des frontalen Kortex mit einem Antikörper gegen A $\beta$  (6E10) angefärbt und beurteilt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Menge an abgelagertem A $\beta$  in Form von extrazellulären Plaques sowie die morphologische Klassifizierung der beobachteten A $\beta$ -Plaques. Das Ergebnis der immunohistochemischen Färbung ist beispielhaft in Abbildung 3.1 dargestellt. Die vollständige Histologie der Patientenkohorte ist in der Abbildung XII.I im Anhang dokumentiert. Für die Alzheimer-Gruppe wurden CERAD- und Braak-Kriterien angewendet (Braak und Braak, 1991; Fillenbaum *et al.*, 2008). Auch wurden in beiden Gruppen genetische Risikofaktoren wie der ApoE4 und der Methionin/ Valin-Polymorphismus im Codon 129 des *PRNP*-Gens bestimmt. Wie zu erwarten, war in der Alzheimer-Gruppe ein hoher prozentualer Anteil von ApoE4-Trägern (66,6 %). Im Gegensatz dazu war lediglich bei 10 % der Kontrollpatienten das E4-Allel nachweisbar (Querfurth und LaFerla, 2010). Keine Unterschiede wurden bei der Bestimmung des *PRNP*-M129V-Polymorphismus gefunden. 46,6 % der Alzheimer- und 50 % der Kontrollgruppe waren hierbei homozygot für Methionin.



**Abb. 3.1: Histologie, Plaque-Belastung und Morphologie der Patientenkohorte.**

Kryoschnitte des frontalen Kortex von Alzheimer (AD)-Patienten und Kontrollpatienten wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) sowie dem A $\beta$ -spezifischen Antikörper 6E10 angefärbt. **A** Dargestellt sind exemplarische Beispiele der HE- und 6E10-Färbungen einer Kontrolle sowie von zwei Alzheimer-Patienten mit einer deutlich unterscheidbaren, neuritischen bzw. diffusen A $\beta$ -Plaque-Morphologie [Maßstabsbalken= 50  $\mu$ m]. **B** Quantifizierung der detektierten A $\beta$ -Plaque-Belastung bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollen (\*\*\* $p$  < 0.001). **C** Graphische Darstellung der Häufigkeit von Alzheimer-D-Patienten mit neuritischen Plaques ( $n=6$ ), diffusen Plaques ( $n=5$ ) oder Patienten mit gemischter Plaque-Pathologie ( $n=4$ ).

Die Alzheimer-Patienten zeigten eine signifikante Erhöhung von A $\beta$ -Plaques im frontalen Kortex im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beobachtete A $\beta$ -Plaques wurden entsprechend ihrer Morphologie in drei Gruppen (neuritische Plaques, diffuse Plaques und A $\beta$ -Ablagerungen mit gemischter Plaque-Morphologie) unterteilt. Bei der untersuchten Patientenkohorte zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung in der beobachteten Plaque-Morphologie.

### 3.1.2 Die PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion kann nur bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden

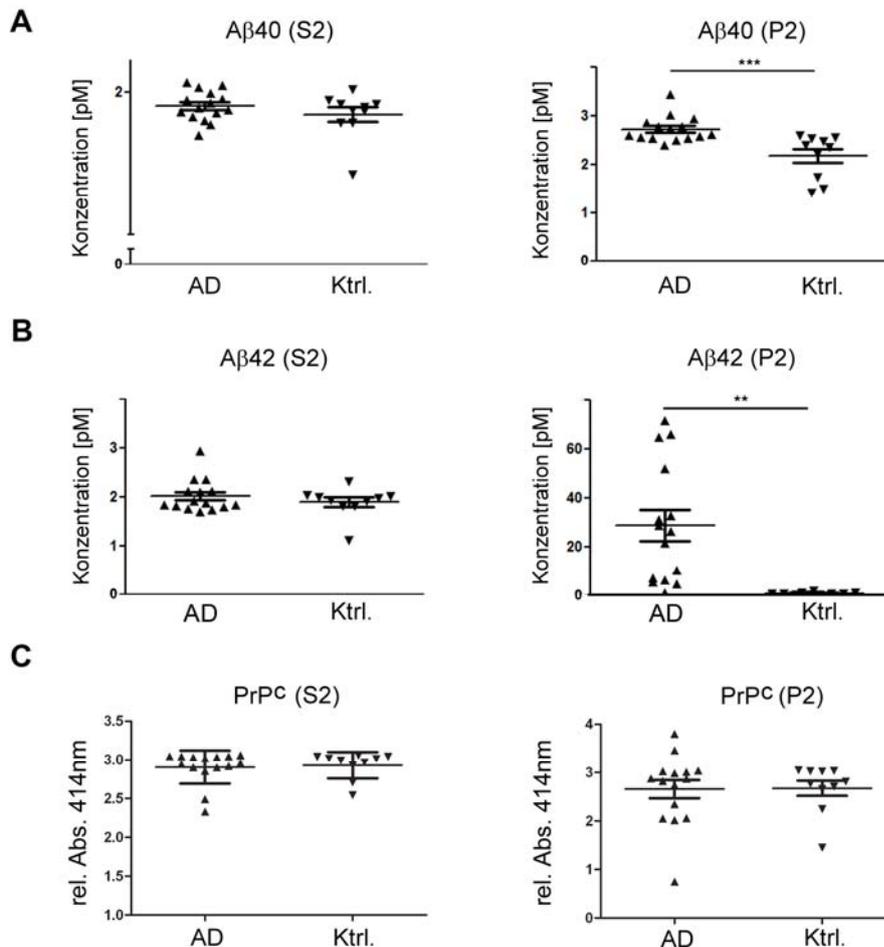
Die Mehrheit der veröffentlichten Studien zur PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion beschreibt Ergebnisse aus Arbeiten unter Verwendung von synthetischem A $\beta$ 42 (s A $\beta$ 42) in Zellkultur oder im transgenen Mausmodell der Alzheimer-Erkrankung. Demgegenüber ist bisher wenig über die Interaktion in Gehirnen von Alzheimer-Patienten bekannt (Zou *et al.*, 2011a, b; Um *et al.*, 2012). Für den Nachweis der Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und A $\beta$ -Oligomeren (A $\beta$ o) im menschlichen Gehirn wurden Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) unter Verwendung des PrP<sup>C</sup>-spezifischen Antikörpers 3F4 (Covance) an P2-Fractionen von Hirnhomogenaten durchgeführt. Diese *in vitro*-Methode ermöglichte die Untersuchung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ o-Interaktion in zumindest *in vivo*-ähnlichen Verhältnissen, d.h. die Bindungspartner wurden mit den in Eukaryoten vorkommenden posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierung und Palmitoylierung versehen oder durch Chaperone in ihre zur Bindung notwendige Konformation gefaltet.

Für die Co-IP wurden 250 mg frontaler Kortex nach Dissektion der grauen von der weißen Substanz abgewogen und in 1 ml Lysepuffer durch 25 Stöße in einem Glas-Dounce-Homogenisator homogenisiert. Die Homogenate wurden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 5.000 x g zentrifugiert um Zelltrümmer und die in der Lösung verbleibende weiße Substanz zu entfernen. Die Überstände (S1-Fractionen) wurden in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4 °C und 100.000 x g zentrifugiert. Die daraus resultierenden Überstände (S2-Fractionen) wurden anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das Pellet (P2-Fraktion) wurde nach zweifachem Waschen in 1 ml Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert. Um eine unspezifische Bindung von Proteinen der Homogenate an die eingesetzte Protein-G-Sepharose zu verhindern, wurde eine angemessene Menge der Sepharose-Beads für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert und im 1:1 Verhältnis (Beads zu Lysepuffer) aufgenommen. Nach drei Waschschrritten konnten die P2-Fractionen zusammen mit den Beads inkubiert werden. Das präzipitierte Protein mit seinem Interaktionspartner im Überstand wurde mit Immunkonjugaten im Western Blot nachgewiesen (Abb. 3.2).



### 3.1.3 Die PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion ist eine direkte Funktion der A $\beta$ -Konzentration

Um einen möglichen, direkten Einfluss der Proteinmenge auf die Interaktion zu untersuchen, wurden die A $\beta$ 40-, A $\beta$ 42- und PrP<sup>C</sup>-Konzentrationen von S2- und P2-Fractionen mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) bestimmt (Abb. 3.3).

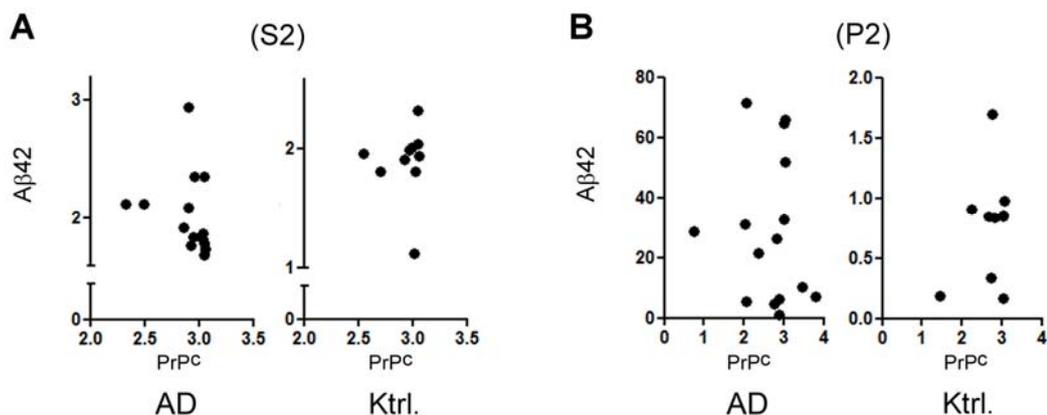


**Abb. 3.3:** Graphische Darstellung der ELISA-Ergebnisse.

Die absolute Konzentration von A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 in S2- und P2-Fractionen der Alzheimer- (AD) und Kontrollpatienten (Ktrl.) sowie die relative PrP<sup>C</sup>-Konzentration wurden mittels ELISA bestimmt. **A** In P2-Fractionen ist die A $\beta$ 40-Konzentration in AD im Vergleich zu Ktrl. signifikant erhöht. **B** Die A $\beta$ 42-Konzentration der P2-Fraktion in AD ist im Vergleich zu Ktrl. signifikant erhöht. **C** Die Bestimmung der relativen Proteinkonzentration von PrP<sup>C</sup> zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen AD und Ktrl. in S2- und P2-Fractionen (\*\* $p > 0,01$ ; \*\*\* $p > 0,0001$ ). pM = pico molar; rel. Abs. 414nm = relative Absorption bei 414nm.

In den S2-Fractionen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Alzheimer- und Kontrollpatienten in der A $\beta$ 40-Konzentration (1,92  $\pm$  0,03 pM in AD und 1,86  $\pm$  0,05 pM in Ktrl.; Abb. 3.1-A) und der Menge an A $\beta$ 42 (2,01  $\pm$  0,09 pM in AD und 1,90  $\pm$  0,10 pM in Ktrl.; Abb. 3.1-B) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte in der P2-Fraktion eine signifikant erhöhte Konzentration für A $\beta$ 40 (2,72  $\pm$  0,07 pM in AD und 2,18  $\pm$  0,14 pM in Ktrl.; Abb. 3.1-A) und für A $\beta$ 42 (28,61  $\pm$  6,29 pM in AD und 0,77  $\pm$  0,14 pM in Ktrl.; Abb. 3.1-B) im Vergleich zwischen Alzheimer- und Kontrollpatientenl. bestimmt werden. Für PrP<sup>C</sup> wurde ein vergleichbares PrP<sup>C</sup>-Expressionslevel in S2- und P2-Fractionen der Patientenkohorte bestimmt (S2: 2,908  $\pm$  0,05520 relative Absorption in AD und 2,932  $\pm$  0,05392 in Ktrl.; P2: 2,658  $\pm$  0,1877 in AD und 2,676  $\pm$  in Ktrl.; Abb. 3.1-C).

Die errechneten Konzentrationen von A $\beta$ 42 der S2- und P2-Fractionen wurden zusätzlich mit dem Gehalt an PrP<sup>C</sup> korreliert (Abb. 3.4).



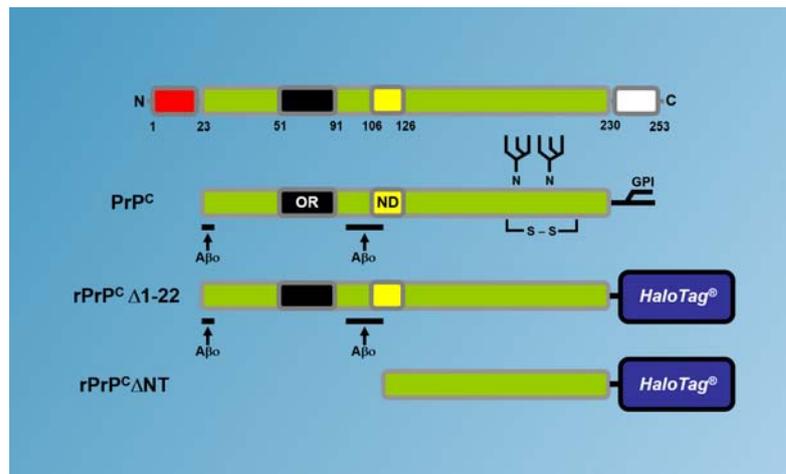
**Abb. 3.4:** Graphische Darstellung der A $\beta$ 42-PrP<sup>C</sup>-Korrelation.

**A** Korrelation zwischen der A $\beta$ 42-Konzentration in S2-Fractionen und relativem PrP<sup>C</sup>-Gehalt bei Alzheimer (AD)- und Kontrollpatienten (Ktrl.). **B** Korrelation zwischen A $\beta$ 42-Konzentration und relativem PrP<sup>C</sup>-Gehalt in den P2 Fractionen von AD und Ktrl.

In den Streudiagrammen wurde die A $\beta$ 42-Konzentration der S2- oder P2-Fractionen gegen den entsprechenden Gehalt an PrP<sup>C</sup> aufgetragen. Es konnte hierbei keine signifikante Korrelation zwischen den beiden untersuchten Variablen bei den Alzheimer- oder bei den Kontrollpatienten festgestellt werden.

### **3.2. Rekombinante Fusionsproteine bilden die Grundlage zur Bestätigung und Charakterisierung der Interaktion *in vitro***

Co-IP-Experimente ermöglichten den Nachweis der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion *in vivo*. Obwohl die IP eine weitverbreitete und akzeptierte Methode zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist, besitzt sie viele Nachteile und Einschränkungen. Durch Homogenisierung des Gehirngewebes werden Zellen aufgebrochen und so können die detektierten Interaktionen möglicherweise erst nach dem Zellaufschluss entstanden sein. Zudem ist bei der Verwendung von Lysepuffern mit Detergentien davon auszugehen, dass Proteine im Homogenat nicht mehr in ihrer natürlichen Konformation vorliegen. Die Konformation stellt für viele Proteine einen wichtigen Faktor zur Bindung an ihren Interaktionspartner dar. Es ist bekannt, dass die Interaktion von PrP<sup>C</sup> mit A $\beta$  über zwei getrennte Bindestellen am N-terminalen Ende von PrP<sup>C</sup> vermittelt wird (Chen *et al.*, 2010; Abb. 3.5). Um die Interaktion von A $\beta$  mit PrP<sup>C</sup> in einem im Rahmen dieser Arbeit neuartig entwickelten *Bindeassay* (APIA, A $\beta$ -Prion-Interaktions-Assay) zu bestätigen, wurde humanes PrP<sup>C</sup> (huPrP<sup>C</sup>) durch rekombinante DNA-Technik als C-Terminal getaggetes Fusionsprotein im bakteriellen *E. coli*-System exprimiert (rPrP<sup>C</sup>). Bei der Positivkontrolle (rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22) wurde die Signalsequenz (AS 1-22) deletiert und das Protein an seinem C-Terminus mit dem HaloTag<sup>®</sup> fusioniert. Als Negativkontrolle (rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT) wurde eine N-terminal trunke Form hergestellt. Durch Deletion des gesamten N-terminus sollte die Bindung von A $\beta$  an PrP<sup>C</sup> nicht mehr möglich sein (s. Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** Schematische Darstellung verwendeter PrP<sup>C</sup>-Teilabschnitte.

Lineare Darstellung der Primärsequenz von humanem PrP<sup>C</sup> mit Angabe wichtiger Proteindomänen. Nach dem Entfernen der N-terminalen Signalsequenz (AS 1-22; rote Box) und der C-terminalen Signalsequenz zum Anheften des GPI-Ankers (AS 231-253; graue Box) durch Signalpeptidasen im Endoplasmatischen Retikulum, besitzt das gereifte Prion-Protein eine *octarepeat*-Sequenz (OR; AS 231-253; schwarze Box), eine neurotoxische Domäne (ND; AS 106-126; gelbe Box), eine Disulfid-Brücke (zwischen AS 179 und 214) sowie zwei variabel besetzte N-Glykolisierungsstellen (AS 181-197). Die notwendigen Bindestellen zur Interaktion mit A $\beta$ -Oligomeren (A $\beta$ ) befinden sich am N-Terminus von PrP<sup>C</sup> (AS 23-27 und AS 95-110; verdeutlicht durch schwarze Balken und Pfeile). Das Protein ist über seinen C-Terminus mit dem HaloTag<sup>®</sup> (blaue Box) fusioniert. Bei rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT wurde der komplette N-Terminus deletiert und besitzt somit keine für die Interaktion benötigten Bindestellen.

Zur Herstellung der rekombinanten Fusionsproteine wurde das Flexi<sup>®</sup>-Vektorsystem (Promega) verwendet. Das Vektorsystem schien aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten für *in vitro*-Studien von Protein-Protein-Interaktionen gut geeignet, da es die Expression von N- und C-Terminal-getaggten Fusionsproteinen ermöglicht. Einklonierte Gene werden in dem System als Fusionsprotein exprimiert, die den sogenannte HaloTag<sup>®</sup> tragen. Dieser Tag kann an unterschiedliche funktionelle Reporter-Liganden koppeln, die viele *downstream*-Applikationen bei der Protein-Protein-Interaktionsstudie ermöglichen. So konnte das rPrP<sup>C</sup> nach Expression, über den HaloTag<sup>®</sup>, gerichtet an Resin Beads immobilisiert werden und so als Fängerprotein für humane und synthetische A $\beta$  dienen. Ebenso konnten über den fusionierten Tag Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-Reporter-moleküle an rPrP<sup>C</sup> gekoppelt werden. So konnte rPrP<sup>C</sup> als Sondenprotein in einem modifizierten Dot-Blot-Assay genutzt werden. Hierbei konnten spezifische Protein-Protein-Interaktionen an der Membran durch Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge in Form von Fluoreszenzsignalen detektiert werden. Zur Herstellung der Plasmid-Konstrukte mussten zunächst die benötigten Abschnitte des

huPrP<sup>C</sup> in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und gleichzeitig mit Schnittstellen für *SgfI* und *PmeI* flankiert werden. Diese ermöglichten die gerichtete Klonierung der proteincodierenden Sequenzen in das Vektor-System.

### 3.2.1 Amplifikation und Modifizierung der huPrP<sup>C</sup>-cDNA ist Voraussetzung zur gerichteten Klonierung in das Flexi<sup>®</sup> - Vektorsystem

Die huPrP<sup>C</sup>-cDNA wurde freundlicherweise von Dr. Susanne Krasemann (Institut für Neuropathologie, UKE) bereitgestellt. Die cDNA lag im pBK-CMV-Vektor (Stratagene) vor und konnte durch einen *HindIII*/*XbaI*-Doppelverdau isoliert werden (s. Anhang, Abb. V.0). Die Überprüfung der cDNA erfolgte nach dem Verdau und der Aufreinigung mit dem Wizard<sup>®</sup> Kit (Promega) durch Sequenzierung. Vor Amplifikation huPrP<sup>C</sup>-cDNA-Sequenzen wurde überprüft, ob sich das Flexi<sup>®</sup>-Vektorsystem zur Klonierung der proteincodierenden Sequenzen eignet. Dazu wurde im Vorfeld die cDNA-Sequenz des huPrP<sup>C</sup> in einer *in silico*-Analyse auf die Abwesenheit endogener Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *SgfI* und *PmeI* bestätigt (Abb. 3.6). Da die gerichtete Klonierung der Sequenz in das Vektorsystem auf den beiden Schnittstellen beruht, dürfen sie nicht in der endogenen Sequenz des huPrP<sup>C</sup> vorhanden sein.

```
huPrPC, 696 bp. (LINEAR)
Restriction analysis 09.03.
pDRAW32 revision 1.1.120

Rebase containing 272 enzymes.
2 enzymes match enzyme selection criteria.

*****

AsiSI      (GCG_AT'CGC) [SgfI,RgaI,SfaAI]
Enzyme does not cut.

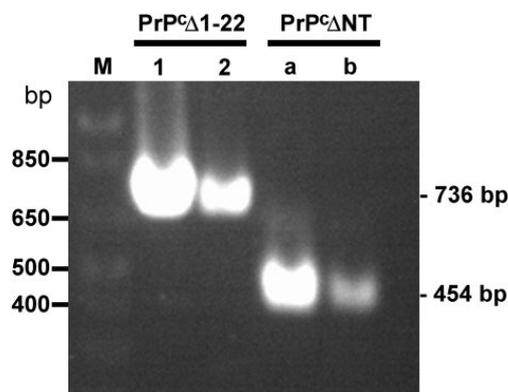
PmeI      (GTTT'AAAC) [MssI]
Enzyme does not cut.
```

**Abb. 3.6:** *In silico*-Restriktionsanalyse huPrP<sup>C</sup>-cDNA (23-230).

Der *in silico*-Verdau wurde mit Hilfe der Software pDRAW32 durchgeführt und bestätigte die Abwesenheit endogener Schnittstellen für *SgfI* (hier als Isoschizomer *AsiSI* angegeben) und *PmeI* innerhalb der Sequenz des humanen Prion-Proteins.

Nachdem die Abwesenheit der Restriktionsschnittstellen innerhalb der Sequenz bestätigt werden konnte, wurden die Primer zur Amplifikation in der PCR so geformt, dass sie notwendige *SgfI*-Schnittstellen an das 3'-aminoterminalen Ende und *PmeI*-Schnittstellen

an das 5'-carboxyterminale Ende der proteincodierenden Sequenz anfügen konnten. Die Sequenz für die *PmeI*-Schnittstelle codierte gleichzeitig das Translations-Stopcodon. Die Amplifikation der unterschiedlichen Sequenzabschnitte des huPrP<sup>C</sup> konnte nach Anpassung der *annealing*-Temperatur für die jeweiligen verwendeten Primerpaare und nach der experimentellen Ermittlung der benötigten MgCl<sub>2</sub>-Ionenkonzentration in der Reaktion erfolgreich durchgeführt werden. Der Erfolg der Amplifikation in der PCR, wurde durch Auftrennung von je 4 µl des jeweiligen PCR-Produktes auf einem 1 %igen Agarosegel getestet. Detektion und Analyse der Banden erfolgte nach Anfärbung des Agarosegels im EtBr-Färbegrad unter Anregung mit UV-Licht. Abbildung 3.3 dokumentiert ein positives PCR-Ergebnis zur Herstellung der huPrP<sup>C</sup>-Sequenzabschnitte.



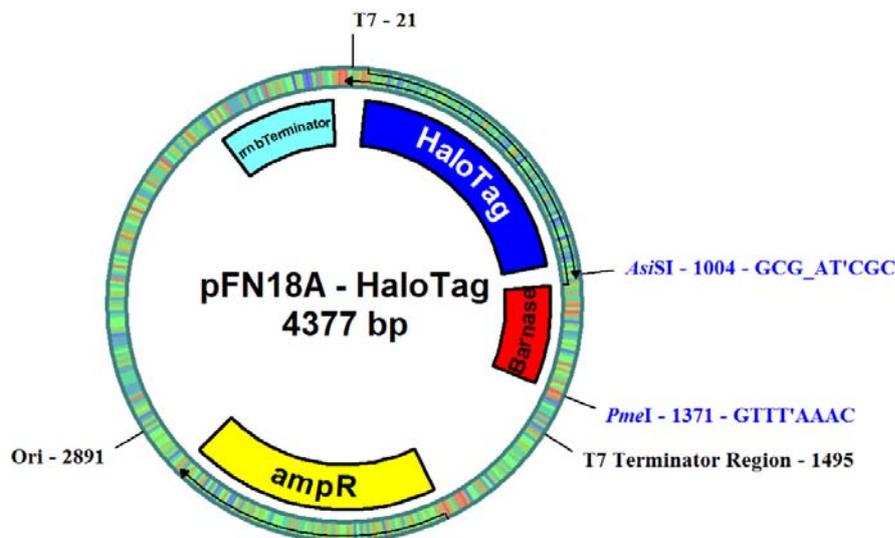
**Abb. 3.7: Überprüfung der Amplifikation von huPrP<sup>C</sup>-Abschnitten.**

Die in der PCR amplifizierten Sequenzabschnitte des huPrP<sup>C</sup> wurden über eine Säule gereinigt und in einem 1 %igen Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Spur 1 und 2: Amplifiziertes PrP<sup>C</sup>Δ1-22; Spur a und b: N-Terminal trunkiertes PrP<sup>C</sup>ΔNT. M= DNA-Größenstandard.

Die im 1 %igen Agarosegel beobachteten Bandenhöhen der PCR-Produkte nach *SgfI*/*PmeI* Doppelverdau entsprachen der theoretisch zu erwartenden Größe. Diese lag für PrP<sup>C</sup>Δ1-22 bei 736 bp und für PrP<sup>C</sup>ΔNT bei 454 bp.

### 3.2.2 Gerichtete Klonierung in das N-terminale Vektorsystem (pFN18A)

Die in der PCR amplifizierte Sequenzabschnitte des huPrP<sup>C</sup> mussten zunächst in den N-terminalen Eingangsvektor pFN18A kloniert werden. Der Aufbau des Vektors ist schematisch in Abb.3.8 dargestellt.

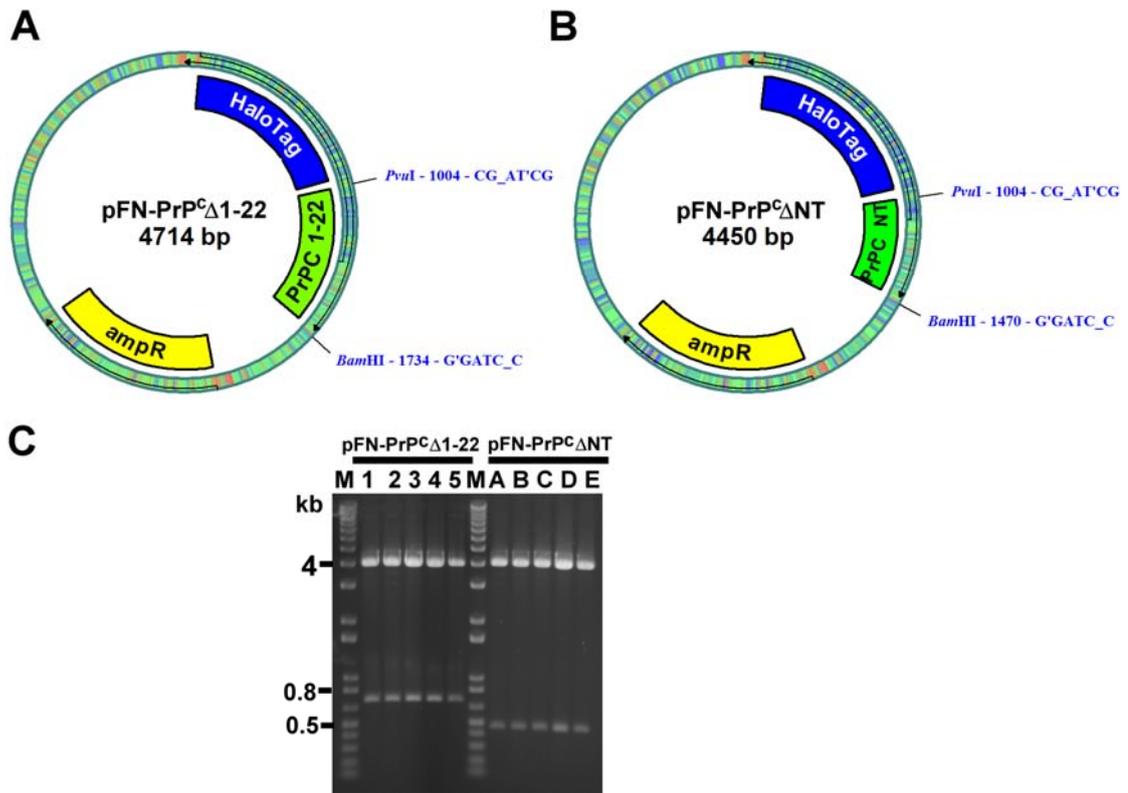


**Abb. 3.8:** Aufbau des N-terminalen pFN18A HaloTag<sup>®</sup> T7 Flexi<sup>®</sup> Vektors.

Der Vektor ermöglicht durch vorhandene *SgfI*- und *PmeI* (hier *AsiSI*)-Schnittstellen eine gerichtete Klonierung von proteincodierenden Sequenzen. Der T7-Promotor ermöglicht Proteinexpression in *E. coli*. Protein codierende Sequenzen werden bei Expression an ihrem N-terminalen Ende mit dem HaloTag<sup>®</sup> fusioniert. Desweiteren besitzt er zur Selektion positiver Transformanten eine Ampicillin-Resistenz sowie ein letales Barnase-Gen.

Um die PrP<sup>C</sup>-Sequenzen als Insert-DNA in den pFN18A-Eingangsvektor zu klonieren, musste dieser zunächst im Doppelverdau mit dem Restriktionsendonucleasen *SgfI* und *PmeI* linearisiert werden. Nach anschließender Aufreinigung der DNA-Fragmente über eine Säule stand der Vektor zur Ligation mit der amplifizierten DNA bereit. Diese wurden parallel in separaten Reaktionsansätzen ebenfalls mit *SgfI* / *PmeI* verdaut und über eine Säule gereinigt. Zur Ligation wurde Vektor- und Insert-DNA in einem bestimmten, experimentell ermittelten, molaren Verhältnis eingesetzt und bei 4 °C in Anwesenheit einer T4-DNA-Ligase über Nacht inkubiert. Zur Hitzeschock-Transformation eines 50 µl Aliquots chemokompetenter *E. coli* XL-10 Gold-Zellen (Stratagene) wurde ~25 ng der ligierten DNA in einem Maximalvolumen von 5 µl eingesetzt. Der Transformationsansatz

wurde auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (100 µg/ ml) ausgestrichen. Von den am Folgetag gewachsenen Kolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und mit geeigneten Restriktionsenzymen ein Kontrollverdau auf das Vorhandensein der Insert-DNA durchgeführt (Abb. 3.9).



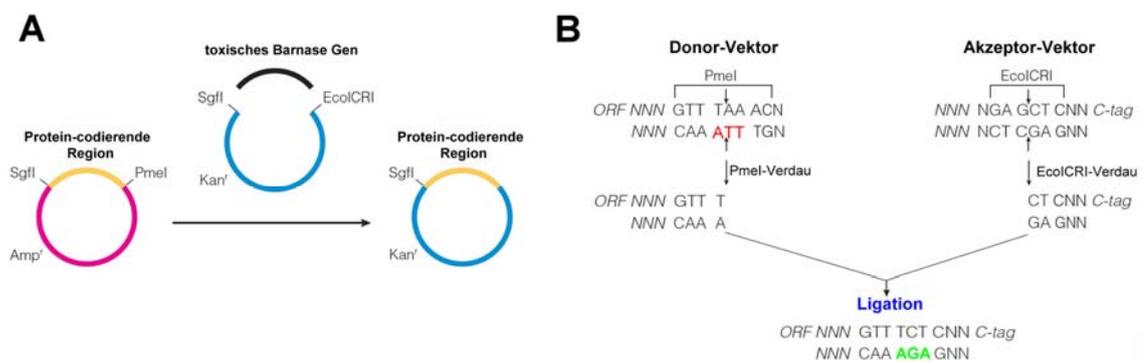
**Abb. 3.9: Vektorkarten und Restriktionsanalyse N-terminaler Plasmid-Konstrukte.**

Schematische Darstellung des N-Terminalen Vektors nach Insertion der DNA von **A** PrP<sup>C</sup>Δ1-22 und **B** PrP<sup>C</sup>ΔNT. Größe des Vektors und Schnittstellen für die im Restriktionsverdau verwendeten Enzyme *PvuI* und *Bam*HI sind jeweils angegeben. **C** Ergebnis eines *PvuI*/*Bam*HI-Doppelverdaus von pFN-PrP<sup>C</sup>Δ1-22 (Spur 1-5) und pFN-PrP<sup>C</sup>ΔNT (Spur A-E) nach Auftrennung auf einem 1 %igen Agarosegel. M= DNA-Größenstandard.

Die im Agarosegel beobachtete Laufhöhe der durch *PvuI*/*Bam*HI-Doppelverdau getesteten DNA-Fragmente, stimmte für beide Plasmid-Konstrukte mit der theoretisch errechneten Größe überein. Positive Transformanten für PrP<sup>C</sup>Δ1-22 zeigten zwei Banden in einer Laufhöhe von 3975 bp (Vektor-Rückgrat) und 735 bp (Insert). PrP<sup>C</sup>ΔNT zeigte analog die Anwesenheit von zwei DNA-Fragmenten in einer Größenordnung von 4044 bp (Vektor-Rückgrat) und 406 bp (trunkiertes Insert). Die durch Restriktionsanalyse positiv getestete DNA wurde sequenziert und bestätigt.

### 3.2.3 Transfer der proteincodierenden Prion-Sequenzen in das C-terminale Vektorsystem

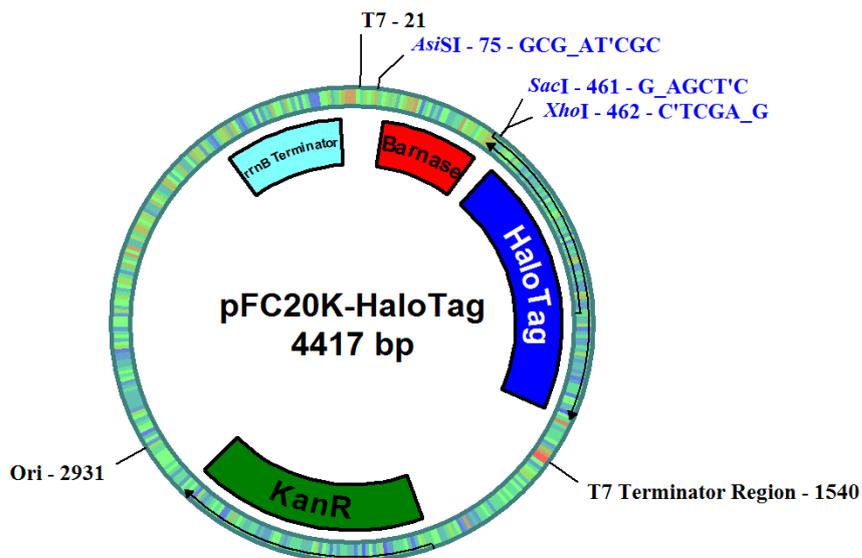
Bei Verwendung des pFN18A-Vektors werden die beiden Formen des huPrP<sup>C</sup> als N-Terminal-getaggte Fusionsproteine exprimiert. Es ist bekannt, dass der N-Terminus von PrP<sup>C</sup> beide Bindestellen für die Bindung von sA $\beta$  enthält. Um zu verhindern, dass wegen sterischer Hinderung des Tags die Interaktion mit A $\beta$  beeinflusst wird, wurden proteincodierende Sequenzen im N-terminalen Vektorsystem ausgeschnitten und in das C-terminale Flexi<sup>®</sup>-Vektorsystem eingebracht. Der Transfer von proteincodierenden Sequenzen, die zuvor in Vektoren des N-terminalen Systems kloniert wurden, in einen C-terminalen Akzeptor-Flexi<sup>®</sup>-Vektor (d.h. ein Vektor, der C-Terminal-getaggte Fusionsproteine exprimiert) war möglich. Der C-terminale Akzeptor-Vektor besitzt im Gegensatz zum N-terminalen System keine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PmeI*. Stattdessen trägt der C-terminale Vektor eine Schnittstelle für *EcoI*. Zum Transfer des Inserts aus dem N-terminalen Donor-Vektor in den C-terminalen Akzeptor-Vektor wurden beide Vektoren in getrennten Reaktionsansätzen mit *PmeI*/ *SgfI* bzw. *EcoI*/ *SgfI* verdaut (Abb. 3.10-A).



**Abb. 3.10: Molekulare Grundlagen des Transfers proteincodierender Sequenzen.**

**A** *SgfI*- und *PmeI*-Schnittstellen im Donor-Vektor und *EcoI*-Schnittstellen im C-terminalen Akzeptor-Vektor sind Grundlage zum Transfer proteincodierender Sequenzen **B** Der Verdauung des Donor-Vektors zerstört das in der *PmeI* Site enthaltene Stopcodon (rot gekennzeichnet). Bei Ligation werden die *blunt ends* von Donor- (*PmeI*) und Akzeptor-Vektor (*EcoI*) verknüpft. Das entstehende *in frame* Serin-Codon (grün gekennzeichnet) ermöglicht die durchgängige Translation der Sequenz bei Expression von C-terminalen Fusionsproteinen. (in Anlehnung an: Flexi<sup>®</sup>Vector Systems, Technical Manual, #TM254, Promega).

Bei Ligation konnten *PmeI* und *EcoI*CRI-Schnittstellen durch die T4-DNA-Ligase wieder verknüpft werden. Das Stopcodon, das im N-terminalen System in der *PmeI*-Schnittstelle codiert ist, wurde in der neuen Anordnung nicht wieder regeneriert (Abb.3.10-B). Die DNA konnte so durchgehend bis zu der Sequenz weitergelesen werden, die für das C-terminale Fusionsprotein codiert. Aufbau und wichtige Strukturelemente des pFC20K HaloTag® T7 SP6 Flexi®-Vektors sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

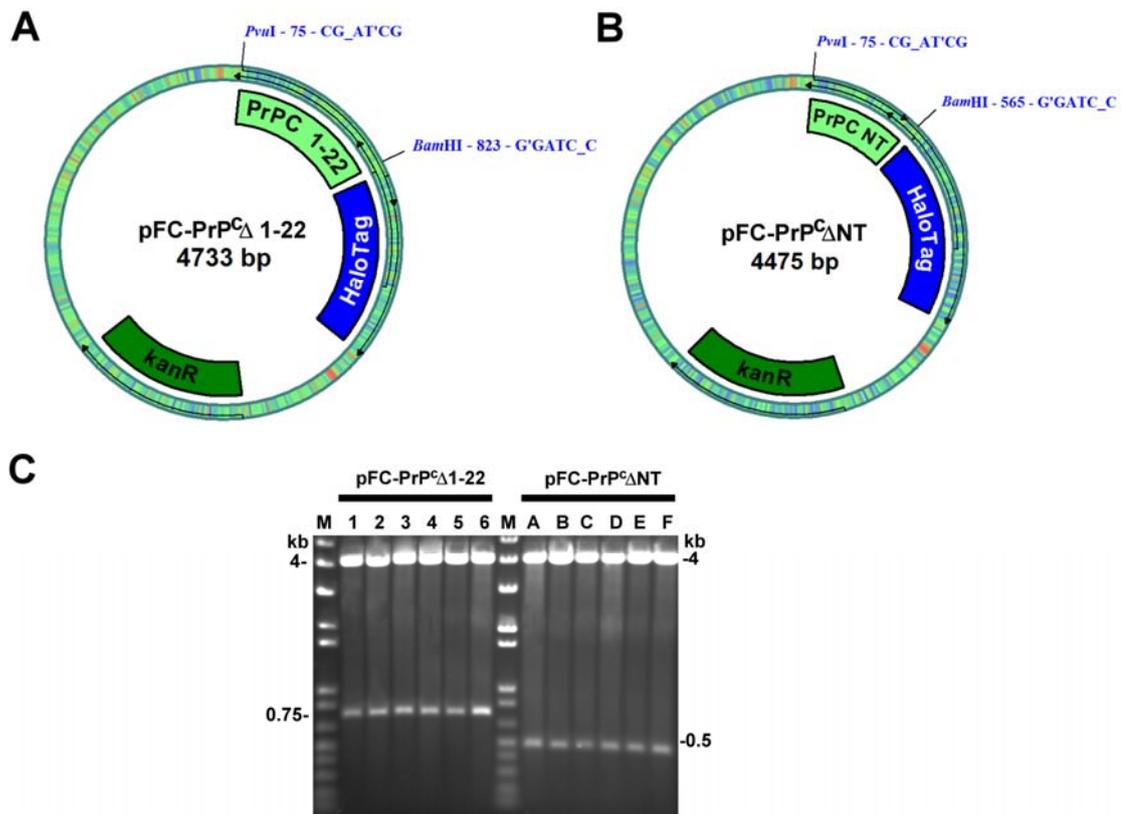


**Abb. 3.11: Aufbau des C-terminalen pFC20K HaloTag® T7 SP6 Flexi®-Vektors.**

Der C-terminale Flexi®-Vektor besitzt zur Proteinexpression einen T7-Promotor. Im Gegensatz zum N-terminalen System trägt er eine Resistenz auf Kanamycin. Proteincodierende Sequenzen werden zwischen die *SgfI*- und *EcoI*CRI-Schnittstelle kloniert. Dabei wird die toxische Barnase aus dem Vektor entfernt. Der Vektor ermöglicht die Expression von C-terminal-getaggten Fusionsproteinen.

Die im N-terminalen Vektorsystem befindliche Insert DNA beider Prion-Abschnitte wurde durch einen Doppelverdau mit *SgfI* und *PmeI* aus dem Donor-Vektor geschnitten. Der pFC20K Akzeptor-Vektor wurde im *SgfI* / *EcoI*CRI Doppelverdau linearisiert. Zur Ligation wurden beide Reaktionsansätze vereint und in Anwesenheit einer T4-DNA-Ligase inkubiert. Der Ligationsansatz wurde mittels Hitzeschock in kompetente *E.coli* XL-10 Gold-Zellen transformiert und auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten (25µg/ml) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Plasmid-DNA der am Folgetag angewachsenen Kolonien wurde isoliert und durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen getestet. Abb. 3.12 zeigt die Vektorkarten C-terminaler Plasmide

nach Insertion der unterschiedlichen Sequenzabschnitte des Prion Proteins, sowie das Ergebnis des Kontrollverbaus.



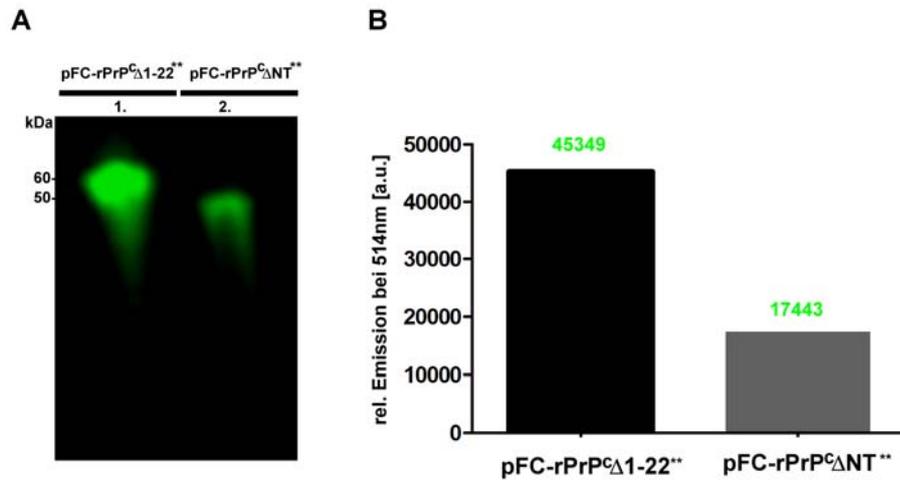
**Abb. 3.12: Vektorkarten und Restriktionsanalyse C-terminaler Plasmid-Konstrukte.**

Schematische Darstellung des C-terminalen Vektors nach Insertion der unterschiedlichen PrP<sup>C</sup>-DNA Abschnitte von **A** PrP<sup>C</sup>Δ1-22 und **B** PrP<sup>C</sup>ΔNT. Größe des Vektors und Schnittstellen für die im Restriktionsverdau verwendeten Enzyme *PvuI* und *BamHI* sind jeweils angegeben. **C** Ergebnis eines *PvuI*/*BamHI* Doppelverdau von pFC-PrP<sup>C</sup>Δ1-22 (Spur 1-6) und pFC-PrP<sup>C</sup>ΔNT (Spur A-F) nach Auftrennung auf einem 1%igen Agarosegel. M= DNA-Größenstandard.

Beide verdauten Plasmid-Konstrukte zeigten im Agarosegel Banden, die mit den theoretisch berechneten Fragmentgrößen übereinstimmten. pFC20K-PrP<sup>C</sup>Δ1-22 lieferte Banden der Größe von 3985 bp und 748 kb, pFC20K-PrP<sup>C</sup>ΔNT von 3985 bp und 490 bp. Die in der Restriktionsanalyse positiv getestete DNA wurde sequenziert und bestätigt.

### 3.2.4 Detektierte Fluoreszenz-Signale in der SDS-PAGE bestätigen den Erfolg der Expression

Nachdem die erfolgreiche Klonierung von PrP<sup>C</sup>-Amplifikaten in das C-terminale Vektorsystem in *E. coli* Gold XL-10-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde die Plasmid-DNA zur Überexpression der Proteine in einen geeigneten bakteriellen Expressionsstamm transformiert. 1 ng/μl Plasmid-DNA der unterschiedlichen Vektorsysteme wurde hierzu durch Hitzeschock in chemokompetente *E. coli* Tuner™ (Invitrogen) transformiert. Nach Inkubation auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37 °C, wurde die Plasmid-DNA der selektierten Kolonien auf Vorhandensein des Inserts mittels Restriktionsanalyse geprüft. Positive Klone wurden zum Animpfen der Vorkultur in 2,5 ml Kanamycin-haltigen LB-Medium verwendet. Die Bakterien wurden durch Inkubation bei 37 °C über Nacht auf einem Schüttler vermehrt und am nächsten Tag zum Animpfen einer 25 ml Hauptkultur verwendet. Zunächst mussten die optimalen Induktionsbedingungen für die beiden Plasmid-Konstrukte gefunden werden. Dazu wurden wichtige Parameter wie die optische Dichte OD<sub>600</sub> (0,3; 0,5; 0,7) zum Zeitpunkt der Induktion mit IPTG sowie die Konzentration des eingesetzten IPTGs (3 μM, 6 μM, 1 mM) variiert. Die besten Ergebnisse lieferte der Einsatz einer IPTG-Konzentration von 1 mM bei einer Expressionsdauer von 5 Stunden. Das an die Proteine fusionierte HaloTag® bindet kovalent an Alexa Fluor® 488-Reporterchromophore. Diese kovalente Bindung ist hochspezifisch und selbst unter denaturierenden Bedingungen, wie in der SDS-PAGE, stabil. Deshalb konnte eine erfolgreiche Expression nach Kopplung der rekombinanten Proteine an Alexa Fluor® 488 in der SDS-PAGE analysiert werden. Zur Kopplung wurden die Pellets der induzierten Bakterienkulturen in PBS mit Ultraschall aufgeschlossen und mit 7 μM Alexa Fluor® 488-Liganden über Nacht bei 4 °C in UV-geschützten Eppendorf-Gefäßen inkubiert. 10 μl Aliquots der gekoppelten Prion-Fusionsproteine wurden anschließend mit einer entsprechenden Menge an 5x SDS-Probenpuffer gemischt, durch Hitze denaturiert und in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion der an Alexa Fluor® 488 gekoppelten rPrP<sup>C</sup>-Fusionsproteine fand am Typhoon™ 9410 Variable Mode Imager (Amersham) bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 499 nm statt (Abb. 3. 13). Die an Alexa Fluor® 488 gekoppelten rPrP<sup>C</sup> Proteinsonden werden in dieser Arbeit mit rPrP<sup>C</sup>Δ1-22\*\* bzw. rPrP<sup>C</sup>ΔNT\*\* bezeichnet.



**Abb. 3.13: Überprüfung der Expression durch Fluoreszenzsignale.**

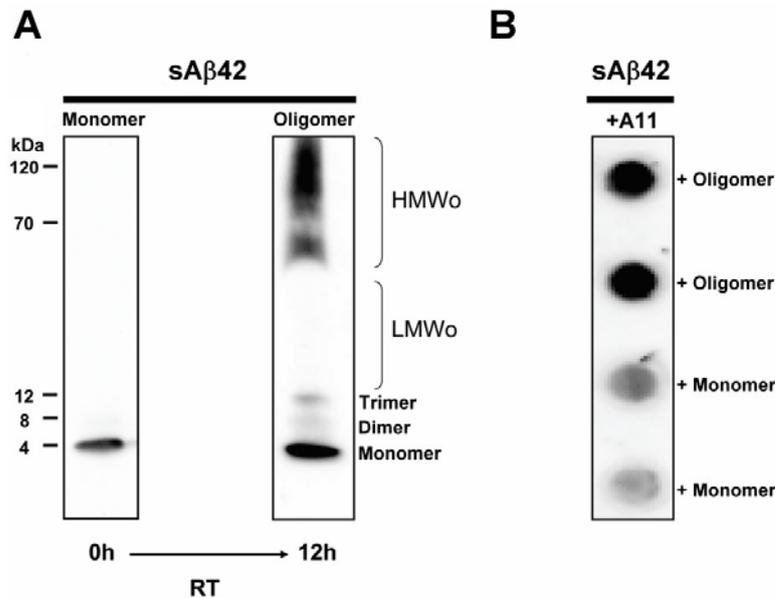
Pellets induzierter Bakterienkulturen wurden nach Zellaufschluss an den Alexa Fluor® 488-Liganden gekoppelt. Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel erfolgte die Detektion der Fluoreszenz an einem Typhoon™ 9410 Variable Mode Imager bei einer Anregungswellenlänge von 499 nm. **A** 2D-Bildarstellung der fluoreszierenden Banden der Sondenproteine nach Auftrennung im SDS-Gel. **B** Darstellung der Emissionsintensität bei 514 nm der Proteinbanden im SDS-Gel als Balkendiagramm. Die Signalstärke korreliert mit der Menge an exprimiertem rPrP<sup>C</sup> und konnte als Näherungswert für die vorliegende Konzentration in der Bakterienkultur gesehen werden.

Die zweidimensionale Bildanalyse am Typhoon™ 9410 zeigte zwei stark fluoreszierende Proteinbanden im SDS-Gel. Diese entsprachen einem Molekulargewicht von 59.48 kDa (pFC-rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22<sup>\*\*</sup>) und 50.5 kDa (pFC-rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT<sup>\*\*</sup>), welche dem theoretisch errechneten Molekulargewicht der beiden Fusionsproteine nach Bindung an das Alexa Fluor® 488 entsprachen. Die Quantifizierung der detektierten Emissionsintensitäten bei 514 nm in SDS-Gelen war insbesondere für die Normierung der Sonden in später folgenden Experimenten von Bedeutung.

### 3.2.5 Die Verwendung von sA $\beta$ 42-Peptiden in Interaktionsstudien erfordert die spezielle Vorbehandlung des Peptids

Monomeres A $\beta$ 42 neigt, aufgrund seiner extrem hydrophoben Natur, zur Aggregation mit anderen A $\beta$ -Molekülen unter der Ausbildung heterogener Aggregationszustände, die von kleinen Aggregaten wie Dimere bis hin zu hochmolekularen Aggregationsformen wie Fibrillen reichen. In der vorliegenden Arbeit sollen reproduzierbare Präparationen von synthetischem A $\beta$ 42 als Interaktionspartner für rPrP<sup>C</sup> hergestellt werden. Nach

Zerstörung von präexistierenden A $\beta$ 42-Aggregaten durch Inkubation des lyophilisierten A $\beta$ 42-Peptids in Hexafluoroisopropanol (HFIP) und anschließender Ultraschallbehandlung, konnte das Peptid durch die „Speed-Vac“ Methode gefriergetrocknet werden (s. 2.2.9.9). Die Lagerung des Peptidfilms bis zur Verwendung erfolgte bei -20 °C. Je nach benötigter A $\beta$ 42-Spezies im Experiment wurde, das Peptid einer entsprechenden Behandlung unterzogen (s. 2.2.9.1). Die Überprüfung der unterschiedlichen A $\beta$ 42-Präparationen erfolgte in Western-Blot-Analysen unter Verwendung von 6E10 (Covance), oder in Dot-Blot Analysen mit dem konformationsabhängigen Antikörper A11 (Invitrogen). Das Ergebnis der unterschiedlichen Methoden zur A $\beta$ -Präparation ist in Abb. 3.14-A und B dargestellt.



**Abb. 3.14:** Charakterisierung der sA $\beta$ 42-Oligomer-Präparationen.

Überprüfung der sA $\beta$ 42-Präparationen fand auf Western Blots und Dot Blots unter Verwendung spezifischer Antikörper gegen die A $\beta$ -Sequenz (6E10) oder typische  $\beta$ -Faltblatt-Konformationen von Oligomeren (A11) statt. **A** Western-Blot-Analyse mit 6E10 zeigt, dass sA $\beta$ 42 nach der initialen Behandlung des lyophilisierten Peptids in vorwiegend monomerer Form bei 4 kDa vorliegt (linker Teil der Abb.). Nach Inkubation der Lösung für 12 h bei Raumtemperatur (RT) haben sich für sA $\beta$ 42 typische Aggregationsformen, von Monomeren bis hin zu hochmolekularen Oligomeren, ausgebildet (rechter Teil der Abb.). **B** Präparationen der A $\beta$ -Monomere und Oligomere wurden auf eine Nitrocellulosemembran überführt und mit dem Oligomer-spezifischen Antikörper A11 getestet. LMWo= *low molecular weight oligomers*, niedermolekulare Oligomere; HMWo= *high molecular weight oligomers*, hochmolekulare Oligomere.

Beide Behandlungsmethoden der sA $\beta$ 42-Peptide führten zu dem gewünschten Ergebnis.

So konnte bei den Präparationen von monomerem sA $\beta$ 42 im Western Blot nur eine

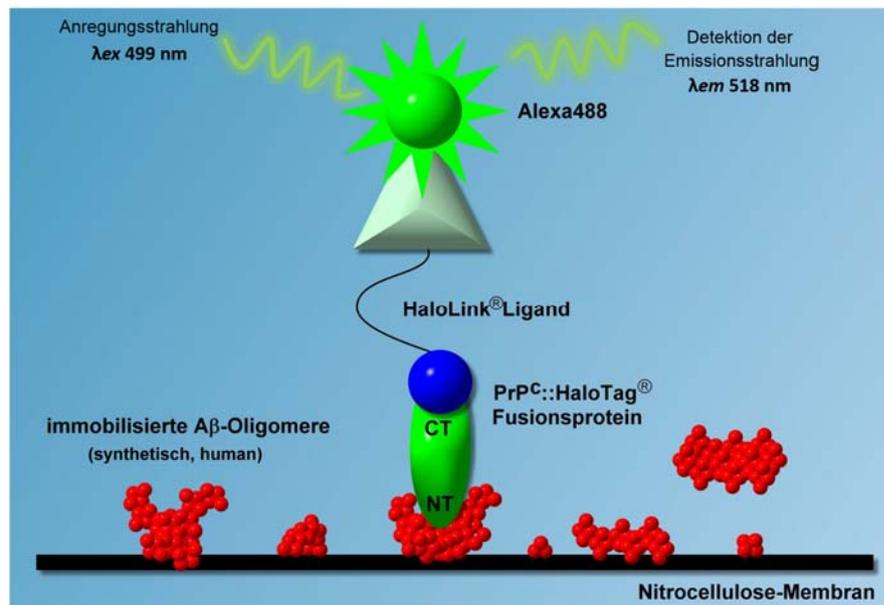
spezifische Bande bei 4 kDa detektiert werden. Zudem konnte im Dot Blot kein Signal für aggregiertes A $\beta$  detektiert werden. Die Präparation von Oligomeren bestätigte im Western Blot die Existenz unterschiedlicher sA $\beta$ -Oligomere in einem Grössenbereich zwischen 4 kDa (Monomere) bis ~200 kDa (HMWo). Ebenso konnten in der Dot-Blot Analyse A11-positive Signale detektiert werden.

### **3.3 APIA bietet verschiedene Möglichkeiten zum Nachweis und zur Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion**

Die erfolgreiche Herstellung und Expression der C-Terminal-getaggtten Fusionsproteine von humanem PrP<sup>C</sup> war die Grundlage zur Etablierung eines neuartigen Bindeassays zum Nachweis und zur Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Bindung. Der A $\beta$ -PrP<sup>C</sup>-Interaktions-Assay (APIA) konnte in verschiedenen Formaten angewendet werden und erlaubte nicht nur den Nachweis und die Charakterisierung der Bindung von humanen rPrP<sup>C</sup> mit sA $\beta$ -Aggregaten, sondern auch mit A $\beta$ -Oligomeren, die aus den Gehirnen von Alzheimer Patienten isoliert wurden.

#### **3.3.1 APIA ermöglicht qualitative und semiquantitative Analysen**

rPrP<sup>C</sup>-Fusionsproteine ermöglichten durch den am C-Terminus lokalisierten Halo<sup>®</sup>-Tag die kovalente Kopplung von fluoreszierenden Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-Reportermolekülen. Der Grundgedanke des etablierten Testsystems war sA $\beta$ 42o oder humane A $\beta$ -Aggregate an einer Membran zu immobilisieren und im Dot-Blot-Format mit den fluoreszierenden Reportermolekülen zu inkubieren. Im Falle einer spezifischen Interaktion zwischen gekoppelten rPrP<sup>C</sup>-Sondenprotein und immobilisierten A $\beta$ o sollte auch nach exzessivem Waschen bei Anregung durch Licht einer geeigneten Wellenlänge ein deutliches Emissionssignal zu detektieren sein. Abbildung 3.15 verdeutlicht das Prinzip des Versuchsaufbaus in einem Schema.



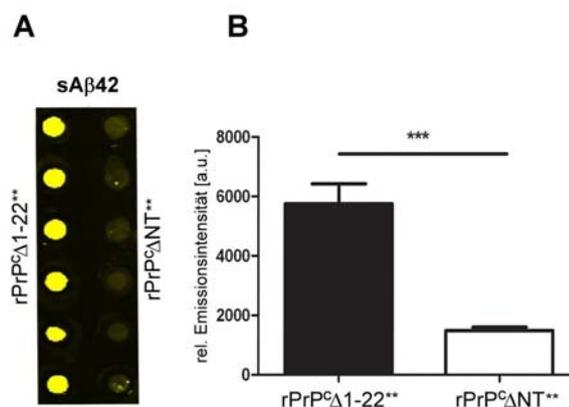
**Abb. 3.15:** Funktionsprinzip von APIA im Versuchsaufbau.

Aβ-Oligomere werden über eine Vakuum-unterstützte Dot-Blot-Apparatur an einer Membran immobilisiert. Durch Inkubation mit dem an Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-gekoppelten PrP<sup>C</sup>-HaloTag<sup>®</sup>-Fusionsprotein entsteht eine spezifische Bindung, die durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge ( $\lambda_{ex}=499$  nm) zu einem Fluoreszenzsignal führt. Die Detektion der Emission durch einen geeigneten Laserscanner fand bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{em}=518$  nm statt.

### 3.3.2 Qualitative Experimente bestätigen die PrP<sup>C</sup>-Aβ-Interaktion

Um Aβ<sub>o</sub> auf die Nitrocellulose-Membran (NCM) zu überführen, wurde eine Vakuum-unterstützte 96 well-Dot-Blot-Apparatur der Firma Roth verwendet. Die sAβ<sub>o</sub> wurden durch das Anlegen eines Vakuums auf die Membran gespottet. Die Inkubation des immobilisierten Aβ mit den verschiedenen C-terminalen Sonden erfolgte in den Wells der Dot-Blot-Apparatur. Zur Detektion der Fluoreszenzsignale an der NCM wurde der Typhoon<sup>™</sup> 9410 Variable Mode Imager der Firma Amersham verwendet. Der im Versuch mit Aβ<sub>o</sub> und Sondenproteinen inkubierte Abschnitt der Membran wird zur Detektion der fluoreszenten Signale schrittweise über seine gesamte Fläche von einem Laser abgetastet und es entsteht ein zweidimensionales Bild der Fluoreszenz. Durch geeignete Software (ImageQuant, Version 5.2) lassen sich die Intensitätsverteilungen an der Membran optisch darstellen, messen und quantifizieren. Um zuverlässige Aussagen über die PrP<sup>C</sup>-Aβ-Interaktion in diesem Assay zu ermöglichen, wurde sichergestellt, dass

in jedem Experiment eine vergleichbare Menge an rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ -122 und rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT Sonden eingesetzt wird. Daher wurde die Sondenkonzentration im Vorfeld über die detektierte Emissionsintensität ihrer Expressionsbande im SDS-Gel durch entsprechende Verdünnung mit PBS normiert. So konnte auch sichergestellt werden, dass das Verhältnis von ungekoppelten Proteinen im Lysat zu fluorophor-markierten Proteinen bei jeder Probe annähernd gleich war. Um das Grundprinzip des Versuchsaufbaus zu bestätigen, wurde in einem ersten Versuch eine konstante Menge (100 ng) des sA $\beta$ 42 an einem Membranstreifen immobilisiert und nach Blockierung mit den normierten PrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22<sup>\*\*</sup>- oder rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT<sup>\*\*</sup>-Sonden von inkubiert. Im Anschluss wurde die detektierte Intensität der Signale quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Es musste zudem sichergestellt werden, dass die eingesetzte Sondenmenge Werte in einem Messbereich liefert, die vom Detektor erfasst werden können und im linearen Messbereich des Fluorophors liegen. Zu starke als auch zu schwache Signale können das Messergebnis verfälschen.



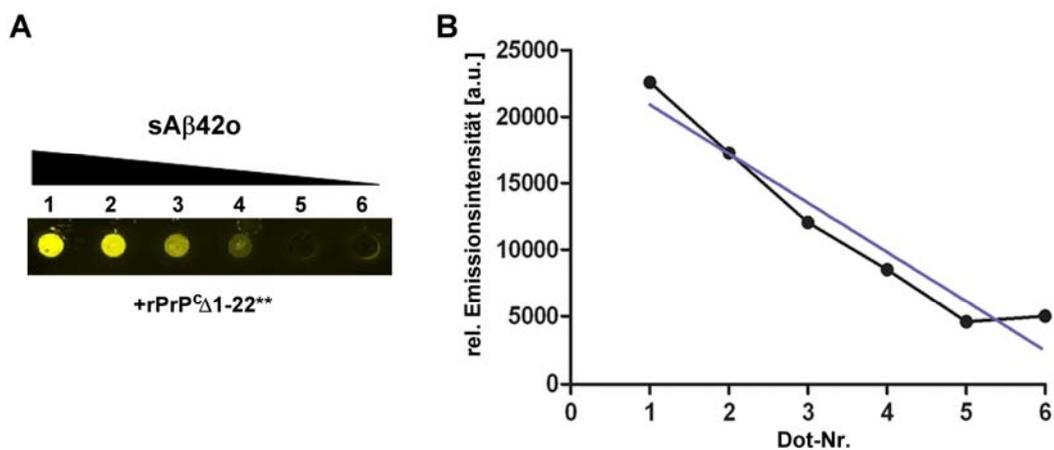
**Abb. 3.16: Qualitativer Nachweis der Interaktion via APIA im Dot-Blot-Format.**

**A** A $\beta$ -Oligomere wurden an einer Membran immobilisiert und zusammen mit rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22<sup>\*\*</sup> oder rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT inkubiert. **B** Quantifizierung der bei 514 nm detektierten Emissionssignale an der Membran. Die für rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22<sup>\*\*</sup> detektierten Signale sind im Vergleich zu Signalen von rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT signifikant erhöht ( $***p > 0.001$ ).

Durch Inkubation des Membranabschnittes mit beiden Sonden, konnte an dem mit rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22<sup>\*\*</sup> inkubierten Abschnitt, im Vergleich zu dem mit rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT<sup>\*\*</sup> inkubierten Bereich, ein signifikant erhöhtes Emissionssignal bei 514 nm detektiert werden.

### 3.3.3 Sondenproteine ermöglichen die semi-quantitative Analyse der Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und A $\beta$

Gealtertes sA $\beta$ 42 wurde in einem Konzentrationsgradient von 100 ng bis 3,25 ng an einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert und mit rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22\*\* inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte nach intensivem Waschen der Membran am Typhoon™ 9410 Variable Mode Imager (Amersham) durch die Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 499 nm. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 3.17 dargestellt.



**Abb. 3.17: Semiquantitativer Nachweis der Interaktion durch APIA.**

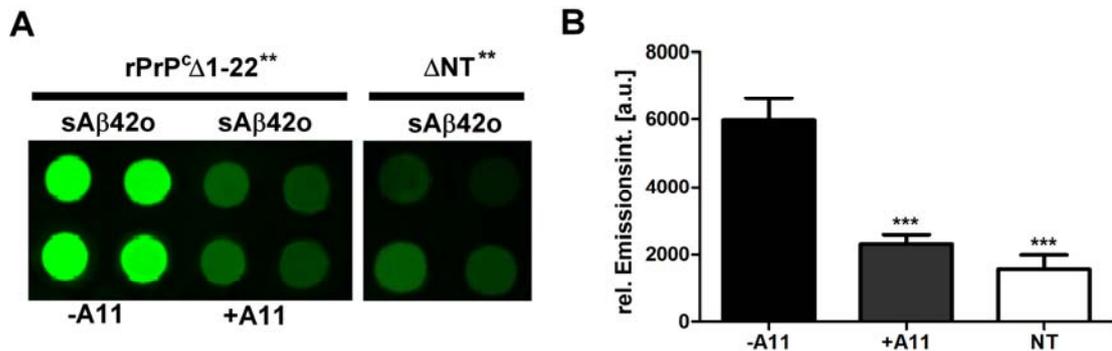
A $\beta$ -Oligomere wurden in einem Konzentrationsgradient an der NCM immobilisiert und mit rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22\*\* inkubiert. **A** Detektierte Fluoreszenzsignale am Membranstreifen. **B** Graphische Darstellung der Quantifizierung der bei 514 nm detektierten Emissionssignale an der Membran. Konz. sA $\beta$ 42 an Spots: 1= 100ng; 2= 50ng; 3= 25ng; 4= 12,5ng; 5= 6,25ng; 6= 3,25ng.

Das Ergebnis zeigt eine lineare Abhängigkeit der detektierten Emissionssignale von der sA $\beta$ 42-Konzentration am untersuchten Membranabschnitt.

### 3.3.4 Die detektierten Signale der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion sind spezifisch

Um die Spezifität der detektierten Fluoreszenzsignale an den Membranen zu bestätigen, wurde versucht die Bindung von A $\beta$  an rPrP<sup>C</sup> zu inhibieren. Dazu wurde der polyklonale Oligomer-spezifische Antikörper A11 (Covance) verwendet. Dieser Antikörper erkennt die typischen  $\beta$ -Faltblatt-reichen Strukturen von Oligomeren unabhängig von ihrer

Sequenz. Monomere oder fibrilläre Strukturen werden von dem A11-Bindeepitop nicht erkannt. 50 ng sA $\beta$ 42o wurde vor seiner Immobilisierung an der Membran für 1,5 h bei 4 °C mit einer hohen Konzentration (5 mM) des A11- Antikörpers auf einem Rotator inkubiert. Nach dem spotten präinkubierter sA $\beta$ 42-Oligomere (+A11) und sA $\beta$ 42o ohne Vorbehandlung (-A11), sowie Absättigung freier Bindestellen auf der Membran, erfolgte die Inkubation mit den rPrP<sup>C</sup>-Sondenproteinen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.18 dargestellt.



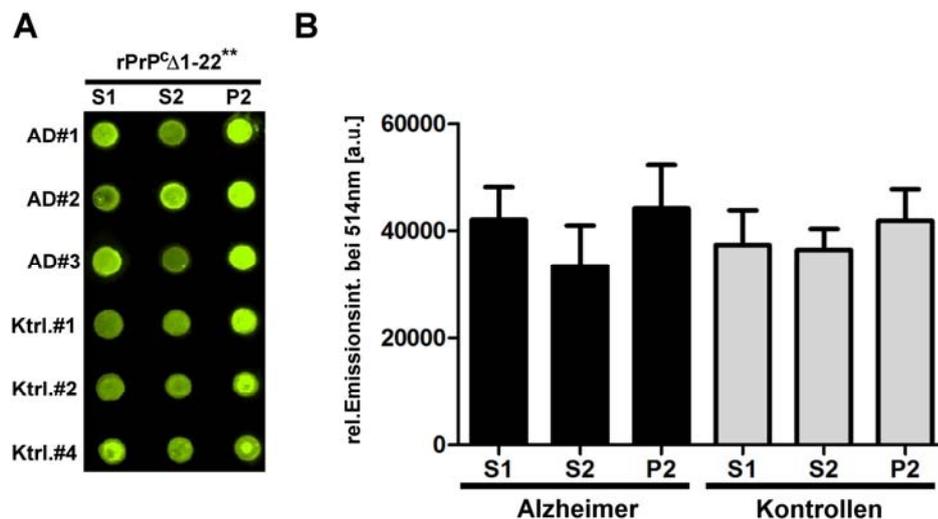
**Abb. 3.18: Nachweis der Spezifität detektierter Fluoreszenzsignale.**

**A** Unbehandelte sA $\beta$ 42o (-A11) oder mit A11 präinkubierte sA $\beta$ 42o (+A11) wurden an einer NCM immobilisiert und mit rPrP<sup>C</sup>Δ1-22<sup>\*\*</sup> inkubiert. Als Referenz wurde eine separater Membransteifen mit sA $\beta$ 42o +rPrP<sup>C</sup>ΔNT inkubiert. Nach Anregung bei einer Wellenlänge von 499 nm wurden die Fluoreszenzsignale detektiert. **B** Quantifizierung der gemessenen relativen Emissionsintensität bei 514nm (\*\*\*)  $p > 0.001$ ).

Durch die Vorbehandlung der sA $\beta$ 42o mit dem A11-Antikörper konnten die detektierten Emissionswerte bei 514 nm im Vergleich zu unbehandelten sA $\beta$ 42o signifikant verringert werden (\*\*\*)  $p > 0.001$ ). Die Emissionsintensität war vergleichbar mit Werten der rPrP<sup>C</sup>ΔNT Negativkontrolle.

### 3.3.5 APIA im Dot-Blot-Format eignet sich nicht zur Analyse von humanen Homogenaten

S1-, S2- und P2-Fractionen von jeweils drei Alzheimer- und drei Kontrollpatienten wurden vorbereitet. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Bradford-Assay wurden 500 ng des Gesamtproteins der entsprechenden Homogenat-Fraktion mit Hilfe von Vakuum auf die Membran überführt. Nach Absättigung freier Bindestellen, durch die Inkubation mit 5 %iger Blockierlösung, konnte der Membranstreifen bei RT für die Dauer von 45 min zusammen mit der rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22\*\* Sonde inkubiert werden. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T konnten die Fluoreszenzintensitäten am Membranabschnitt unter Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm detektiert werden. Abbildung 3.19 zeigt das Ergebnis des Versuchs.



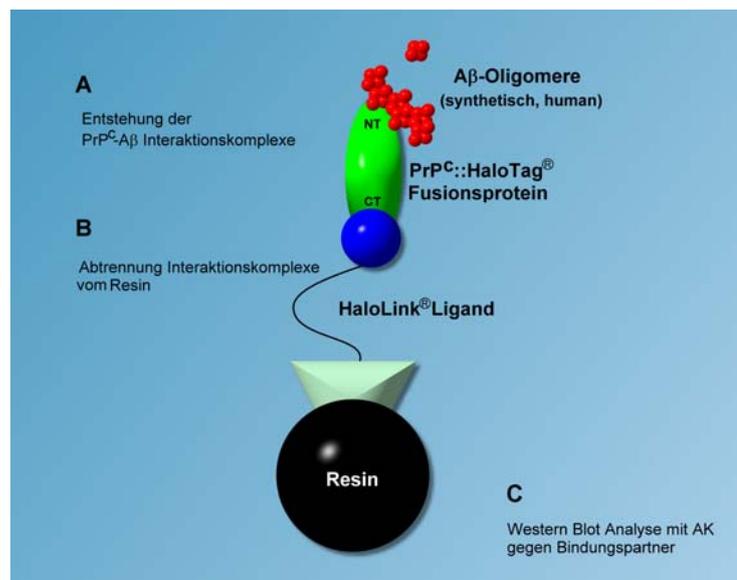
**Abb. 3.19:** APIA mit humanen S1-, S2- und P2-Fractionen.

500 ng der S1-, S2- und P2-Fractionen von drei Alzheimer- und drei Kontrollpatienten wurden an der Membran immobilisiert und mit der rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22\*\* Sonde via APIA getestet. **A** Darstellung des detektierten Fluoreszenzprofils am Membranabschnitt. **B** Darstellung der gemessenen relativen Emissionswerte bei 514 nm im Balkendiagramm.

An dem untersuchten Membranstreifen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der gemessenen relativen Emissionsintensitäten bei 514 nm feststellen.

### 3.4 Nachweis der Interaktion zwischen rPrP<sup>C</sup> und A $\beta$ -Oligomeren im APIA mit immobilisierten Fängerproteinen

Das verwendete HaloTag<sup>®</sup>-Vektorsystem ermöglichte es nicht nur die rekombinant exprimierten Fusionsproteine kovalent an fluoreszierende Reportermoleküle zu koppeln, sondern auch an einer stationären Phase gerichtet zu immobilisieren und als Fängerprotein für A $\beta$  verschiedener Quellen (synthetisch oder human) zu nutzen. Da der APIA im Dot-Blot-Format nur für Bindestudien unter Verwendung von sA $\beta$ 42 geeignet war, wurden weitere Bindestudien in diesem Format durchgeführt. Abbildung 3.20 zeigt schematisch das Funktionsprinzip des Interaktionsassays dieser Form.

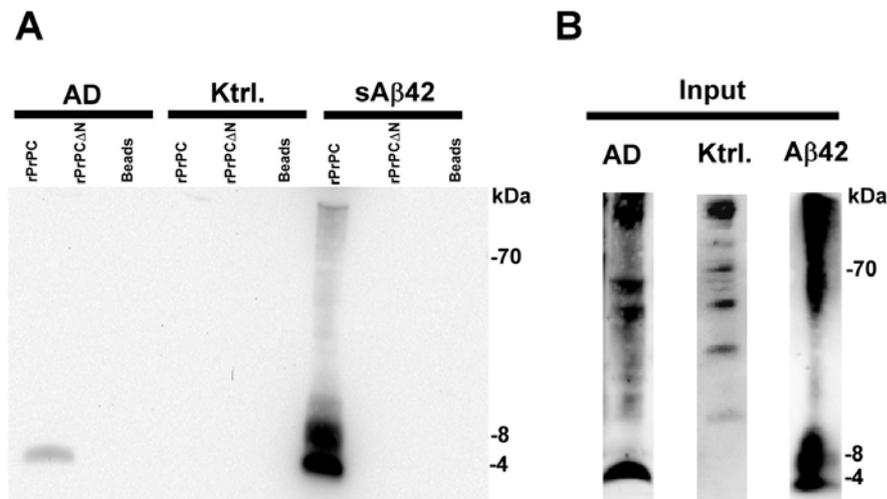


**Abb. 3.20:** Funktionsprinzip mit immobilisierten rPrP<sup>C</sup>-Fängerproteinen.

Rekombinant exprimiertes PrP<sup>C</sup> kann über den Tag an einer stationären Phase (Resin) gerichtet immobilisiert werden. Die grundlegenden Schritte des Assays beinhalten **A** die Inkubation von A $\beta$ -Oligomeren mit immobilisierten rPrP<sup>C</sup>, **B** das Abtrennen der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Komplexe vom Resin durch Hitze und **C** die Western-Blot-Analyse des Interaktionskomplexes mit dem A $\beta$ -spezifischem Antikörper 6E10.

### 3.4.1 Funktionelle Überprüfung von APIA mit immobilisierten rPrP<sup>C</sup>

Um in vorausgehenden Experimenten die Funktionalität des Assay-Formats für die Verwendung von sA $\beta$ 42 und humanen Homogenaten zu überprüfen, wurde rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 und rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT an die stationäre Resin-Phase gekoppelt. S1-Fractionen von Gewebe aus dem frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten und Kontrollpatienten sowie gealtertes sA $\beta$ 42 wurden hergestellt. Immobilisiertes rPrP<sup>C</sup> wurde mit den Bindepartnern gemeinsam bei 4 °C über Nacht auf einem Rotator inkubiert. Nach Zentrifugation am Folgetag bei 800 x g für 1 min wurde der Überstand verworfen und das Resin in 20  $\mu$ l Probepuffer aufgenommen, für 5 min bei 95 °C gekocht und auf einem 4-12 %igen Bis-Tris-Gradientengel aufgetrennt. Nach dem Western Blot erfolgte die Detektion von gebundenem A $\beta$  mit 6E10. Abbildung 3.21 zeigt das Ergebnis des Versuchs.



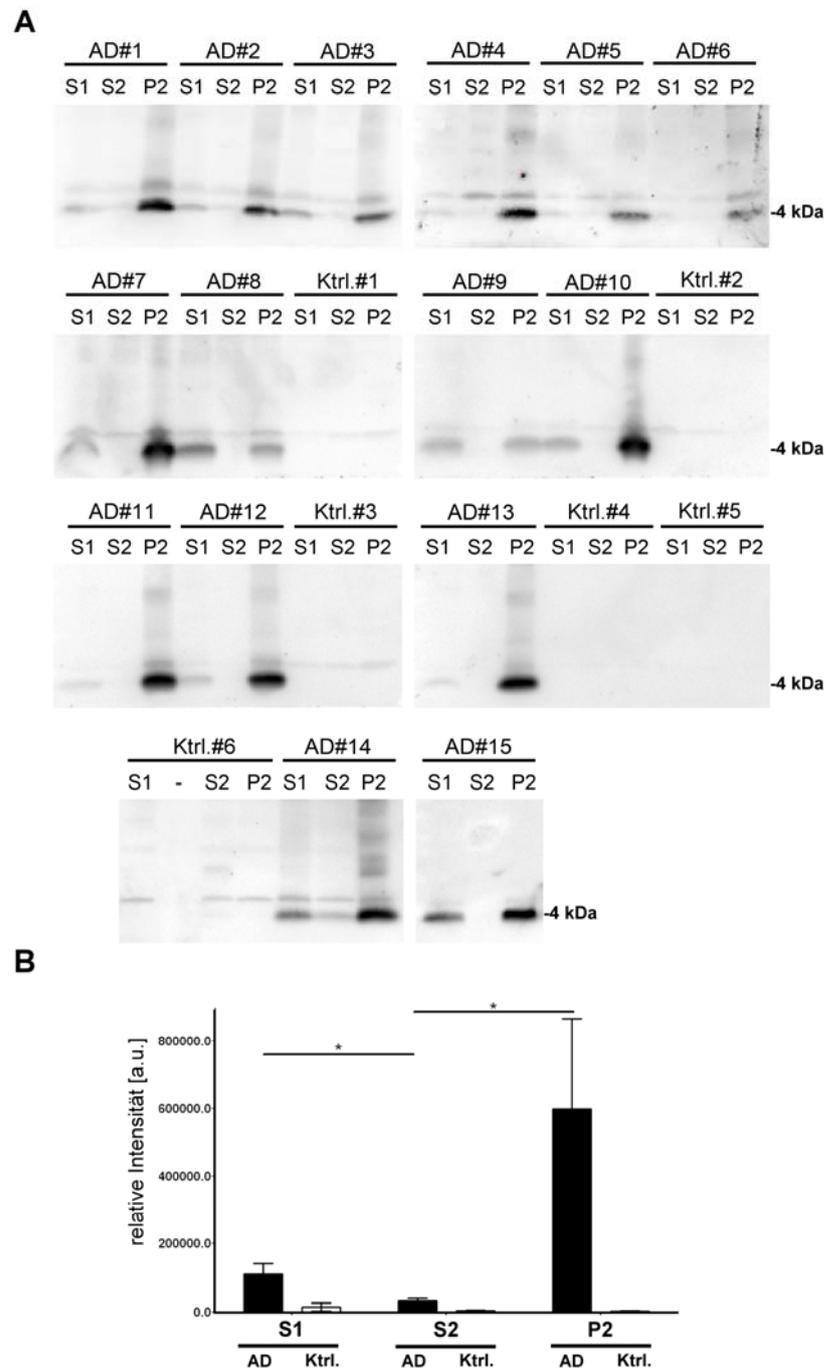
**Abb. 3.21: Funktionelle Überprüfung des Assays mit immobilisierten rPrP<sup>C</sup>.**

**A** S1-Fractionen (Totalhomogenate) von Alzheimer- (AD) und Kontrollpatienten (Ktrl.) sowie gealtertes synthetisches A $\beta$ 42 (sA $\beta$ 42) wurden im APIA unter Verwendung von rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 (rPrP<sup>C</sup>) und rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT (rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ N) getestet. Als zusätzliche Negativkontrolle wurden Beads mit den S1-Homogenaten bzw. sA $\beta$ 42 inkubiert. Nach Auftrennung auf 4-12 %igen Bis-Tris-Gradientengelen und Western Blots erfolgte die Überprüfung der Interaktion mit dem A $\beta$ -spezifischen AK 6E10. **B** Western-Blot-Analyse unter Verwendung von 6E10 des in den Assay eingesetzten Inputs.

Eine Interaktion kann nur unter Verwendung von immobilisierten rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 und dem Homogenat von Alzheimer-Patienten und sA $\beta$ 42 detektiert werden. Keine Interaktion konnte bei Verwendung des Homogenats des Kontrollpatienten nachgewiesen werden.

### **3.4.2 Die stärkste Interaktion zwischen rPrP<sup>C</sup> und A $\beta$ ist in P2-Fractionen von Alzheimer-Patienten detektierbar.**

Ergebnisse durch Co-Immunopräzipitation mit dem Prion-spezifischen Antikörper 3F4 zeigten eine starke Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und A $\beta$  in den P2-Fractionen von Alzheimer-Patienten *in vivo*. Die Interaktion konnte nicht bei Verwendung von P2-Fractionen der Kontrollpatienten detektiert werden. Um die Beobachtung aus den Experimenten durch Co-IP zu untermauern, wurden S1-, S2- und P2-Fractionen von 15 Alzheimer- und sechs Kontrollpatienten hergestellt und durch APIA getestet. Dazu wurde 0,125 mg graue Substanz des frontalen Kortex der unterschiedlichen Patienten abgewogen und in 600  $\mu$ l Lysepuffer mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators homogenisiert. Der anschließende Zentrifugationsschritt bei 7.500 x g für 1 min bei 4 °C diente dazu Zelltrümmer und Fettreste der weißen Substanz aus dem Homogenat zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues, auf Eis vorgekühltes, 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Hiervon wurden 100  $\mu$ l entnommen um ihn im späteren Assay als S1-Fraktion (Totalhomogenat) zu testen. Die restlichen 500  $\mu$ l wurden in einer Ultrazentrifuge (L-60, Beckman Coulter) bei 4 °C und 100.000 x g für 60 min zentrifugiert. Der Überstand (S2-Fraktion) wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und das verbleibende Pellet in 500  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert (P2-Fraktion). Jeweils 80  $\mu$ l der jeweiligen Fractionen wurden zu Resin-gekoppelten rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ -122 gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Nach Abtrennung der rPrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktionskomplexe durch Kochen bei 95 °C für 5 min in Probenpuffer, wurde die Probe nach Auftrennung auf 4-12 %igen Bis-Tris-Gradientengelen in der anschließenden Western-Blot-Analyse mit dem A $\beta$ -spezifischen Antikörper 6E10 getestet (Abb. 3.22).



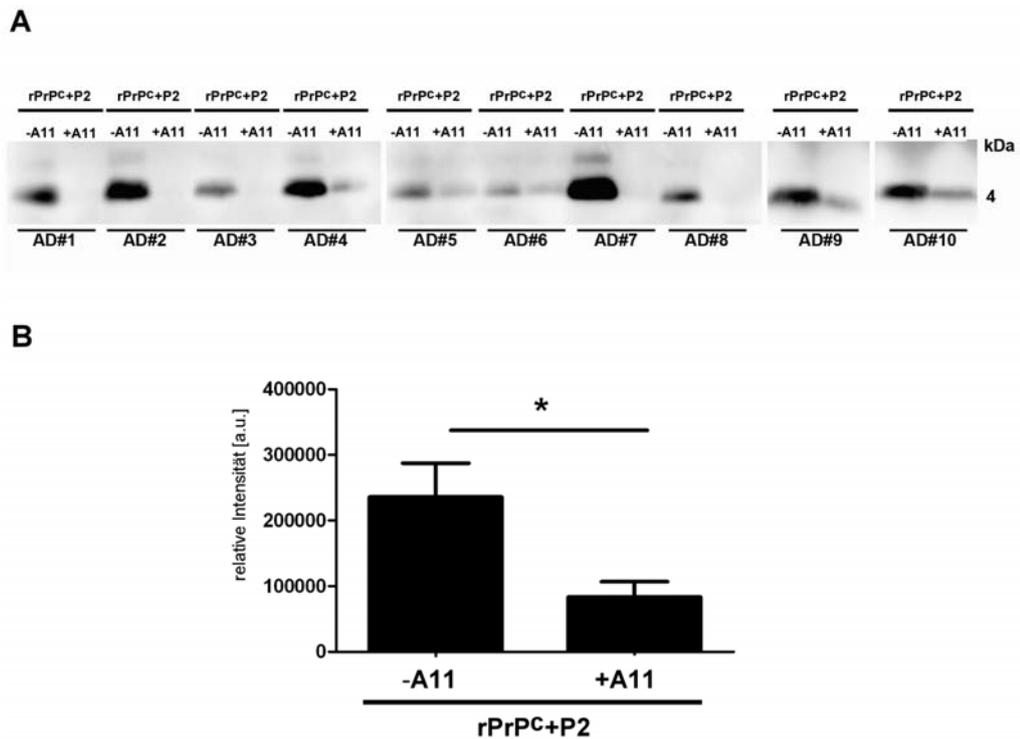
**Abb. 3.22: Analyse von S1-, S2- und P2-Fractionen der Kohorte via APIA.**

S1-, S2- und P2-Fractionen von 15 Alzheimer- (AD) und sechs Kontrollpatienten (Ktrl.) wurden im APIA mit immobilisiertem rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 getestet. **A** Ergebnis der Western-Blot-Analyse nach Inkubation der Membran mit dem Antikörper 6E10. **B** Quantifizierung der detektierten Signale an der Membran (\* $p > 0,05$ ).

Eine Interaktion zwischen den immobilisierten rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 mit A $\beta$ o konnte bei allen Homogenaten der Alzheimer-Patienten bestätigt werden. Das stärkste Signal zur Interaktion zeigten P2-, das schwächste Signal die S2-Fractionen. Demgegenüber konnte keine Interaktion in den Homogenat-Fractionen der Kontrollpatienten detektiert werden.

### **3.4.3 Die rPrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion ist spezifisch und kann durch den A11-Antikörper inhibiert werden**

Die Interaktion zwischen A $\beta$ o und den N-terminalen Bindestellen von rPrP<sup>C</sup> kann durch die Verwendung von Antikörpern wie A11 spezifisch gehemmt werden. Dieser Antikörper erkennt die typischen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen von Oligomeren unabhängig ihres Ursprungs oder ihrer Sequenz und sollte somit die Bindung effizient inhibieren können. rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 (rPrP<sup>C</sup>) wurde am Resin immobilisiert. P2-Fractionen von Zehn Alzheimer-Patienten wurden für 60 min auf einem Rotator bei 4 °C mit A11 in einer Konzentration von 5 mM präinkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte P2-Fractionen der entsprechenden Patienten im Versuch mitgeführt. Nach gemeinsamer Inkubation der Bindepartner wurde das Resin in Probenpuffer aufgenommen, gekocht und im Western Blot unter Verwendung von 6E10 analysiert (Abb. 3.23).



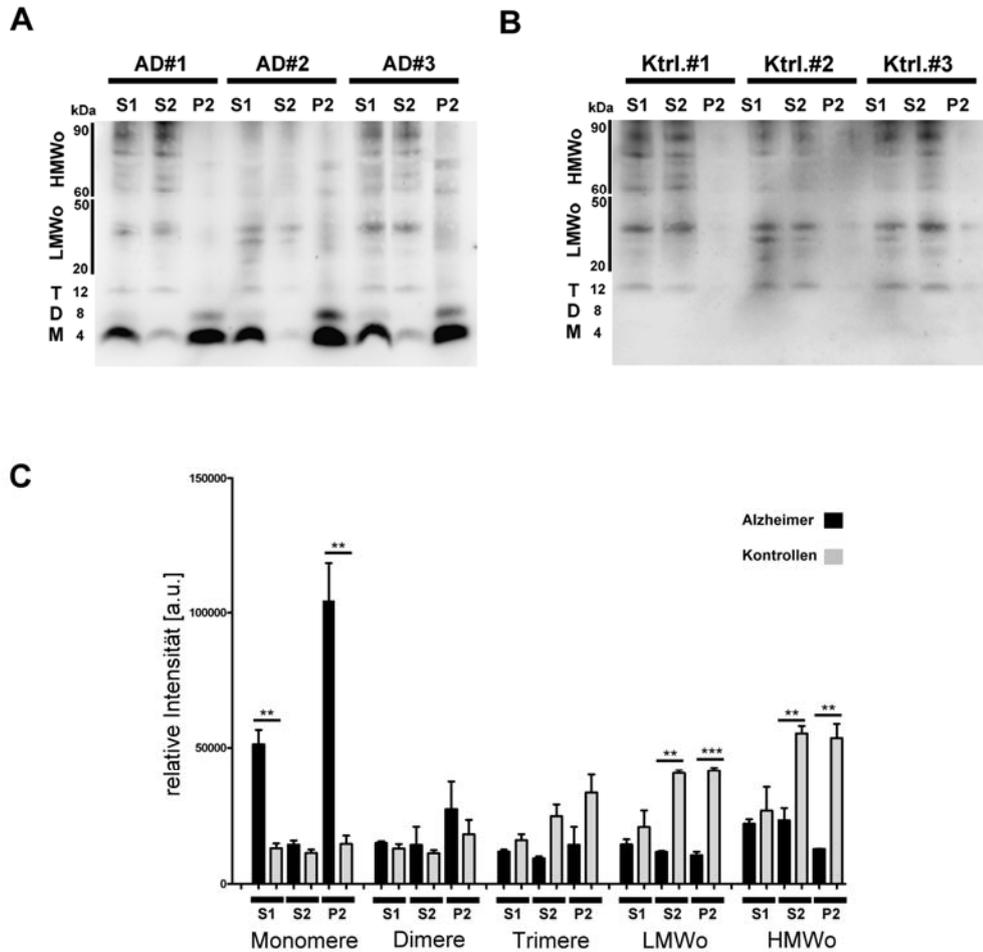
**Abb. 3.23: Nachweis der Spezifität detektierter Signale im APIA-Bindeassay.**

An Resin immobilisiertes rPrPC $\Delta$ 1-22 (rPrPC) wurde zusammen mit P2-Fractionen von Alzheimer (AD)-Patienten inkubiert, die im Vorfeld entweder nicht mit dem A11-AK (-A11) oder zusammen mit dem AK inkubiert worden sind (+A11). **A** Ergebnis der Western-Blot-Analyse unter Verwendung des Antikörpers 6E10. **B** Im Western Blot detektierte Banden wurden densitometrisch quantifiziert und im Balkendiagramm dargestellt (\* $p > 0,05$ ).

Durch die Präinkubation der humanen Alzheimer-P2-Fractionen mit dem Oligomer-spezifischen Antikörper A11 konnte die Interaktion zwischen dem am Resin gekoppelten rPrPC $\Delta$ 1-22 im Vergleich zu den unbehandelten Proben signifikant reduziert werden.

### **3.4.4 A $\beta$ liegt in Western-Blot-Analysen der P2-Fractionen von Alzheimer-Patienten hauptsächlich in monomerer Form vor**

Die stärkste Interaktion konnte in den P2-Fractionen von Alzheimer-Patienten detektiert werden, während die Homogenate der Kontrollen nicht mit den an Resin gekoppelten rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 interagierten (Abb. 3.22). Auch im ELISA wurden die höchsten Konzentrationen an A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42 in den P2-Fractionen gefunden (Abb. 3.3). Der ELISA-Test unterscheidet hierbei nicht zwischen den unterschiedlichen A $\beta$ -Aggregationszuständen in den untersuchten Fractionen der Alzheimer- und Kontrollpatienten. Deshalb wurden Western-Blot-Analysen der S1-, S2- und P2-Fractionen von je drei Alzheimer-Patienten und Kontrollen durchgeführt. Fractionen wurden wie in Abschnitt **2.2.9.5** beschrieben hergestellt. Nach Angleichen der Proteinkonzentration wurden jeweils 50  $\mu$ g Totalprotein der Homogenat-Fractionen auf 4-12 %igen Bis-Tris-Gradientengelen aufgetrennt und anschließend in Western-Blot-Analysen unter Verwendung des 6E10-Antikörpers untersucht. Die hierbei detektierten A $\beta$ -Banden wurden entsprechend ihres Molekulargewichts in Monomere (M; 4 kDa), Dimere (D; 8 kDa), Trimere (T; 12 kDa), sowie LMWo (*low molecular weight oligomers*; A $\beta$ o mit kleinem Molekulargewicht; ~20-55 kDa) und HMWo (*high molecular weight oligomers*; A $\beta$ o mit großem Molekulargewicht; ~60-95 kDa) eingeteilt und mit Hilfe der Quantity One<sup>®</sup>-Software (BioRad) quantifiziert. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse und der Quantifizierung ist in Abbildung 3.24 aufgeführt.



**Abb. 3.24:** Vergleich der A $\beta$ -Spezies in Gehirnen von Alzheimer- und Kontrollpatienten.

Homogenat-Fractionen von jeweils drei Alzheimer- (AD) und Kontrollpatienten (Ktrl.) wurden im Western Blot unter Verwendung des Antikörpers 6E10 auf das Vorhandensein von unterschiedlichen Formen der A $\beta$ -Oligomere untersucht. **A** Detektiertes Bandenmuster auf der Membran in der Western-Blot-Analyse der Alzheimer Patienten und **B** Kontrollpatienten. **C** Graphische Darstellung der Quantifizierung der Banden. (\*\* $p > 0,01$ ; \*\*\* $p > 0,0001$ ).

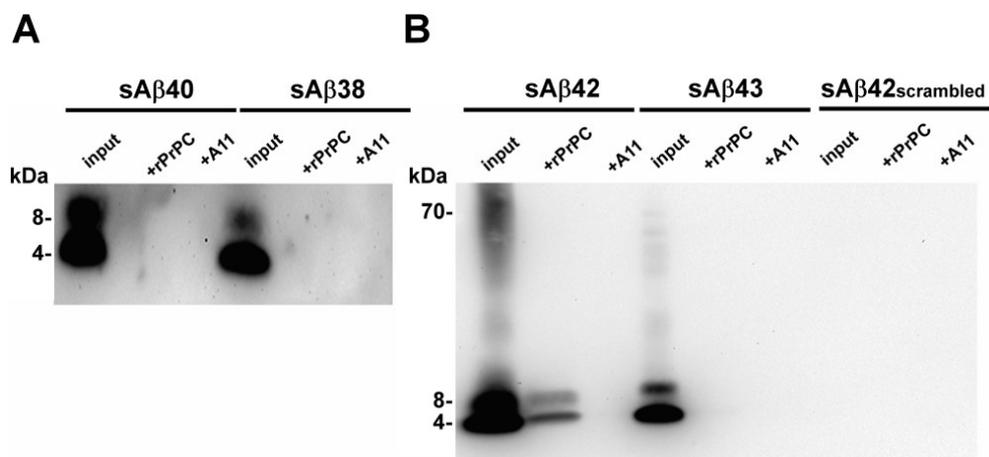
In den S1- und P2-Fractionen der drei getesteten Alzheimer-Patienten ist die Menge an detektiertem monomeren A $\beta$  im Vergleich zu den entsprechenden Fractionen der Kontrollen signifikant erhöht. Bei den Kontrollen ist hingegen die Menge an LMW-Oligomeren und HMW-Oligomeren in den S2- und P2-Fractionen im Vergleich zu Alzheimer-Patienten signifikant erhöht.

### 3.5 Identifizierung der bindenden A $\beta$ 42-Oligomer Spezies

Durch Größenausschlusschromatographie (SEC) in Kombination mit APIA sollte die Größe der sA $\beta$ 42o-Spezies und der A $\beta$ -Oligomere bei Alzheimer-Patienten identifiziert werden, die eine bevorzugte Interaktion mit humanem rPrP<sup>C</sup> zeigen. Da APIA im Dot-Blot-Format nicht für die Arbeit mit humanem Probenmaterial geeignet erschien, wurden die folgenden Experimente via APIA mit immobilisiertem rPrP<sup>C</sup> durchgeführt. Dazu wurde zuerst die Spezifität des Assays für die Arbeit mit sA $\beta$ 42o überprüft.

#### 3.5.1 rPrP<sup>C</sup> bindet ausschließlich an sA $\beta$ 42o.

Zum Nachweis der Spezifität der Bindung wurde rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 nach Zellaufschluß der Bakterien am Resin immobilisiert. Als Bindepartner für rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 wurden gealterte Proben von synthetischen A $\beta$ 38 (sA $\beta$ 38)-, A $\beta$ 40 (sA $\beta$ 40)-, A $\beta$ 42- und A $\beta$ 42<sub>scrambled</sub> (sA $\beta$ 42<sub>scrambled</sub>)-Peptiden verwendet. Als zusätzliche Kontrolle wurden die sA $\beta$ -Peptide, die vorher mit dem Oligomer-spezifischen Antikörper A11 für 60 min auf einem Rotator bei 4 °C präinkubiert wurden, im Versuch mitgeführt. Der Antikörper bindet die typischen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen der sA $\beta$ o und inhibiert somit die Interaktion. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 3.27 dokumentiert.



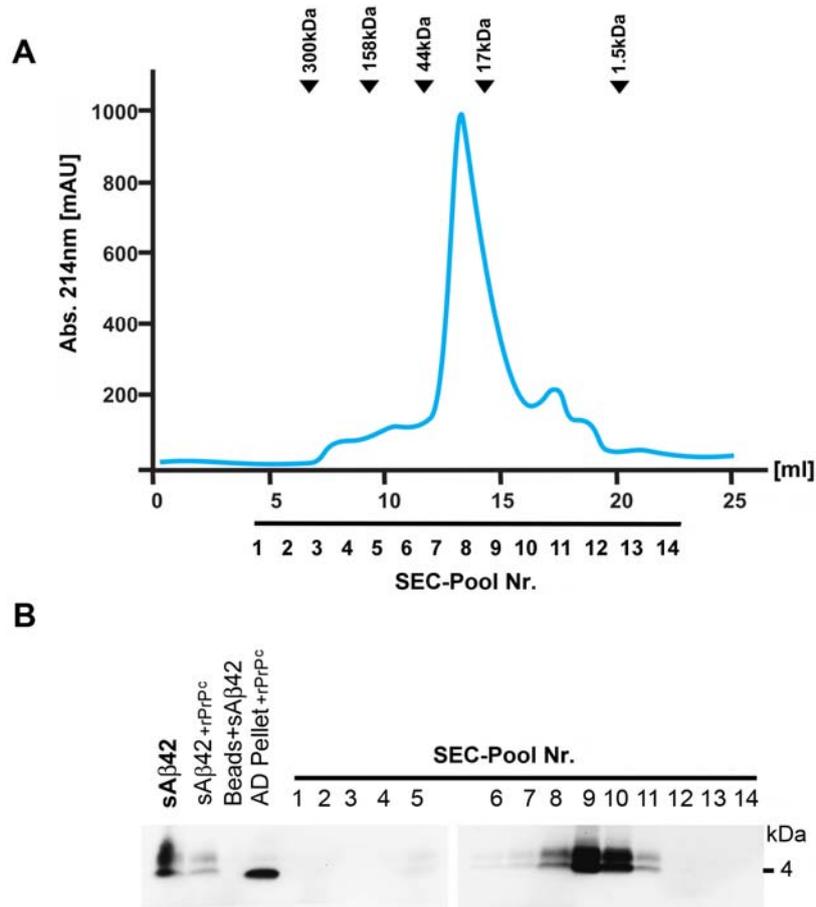
**Abb. 3.25: Nachweis der Spezifität der Interaktion zwischen rPrP<sup>C</sup> und sA $\beta$ 42**

Immobilisiertes rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 (rPrP<sup>C</sup>) wurde mit gealterten Proben von synthetischem A $\beta$ 38, A $\beta$  40, A $\beta$ 42 und A $\beta$ 42<sub>scrambled</sub> inkubiert. Ebenso wurden zusätzliche Proben der sA $\beta$ o im Vorfeld mit A11 inkubiert. **A** Ergebnis der Western-Blot-Analyse mit 6E10 von sA $\beta$ 40 und sA $\beta$ 38. **B** Ergebnis der Western-Blot-Analyse mit 6E10 von sA $\beta$ 42, sA $\beta$ 43 und sA $\beta$ 42<sub>scrambled</sub>.

Obwohl sA $\beta$ 38, sA $\beta$ 40 und sA $\beta$ 43 Oligomerisierung zeigen, konnte keine Interaktion mit rPrPC $\Delta$ 1-22 detektiert werden. Interaktion zwischen rPrPC $\Delta$ 1-22 und A $\beta$  konnte in der Western-Blot-Analyse mit 6E10 nur für sA $\beta$ 42 nachgewiesen werden. Die Bindung der sA $\beta$ 42o an rPrPC konnte durch die Vorbehandlung der Peptide mit dem A11-Antikörper effektiv inhibiert werden.

### **3.5.2 Niedermolekulare sA $\beta$ 42-Oligomere binden huPrPC**

SEC-Experimente in Kombination mit APIA unter Verwendung von rPrPC $\Delta$ 1-22 zeigten bei P2-Fractionen des frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten, dass bevorzugt hochmolekulare A $\beta$ -Aggregate im Assay an huPrPC binden. Für die Bestimmung der bindenden Spezies von sA $\beta$ 42o, wurde 0,5 mg gealtertes sA $\beta$ 42 in einem Volumen von 500  $\mu$ l auf die Superose<sup>TM</sup> 12 10/300 GL Säule an der Äkta-Explorer (GE Healthcare) aufgetragen. Die bei einer Flussrate von 0,25 ml/min eluierten Fraktionen des sA $\beta$ 42-Peptids wurden bei einer Wellenlänge von 216 nm detektiert und in Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt. Abb. 3.28-A zeigt das Chromatogramm der nativen Gelfiltration von sA $\beta$ 42o mit PBS als Elutionspuffer.



**Abb. 3.26: LMW von sA $\beta$ 42o binden humanes rPrP<sup>C</sup>.**

sA $\beta$ 42o wurde in einer Größenausschlusschromatographie aufgetrennt, eluierte sA $\beta$ 42-Fraktionen gepoolt und anschließend mit APIA getestet. **A** Typisches Elutionsprofil von sA $\beta$ 42o bei Detektion mit einer Wellenlänge von 216 nm. Schwarze Pfeile geben das durch Standardpeptide bestimmte Molekulargewicht der Fraktionen bei einem bestimmten Elutionsvolumen wieder. **B** Western-Blot-Analyse des APIA-Experiments der gepoolten sA $\beta$ 42-Fraktionen. sA $\beta$ 42 + rPrP<sup>C</sup>, sowie die P2-Fraktion eines Alzheimer-Patienten + rPrP<sup>C</sup> dienten als Positivkontrolle.

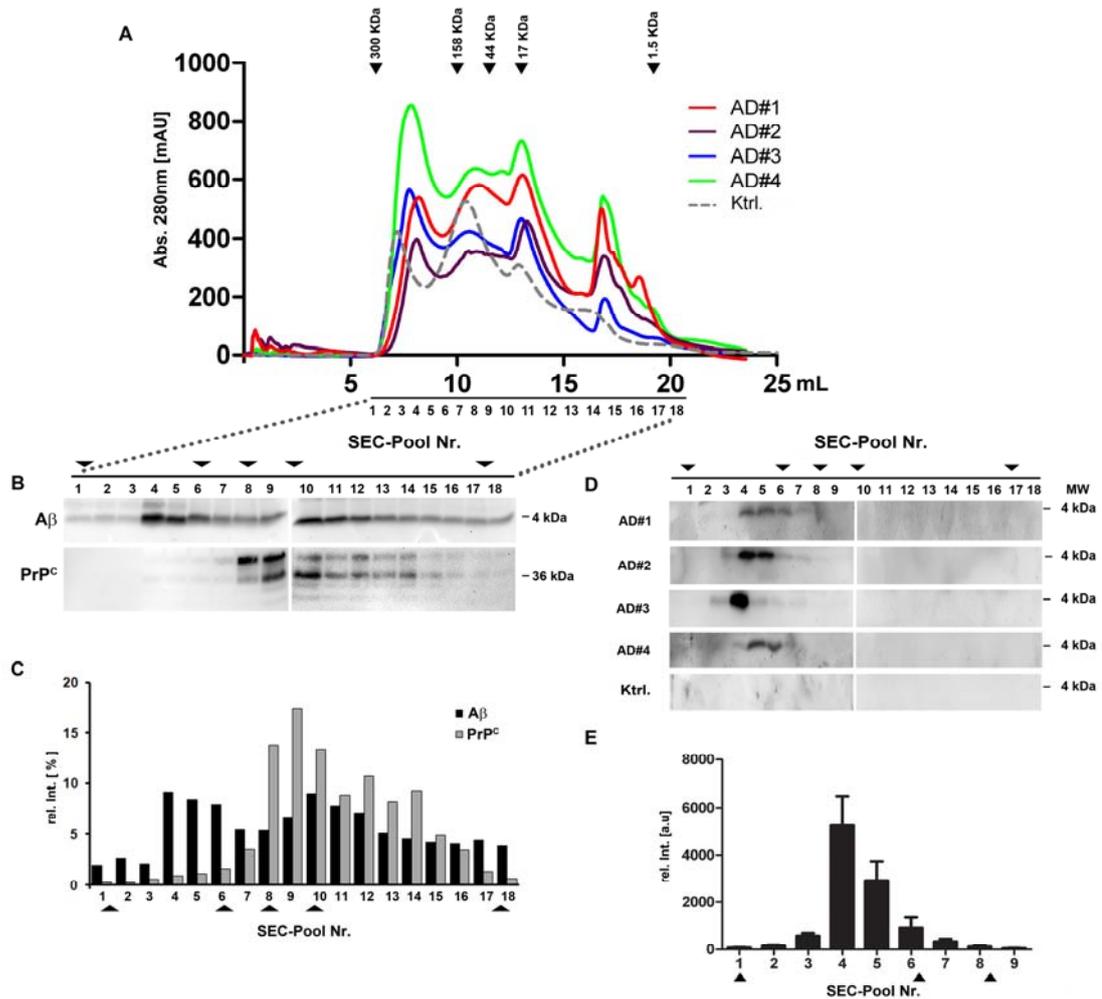
Je drei benachbarte der eluierten Fraktionen wurden zu einem Pool zusammengefasst, anschließend in einer Speed Vac lyophilisiert und in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. 70  $\mu$ l der Pools wurden zusammen mit rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation des Resins bei 800 x g für 1 min wurde der Überstand verworfen, das Resin in 20  $\mu$ l 10x Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C gekocht. Die Auftrennung der Probe erfolgte in 4-12 %igen Bis-Tris-Gradientengelen. Der Erfolg der Interaktion wurde in Western-Blot-Analysen unter Verwendung von 6E10 überprüft (Abb.

3.27-B). Die stärkste Interaktion zwischen sA $\beta$ 42o und rPrP $^C$  $\Delta$ 1-22 konnte in den Pools 8,9 und 10 detektiert werden. Die eluierten Peptide in diesen Fraktionen besitzen ein Molekulargewicht von 8 bis 21 kDa. Die rPrP $^C$ -bindenden A $\beta$ 42-Pools lagen in der Nähe des Absorptionsmaximums bei 214 nm. Um auszuschließen, dass die Signalstärke in der Western-Blot-Analyse von der Menge an eluiertem A $\beta$  bestimmt wird, wurde in einem zusätzlichen Experiment die sA $\beta$ 42-Konzentration in jedem Pool angeglichen und in APIA getestet. Auch nach dem Angleichen der Peptidkonzentration zeigten Pool 8, 9 und 10 die stärkste Interaktion mit rPrP $^C$  (s. Anhang, Abb. VII. III).

### 3.5.3 Hochmolekulare A $\beta$ -Aggregate binden rPrP $^C$ in AD

Abbildung 3.24 zeigt, dass unterschiedliche A $\beta$ -Aggregationszustände in den Gewebeproben des Frontalkortex von Alzheimer- und Kontroll-Patienten zu detektieren sind. Um die Frage zu beantworten, welche Spezies der A $\beta$ o bevorzugt an humanes rPrP $^C$  $\Delta$ 1-22 binden, wurden die Proteine der P2-Fractionen von vier Alzheimer- sowie einem Kontrollpatienten mittels Größenausschlusschromatographie (SEC; *Size Exclusion Chromatography*) aufgetrennt. P2-Fractionen der getesteten Patienten wurden in einem Gemisch aus Lysepuffer und Sarkosyl hergestellt. Zur Auftrennung der Homogenate wurde die Superose<sup>TM</sup> 12 10/300 GL an einem Äkta-Explorer-System (GE Healthcare) verwendet. Die Säule trennt Proteine in einem Bereich von 1 kDa bis 300 kDa auf. 1 ml der P2-Fractionen wurde auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate an der Äkta-Explorer betrug 0,25 ml/min, das Sammelvolumen der eluierten Proteinfractionen 0,5 ml. Die Detektion der eluierten Proteine fand bei einer Wellenlänge von 280 nm statt. Als Elutionspuffer wurde PBS + 1 % Sarkosyl verwendet. Abbildung 3.24-A zeigt die typischen Chromatogramme der P2-Fractionen von Alzheimer- und Kontrollpatienten. Jeweils drei benachbarte Elutionsfractionen wurden zu einem Probenpool zusammengefasst. Das Probenvolumen von 1,5 ml wurde komplett in einer Speed Vac verdampft und die Proteine in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. 10  $\mu$ l der Pools wurden entnommen, auf einem 4-12 %igen Gradientengel aufgetrennt und in Western-Blot-Analyse mit dem A $\beta$ -spezifischen AK 6E10, sowie dem PrP $^C$ -spezifischen AK Pom-1 getestet (Abb. 3.24-B). Detektierte Signale wurden im Anschluss quantifiziert (Abb. 3.24-C). Zur Bestimmung der bindenden A $\beta$ o-Spezies wurden 80  $\mu$ l der P2-Fractionen zusammen mit an Resin immobilisierten rPrP $^C$  $\Delta$ 1-22 bei 4 °C über Nacht auf einem Rotator inkubiert. Nach Auftrennung der Proteine auf 4-12 %igen Bis-Tris-

Gradientengelen und Western Blotting, wurden Membranen zur weiteren Analyse mit A $\beta$ -spezifischen AK 6E10 inkubiert. Detektierte Signale, als Nachweis der Interaktion, wurden dokumentiert und quantifiziert (Abb. 3.25-D und E).



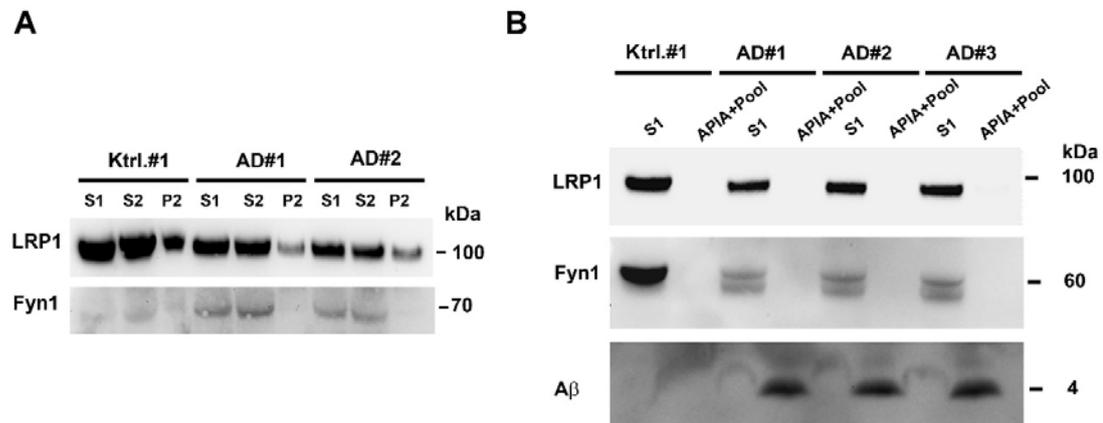
**Abb. 3.27: Identifizierung der interagierenden A $\beta$ -Spezies in Alzheimer-Patienten.**

P2-Fractionen von vier Alzheimer- (AD) und einem Kontrollpatienten (Ktrl.) wurden mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt und eluierte Proteinfractionen in anschließenden Western-Blot-Analysen untersucht. **A** Typische SEC-Elutionsprofile von P2-Fractionen. Detektion der Proteine fand bei einer Wellenlänge von 280nm statt. Pfeile geben das ungefähre Molekulargewicht der eluierten Fractionen wieder. **B** Western-Blot-Analyse der gepoolten Elutionsfractionen (1–18) mit den Antikörpern 6E10 und Pom-1. **C** Quantifizierung der detektierten Signale für A $\beta$  und PrP<sup>C</sup> eines Alzheimer-Patienten. **D** Ergebnis der Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper 6E10. Eluierte SEC-Pools wurden zusammen mit immobilisiertem rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 inkubiert. **E** Darstellung der densitometrischen Analyse der detektierten Signale bei Alzheimer-Patienten im Balkendiagramm.

Die vier Alzheimer- und der verwendete Kontrollpatient zeigten ein vergleichbares Elutionsprofil in der Größenausschlusschromatographie mit vier prominenten Schulterpeaks nahe 300 kDa, zwischen 150 kDa und 50 kDa, bei 17 kDa sowie zwischen 17 kDa und 1,5 kDa. Western-Blot-Analysen der eluierten Protein-Pools zeigten, dass monomeres A $\beta$  in Pool 1 bis 18 zu finden ist. PrP<sup>C</sup> hingegen konnte hauptsächlich in den Pools 4 bis 16 detektiert werden. Wurden die eluierten Pools der Alzheimer-Patienten im APIA getestet, konnte eine Interaktion mit A $\beta$ -Aggregaten in Pool 3 bis Pool 7 detektiert werden. Die stärksten Signale traten hierbei in Pool 4 bis Pool 6 auf. Die A $\beta$ -Aggregate in diesen Pools entsprechen einem Molekulargewicht >158 kDa. Keiner der Pools des Kontrollpatienten zeigte hier eine Bindung an rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22.

#### **3.5.4 LRP1 und Fyn1 können mit APIA nicht als potentielle scaffold-Protein-Komplexparker bei Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden**

Die Abbildungen 3.25-D und E zeigen deutlich, dass die mit rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 interagierenden A $\beta$ -Aggregate nur in Alzheimer-Patienten zu finden sind und ein Molekulargewicht von >150 kDa haben. Dies legt die Vermutung nahe, dass die bindenden A $\beta$ o vielleicht im Komplex mit weiteren, potentiellen *scaffold*-Proteinen eine Interaktion eingehen. So könnte das beobachtete, hohe Molekulargewicht der interagierenden A $\beta$ -Aggregate erklärt werden. Als potentielle Komplexparker sind LRP1 und Fyn1 in der Literatur beschrieben (Laurén, 2014). Liegen die A $\beta$ -Aggregate *in vivo* im Komplex mit diesen Proteinen vor, sollten sie durch APIA-Experimente detektierbar sein. In folgenden Experimenten wurde zuerst bestimmt, in welchen Fraktionen der Homogenate (S1, S2 oder P2) LRP1 und Fyn1 zu detektieren sind (Abb. 3.26-A). Anschließend wurden die am stärksten mit rPrP<sup>C</sup> interagierenden Pools (Pool 4 bis Pool 6) von drei Alzheimer-Patienten zu einem Pool zusammengefasst und in APIA an immobilisierten rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 getestet. Die Proteine des Interaktionskomplexes wurden durch Hitze vom Resin abgetrennt, auf einem 4-12 %igen Bis-Tris-Gradientengel aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen A $\beta$ , LRP1 und Fyn1 untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.26-B gezeigt.



**Abb. 3.28: Identifizierung potentieller *scaffold*-Proteine via APIA.**

Mit rPrP<sup>C</sup> interagierende Elutionsfraktionen von drei Alzheimer (AD)-Patienten wurden in einem Pool vereint und in APIA verwendet. **A** Nachweis von LRP1 sowie Fyn1, in S1-, S2- und P2-Fractionen (ohne APIA) bei einem Kontroll-Patienten und drei Alzheimer-Patienten durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung der entsprechenden Antikörper. **B** Ergebnis der Western-Blot-Analyse unter Verwendung von Antikörpern gegen Aβ (6E10), LRP1 (8G1) und Fyn1 (Fyn) nach vorausgehendem Pulldown im APIA.

LRP1 und Fyn1 konnten am stärksten in der S1- und S2-Fraktion von Alzheimer- und Kontrollpatienten nachgewiesen werden. Der P2-Bindepool der Alzheimer-Patienten und Kontrollen zeigte nach Inkubation mit rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 keine Signale für LRP1 und Fyn1 in der Western-Blot-Analyse nach Verwendung der entsprechenden Antikörper. Lediglich die Verwendung von 6E10 zeigte in den Bindepools der Alzheimer-Patienten ein positives Signal. Zudem wurden Pools der Alzheimer-Patienten, die Interaktion mit rPrP<sup>C</sup> zeigten, auf 4-12 %igen Bis-Tris-Gradientengelen aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die Spuren wurden in zehn Abschnitte entsprechend des Molekulargewichts unterteilt, ausgeschnitten und durch ESI-TOF (*electrospray ionization-time of flight*) Massenspektrometrie analysiert. Auch durch diese Methode konnte weder LRP1 oder Fyn als ein potentieller Komplexpartner nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion des zellulären Prion-Proteins (PrP<sup>C</sup>) mit A $\beta$ -Oligomeren (A $\beta$ <sub>o</sub>) *in vivo* und *in vitro* charakterisiert. Erst kurze Zeit vor dem Beginn des Projektes im Jahr 2010, wurde der lang vermutete Zusammenhang zwischen Prionerkrankungen und der Alzheimer-Erkrankung durch die Identifizierung von PrP<sup>C</sup> als hochspezifischer Rezeptor für lösliche A $\beta$  bestätigt (Laurén *et al.*, 2009). Die Beobachtung, dass PrP<sup>C</sup> für die Vermittlung der durch A $\beta$  verursachten toxischen Effekte teilweise verantwortlich ist, eröffnete schnell ein bis heute stark kontrovers diskutiertes Gebiet in der Neurodegenerationsforschung. So konnte Lauréns initiale Beobachtung, dass PrP<sup>C</sup> zur Vermittlung der toxischen Effekte von A $\beta$  notwendig ist, in zwei unabhängigen Studien nicht bestätigt werden (Kessels *et al.*, 2010; Balducci *et al.*, 2010). Auch wenn kein Zweifel an der hochspezifischen Interaktion besteht, liefern bis heute zahlreiche weitere Studien widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die vermittelten toxischen A $\beta$ -Effekte in Abhängigkeit von PrP<sup>C</sup> (Benilova und De Strooper, 2010). Die meisten Studien wurden unter Verwendung von synthetischen A $\beta$ 42-Peptiden (sA $\beta$ 42) in neuronalen Zellkultur- oder transgenen Mausmodellen durchgeführt. Dabei stellt die Präparation der sA $\beta$ 42o einen entscheidenden kritischen Punkt dar. Die Hinweise häufen sich, dass sich die A $\beta$ -Präparationen bei verschiedenen Arbeitsgruppen stark unterscheiden und der Experimentator maßgeblichen Einfluss auf die entstehenden Oligomer-Spezies ausüben kann. Durch kleine Unterschiede in der Vorbehandlung synthetischer Peptide können unterschiedliche A $\beta$ -Aggregate in den Lösungen entstehen, die auch im vergleichbaren Versuchsaufbau gegensätzliche Effekte hervorrufen können. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass synthetische A $\beta$ -Peptide Aggregationsformen ausbilden, die *in vivo* nicht existieren. Weitere Probleme bei der Arbeit mit synthetischen Peptiden ergeben sich bei der Charakterisierung der vorliegenden Aggregationsformen in der Lösung sowie bei der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Daher ist die Notwendigkeit der Verwendung von A $\beta$ -Präparationen aus biologischen Quellen, wie den Gehirnen von Alzheimer-Patienten offensichtlich. Erstaunlicherweise war lange Zeit nichts über die molekularen Grundlagen der Interaktion von A $\beta$  und PrP<sup>C</sup> in Gehirnen von Alzheimer-Patienten

bekannt. Die Bindung von A $\beta$  an PrP<sup>C</sup> *in vivo* wurde lediglich in zwei Studien beschrieben (Zou *et al.*, 2011; Um *et al.*, 2012).

Die vorliegende Arbeit charakterisiert die PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion unter Verwendung einer großen, gut charakterisierten Patientenkohorte aus Alzheimer- und nicht-dementen Kontrollpatienten. Durch biochemische Methoden erfolgt im ersten Teil der Arbeit der Nachweis der Interaktion *in vivo* sowie eine weitere Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Bindung auf genetischer- und proteinchemischer Ebene unter Verwendung von Gewebe des frontalen Kortex der Patientenkohorte. Zur weiteren Differenzierung der an der Interaktion beteiligten A $\beta$ -Spezies wurde ein neuartiger A $\beta$ -PrP<sup>C</sup>-Interaktionsassay (APIA) etabliert, der neue Erkenntnisse über die interagierende A $\beta$ -Spezies beim Mensch im Vergleich zu sA $\beta$ 42 erbringen konnte.

## **4.1 Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion *in vivo***

### **4.1.1 Der Nachweis der Interaktion *in vivo***

Die Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und A $\beta$  in postmortalen Alzheimer-Gehirnen wurde zuvor bei einer kleinen Patientenkohorte mit n=2 gezeigt (Zou *et al.*, 2011a). Die Existenz des PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktionskomplexes *in vivo* konnte auch in dieser Arbeit via Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) in allen P2-Homogenatfraktionen der Alzheimer-Patienten (n=15) nachgewiesen werden. Die Kontrollpatienten (n=10) zeigten keine Interaktion (Abb. 3.2). Die Existenz des PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Komplexes *in vivo* lässt auf eine pathophysiologische Relevanz dieser Interaktion bei der Alzheimer-Erkrankung schließen. Da die Interaktion nur in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden konnte, kann man davon ausgehen, dass bei diesen Patienten besondere Konformere der A $\beta$ -Aggregate vorliegen, die eine besondere Bindekapazität für PrP<sup>C</sup> besitzen.

Zur Co-IP wurde der PrP<sup>C</sup>-spezifische, monoklonale Antikörper 3F4 verwendet. Der AK bindet und erkennt ein Epitop, das den Aminosäuren (AS) 109 bis 112 (Met-Lys-His-Met) des humanen Prion-Proteins (huPrP<sup>C</sup>) entspricht. Für die hochaffine Bindung des

Antikörpers sind vor allem die beiden Methionine an Stelle 109 und 112 von Bedeutung. In Spezies, denen ein Methionin (wie z.B. bei Rindern und Schafen) oder beide Methionine (wie z.B. bei Ratten und Mäusen) fehlen, kann der AK nicht binden (Lund *et al.*, 2007). Das 3F4-Bindeepitop liegt am Ende des PrP<sup>C</sup> N-Terminus und überlappt in zwei Aminosäuren, inklusive dem wichtigen Met 109, mit einer der bekannten Bindedomänen für A $\beta$ . Die PrP<sup>C</sup>-Interaktion mit A $\beta$  wird über zwei getrennte Bindestellen – AS 23-27 und AS 95-110 - vermittelt (Laurén *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010). Die Überlappung des 3F4- und A $\beta$ -Bindemotivs in den AS 109 und 110 hatte keinen Einfluss auf den Erfolg der Co-IP. 3F4 konnte in dem Experiment an PrP<sup>C</sup> binden und im Komplex mit A $\beta$  eluieren. Die A $\beta$ -PrP<sup>C</sup>-Bindung ist in der Literatur als hochaffine Wechselwirkung mit K<sub>D</sub>-Werten im nanomolaren bis subnanomolaren Bereich beschrieben (Chen *et al.*, 2010; Laurén, 2014). Auch 3F4 bindet PrP<sup>C</sup> mit nanomolarer Affinität (Kascsak, 2010). Eine partielle Verdrängung gebundener A $\beta$  im Bereich der 3F4 Erkennungssequenz ist jedoch wahrscheinlich.

Der Nachweis der Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und A $\beta$  erfolgte nach Auftrennung der Immunkomplexe im Gradientengel durch Western-Blot-Analysen unter Verwendung des 6E10 Antikörpers gegen A $\beta$ . Auf der Membran konnten unspezifische und spezifische Signale detektiert werden. Unspezifische Banden bei ~55 kDa und ~25 kDa repräsentierten die IgG Hc (*Immunoglobulin heavy chain*, schwere Kette) und IgG Lc (*Immunoglobulin light chain*, leichte Kette) des eingesetzten 3F4-Antikörpers und konnten bei Alzheimer- und bei Kontrollpatienten beobachtet werden. Die prominente, spezifische A $\beta$ -Bande bei ~4 kDa wurde nur bei Alzheimer-Patienten beobachtet und diente der Bestätigung der Interaktion *in vivo*. In dem Experiment wurde 6E10 zur Detektion von A $\beta$ -spezifischen Signalen eingesetzt. Der Antikörper erkennt die AS 1-16 in der Sequenz von A $\beta$ -Peptiden und kann somit nicht zwischen unterschiedlich langen A $\beta$ -Spezies unterscheiden. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass es sich bei der detektierten Bande um A $\beta$ 42 handelt, da die Konzentration in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten stark erhöht ist (Abb. 3.3.-B). Wie auch Zou *et al.* berichteten, konnte über der spezifischen A $\beta$ 42 Bande ein verwaschener „Schleier“ detektiert werden, der die Beteiligung von höheren A $\beta$ -Aggregationsformen bei der Interaktion schließen lässt (Zou *et al.*, 2011). Diese A $\beta$ -Aggregate werden bei der Vorbereitung der Proben zur Gelelektrophorese, insbesondere durch das Aufkochen in  $\beta$ -Mercaptoethanol-haltigem Puffer sowie durch die Anwesenheit hoher SDS-

Konzentrationen bei der Gelelektrophorese selbst, wieder zurück in ihre monomeren „Grundbausteine“ zerlegt. Wurden S2-Fractionen von Alzheimer-Patienten durch Co-IP getestet, war das detektierte A $\beta$ -Signal bei 4 kDa deutlich schwächer als in entsprechenden P2-Fractionen (Abb. VII.V im Anhang).

#### **4.1.2 Die Interaktion ist eine Funktion der A $\beta$ 42-Konzentration und unabhängig von genetischen Risikofaktoren**

In den anschließenden Versuchen sollte ein möglicher Einfluss der A $\beta$ - und PrP<sup>C</sup>-Konzentration auf die Interaktion dieser Proteine untersucht werden. Dazu wurden ELISA spezifisch für A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 und PrP<sup>C</sup> an S2- und P2-Fractionen der Patientenkohorte durchgeführt (Abb. 3.3.). Für S2-Fractionen konnte eine vergleichbare Konzentration an A $\beta$ -Peptiden zwischen Alzheimer- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Trotz der fast identischen Konzentration an A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42, zeigten in der Co-IP interessanterweise nur Alzheimer-Patienten die Interaktion. Dies spricht für die mögliche Existenz bestimmter A $\beta$ -Konformere mit einer starken Bindekapazität an PrP<sup>C</sup>, die nur unter pathologischen Bedingungen zu finden sind. In den P2-Fractionen ist der Unterschied zwischen Alzheimer- und Kontrollpatienten für A $\beta$ 42 am stärksten und erklärt die bevorzugte Interaktion zwischen A $\beta$  und PrP<sup>C</sup> in den P2-Fractionen der Alzheimer-Gruppe. Zusammen betrachtet lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Interaktion eine direkte Funktion der A $\beta$ 42-Konzentration ist. P2-Fractionen wurden durch Ultrazentrifugation gewonnen und somit kann auf eine Beteiligung von unlöslichen, hochmolekularen A $\beta$ -Oligomeren bei der Interaktion ausgegangen werden (Zou *et al.*, 2011). Die Beobachtung steht im Kontrast zu anderen Studien, in denen kleine, lösliche A $\beta$ o als Interaktionspartner für PrP<sup>C</sup> beschrieben sind (Laurén *et al.*, 2009; Balducci *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Barry *et al.*, 2011; Larson *et al.*, 2012). Gründe hierfür können die Verwendung von sA $\beta$ 42o im Vergleich zu humanen A $\beta$ o sowie Unterschiede in den angewandten Methoden der Experimente liefern.

In der Literatur ist die Verringerung der PrP<sup>C</sup>-Expression im frontalen Kortex von Patienten mit Alzheimer im Vergleich zu gesunden Kontrollen beschrieben. Dabei wird eine inverse Korrelation zwischen PrP<sup>C</sup>-Gehalt und A $\beta$ -Konzentration festgestellt (Whitehouse *et al.*, 2013). Die Korrelation zwischen PrP<sup>C</sup>-Gehalt, A $\beta$ -Konzentration sowie BACE-1-Aktivität lässt Rückschlüsse auf die Rolle des Prion-Proteins bei der

Regulation der  $\beta$ -Sekretase BACE-1 zu. Bei Bestimmung des PrP<sup>C</sup>-Gehalts in unserer Patientenkohorte durch ELISA konnte weder ein Unterschied zwischen Alzheimer- und Kontrollpatienten in den S2- und P2-Fractionen festgestellt werden (Abb. 3.3.-C), noch gibt es Hinweise auf eine Korrelation zwischen A $\beta$ 42-Konzentration und PrP<sup>C</sup>-Gehalt (Abb. 3.4). Wie auch Whitehouse *et al.* beschreiben, konnte in dieser Arbeit eine signifikant erhöhte A $\beta$ -Konzentration in den unlöslichen P2-Fractionen sowie der signifikant erhöhter Gehalt an A $\beta$ -Plaques bei Alzheimer-Patienten bestätigt werden. Zur Verifizierung des Ergebnisses und zum direkten Vergleich beider Studien sollte der PrP<sup>C</sup>-Gehalt durch Western-Blot-Analysen sowie die BACE-1-Aktivität in unserer Patientenkohorte, wie bei Whitehouse *et al.* beschrieben, erneut bestimmt werden. Andere Studien unterstützen unsere Ergebnisse der unveränderten Expression von PrP<sup>C</sup> in den Gehirnen der Alzheimer-Patienten (Sajio *et al.*, 2011).

*PRNP* codiert für das humane Prion-Protein. Der M129V-Polymorphismus wird als genetischer Risikofaktor für den frühen Ausbruch der Alzheimer-Erkrankung beschrieben worden (Dermaut *et al.*, 2003; Riemenschneider *et al.*, 2004, He *et al.*, 2013). Auch wird in anderen Studien die Inhibierung der APP-Prozessierung durch BACE-1, bei der es zu einer Verringerung freigesetzter A $\beta$ -Peptide kommt, beobachtet (Parkin *et al.*, 2007). Das lässt auf eine neuroprotektive Rolle von PrP<sup>C</sup> bei der Alzheimer-Erkrankung vermuten, der möglicherweise durch den *PRNP*-M129V-Polymorphismus reguliert wird. Diese neuroprotektive Rolle des Prion-Proteins steht im Gegensatz zu Lauréns Beobachtung, dass PrP<sup>C</sup> an der Vermittlung von toxischen Effekten durch Bindung an A $\beta$ o beteiligt ist (Laurén *et al.*, 2009). Um den Einfluss des M129V-Polymorphismus im Bezug zur PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ o-Bindung zu untersuchen, wurde in Kooperation mit dem nationalen Referenzzentrum für die Überwachung Transmissibler Enzephalopathien (Arbeitsgruppe Inga Zerr) der *PRNP*-M129V-Status in der Patientenkohorte bestimmt. Wie auch andere Gruppen berichten, konnte kein direkter Einfluss des *PRNP*-M129V-Polymorphismus auf die PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion gefunden werden (Chen *et al.*, 2010). In der Alzheimer-Gruppe zeigten 46,7 % den M129V-Polymorphismus, während er bei den Kontrollen mit 40 % vertreten war.

Das ApoE4-Allel ist der wichtigste genetische Risikofaktor für die Entstehung der Alzheimer-Erkrankung. So zeigt wie erwartet mit 66,6 % die Mehrzahl der Alzheimer-Patienten mindestens ein ApoE4-Allel. Demgegenüber ist nur ein Patient aus der

Kontrollkohorte positiv auf das Vorhandensein mindestens eines ApoE4-Allels getestet worden (Tab.2.14). Während die frühere Annahme von der beschleunigten Ausbildung von Fibrillen und der unmittelbaren A $\beta$ -Ablagerung durch ApoE4 ausging (Wisniewski *et al.*, 1994), deuten aktuelle Studien darauf hin, dass durch ApoE4 die Bildung von A $\beta$  begünstigt wird. In einer Studie von Hashimoto *et al.*, konnte durch Messung der A $\beta$ -Level in Proben aus postmortalen Gehirnen gezeigt werden, dass E4-homozygote Alzheimer-Patienten einen siebenfach höheren A $\beta$  Spiegel aufweisen als E2-homozygote Patienten mit gleich starker A $\beta$ -Plaques-Belastung (Hashimoto *et al.*, 2012). Um genauere Aussagen über den Einfluss des ApoE4-Status und A $\beta$ -Konzentration im Bezug zur PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion in Alzheimer-Gehirnen treffen zu können, sollte in zukünftigen Experimenten der genaue A $\beta$ -Spiegel in geeigneten ELISA-Tests bestimmt werden.

## 4.2 Charakterisierung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion *in vitro*

Durch Co-IP-Experimente kann die Existenz des PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktionskomplexes *in vivo* an Homogenaten aus Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden (Abb.3.2). Die Detektion von monomeren, A $\beta$ -spezifischen Signalen in Western-Blot-Analysen als Nachweis der Interaktion ist möglich. Variationen in der Kopplungseffizienz des Antikörpers an die verwendeten G-Sepharose-Beads erschweren die quantitative Analyse der Ergebnisse (Lal *et al.*, 2005). Zudem können eine Reihe von unspezifischen Signalen der leichten und schweren Proteinketten der Antikörper an der Membran detektiert werden (Zou *et al.*, 2011). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass A $\beta$ -spezifische Signale maskiert und nicht detektiert werden können. Da die Verwendung der Methode auf dem Gebrauch von Antikörpern beruht, stellt auch der Kostenfaktor ein zusätzliches Argument dar, alternative Strategien zur Charakterisierung der Interaktion zu etablieren. Die Beobachtungen in Co-IP-Experimenten sprechen für eine Beteiligung von hochmolekularen A $\beta$ -Spezies an der PrP<sup>C</sup>-Bindung und stehen somit im Kontrast zu anderen Studien, die kleine lösliche A $\beta$ , sogenannte ADDL's (*amyloid-derived diffusible ligands*, A $\beta$ -abgeleitete lösliche Liganden), als die PrP<sup>C</sup>-bindende Spezies zur Vermittlung der Effekte beschreiben (Laurén *et al.*, 2009). Die Verwendung von sA $\beta$ 42 und Unterschiede in der Methodik führten oft zur unterschiedlichen Interpretation der Ergebnisse (Kessels *et al.*, 2010; Balducci *et al.*, 2010, Westaway und Jhamandas,

2012). Da die Verwendung von synthetischen Peptiden innerhalb der Literatur unterschiedliche Ergebnisse liefert und zudem nur wenige Studien die Arbeit mit A $\beta$  aus humanen Quellen beschreiben (Zou *et al.*, 2011; Barry *et al.*, 2011; Freir *et al.*, 2011; Barry *et al.*, 2011; Um *et al.*, 2012), gestaltet sich ein direkter Vergleich von Ergebnissen schwierig. Die Etablierung eines neuen Assays sollte die gleichzeitige Verwendung von sA $\beta$ 42-Peptiden sowie humanen A $\beta$  ermöglichen.

#### **4.2.1 Klonierungen und Expression im Flexi<sup>®</sup>-Vektorsystem. Probleme und Vorteile.**

APIA beruht auf der Verwendung des HaloTag<sup>®</sup> Vektor-Systems und erlaubt die Expression von N- und C-terminal getaggten Fusionsproteinen. Humanes Prion-Protein wurde als „Fängerprotein“ (*bait*) in dem System verwendet. Die Möglichkeit C-terminal getaggte Fusionsproteine herzustellen war ein wichtiger Punkt bei der Planung der Experimente. Die Rolle der Bindestellen von PrP<sup>C</sup> bei der Interaktion mit A $\beta$  ist von Chen *et al.*, 2010 beschrieben worden. Sie befinden sich am flexiblen N-Terminus des Proteins. Die Fusionierung des Halo<sup>®</sup>Tags erfolgt über eine ebenso flexible Linker-Region an das Protein. Es ist somit wahrscheinlich, dass die Interaktion der PrP<sup>C</sup>-Bindestellen mit A $\beta$  durch die enorme Flexibilität und durch die Größe des HaloTags<sup>®</sup> von 38 kDa sterisch gehindert wird. Die humane PrP<sup>C</sup>-cDNA kann via PCR mit den notwendigen Schnittstellen für die Klonierung in das N-terminale Eingangsvektor-System flankiert werden (Abb. 3.7 und Abb. 3.8). Die in den N-terminalen Vektor klonierte Insert-DNA wird im Mini- oder Midi-Maßstab isoliert und durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsanalysen überprüft (Abb. 3.9). Positive Kolonien werden durch Sequenzierung überprüft. Grundlagen zum Transfer proteincodierender Sequenzen zwischen N- und C-terminalen Vektorsystemen sind in Abschnitt 3.2.3 erläutert. Der Transfer zwischen den Vektorsystemen war problemlos möglich. Nach Überprüfung der Insert-DNA im C-terminalen System (Abb.3.12.) wurde die PrP<sup>C</sup>-DNA in den bakteriellen Expressionsstamm *E. Coli* Tuner<sup>™</sup> transformiert. Die Expressionsbedingungen wurden experimentell ermittelt. Die Expression der rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22- und rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT-Proteine war ein kritischer Punkt bei der Herstellung der Fängerproteine. Die Proteinausbeute nach Expression variierte dabei sehr stark und häufig waren die Ausbeuten sehr gering. In zukünftigen Experimenten wäre ein Wechsel des *E. coli*-Expressionsstamms in Betracht zu ziehen. Die rPrP<sup>C</sup>-Proteine können über den fusionierten Tag in unterschiedlichen

*downstream*-Applikationen zur Studie von Protein-Protein-Interaktionen verwendet werden (Abb. 3.15 und Abb. 3.20). Die geringe Proteinausbeute wirkt sich vor allem in APIA-Experimenten negativ aus, bei denen rPrP<sup>C</sup> an dem Resin immobilisiert wird. Damit sichergestellt wird, dass der Resin bei jedem Experiment vollständig durch rPrP<sup>C</sup>-Proteine gesättigt wird, werden zusätzliche Kopplungsschritte eingeführt. Die Überprüfung der Expressionslevel kann nach Kopplung an den Alexa Fluor®488-Liganden in SDS-Gelen an einem geeigneten Laser-Scanner (Typhoon, Amersham) erfolgen (Abb.3.13). Die Detektion des Fluorophors erlaubt die Bestimmung von Proteinkonzentrationen, die von standardmäßigen Coomassie-Färbungen nicht erfasst werden. Über die gemessenen Emissionswerte bei 514 nm kann eine Normierung der rPrP<sup>C</sup>Δ1-22\*\*<sup>-</sup> bzw. rPrP<sup>C</sup>ΔNT\*\*<sup>-</sup>-Sonde erfolgen. Die grundsätzlichen Schritte zur Etablierung fluoreszenzbasierter Dot-Blot-Overlay-Assays sind beschrieben (Dohler, F. (2009), unveröffentlichte Diplomarbeit: Molekularbiologischer Nachweis und Charakterisierung einer Protein-Protein Interaktion des cAMP abhängigen Signaltransduktionsweges, Universität des Saarlandes, Saarbrücken). Besonderheiten zur Herstellung von sAβ<sub>0</sub> als Interaktionspartner für rPrP<sup>C</sup>-Fusionsproteine sind in Kapitel 3 beschrieben.

#### **4.2.2 APIA im Dot-Blot-Format: Möglichkeiten zur quantitativen und semi-qualitativen Charakterisierung der Interaktion *in vitro***

APIA konnte die Interaktion von humanem rPrP<sup>C</sup> mit synthetischen- und humanen Aβ<sub>0</sub> *in vitro* bestätigen und charakterisieren. Quantitative Analysen im modifizierten Dot-Blot-Overlay-Assay liefern den Nachweis der Interaktion *in vitro* und bestätigen die Notwendigkeit der in der Literatur beschriebenen N-terminalen Aβ<sub>0</sub>-Bindestellen von PrP<sup>C</sup> zur Vermittlung der Interaktion (Chen *et al.*, 2010; Calella *et al.*, 2010; Nieznanski *et al.*, 2012; Fluharty *et al.*, 2013). Liegt eine konstante Menge an sAβ<sub>42o</sub> immobilisiert an einem Membranstreifen vor, so kann nur nach gemeinsamer Inkubation mit rPrP<sup>C</sup>Δ1-22\*\* ein deutlich detektierbares Signal am Membranstreifen wahrgenommen werden. Membranabschnitte, die zuvor mit der N-terminal trunkierten Sonde inkubiert werden, zeigen ein signifikant verringertes Emissionssignal (Abb. 3.16).

Co-IP-Experimente mit P2-Fractionen von Alzheimer-Gehirnen (Abb.3.2) und anschließende Konzentrationsbestimmungen des Aβ<sub>42</sub>-Gehaltes in den Fractionen

lassen vermuten, dass die PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion eine direkte Funktion der A $\beta$ 42-Konzentration ist. Semiquantitative Analysen in APIA bestätigen diese Beobachtung. Wird sA $\beta$ 42<sub>0</sub> in einem Konzentrationsgradient an der Membran immobilisiert und mit einer konstanten Menge an rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22\*\* inkubiert, zeigt die detektierte Emissionsintensität eine lineare Abhängigkeit von der am jeweiligen *spot* vorliegenden sA $\beta$ 42-Konzentration (Abb.3.17.). Da vor allem sA $\beta$ 42-Peptide, die in einer hohen Konzentration vorliegen, eine sehr starke Tendenz zur Aggregation besitzen, kann die Immobilisierung an einer Membran von Vorteil sein. So wird sichergestellt, dass die A $\beta$ 42-Peptide über die Versuchsdauer nicht weiterhin aggregieren und dadurch unterschiedliche Aggregationsformen im Experiment vorliegen.

APIA im Dot-Blot-Format ist nicht zur Verwendung mit humanen Homogenat-Fractionen geeignet. S1-, S2- und P2-Fractionen der Alzheimer- und Kontrollpatienten zeigen nach Inkubation mit der rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22\*\*-Sonde keine signifikanten Unterschiede in den detektierten Emissionssignalen bei 514 nm an dem untersuchten Membranabschnitt (Abb. 3.19). Diese Methode eignet sich somit nicht zur Untersuchung der PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion. Es ist offensichtlich, dass sich in den unterschiedlichen Fractionen der Totalhomogenate von Alzheimer- und Kontrollpatienten noch weitere hochaffine C- und N-terminale PrP<sup>C</sup>-Bindepartner befinden wie z.B. Vitronectin (Hajj *et al.*, 2007) oder LRP1 (Parkyn *et al.*, 2008), die von der Sonde gebunden und anschließend detektiert werden können. Auch andere Proteine, die reich an  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind, werden von den AS 27-89 des Prion-Proteins gebunden (Resenberger *et al.*, 2011).

Da die Arbeit mit fluoreszierenden rPrP<sup>C</sup>-Reporter-molekülen nicht für die Analyse von Alzheimer-Homogenaten geeignet ist, wurde rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 und rPrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT über seinen C-terminalen Tag an einer stationären Phase immobilisiert und mit sA $\beta$ 42<sub>0</sub> oder S1-Fractionen (Totalhomogenate) der Patientenkohorte inkubiert. Die PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion kann so erneut *in vitro* bestätigt werden. Alzheimer-Homogenate, nicht aber Homogenate der Kontrollpatienten, zeigen eine Interaktion. Zum ersten Mal wird die Notwendigkeit der N-terminalen Hälfte des humanen Prion-Proteins bei der Interaktion mit A $\beta$  aus humanem Probenmaterial gezeigt (Abb. 3.21).

### **4.2.3 Unlösliche P2-Fractionen zeigen die stärkste Interaktion in APIA.**

Nach Überprüfung der Funktionalität von APIA kann eine genaue Charakterisierung der Patientenkohorte erfolgen. Ergebnisse der Co-IP zeigen die Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und A $\beta$ 42 bevorzugt in den unlöslichen P2-Fractionen der Alzheimer-Patienten (Abb. 3.2). Das Ergebnis soll durch eine weitere Methode verifiziert werden. Im Gegensatz zur Co-IP, werden alle Fraktionen (S1, S2, P2) der 15 Alzheimer-Patienten und von sechs Kontroll-Patienten im APIA getestet. Das ist wichtig, da der Großteil der Veröffentlichungen die Interaktion mit löslichen A $\beta$ 0 beschreibt und somit der Fokus der Fachwelt hauptsächlich auf den S2-Fractionen liegt (Um *et al.*, 2012, Barry *et al.*, 2011; Larson *et al.*, 2012). APIA kann die Ergebnisse aus der Co-IP bestätigen. Eine Bindung wird nur bei Alzheimer-Patienten und nicht bei Kontrollpatienten, nachgewiesen. Das detektierte Signal bei 4 kDa in Western-Blot-Analysen, als Nachweis der Interaktion, ist in den unlöslichen P2-Fractionen der Alzheimer-Patienten signifikant erhöht (Abb. 3.22). Die Ergebnisse der Co-IP können so durch APIA bestätigt werden. Die stärkste Bindung wird in der P2-Fraktion detektiert und auch der zuvor beobachtete „Schleier“, aufwärts der 4 kDa-Bande, ist detektierbar. (Zou *et al.*, 2011).

Der Vorteil liegt darin, dass bei dieser Methode keine unspezifischen Banden bei 25 kDa (IgG Lc) und 55 kDa (IgG Hc) auftreten, die mögliche Banden von SDS-stabilen A $\beta$ 0 maskieren können. Jedoch ist bei APIA-Experimenten eine zusätzliche Bande bei ~8 kDa zu beobachten, die auch vereinzelt bei Kontrollpatienten auftritt. Da APIA auf rekombinant exprimierten Proteinen basiert, kann von einem „unspezifischen“ Hintergrundsignal ausgegangen werden. Die Laufhöhe der Bande bei 8 kDa und die Beobachtung, dass sie am stärksten in den P2-Fractionen von Alzheimer-Patienten zu detektieren ist, kann auch auf die Gegenwart SDS-stabiler Dimere schließen lassen. Um diese Frage zu beantworten, sollten Gelbanden in dieser Höhe ausgeschnitten werden und durch Massenspektrometrie identifiziert werden.

### **4.2.4 Die rPrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion ist spezifisch und selektiv**

Die Spezifität der detektierten Signale in beiden unterschiedlichen APIA-Anwendungsformen können mit dem Pan-Oligomer-spezifischen A11-Antikörper

überprüft werden. A11 ist ein konformationsabhängiger Antikörper, der vor allem prä-fibrilläre, nicht jedoch fibrilläre Strukturen oder intrinsisch ungeordnete Moleküle wie A $\beta$ -Monomere, erkennt (Kayed *et al.*, 2010). Prä-fibrilläre A $\beta$ -Aggregate in der SDS-PAGE zeigen Molekulargewichte zwischen 8 kDa (Dimere) und 240 kDa (HMW<sub>o</sub>, Hochmolekulare-Oligomere). A11-positive Oligomere sind strukturell verschieden von Fibrillen (Wu *et al.*, 2010). Durch Präinkubation der sA $\beta$ 42<sub>o</sub> mit A11 können im APIA-Dot-Blot-Overlay die detektierten Emissionssignale an der Membran im Vergleich zu nicht vorbehandelten Sonden signifikant reduziert werden. Die bei vorbehandelten rPrP<sup>C</sup>- $\Delta$ 1-22-Sonden gemessenen Emissionswerte bei 514 nm sind vergleichbar mit Werten bei Verwendung der N-terminal trunkierten Negativkontrolle PrP<sup>C</sup> $\Delta$ NT\*\* (Abb. 3.18). Auch die Inkubation des mit A11 vorbehandelten, sA $\beta$ 42-Peptids mit immobilisiertem rPrP<sup>C</sup>- $\Delta$ 1-22 verhindert die Interaktion vollständig. rPrP<sup>C</sup> zeigt zudem eine hohe Selektivität für die Bindung von A $\beta$ 42<sub>o</sub> im Assay. Werden die typischen Vertreter der A $\beta$ -Spezies (wie z.B. A $\beta$ 38; A $\beta$ 40; A $\beta$ 42 und A $\beta$ 43) zur Interaktion mit rPrP<sup>C</sup>- $\Delta$ 1-22 gegeben, interagieren exklusiv gealterte A $\beta$ 42<sub>o</sub> mit rPrP<sup>C</sup> (Abb. 3.27). A $\beta$ 38 und A $\beta$ 40 zeigen nach einem Alterungsprozess von 12 Stunden keine größeren Aggregate als Dimere in Western-Blot-Analysen und scheinen somit nicht die zur Interaktion notwendige Konformation bereitzustellen. A $\beta$ 43 hingegen zeigt an der Membran einen weiter fortgeschrittenen Aggregationszustand mit Signalen in einer Größenordnung von Monomeren bis hin zu hochmolekularen Oligomeren. Da A $\beta$ 43 nicht an PrP<sup>C</sup> bindet, kann auch hier angenommen werden, dass die A $\beta$ o eine bestimmte Größe besitzen oder definierte strukturelle Voraussetzungen erfüllt werden müssen, um mit PrP<sup>C</sup> interagieren zu können (Lauren, 2014).

#### **4.2.5 Niedermolekulare Aggregate von sA $\beta$ 42<sub>o</sub> binden rPrP<sup>C</sup>**

Studien unter Verwendung von sA $\beta$ 42<sub>o</sub> haben gezeigt, dass manche Aggregationsformen des Peptids wie Monomere und Fibrillen nicht mit PrP<sup>C</sup> interagieren (Laurén *et al.*, 2009). Eine genauere Bestimmung der Größe von bindenden sA $\beta$ o ist derzeit nicht beschrieben. Die Analyse von unterschiedlichen Präparationen der sA $\beta$ 42<sub>o</sub>-Peptide, durch Verwendung konformationsabhängiger Antikörper, unterscheidet nur zwischen der Konformation der A $\beta$ o. Am häufigsten wird der Antikörper A11 zur Detektion von prä-fibrillären (Oligomeren-) Aggregationsformen sowie der OC-Antikörper zur Detektion von fibrillären Aggregationsformen eingesetzt (Fluharty *et al.*, 2013). Auch

biophysikalische Experimente erlauben nur Abschätzungen der Größe interagierender sA $\beta$ 42o-Peptide (Chen *et al.*, 2010). Durch die Kombination von Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) und APIA können neue Informationen zur Größe der mit PrP<sup>C</sup> interagierenden sA $\beta$ 42o-Spezies gewonnen werden. Das Experiment zeigt, dass normierte Fraktionen von sA $\beta$ 42o in einem Größenbereich von ~8 kDa bis ~21 kDa bevorzugt an immobilisiertes rPrP<sup>C</sup> binden (Abb.3.26 und Anhang Abb.V.III). Die Größen entsprechen A $\beta$ 42-Dimeren und Pentameren, deren Fähigkeit zur Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität in Abhängigkeit von PrP<sup>C</sup> in der Literatur beschrieben wird (Laurén *et al.*, 2009; Larson *et al.*, 2012; Um *et al.*, 2012).

#### **4.2.6 Hochmolekulare A $\beta$ -Aggregate binden rPrP<sup>C</sup> in Alzheimer-Patienten**

SEC in Kombination mit APIA an unlöslichen P2-Fractionen von Alzheimer-Patienten zeigt eine bevorzugte Bindung hochmolekularer A $\beta$ -Spezies in einem Bereich von ~150 bis 300 kDa an PrP<sup>C</sup> (Abb. 3.27). Interessanterweise zeigt die Analyse von löslichen S2-Fractionen die gleichen hochmolekularen A $\beta$ -Spezies bei APIA, jedoch mit einer geringeren Bindeeffizienz (Anhang, Abb. VII.V-C und D). Die Ergebnisse stehen in Kontrast zu Beobachtungen aus APIA-Experimenten unter Verwendung von sA $\beta$ 42o, die A $\beta$ -Aggregate im Bereich von 8 bis 21 kDa mit bevorzugter Bindung an PrP<sup>C</sup> identifizieren.

Eine mögliche Erklärung der Ergebnisse ist, dass bei Alzheimer-Patienten große A $\beta$ -Aggregate mit PrP<sup>C</sup> interagieren. Das ermittelte Molekulargewicht in einem Bereich zwischen ~150 bis ~300 kDa entspräche A $\beta$ -Aggregaten von 35- bis 70meren und bestätigt Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die von einer bevorzugten Bindung von 20- bis 100meren des A $\beta$ -Peptids berichten (Freir *et al.*, 2011; Younan *et al.*, 2013). Die Studie von Younan und Mitarbeitern zeigt interessanterweise, dass die PrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Interaktion zu einer Disassemblierung von A $\beta$ -Fibrillen führt. Dies passt zu weiteren Studien, die zeigen, dass A $\beta$ o in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten vorwiegend hochmolekulare A $\beta$ -Aggregate darstellen (Esperanza *et al.*, 2013).

Eine andere Erklärung der Ergebnisse basiert auf der Möglichkeit, dass A $\beta$  als *scaffold*-Protein agiert und unterschiedliche Proteine zusammenführen kann, indem es entweder allein oder zusammen mit PrP<sup>C</sup> im Komplex bindet (Noguchi *et al.*, 2009). Die Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass PrP<sup>C</sup> in SEC-Experimenten auch in früheren Fraktionen eluiert, die nicht dem Molekulargewicht von monomerem PrP<sup>C</sup> entsprechen (Abb. 3.25-B und C). PrP<sup>C</sup> könnte in diesen Fraktionen somit in einem Komplex vorliegen. Als mögliche Kandidaten können A $\beta$ -bindende Proteine des Fettstoffwechsels (Ray *et al.*, 1998) und Chaperone (Fonte *et al.*, 2002) angesehen werden. APIA konnte die Gegenwart von LRP1 (*low density lipoprotein receptor 1*) und anderen PrP<sup>C</sup>-bindenden Proteinen wie der Fyn-Kinase (Lambert *et al.*, 1998) nicht bestätigen (Abb. 3.28). Diese Beobachtung spricht somit gegen die Beteiligung dieser Proteine als Ursache der hochmolekularen Masse der bindenden A $\beta$ -Fraktionen (De Felice *et al.*, 2007; Rushworth *et al.*, 2013). Möglicherweise handelt es sich somit um eine größere A $\beta$ -Spezies.

Auch massenspektrometrische Analysen des rPrP<sup>C</sup>-A $\beta$ -Komplexes nach APIA konnte die Anwesenheit dieser Bindepartner nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt). Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Existenz dieser Komplexe *in vivo* nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Trotz den Vorteilen bei der Arbeit mit APIA, handelt es sich weiterhin um eine *in vitro*-Methode, die zwar die Arbeit mit humanem Material erlaubt, aber die komplexen Gegebenheiten im Gehirn nicht widerspiegeln kann. Ein großer Unterschied von APIA zu CO-IP Experimenten z.B. ist, dass APIA durch das immobilisierte rPrP<sup>C</sup>-Fängerprotein A $\beta$  im Versuch selbst erst bindet. Das ist wegen der hohen Spezifität und Bindeaffinität der A $\beta$  problemlos während der Versuchsdauer möglich. Die Anlagerungen von weiteren potentiellen Partnern an den Komplex kann somit durch Versuchsbedingungen und Dauer des Experiments negativ beeinflusst werden. Die Co-IP zeigt die Existenz einer Interaktion oder Interaktionskomplexes *in vivo*. Um die Abwesenheit potentieller Bindepartner wie LRP1, Fyn1 und auch AMPA-Rezeptoren im Komplex zu bestätigen oder widerlegen, sollten Co-IP Experimente unter der Verwendung des PrP<sup>C</sup>-spezifischen Antikörpers 3F4 an SEC-Fraktionen durchgeführt werden und für die entsprechenden Proteine getestet werden.

### 4.3 Relevanz der Ergebnisse

Durch die Etablierung eines neuartigen A $\beta$ -PrP<sup>C</sup>-Interaktions-Assays (APIA) konnte die Interaktion zwischen dem PrP<sup>C</sup> und A $\beta$  aus unterschiedlichen Quellen untersucht werden. Die Ergebnisse mit APIA zeigen, dass PrP<sup>C</sup> $\Delta$ 1-22 mit hoher Spezifität A $\beta$  aus unterschiedlichen Quellen wie sA $\beta$ 42 und A $\beta$ , die aus Alzheimer-Gehirnen isoliert wurden, bindet. Dabei wird die Notwendigkeit der N-terminalen PrP<sup>C</sup>-Bindestellen zur Vermittlung der Interaktion zum ersten Mal bei Verwendung von humanem PrP<sup>C</sup> und A $\beta$  aus Alzheimer-Gehirnen bestätigt. Die Interaktion erfolgt dabei hochspezifisch für A $\beta$ 42. Die stärkste Bindung zu rPrP<sup>C</sup> konnte in Co-IP und APIA Experimenten in der P2-Fraktion festgestellt werden. ELISA-Tests zeigten, dass in diesen Fraktionen der Alzheimer-Patienten die höchste Konzentration an A $\beta$ 42 zu finden ist. In S2-Fraktionen hingegen zeigten Kontroll- und Alzheimer-Patienten eine ähnliche Konzentration an A $\beta$ 40 und A $\beta$ 42. Trotzdem konnte die Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und A $\beta$  nur bei den Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass die Interaktion einerseits von einer gewissen A $\beta$ 42-Konzentration abhängig ist und ebenso von einer speziellen A $\beta$ -Konformation, die exklusiv unter pathologischen Bedingungen wie in der Alzheimer-Krankheit zu finden ist (Zou *et al.*, 2011). Durch die Kombination von analytischen Methoden wie der Größenausschlusschromatographie mit APIA gelang es, die Größe der mit rPrP<sup>C</sup> interagierenden A $\beta$ -Spezies zu definieren. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede bei der Verwendung von synthetischen einerseits und humanen A $\beta$  aus Alzheimer-Gehirnen andererseits bezüglich der Größe der interagierenden A $\beta$ -Spezies. Die sA $\beta$ -Präparationen beinhalten möglicherweise A $\beta$ -Aggregationsformen, die *in vivo* nicht zu finden sind und *vice versa* (Freir *et al.*, 2011). Zusammen betrachtet kann somit angenommen werden, dass nicht nur die Größe der A $\beta$  allein, sondern auch die Konformation und Konzentration von A $\beta$ 42 maßgeblich an der Bindekapazität beteiligt sind (Laurén, 2014).

Interessanterweise entsteht unter physiologischen Bedingungen bei der proteolytischen Prozessierung von PrP<sup>C</sup>, durch die konstitutive Aktivität einer noch zu identifizierenden „ $\alpha$ -PrPase“, zwischen den AS 111 und AS 112 (sogenanntes „ $\alpha$ -cleavage“) das lösliche N1-Fragment (Chen *et al.*, 1998; Altmeppen *et al.*, 2012). Das N1-Fragment enthält die notwendigen Bindestellen für die Interaktion mit A $\beta$ . Bei seiner Freisetzung wird nicht

nur die neurotoxische Domäne von PrP<sup>C</sup> zerstört (Abb. 1.6), sondern das lösliche N1-Fragment verhindert durch Bindung und Blockade von A $\beta$ o im extrazellulären Raum deren toxische Interaktion mit membrangebundenem PrP<sup>C</sup> (Guillot-Sestier *et al.*, 2009 und 2012; Altmeyen *et al.*, 2013). Dem nach der Spaltung an der Membran verbleibenden C1-Fragment von PrP<sup>C</sup> fehlen zudem die Bindestellen für A $\beta$ o. Das in dieser Arbeit verwendete rPrP<sup>C</sup>- $\Delta$ NTKonstrukt imitiert die physiologische Spaltung durch die  $\alpha$ -PrPase. Die Ergebnisse bei der Arbeit mit humanen Gehirnen von Alzheimer-Patienten bestätigen die Selektivität der A $\beta$ o-Bindung an das N-terminale Ende des PrP<sup>C</sup>, unterstützen somit die Annahme einer neuroprotektiven Rolle der  $\alpha$ -Spaltung und verweisen so auf die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes in der Alzheimer-Erkrankung (Biasini *et al.*, 2012; Fluharty *et al.*, 2013; Altmeyen *et al.*, 2013).

## 5 Zusammenfassung

Bei fehlerhafter Faltung, können Proteine toxische Eigenschaften erlangen und mit anderen Proteinen zu Aggregaten verklumpen. Die Aggregate können sich in verschiedenen Organsystemen ablagern und so zu Funktionsstörungen bis hin zum Funktionsverlust von Organen führen. Auf diesem Prozess basieren viele neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. die Lewy-Body Demenz, die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien und die Alzheimer-Erkrankung (AD). Trotz der unterschiedlichen Proteine, die von einer Fehlfaltung bei diesen verschiedenen Krankheitsbildern betroffen sind, wird ein gemeinsamer Mechanismus vermutet.

So konnten Laurén und Mitarbeiter im Jahr 2009 einen lang vermuteten Zusammenhang zwischen Prionenerkrankungen und der AD bestätigen, indem sie Beweise für eine direkte und hochaffine Interaktion zwischen dem zellulären Prion Protein (PrP<sup>C</sup>) und  $\beta$ -Amyloid Oligomeren (A $\beta$ ) erbrachten.

Seitdem fokussieren sich zahlreiche Studien auf die Klärung molekularer Grundlagen und Mechanismen, die bei der Vermittlung der toxischen Effekte ausschlaggebend sein könnten. Interessanterweise basiert ein Großteil des derzeitigen Verständnisses der Interaktion auf Ergebnissen, die unter Verwendung von synthetischen A $\beta$ -Präparationen und transgenen Mausmodellen zur Alzheimer-Erkrankung produziert wurden. Wenig ist über die molekularen Grundlagen beim Menschen *in vivo* bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Interaktion zwischen A $\beta$  und PrP<sup>C</sup> gewonnen werden. Durch Co-Immunopräzipitation konnte an einer großen Kohorte von Alzheimer- und Kontrollpatienten gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen PrP<sup>C</sup> und A $\beta$  nur in Gehirnen der Alzheimer-Patienten zu detektieren ist. Die Analyse von genetischen Risikofaktoren für die Alzheimer-Erkrankung, wie ApoE4 und PRNP M129V Polymorphismus konnte keinen Einfluss dieser Parameter in Bezug auf die Interaktion herstellen. Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass die Interaktion eine direkte Funktion der A $\beta$ -Konzentration ist und unabhängig der Prion-Expression im frontalen Kortex entsteht. Durch die erfolgreiche Etablierung eines neuartigen A $\beta$ -PrP<sup>C</sup> Interaktions-Assays (APIA) konnte die Interaktion durch Verwendung von rekombinant exprimierten humanen PrP<sup>C</sup> mit Präparationen von sA $\beta$ 42-Oligomeren erneut bestätigt werden. Durch die Verwendung einer N-terminalen Deletion des Prion Proteins wurde ebenso die Notwendigkeit des flexiblen N-Terminus von PrP<sup>C</sup> bestätigt. Die Interaktion

ist dabei hochspezifisch. So konnte durch die Verwendung eines oligomerspezifischen Antikörpers die Bindung von A $\beta$ -Oligomeren an humanes rPrP<sup>C</sup> inhibiert werden. Die Bindung von PrP<sup>C</sup> erfolgt nur bei gealterten Präparationen des synthetischen A $\beta$ 42-Peptids. Monomere A $\beta$ 42-Präparationen, sowie A $\beta$ -Peptide anderer Länge wie A $\beta$ 38, A $\beta$ 40 und A $\beta$ 43 zeigen keine Bindung an das immobilisierte Prion Protein im Interaktionsassay. Fraktionierung der sA $\beta$ 42-Präparationen durch Gelfiltration und die anschließende Analyse der eluierten Fraktionen via APIA führten letztendlich zur Identifizierung der mit PrP<sup>C</sup> interagierenden sA $\beta$ -Oligomer Spezies. Diese besitzen ein Molekulargewicht (Mw) von 8 bis 21 kDa, was einer dimeren bis pentameren A $\beta$ -Aggregationsform entspricht. Das rekombinante PrP<sup>C</sup> konnte über sein C-terminal anfündiertes Tag kovalent an Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Reporterchromophore gekoppelt werden. So wurde auch erfolgreich ein modifizierter Dot-Blot Overlay Assay etabliert, der die qualitative und semi-quantitative Charakterisierung der Interaktion bei Verwendung mit sA $\beta$ 42 ermöglichte. Die Interaktion konnte auch in humanen A $\beta$ 42 Präparationen durch die Verwendung von Homogenaten aus frontalen Kortices von AD-Patienten bestätigt werden. Auch in diesem Assay-Format konnte die Interaktion nicht in Kontrollgehirnen nachgewiesen werden. Die stärkste Bindung wurde in den unlöslichen P2-Fraktionen der AD-Patienten detektiert. Hierbei wurde zum ersten Mal die Notwendigkeit der PrP<sup>C</sup> N-terminal lokalisierten Bindestellen zur Vermittlung der Interaktion zwischen humanem Prion Protein und humanen A $\beta$ -Oligomeren nachgewiesen. Die Spezifität der Interaktion ließ sich durch die Verwendung des oligomerspezifischen Antikörpers A11 beweisen. Durch Kombination von Größenausschlusschromatographie mit APIA wurde die bindende A $\beta$ -Oligomer Spezies in menschlichen Gehirnen identifiziert. Interessanterweise zeigen diese im Vergleich zu sA $\beta$ 42 ein hohes Molekulargewicht im Bereich von >156 kDa – 300 kDa. Die Vermutung es handelt sich wahrscheinlich um einen ternären Komplex von A $\beta$ -Oligomeren mit assoziierten Proteinen konnte bisher nicht bestätigt werden. Möglicherweise handelt es sich somit um eine größere oligomere-Spezies von A $\beta$ .

## Literaturverzeichnis

- Abramov, Efrat, Iftach Dolev, Hilla Fogel, Giuseppe D Ciccotosto, Eyal Ruff, and Inna Slutsky. "Amyloid-Beta as a Positive Endogenous Regulator of Release Probability at Hippocampal Synapses." *Nature Neuroscience* 12, no. 12 (December 2009): 1567–76. doi:10.1038/nn.2433.
- Abramowski, Dorothee, Karl-Heinz Wiederhold, Ulrich Furrer, Anne-Lise Jaton, Anton Neuenschwander, Marie-Joséphine Runser, Simone Danner, et al. "Dynamics of Abeta Turnover and Deposition in Different Beta-Amyloid Precursor Protein Transgenic Mouse Models Following Gamma-Secretase Inhibition." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327, no. 2 (November 2008): 411–24. doi:10.1124/jpet.108.140327.
- Aguzzi, Adriano, Frank Baumann, and Juliane Bremer. "The Prion's Elusive Reason for Being." *Annual Review of Neuroscience* 31 (2008): 439–77. doi:10.1146/annurev.neuro.31.060407.125620.
- Aguzzi, Adriano, and Magdalini Polymenidou. "Mammalian Prion Biology: One Century of Evolving Concepts." *Cell* 116, no. 2 (January 23, 2004): 313–27.
- Alier, Kwai, Li Ma, Jing Yang, David Westaway, and Jack H Jhamandas. "A $\beta$  Inhibition of Ionic Conductance in Mouse Basal Forebrain Neurons Is Dependent upon the Cellular Prion Protein PrPC." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31, no. 45 (November 9, 2011): 16292–97. doi:10.1523/JNEUROSCI.4367-11.2011.
- Altmeppen, Hermann C, Johannes Prox, Berta Puig, Frank Dohler, Clemens Falker, Susanne Krasemann, and Markus Glatzel. "Roles of Endoproteolytic A-Cleavage and Shedding of the Prion Protein in Neurodegeneration." *The FEBS Journal* 280, no. 18 (September 2013): 4338–47. doi:10.1111/febs.12196.
- Altmeppen, Hermann C, Berta Puig, Frank Dohler, Dana K Thurm, Clemens Falker, Susanne Krasemann, and Markus Glatzel. "Proteolytic Processing of the Prion Protein in Health and Disease." *American Journal of Neurodegenerative Disease* 1, no. 1 (2012): 15–31.
- Altmeppen, Hermann C., Johannes Prox, Berta Puig, Mark A. Kluth, Christian Bernreuther, Dana Thurm, Ellen Jorissen, et al. "Lack of a-Disintegrin-and-Metalloproteinase ADAM10 Leads to Intracellular Accumulation and Loss of Shedding of the Cellular Prion Protein in Vivo." *Molecular Neurodegeneration* 6, no. 1 (May 27, 2011): 36. doi:10.1186/1750-1326-6-36.
- "AlzGene." Accessed April 21, 2014. <http://www.alzgene.org/meta.asp?geneID=83>.
- Alzheimer, Alzheimer. "About a Peculiar Disease of the Cerebral Cortex. By Alois Alzheimer, 1907 (Translated by L. Jarvik and H. Greenson)." *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 1, no. 1 (1987): 3–8.
- Alzheimer's Association. "2012 Alzheimer's Disease Facts and Figures." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 8, no. 2 (2012): 131–68. doi:10.1016/j.jalz.2012.02.001.
- Amieva, H el ene, Hind Mokri, M elanie Le Goff, C eline Meillon, H el ene Jacqmin-Gadda, Alexandra Foubert-Samier, Jean-Marc Orgogozo, Yaakov Stern, and Jean-Fran ois Dartigues. "Compensatory Mechanisms in Higher-Educated Subjects with Alzheimer's Disease: A Study of 20 Years of Cognitive Decline." *Brain: A Journal of Neurology* 137, no. Pt 4 (April 2014): 1167–75. doi:10.1093/brain/awu035.
- . "Compensatory Mechanisms in Higher-Educated Subjects with Alzheimer's Disease: A Study of 20 Years of Cognitive Decline." *Brain: A Journal of Neurology* 137, no. Pt 4 (April 2014): 1167–75. doi:10.1093/brain/awu035.
- Arispe, N, H B Pollard, and E Rojas. "Giant Multilevel Cation Channels Formed by Alzheimer Disease Amyloid Beta-Protein [A Beta P-(1-40)] in Bilayer Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 22 (November 15, 1993): 10573–77.

- Arriagada, P V, J H Growdon, E T Hedley-Whyte, and B T Hyman. "Neurofibrillary Tangles but Not Senile Plaques Parallel Duration and Severity of Alzheimer's Disease." *Neurology* 42, no. 3 Pt 1 (March 1992): 631–39.
- Balducci, Claudia, Marten Beeg, Matteo Stravalaci, Antonio Bastone, Alessandra Scip, Emiliano Biasini, Laura Tapella, et al. "Synthetic Amyloid-Beta Oligomers Impair Long-Term Memory Independently of Cellular Prion Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, no. 5 (February 2, 2010): 2295–2300. doi:10.1073/pnas.0911829107.
- Ball, K Aurelia, Aaron H Phillips, Paul S Nerenberg, Nicolas L Fawzi, David E Wemmer, and Teresa Head-Gordon. "Homogeneous and Heterogeneous Tertiary Structure Ensembles of Amyloid-B Peptides." *Biochemistry* 50, no. 35 (September 6, 2011): 7612–28. doi:10.1021/bi200732x.
- Ball, K. Aurelia, Aaron H. Phillips, David E. Wemmer, and Teresa Head-Gordon. "Differences in B-Strand Populations of Monomeric A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42." *Biophysical Journal* 104, no. 12 (June 2013): 2714–24. doi:10.1016/j.bpj.2013.04.056.
- Ballard, Clive, Serge Gauthier, Anne Corbett, Carol Brayne, Dag Aarsland, and Emma Jones. "Alzheimer's Disease." *Lancet* 377, no. 9770 (March 19, 2011): 1019–31. doi:10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
- Barberger-Gateau, Pascale, Jean-Charles Lambert, Catherine Féart, Karine Pérès, Karen Ritchie, Jean-François Dartigues, and Annick Alpérovitch. "From Genetics to Dietetics: The Contribution of Epidemiology to Understanding Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 33 Suppl 1 (2013): S457–463. doi:10.3233/JAD-2012-129019.
- Barghorn, Stefan, Volker Nimmrich, Andreas Striebinger, Carsten Krantz, Patrick Keller, Bodo Janson, Michael Bahr, et al. "Globular Amyloid Beta-Peptide Oligomer - a Homogenous and Stable Neuropathological Protein in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 95, no. 3 (November 2005): 834–47. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03407.x.
- Barry, Andrew E, Igor Klyubin, Jessica M Mc Donald, Alexandra J Mably, Michael A Farrell, Michael Scott, Dominic M Walsh, and Michael J Rowan. "Alzheimer's Disease Brain-Derived Amyloid-B-Mediated Inhibition of LTP in Vivo Is Prevented by Immunotargeting Cellular Prion Protein." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31, no. 20 (May 18, 2011): 7259–63. doi:10.1523/JNEUROSCI.6500-10.2011.
- Bate, Clive, and Alun Williams. "Amyloid-B-Induced Synapse Damage Is Mediated via Cross-Linkage of Cellular Prion Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 286, no. 44 (November 4, 2011): 37955–63. doi:10.1074/jbc.M111.248724.
- Bateman, Randall J, Ling Y Munsell, John C Morris, Robert Swarm, Kevin E Yarasheski, and David M Holtzman. "Human Amyloid-Beta Synthesis and Clearance Rates as Measured in Cerebrospinal Fluid in Vivo." *Nature Medicine* 12, no. 7 (July 2006): 856–61. doi:10.1038/nm1438.
- Bates, K A, G Verdile, Q-X Li, D Ames, P Hudson, C L Masters, and R N Martins. "Clearance Mechanisms of Alzheimer's Amyloid-Beta Peptide: Implications for Therapeutic Design and Diagnostic Tests." *Molecular Psychiatry* 14, no. 5 (May 2009): 469–86. doi:10.1038/mp.2008.96.
- Bekris, Lynn M, Chang-En Yu, Thomas D Bird, and Debby W Tsuang. "Genetics of Alzheimer Disease." *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23, no. 4 (December 2010): 213–27. doi:10.1177/0891988710383571.
- Benilova, Iryna, and Bart De Strooper. "Prion Protein in Alzheimer's Pathogenesis: A Hot and Controversial Issue." *EMBO Molecular Medicine* 2, no. 8 (August 2010): 289–90. doi:10.1002/emmm.201000088.
- Berr, Claudine, Nicole Helbecque, Véronique Sazdovitch, Michel Mohr, Carole Amant, Philippe Amouyel, Annick Alpérovitch, and Jean-Jacques Hauw. "Polymorphism of the Codon 129 of the Prion Protein (PrP) Gene and

- Neuropathology of Cerebral Ageing." *Acta Neuropathologica* 106, no. 1 (July 2003): 71–74. doi:10.1007/s00401-003-0700-7.
- Biasini, Emiliano, Jessie A Turnbaugh, Ursula Unterberger, and David A Harris. "Prion Protein at the Crossroads of Physiology and Disease." *Trends in Neurosciences* 35, no. 2 (February 2012): 92–103. doi:10.1016/j.tins.2011.10.002.
- Bitan, Gal, Marina D Kirkitadze, Aleksey Lomakin, Sabrina S Vollers, George B Benedek, and David B Teplow. "Amyloid Beta -Protein (Abeta) Assembly: Abeta 40 and Abeta 42 Oligomerize through Distinct Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 1 (January 7, 2003): 330–35. doi:10.1073/pnas.222681699.
- Braak, H, and E Braak. "Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82, no. 4 (1991): 239–59.
- Brody, David L, Sandra Magnoni, Kate E Schwetye, Michael L Spinner, Thomas J Esparza, Nino Stocchetti, Gregory J Zipfel, and David M Holtzman. "Amyloid-Beta Dynamics Correlate with Neurological Status in the Injured Human Brain." *Science (New York, N. Y.)* 321, no. 5893 (August 29, 2008): 1221–24. doi:10.1126/science.1161591.
- Brown, D R, B Schmidt, M H Groschup, and H A Kretzschmar. "Prion Protein Expression in Muscle Cells and Toxicity of a Prion Protein Fragment." *European Journal of Cell Biology* 75, no. 1 (January 1998): 29–37. doi:10.1016/S0171-9335(98)80043-5.
- Brown, David R. "Prion Protein Expression Modulates Neuronal Copper Content." *Journal of Neurochemistry* 87, no. 2 (October 2003): 377–85.
- Bucciantini, Monica, Elisa Giannoni, Fabrizio Chiti, Fabiana Baroni, Lucia Formigli, Jesús Zurdo, Niccolò Taddei, Giampietro Ramponi, Christopher M Dobson, and Massimo Stefani. "Inherent Toxicity of Aggregates Implies a Common Mechanism for Protein Misfolding Diseases." *Nature* 416, no. 6880 (April 4, 2002): 507–11. doi:10.1038/416507a.
- Bufill, E, A Bartés, A Moral, T Casadevall, M Codinachs, E Zapater, J Carles Rovira, P Roura, R Oliva, and R Blesa. "[Genetic and environmental factors that may influence in the senile form of Alzheimer's disease: nested case control studies]." *Neurología (Barcelona, Spain)* 24, no. 2 (March 2009): 108–12.
- Busciglio, J, D H Gabuzda, P Matsudaira, and B A Yankner. "Generation of Beta-Amyloid in the Secretory Pathway in Neuronal and Nonneuronal Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 5 (March 1, 1993): 2092–96.
- Caccamo, Antonella, Salvatore Oddo, Michael C Sugarman, Yama Akbari, and Frank M LaFerla. "Age- and Region-Dependent Alterations in Abeta-Degrading Enzymes: Implications for Abeta-Induced Disorders." *Neurobiology of Aging* 26, no. 5 (May 2005): 645–54. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.013.
- Caetano, Fabiana A, Flavio H Beraldo, Glaucia N M Hajj, Andre L Guimaraes, Sofia Jürgensen, Ana Paula Wasilewska-Sampaio, Pedro H F Hirata, et al. "Amyloid-Beta Oligomers Increase the Localization of Prion Protein at the Cell Surface." *Journal of Neurochemistry* 117, no. 3 (May 2011): 538–53. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07225.x.
- Callela, Anna Maria, Mélissa Farinelli, Mario Nuvolone, Osvaldo Mirante, Rita Moos, Jeppe Falsig, Isabelle M Mansuy, and Adriano Aguzzi. "Prion Protein and Abeta-Related Synaptic Toxicity Impairment." *EMBO Molecular Medicine* 2, no. 8 (August 2010): 306–14. doi:10.1002/emmm.201000082.
- Cao, X, and T C Südhof. "A Transcriptionally [correction of Transcriptively] Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60." *Science (New York, N. Y.)* 293, no. 5527 (July 6, 2001): 115–20. doi:10.1126/science.1058783.
- Cao, Xinwei, and Thomas C Südhof. "Dissection of Amyloid-Beta Precursor Protein-Dependent Transcriptional Transactivation." *The Journal of Biological Chemistry* 279, no. 23 (June 4, 2004): 24601–11. doi:10.1074/jbc.M402248200.

- Cashman, N R, R Loertscher, J Nalbantoglu, I Shaw, R J Kascsak, D C Bolton, and P E Bendheim. "Cellular Isoform of the Scrapie Agent Protein Participates in Lymphocyte Activation." *Cell* 61, no. 1 (April 6, 1990): 185–92.
- Cataldo, Janine K, and Stanton A Glantz. "Smoking Cessation and Alzheimer's Disease: Facts, Fallacies and Promise." *Expert Review of Neurotherapeutics* 10, no. 5 (May 2010): 629–31. doi:10.1586/ern.10.34.
- Chen, S G, D B Teplow, P Parchi, J K Teller, P Gambetti, and L Autilio-Gambetti. "Truncated Forms of the Human Prion Protein in Normal Brain and in Prion Diseases." *The Journal of Biological Chemistry* 270, no. 32 (August 11, 1995): 19173–80.
- Chen, Shugui, Satya P Yadav, and Witold K Surewicz. "Interaction between Human Prion Protein and Amyloid-Beta (Abeta) Oligomers: Role OF N-Terminal Residues." *The Journal of Biological Chemistry* 285, no. 34 (August 20, 2010): 26377–83. doi:10.1074/jbc.M110.145516.
- Chen, Xiao-Han, Victoria E Johnson, Kunihiro Uryu, John Q Trojanowski, and Douglas H Smith. "A Lack of Amyloid Beta Plaques despite Persistent Accumulation of Amyloid Beta in Axons of Long-Term Survivors of Traumatic Brain Injury." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 19, no. 2 (April 2009): 214–23. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00176.x.
- Chiang, Peter K, Michael A Lam, and Yuan Luo. "The Many Faces of Amyloid Beta in Alzheimer's Disease." *Current Molecular Medicine* 8, no. 6 (September 2008): 580–84.
- Chiarini, Luciana B, Adriana R O Freitas, Silvio M Zanata, Ricardo R Brentani, Vilma R Martins, and Rafael Linden. "Cellular Prion Protein Transduces Neuroprotective Signals." *The EMBO Journal* 21, no. 13 (July 1, 2002): 3317–26. doi:10.1093/emboj/cdf324.
- Chung, Erika, Yong Ji, Yanjie Sun, Richard J Kascsak, Regina B Kascsak, Pankaj D Mehta, Stephen M Strittmatter, and Thomas Wisniewski. "Anti-PrPC Monoclonal Antibody Infusion as a Novel Treatment for Cognitive Deficits in an Alzheimer's Disease Model Mouse." *BMC Neuroscience* 11 (2010): 130. doi:10.1186/1471-2202-11-130.
- Cleary, James P, Dominic M Walsh, Jacki J Hofmeister, Ganesh M Shankar, Michael A Kuskowski, Dennis J Selkoe, and Karen H Ashe. "Natural Oligomers of the Amyloid-Beta Protein Specifically Disrupt Cognitive Function." *Nature Neuroscience* 8, no. 1 (January 2005): 79–84. doi:10.1038/nn1372.
- Corder, E H, A M Saunders, N J Risch, W J Strittmatter, D E Schmechel, P C Gaskell Jr, J B Rimmler, P A Locke, P M Conneally, and K E Schmechel. "Protective Effect of Apolipoprotein E Type 2 Allele for Late Onset Alzheimer Disease." *Nature Genetics* 7, no. 2 (June 1994): 180–84. doi:10.1038/ng0694-180.
- Corder, E H, A M Saunders, W J Strittmatter, D E Schmechel, P C Gaskell, G W Small, A D Roses, J L Haines, and M A Pericak-Vance. "Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families." *Science (New York, N.Y.)* 261, no. 5123 (August 13, 1993): 921–23.
- Cummings, B J, C J Pike, R Shankle, and C W Cotman. "Beta-Amyloid Deposition and Other Measures of Neuropathology Predict Cognitive Status in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 17, no. 6 (December 1996): 921–33.
- Dahlgren, Karie N, Arlene M Manelli, W Blaine Stine Jr, Lorinda K Baker, Grant A Krafft, and Mary Jo LaDu. "Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid-Beta Peptides Differentially Affect Neuronal Viability." *The Journal of Biological Chemistry* 277, no. 35 (August 30, 2002): 32046–53. doi:10.1074/jbc.M201750200.
- De Strooper, B, and W Annaert. "Proteolytic Processing and Cell Biological Functions of the Amyloid Precursor Protein." *Journal of Cell Science* 113 ( Pt 11) (June 2000): 1857–70.
- Debatin, Laura, Johannes Streffer, Markus Geissen, Jakob Matschke, Adriano Aguzzi, and Markus Glatzel. "Association between Deposition of Beta-Amyloid

- and Pathological Prion Protein in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease." *Neuro-Degenerative Diseases* 5, no. 6 (2008): 347–54. doi:10.1159/000121389.
- DeKosky, Steven T, Kaj Blennow, Milos D Ikonovic, and Sam Gandy. "Acute and Chronic Traumatic Encephalopathies: Pathogenesis and Biomarkers." *Nature Reviews. Neurology* 9, no. 4 (April 2013): 192–200. doi:10.1038/nrneurol.2013.36.
- Del Bo, Roberto, Marina Scarlato, Serena Ghezzi, Filippo Martinelli-Boneschi, Chiara Fenoglio, Gloria Galimberti, Sara Galbiati, et al. "Is M129V of PRNP Gene Associated with Alzheimer's Disease? A Case-Control Study and a Meta-Analysis." *Neurobiology of Aging* 27, no. 5 (May 2006): 770.e1–770.e5. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.025.
- Dermaut, Bart, Esther A Croes, Rosa Rademakers, Marleen Van den Broeck, Marc Cruts, Albert Hofman, Cornelia M van Duijn, and Christine Van Broeckhoven. "PRNP Val129 Homozygosity Increases Risk for Early-Onset Alzheimer's Disease." *Annals of Neurology* 53, no. 3 (March 2003): 409–12. doi:10.1002/ana.10507.
- Deshpande, Atul, Erene Mina, Charles Glabe, and Jorge Busciglio. "Different Conformations of Amyloid Beta Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, no. 22 (May 31, 2006): 6011–18. doi:10.1523/JNEUROSCI.1189-06.2006.
- Dodson, Sara E, Marla Gearing, Carol F Lippa, Thomas J Montine, Allan I Levey, and James J Lah. "LR11/SorLA Expression Is Reduced in Sporadic Alzheimer Disease but Not in Familial Alzheimer Disease." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65, no. 9 (September 2006): 866–72. doi:10.1097/01.jnen.0000228205.19915.20.
- Du, An-Tao, Norbert Schuff, Joel H Kramer, Howard J Rosen, Maria Luisa Gorno-Tempini, Katherine Rankin, Bruce L Miller, and Michael W Weiner. "Different Regional Patterns of Cortical Thinning in Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia." *Brain: A Journal of Neurology* 130, no. Pt 4 (April 2007): 1159–66. doi:10.1093/brain/awm016.
- Dubois, Bruno, Howard H Feldman, Claudia Jacova, Jeffrey L Cummings, Steven T Dekosky, Pascale Barberger-Gateau, André Delacourte, et al. "Revising the Definition of Alzheimer's Disease: A New Lexicon." *Lancet Neurology* 9, no. 11 (November 2010): 1118–27. doi:10.1016/S1474-4422(10)70223-4.
- Eckman, Elizabeth A, Mona Watson, Laura Marlow, Kumar Sambamurti, and Christopher B Eckman. "Alzheimer's Disease Beta-Amyloid Peptide Is Increased in Mice Deficient in Endothelin-Converting Enzyme." *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 4 (January 24, 2003): 2081–84. doi:10.1074/jbc.C200642200.
- Edbauer, Dieter, Edith Winkler, Joerg T Regula, Brigitte Pesold, Harald Steiner, and Christian Haass. "Reconstitution of Gamma-Secretase Activity." *Nature Cell Biology* 5, no. 5 (May 2003): 486–88. doi:10.1038/ncb960.
- Engelborghs, Sebastiaan, Karen De Vreese, Tom Van de Castele, Hugo Vanderstichele, Bart Van Everbroeck, Patrick Cras, Jean-Jacques Martin, Eugeen Vanmechelen, and Peter Paul De Deyn. "Diagnostic Performance of a CSF-Biomarker Panel in Autopsy-Confirmed Dementia." *Neurobiology of Aging* 29, no. 8 (August 2008): 1143–59. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.016.
- Englund, Hillevi. "Soluble Amyloid-B Aggregates in Alzheimer's Disease," 2009. <http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2:174745>.
- Esch, F S, P S Keim, E C Beattie, R W Blacher, A R Culwell, T Oltersdorf, D McClure, and P J Ward. "Cleavage of Amyloid Beta Peptide during Constitutive Processing of Its Precursor." *Science (New York, N.Y.)* 248, no. 4959 (June 1, 1990): 1122–24.
- Ferri, Cleusa P, Martin Prince, Carol Brayne, Henry Brodaty, Laura Fratiglioni, Mary Ganguli, Kathleen Hall, et al. "Global Prevalence of Dementia: A Delphi

- Consensus Study." *Lancet* 366, no. 9503 (December 17, 2005): 2112–17. doi:10.1016/S0140-6736(05)67889-0.
- Fillenbaum, Gerda G, Gerald van Belle, John C Morris, Richard C Mohs, Suzanne S Mirra, Patricia C Davis, Pierre N Tariot, et al. "Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): The First Twenty Years." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 4, no. 2 (March 2008): 96–109. doi:10.1016/j.jalz.2007.08.005.
- Fletcher, T G, and D A Keire. "The Interaction of Beta-Amyloid Protein Fragment (12-28) with Lipid Environments." *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 6, no. 3 (March 1997): 666–75. doi:10.1002/pro.5560060316.
- Fluharty, Brian R, Emiliano Biasini, Matteo Stravalaci, Alessandra Scip, Luisa Diomede, Claudia Balducci, Pietro La Vitola, et al. "An N-Terminal Fragment of the Prion Protein Binds to Amyloid-B Oligomers and Inhibits Their Neurotoxicity in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 288, no. 11 (March 15, 2013): 7857–66. doi:10.1074/jbc.M112.423954.
- Fonte, Virginia, Wadim Jan Kapulkin, Vadim Kapulkin, Andrew Taft, Amy Fluet, David Friedman, and Christopher D Link. "Interaction of Intracellular Beta Amyloid Peptide with Chaperone Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, no. 14 (July 9, 2002): 9439–44. doi:10.1073/pnas.152313999.
- Förstl, Hans. *Demenzen in Theorie und Praxis*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-19795-6>.
- Freir, Darragh B, Andrew J Nicoll, Igor Klyubin, Silvia Panico, Jessica M Mc Donald, Emmanuel Risse, Emmanuel A Asante, et al. "Interaction between Prion Protein and Toxic Amyloid B Assemblies Can Be Therapeutically Targeted at Multiple Sites." *Nature Communications* 2 (2011): 336. doi:10.1038/ncomms1341.
- Gandy, Sam. "The Role of Cerebral Amyloid Beta Accumulation in Common Forms of Alzheimer Disease." *The Journal of Clinical Investigation* 115, no. 5 (May 2005): 1121–29. doi:10.1172/JCI25100.
- Gatz, Margaret, Chandra A Reynolds, Laura Fratiglioni, Boo Johansson, James A Mortimer, Stig Berg, Amy Fiske, and Nancy L Pedersen. "Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease." *Archives of General Psychiatry* 63, no. 2 (February 2006): 168–74. doi:10.1001/archpsyc.63.2.168.
- Gellermann, Gerald P, Helga Byrnes, Andreas Striebinger, Kathrin Ullrich, Reinhold Mueller, Heinz Hillen, and Stefan Barghorn. "Abeta-Globulomers Are Formed Independently of the Fibril Pathway." *Neurobiology of Disease* 30, no. 2 (May 2008): 212–20. doi:10.1016/j.nbd.2008.01.010.
- Gifford, D R, R G Holloway, and B G Vickrey. "Systematic Review of Clinical Prediction Rules for Neuroimaging in the Evaluation of Dementia." *Archives of Internal Medicine* 160, no. 18 (October 9, 2000): 2855–62.
- Gimbel, David A, Haakon B Nygaard, Erin E Coffey, Erik C Gunther, Juha Laurén, Zachary A Gimbel, and Stephen M Strittmatter. "Memory Impairment in Transgenic Alzheimer Mice Requires Cellular Prion Protein." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30, no. 18 (May 5, 2010): 6367–74. doi:10.1523/JNEUROSCI.0395-10.2010.
- Glabe, Charles G. "Structural Classification of Toxic Amyloid Oligomers." *The Journal of Biological Chemistry* 283, no. 44 (October 31, 2008): 29639–43. doi:10.1074/jbc.R800016200.
- Glabe, Charles G, and Rakez Kaye. "Common Structure and Toxic Function of Amyloid Oligomers Implies a Common Mechanism of Pathogenesis." *Neurology* 66, no. 2 Suppl 1 (January 24, 2006): S74–78. doi:10.1212/01.wnl.0000192103.24796.42.
- Glatzel, Markus, Peter M Ott, Thomas Linder, Jan O Gebbers, Arnold Gmür, Werner Wüst, Gerhard Huber, et al. "Human Prion Diseases: Epidemiology and Integrated Risk Assessment." *Lancet Neurology* 2, no. 12 (December 2003): 757–63.

- Glenner, G G, and C W Wong. "Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, no. 3 (May 16, 1984): 885–90.
- Gong, Yuesong, Lei Chang, Kirsten L Viola, Pascale N Lacor, Mary P Lambert, Caleb E Finch, Grant A Krafft, and William L Klein. "Alzheimer's Disease-Affected Brain: Presence of Oligomeric A Beta Ligands (ADDLs) Suggests a Molecular Basis for Reversible Memory Loss." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 18 (September 2, 2003): 10417–22. doi:10.1073/pnas.1834302100.
- Graner, E, A F Mercadante, S M Zanata, O V Forlenza, A L Cabral, S S Veiga, M A Juliano, et al. "Cellular Prion Protein Binds Laminin and Mediates Neuritogenesis." *Brain Research. Molecular Brain Research* 76, no. 1 (March 10, 2000): 85–92.
- Granic, Antoneta, and Huntington Potter. "Mitotic Spindle Defects and Chromosome Mis-Segregation Induced by LDL/Cholesterol—Implications for Niemann-Pick C1, Alzheimer's Disease, and Atherosclerosis." Edited by Ken Arai. *PLoS ONE* 8, no. 4 (April 12, 2013): e60718. doi:10.1371/journal.pone.0060718.
- Gravina, S A, L Ho, C B Eckman, K E Long, L Otvos Jr, L H Younkin, N Suzuki, and S G Younkin. "Amyloid Beta Protein (A Beta) in Alzheimer's Disease Brain. Biochemical and Immunocytochemical Analysis with Antibodies Specific for Forms Ending at A Beta 40 or A Beta 42(43)." *The Journal of Biological Chemistry* 270, no. 13 (March 31, 1995): 7013–16.
- Green, Robert C, L Adrienne Cupples, Alex Kurz, Sanford Auerbach, Rodney Go, Dessa Sadovnick, Ranjan Duara, et al. "Depression as a Risk Factor for Alzheimer Disease: The MIRAGE Study." *Archives of Neurology* 60, no. 5 (May 2003): 753–59. doi:10.1001/archneur.60.5.753.
- Griffiths, Heledd H, Isobel J Whitehouse, Herbert Baybutt, Debbie Brown, Katherine A B Kellett, Carolyn D Jackson, Anthony J Turner, Pedro Piccardo, Jean C Manson, and Nigel M Hooper. "Prion Protein Interacts with BACE1 Protein and Differentially Regulates Its Activity toward Wild Type and Swedish Mutant Amyloid Precursor Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 286, no. 38 (September 23, 2011): 33489–500. doi:10.1074/jbc.M111.278556.
- Grimmer, Timo, Susanne Tholen, Behrooz H Yousefi, Panagiotis Alexopoulos, Annette Förschler, Hans Förstl, Gjermund Henriksen, et al. "Progression of Cerebral Amyloid Load Is Associated with the Apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 Genotype in Alzheimer's Disease." *Biological Psychiatry* 68, no. 10 (November 15, 2010): 879–84. doi:10.1016/j.biopsych.2010.05.013.
- Guillot-Sestier, Marie-Victoire, Claire Sunyach, Charlotte Druon, Sabine Scarzello, and Frédéric Checler. "The Alpha-Secretase-Derived N-Terminal Product of Cellular Prion, N1, Displays Neuroprotective Function in Vitro and in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry* 284, no. 51 (December 18, 2009): 35973–86. doi:10.1074/jbc.M109.051086.
- Guillot-Sestier, Marie-Victoire, Claire Sunyach, Sergio T Ferreira, Maria-Paz Marzolo, Charlotte Bauer, Aurélie Thevenet, and Frédéric Checler. "A-Secretase-Derived Fragment of Cellular Prion, N1, Protects against Monomeric and Oligomeric Amyloid B (A $\beta$ )-Associated Cell Death." *The Journal of Biological Chemistry* 287, no. 7 (February 10, 2012): 5021–32. doi:10.1074/jbc.M111.323626.
- Gunther, Erik C, and Stephen M Strittmatter. "Beta-Amyloid Oligomers and Cellular Prion Protein in Alzheimer's Disease." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 88, no. 4 (April 2010): 331–38. doi:10.1007/s00109-009-0568-7.
- Gustafson, Deborah, Elisabet Rothenberg, Kaj Blennow, Bertil Steen, and Ingmar Skoog. "An 18-Year Follow-up of Overweight and Risk of Alzheimer Disease." *Archives of Internal Medicine* 163, no. 13 (July 14, 2003): 1524–28. doi:10.1001/archinte.163.13.1524.

- Haass, C, and D J Selkoe. "Cellular Processing of Beta-Amyloid Precursor Protein and the Genesis of Amyloid Beta-Peptide." *Cell* 75, no. 6 (December 17, 1993): 1039–42.
- Haass, Christian. "Take Five--BACE and the Gamma-Secretase Quartet Conduct Alzheimer's Amyloid Beta-Peptide Generation." *The EMBO Journal* 23, no. 3 (February 11, 2004): 483–88. doi:10.1038/sj.emboj.7600061.
- Haass, Christian, Christoph Kaether, Gopal Thinakaran, and Sangram Sisodia. "Trafficking and Proteolytic Processing of APP." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, no. 5 (May 2012): a006270. doi:10.1101/cshperspect.a006270.
- Haass, Christian, and Dennis J Selkoe. "Soluble Protein Oligomers in Neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's Amyloid Beta-Peptide." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8, no. 2 (February 2007): 101–12. doi:10.1038/nrm2101.
- Hajj, Glaucia N M, Marilene H Lopes, Adriana F Mercadante, Silvio S Veiga, Rafael B da Silveira, Tiago G Santos, Karina C B Ribeiro, et al. "Cellular Prion Protein Interaction with Vitronectin Supports Axonal Growth and Is Compensated by Integrins." *Journal of Cell Science* 120, no. Pt 11 (June 1, 2007): 1915–26. doi:10.1242/jcs.03459.
- . "Cellular Prion Protein Interaction with Vitronectin Supports Axonal Growth and Is Compensated by Integrins." *Journal of Cell Science* 120, no. Pt 11 (June 1, 2007): 1915–26. doi:10.1242/jcs.03459.
- Handels, Ron L H, Pauline Aalten, Claire A G Wolfs, Marcel OldeRikkert, Philip Scheltens, Pieter Jelle Visser, Manuela A Joore, Johan L Severens, and Frans R J Verhey. "Diagnostic and Economic Evaluation of New Biomarkers for Alzheimer's Disease: The Research Protocol of a Prospective Cohort Study." *BMC Neurology* 12 (2012): 72. doi:10.1186/1471-2377-12-72.
- Hardy, J A, and G A Higgins. "Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis." *Science (New York, N.Y.)* 256, no. 5054 (April 10, 1992): 184–85.
- Hardy, John, and Dennis J Selkoe. "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics." *Science (New York, N.Y.)* 297, no. 5580 (July 19, 2002): 353–56. doi:10.1126/science.1072994.
- Harper, J D, and P T Lansbury Jr. "Models of Amyloid Seeding in Alzheimer's Disease and Scrapie: Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins." *Annual Review of Biochemistry* 66 (1997): 385–407. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.385.
- Harper, J D, S S Wong, C M Lieber, and P T Lansbury. "Observation of Metastable Aβ Amyloid Protofibrils by Atomic Force Microscopy." *Chemistry & Biology* 4, no. 2 (February 1997): 119–25.
- Hartley, D M, D M Walsh, C P Ye, T Diehl, S Vasquez, P M Vassilev, D B Teplow, and D J Selkoe. "Protofibrillar Intermediates of Amyloid Beta-Protein Induce Acute Electrophysiological Changes and Progressive Neurotoxicity in Cortical Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, no. 20 (October 15, 1999): 8876–84.
- Hasegawa, K, I Yamaguchi, S Omata, F Gejyo, and H Naiki. "Interaction between Aβ(1-42) and Aβ(1-40) in Alzheimer's Beta-Amyloid Fibril Formation in Vitro." *Biochemistry* 38, no. 47 (November 23, 1999): 15514–21.
- Hashimoto, Tadafumi, Alberto Serrano-Pozo, Yukiko Hori, Kenneth W Adams, Shuko Takeda, Adrian Olaf Banerji, Akinori Mitani, et al. "Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid B Peptide." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32, no. 43 (October 24, 2012): 15181–92. doi:10.1523/JNEUROSCI.1542-12.2012.
- Hayden, K M, M C Norton, D Darcey, T Ostbye, P P Zandi, J C S Breitner, K A Welsh-Bohmer, and Cache County Study Investigators. "Occupational Exposure to Pesticides Increases the Risk of Incident AD: The Cache County Study." *Neurology* 74, no. 19 (May 11, 2010): 1524–30. doi:10.1212/WNL.0b013e3181dd4423.

- He, Jie, Xiaoyan Li, Jiqiao Yang, Jichong Huang, Xiaowei Fu, Yonggang Zhang, and Hong Fan. "The Association between the Methionine/valine (M/V) Polymorphism (rs1799990) in the PRNP Gene and the Risk of Alzheimer Disease: An Update by Meta-Analysis." *Journal of the Neurological Sciences* 326, no. 1–2 (March 15, 2013): 89–95. doi:10.1016/j.jns.2013.01.020.
- Hejl, A, P Høgh, and G Waldemar. "Potentially Reversible Conditions in 1000 Consecutive Memory Clinic Patients." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 73, no. 4 (October 2002): 390–94.
- Hemming, Matthew L, and Dennis J Selkoe. "Amyloid Beta-Protein Is Degraded by Cellular Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) and Elevated by an ACE Inhibitor." *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 45 (November 11, 2005): 37644–50. doi:10.1074/jbc.M508460200.
- Holmes, Clive, Delphine Boche, David Wilkinson, Ghasem Yadegarfar, Vivienne Hopkins, Anthony Bayer, Roy W Jones, et al. "Long-Term Effects of Abeta42 Immunisation in Alzheimer's Disease: Follow-up of a Randomised, Placebo-Controlled Phase I Trial." *Lancet* 372, no. 9634 (July 19, 2008): 216–23. doi:10.1016/S0140-6736(08)61075-2.
- Hoshi, Minako, Michio Sato, Shinichiro Matsumoto, Akihiko Noguchi, Kaori Yasutake, Natsuko Yoshida, and Kazuki Sato. "Spherical Aggregates of Beta-Amyloid (amylospheroid) Show High Neurotoxicity and Activate Tau Protein Kinase I/glycogen Synthase Kinase-3beta." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 11 (May 27, 2003): 6370–75. doi:10.1073/pnas.1237107100.
- Hou, Liming, Haiyan Shao, Yongbo Zhang, Hua Li, Nanda K Menon, Elizabeth B Neuhaus, John M Brewer, et al. "Solution NMR Studies of the A beta(1-40) and A beta(1-42) Peptides Establish That the Met35 Oxidation State Affects the Mechanism of Amyloid Formation." *Journal of the American Chemical Society* 126, no. 7 (February 25, 2004): 1992–2005. doi:10.1021/ja036813f.
- Hulette, C M, K A Welsh-Bohmer, M G Murray, A M Saunders, D C Mash, and L M McIntyre. "Neuropathological and Neuropsychological Changes in 'Normal' Aging: Evidence for Preclinical Alzheimer Disease in Cognitively Normal Individuals." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 57, no. 12 (December 1998): 1168–74.
- Hyeon, Jae Wook, Su Yeon Kim, Jun Sun Park, Bo Yeong Choi, Sol Moe Lee, Young Ran Ju, Seong Soo A An, and Chi-Kyeong Kim. "The Association between Prion Proteins and Aβ<sub>1-42</sub> Oligomers in Cytotoxicity and Apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424, no. 2 (July 27, 2012): 214–20. doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.056.
- Irie, Fumiko, Annette L Fitzpatrick, Oscar L Lopez, Lewis H Kuller, Rita Peila, Anne B Newman, and Lenore J Launer. "Enhanced Risk for Alzheimer Disease in Persons with Type 2 Diabetes and APOE epsilon4: The Cardiovascular Health Study Cognition Study." *Archives of Neurology* 65, no. 1 (January 2008): 89–93. doi:10.1001/archneurol.2007.29.
- Iwatsubo, T, A Odaka, N Suzuki, H Mizusawa, N Nukina, and Y Ihara. "Visualization of A Beta 42(43) and A Beta 40 in Senile Plaques with End-Specific A Beta Monoclonals: Evidence That an Initially Deposited Species Is A Beta 42(43)." *Neuron* 13, no. 1 (July 1994): 45–53.
- Jakob-Roetne, Roland, and Helmut Jacobsen. "Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 48, no. 17 (2009): 3030–59. doi:10.1002/anie.200802808.
- Jarrett, J T, and P T Lansbury Jr. "Seeding 'One-Dimensional Crystallization' of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie?" *Cell* 73, no. 6 (June 18, 1993): 1055–58.
- Johansson, Ann-Sofi, Anita Garlind, Fredrik Berglind-Dehlin, Göran Karlsson, Katarina Edwards, Pär Gellerfors, Frida Ekholm-Pettersson, Jan Palmblad, and Lars Lannfelt. "Docosahexaenoic Acid Stabilizes Soluble Amyloid-Beta

- Protofibrils and Sustains Amyloid-Beta-Induced Neurotoxicity in Vitro." *The FEBS Journal* 274, no. 4 (February 2007): 990–1000. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05647.x.
- Kalbe, E, J Kessler, P Calabrese, R Smith, A P Passmore, M Brand, and R Bullock. "DemTect: A New, Sensitive Cognitive Screening Test to Support the Diagnosis of Mild Cognitive Impairment and Early Dementia." *International Journal of Geriatric Psychiatry* 19, no. 2 (February 2004): 136–43. doi:10.1002/gps.1042.
- Kanemitsu, Hyoe, Takami Tomiyama, and Hiroshi Mori. "Human Nephilysin Is Capable of Degrading Amyloid Beta Peptide Not Only in the Monomeric Form but Also the Pathological Oligomeric Form." *Neuroscience Letters* 350, no. 2 (October 23, 2003): 113–16.
- Kasczak, Richard. "Reiterating the Epitope Specificity of Prion-Specific mAb 3F4." *Journal of Biological Chemistry* 285, no. 20 (May 14, 2010): 1e5–1e5. doi:10.1074/jbc.L109.088831.
- Kawahara, M, and Y Kuroda. "Molecular Mechanism of Neurodegeneration Induced by Alzheimer's Beta-Amyloid Protein: Channel Formation and Disruption of Calcium Homeostasis." *Brain Research Bulletin* 53, no. 4 (November 1, 2000): 389–97.
- Kayed, Rakez, Isabel Canto, Leonid Breydo, Suhail Rasool, Tamas Lukacsovich, Jessica Wu, Ricardo Albay 3rd, et al. "Conformation Dependent Monoclonal Antibodies Distinguish Different Replicating Strains or Conformers of Prefibrillar A $\beta$  Oligomers." *Molecular Neurodegeneration* 5 (2010): 57. doi:10.1186/1750-1326-5-57.
- Kayed, Rakez, Elizabeth Head, Jennifer L Thompson, Theresa M McIntire, Saskia C Milton, Carl W Cotman, and Charles G Glabe. "Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis." *Science (New York, N.Y.)* 300, no. 5618 (April 18, 2003): 486–89. doi:10.1126/science.1079469.
- Kayed, Rakez, Yuri Sokolov, Brian Edmonds, Theresa M McIntire, Saskia C Milton, James E Hall, and Charles G Glabe. "Permeabilization of Lipid Bilayers Is a Common Conformation-Dependent Activity of Soluble Amyloid Oligomers in Protein Misfolding Diseases." *The Journal of Biological Chemistry* 279, no. 45 (November 5, 2004): 46363–66. doi:10.1074/jbc.C400260200.
- Kessels, Helmut W, Louis N Nguyen, Sadegh Nabavi, and Roberto Malinow. "The Prion Protein as a Receptor for Amyloid-Beta." *Nature* 466, no. 7308 (August 12, 2010): E3–4; discussion E4–5. doi:10.1038/nature09217.
- Kim, Woojin, and Michael H Hecht. "Sequence Determinants of Enhanced Amyloidogenicity of Alzheimer A $\beta$ 42 Peptide Relative to A $\beta$ 40." *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 41 (October 14, 2005): 35069–76. doi:10.1074/jbc.M505763200.
- Kimberly, W T, W Xia, T Rahmati, M S Wolfe, and D J Selkoe. "The Transmembrane Aspartates in Presenilin 1 and 2 Are Obligatory for Gamma-Secretase Activity and Amyloid Beta-Protein Generation." *The Journal of Biological Chemistry* 275, no. 5 (February 4, 2000): 3173–78.
- Kivipelto, M, E L Helkala, M P Laakso, T Hänninen, M Hallikainen, K Alhainen, H Soininen, J Tuomilehto, and A Nissinen. "Midlife Vascular Risk Factors and Alzheimer's Disease in Later Life: Longitudinal, Population Based Study." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 322, no. 7300 (June 16, 2001): 1447–51.
- Klunk, William E, Henry Engler, Agneta Nordberg, Yanming Wang, Gunnar Blomqvist, Daniel P Holt, Mats Bergström, et al. "Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B." *Annals of Neurology* 55, no. 3 (March 2004): 306–19. doi:10.1002/ana.20009.
- Klyubin, Igor, Dominic M Walsh, William K Cullen, Julia V Fadeeva, Roger Anwyl, Dennis J Selkoe, and Michael J Rowan. "Soluble Arctic Amyloid Beta Protein Inhibits Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo." *The European Journal of*

- Neuroscience* 19, no. 10 (May 2004): 2839–46. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03389.x.
- Koffie, Robert M, Melanie Meyer-Luehmann, Tadafumi Hashimoto, Kenneth W Adams, Matthew L Mielke, Monica Garcia-Alloza, Kristina D Micheva, et al. “Oligomeric Amyloid Beta Associates with Postsynaptic Densities and Correlates with Excitatory Synapse Loss near Senile Plaques.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 10 (March 10, 2009): 4012–17. doi:10.1073/pnas.0811698106.
- Kok, Eloise H., Teemu Luoto, Satu Haikonen, Sirkka Goebeler, Hannu Haapasalo, and Pekka J. Karhunen. “CLU, CR1 and PICALM Genes Associate with Alzheimer’s-Related Senile Plaques.” *Alzheimer’s Research & Therapy* 3, no. 2 (April 5, 2011): 12. doi:10.1186/alzrt71.
- Kretzschmar, H A, J W Ironside, S J DeArmond, and J Tateishi. “Diagnostic Criteria for Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease.” *Archives of Neurology* 53, no. 9 (September 1996): 913–20.
- Kretzschmar, H A, L E Stowring, D Westaway, W H Stubblebine, S B Prusiner, and S J Dearmond. “Molecular Cloning of a Human Prion Protein cDNA.” *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)* 5, no. 4 (August 1986): 315–24.
- Kudo, Wataru, Hyun-Pil Lee, Wen-Quan Zou, Xinglong Wang, George Perry, Xiongwei Zhu, Mark A Smith, Robert B Petersen, and Hyoung-gon Lee. “Cellular Prion Protein Is Essential for Oligomeric Amyloid-B-Induced Neuronal Cell Death.” *Human Molecular Genetics* 21, no. 5 (March 1, 2012): 1138–44. doi:10.1093/hmg/ddr542.
- Lal, Ashish, Susan R Haynes, and Myriam Gorospe. “Clean Western Blot Signals from Immunoprecipitated Samples.” *Molecular and Cellular Probes* 19, no. 6 (December 2005): 385–88. doi:10.1016/j.mcp.2005.06.007.
- Lambert, M P, A K Barlow, B A Chromy, C Edwards, R Freed, M Liosatos, T E Morgan, et al. “Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from Abeta1-42 Are Potent Central Nervous System Neurotoxins.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 11 (May 26, 1998): 6448–53.
- Landau, Susan M, Christopher Breault, Abhinav D Joshi, Michael Pontecorvo, Chester A Mathis, William J Jagust, Mark A Mintun, and Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative. “Amyloid-B Imaging with Pittsburgh Compound B and Florbetapir: Comparing Radiotracers and Quantification Methods.” *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 54, no. 1 (January 2013): 70–77. doi:10.2967/jnumed.112.109009.
- Larson, Megan, Mathew A Sherman, Fatou Amar, Mario Nuvolone, Julie A Schneider, David A Bennett, Adriano Aguzzi, and Sylvain E Lesné. “The Complex PrP(c)-Fyn Couples Human Oligomeric A $\beta$  with Pathological Tau Changes in Alzheimer’s Disease.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32, no. 47 (November 21, 2012): 16857–16871a. doi:10.1523/JNEUROSCI.1858-12.2012.
- Lasagna-Reeves, Cristian A, Charles G Glabe, and Rakez Kaye. “Amyloid-B Annular Protofibrils Evade Fibrillar Fate in Alzheimer Disease Brain.” *The Journal of Biological Chemistry* 286, no. 25 (June 24, 2011): 22122–30. doi:10.1074/jbc.M111.236257.
- Laurén, Juha. “Cellular Prion Protein as a Therapeutic Target in Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 38, no. 2 (2014): 227–44. doi:10.3233/JAD-130950.
- Laurén, Juha, David A Gimbel, Haakon B Nygaard, John W Gilbert, and Stephen M Strittmatter. “Cellular Prion Protein Mediates Impairment of Synaptic Plasticity by Amyloid-Beta Oligomers.” *Nature* 457, no. 7233 (February 26, 2009): 1128–32. doi:10.1038/nature07761.
- LaVoie, Matthew J, Patrick C Fraering, Beth L Ostaszewski, Wenjuan Ye, W Taylor Kimberly, Michael S Wolfe, and Dennis J Selkoe. “Assembly of the Gamma-Secretase Complex Involves Early Formation of an Intermediate Subcomplex of

- Aph-1 and Nicastrin." *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 39 (September 26, 2003): 37213–22. doi:10.1074/jbc.M303941200.
- Lemere, C A, J K Blusztajn, H Yamaguchi, T Wisniewski, T C Saido, and D J Selkoe. "Sequence of Deposition of Heterogeneous Amyloid Beta-Peptides and APO E in Down Syndrome: Implications for Initial Events in Amyloid Plaque Formation." *Neurobiology of Disease* 3, no. 1 (February 1996): 16–32. doi:10.1006/nbdi.1996.0003.
- Leonard, Brian E. "Inflammation, Depression and Dementia: Are They Connected?" *Neurochemical Research* 32, no. 10 (October 1, 2007): 1749–56. doi:10.1007/s11064-007-9385-y.
- Lesné, S, L Kotilinek, and K H Ashe. "Plaque-Bearing Mice with Reduced Levels of Oligomeric Amyloid-Beta Assemblies Have Intact Memory Function." *Neuroscience* 151, no. 3 (February 6, 2008): 745–49. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.10.054.
- Lesné, Sylvain, Ming Teng Koh, Linda Kotilinek, Rakez Kaye, Charles G Glabe, Austin Yang, Michela Gallagher, and Karen H Ashe. "A Specific Amyloid-Beta Protein Assembly in the Brain Impairs Memory." *Nature* 440, no. 7082 (March 16, 2006): 352–57. doi:10.1038/nature04533.
- Linden, Rafael, Vilma R Martins, Marco A M Prado, Martín Cammarota, Iván Izquierdo, and Ricardo R Brentani. "Physiology of the Prion Protein." *Physiological Reviews* 88, no. 2 (April 2008): 673–728. doi:10.1152/physrev.00007.2007.
- Lue, L F, Y M Kuo, A E Roher, L Brachova, Y Shen, L Sue, T Beach, J H Kurth, R E Rydel, and J Rogers. "Soluble Amyloid Beta Peptide Concentration as a Predictor of Synaptic Change in Alzheimer's Disease." *The American Journal of Pathology* 155, no. 3 (September 1999): 853–62.
- Lund, Christoffer, Christel Moraeus Olsen, Heidi Tveit, and Michael A Tranulis. "Characterization of the Prion Protein 3F4 Epitope and Its Use as a Molecular Tag." *Journal of Neuroscience Methods* 165, no. 2 (September 30, 2007): 183–90. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.06.005.
- Lyubchenko, Yuri L, Bo-Hyun Kim, Alexey V Krasnoslobodtsev, and Junping Yu. "Nanoimaging for Protein Misfolding Diseases." *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2, no. 5 (October 2010): 526–43. doi:10.1002/wnan.102.
- Magdesian, Margaret H, Milena M V F Carvalho, Fabio A Mendes, Leonardo M Saraiva, Maria A Juliano, Luiz Juliano, José Garcia-Abreu, and Sérgio T Ferreira. "Amyloid-Beta Binds to the Extracellular Cysteine-Rich Domain of Frizzled and Inhibits Wnt/beta-Catenin Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 283, no. 14 (April 4, 2008): 9359–68. doi:10.1074/jbc.M707108200.
- Mahley, R W, and S C Rall Jr. "Apolipoprotein E: Far More than a Lipid Transport Protein." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 1 (2000): 507–37. doi:10.1146/annurev.genom.1.1.507.
- Málaga-Trillo, Edward, Gonzalo P Solis, Yvonne Schrock, Corinna Geiss, Lydia Luncz, Venus Thomanetz, and Claudia A O Stuermer. "Regulation of Embryonic Cell Adhesion by the Prion Protein." *PLoS Biology* 7, no. 3 (March 10, 2009): e55. doi:10.1371/journal.pbio.1000055.
- Mangé, Alain, Florence Béranger, Katell Peoc'h, Takashi Onodera, Yveline Frobert, and Sylvain Lehmann. "Alpha- and Beta- Cleavages of the Amino-Terminus of the Cellular Prion Protein." *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 96, no. 2 (March 2004): 125–32. doi:10.1016/j.biolcel.2003.11.007.
- Mangé, Alain, Ollivier Milhavet, David Umlauf, David Harris, and Sylvain Lehmann. "PrP-Dependent Cell Adhesion in N2a Neuroblastoma Cells." *FEBS Letters* 514, no. 2–3 (March 13, 2002): 159–62.
- Masters, C L, G Simms, N A Weinman, G Multhaup, B L McDonald, and K Beyreuther. "Amyloid Plaque Core Protein in Alzheimer Disease and Down

- Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, no. 12 (June 1985): 4245–49.
- Mattson, M P. "Calcium and Neuronal Injury in Alzheimer's Disease. Contributions of Beta-Amyloid Precursor Protein Mismetabolism, Free Radicals, and Metabolic Compromise." *Annals of the New York Academy of Sciences* 747 (December 15, 1994): 50–76.
- Mattson, M P, B Cheng, D Davis, K Bryant, I Lieberburg, and R E Rydel. "Beta-Amyloid Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical Neurons Vulnerable to Excitotoxicity." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 12, no. 2 (February 1992): 376–89.
- McKhann, Guy M, David S Knopman, Howard Chertkow, Bradley T Hyman, Clifford R Jack Jr, Claudia H Kawas, William E Klunk, et al. "The Diagnosis of Dementia due to Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 7, no. 3 (May 2011): 263–69. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- McLean, C A, R A Cherny, F W Fraser, S J Fuller, M J Smith, K Beyreuther, A I Bush, and C L Masters. "Soluble Pool of Abeta Amyloid as a Determinant of Severity of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease." *Annals of Neurology* 46, no. 6 (December 1999): 860–66.
- Meyers, J A, D Sanchez, L P Elwell, and S Falkow. "Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid." *Journal of Bacteriology* 127, no. 3 (September 1976): 1529–37.
- Moreira, Paula I. "High-Sugar Diets, Type 2 Diabetes and Alzheimer's Disease." *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 16, no. 4 (July 2013): 440–45. doi:10.1097/MCO.0b013e328361c7d1.
- Morris, J C, A Heyman, R C Mohs, J P Hughes, G van Belle, G Fillenbaum, E D Mellits, and C Clark. "The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part I. Clinical and Neuropsychological Assessment of Alzheimer's Disease." *Neurology* 39, no. 9 (September 1989): 1159–65.
- Morris, J C, and J L Price. "Pathologic Correlates of Nondemented Aging, Mild Cognitive Impairment, and Early-Stage Alzheimer's Disease." *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 17, no. 2 (October 2001): 101–18.
- . "Pathologic Correlates of Nondemented Aging, Mild Cognitive Impairment, and Early-Stage Alzheimer's Disease." *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 17, no. 2 (October 2001): 101–18.
- Mosconi, Lisa, Valentina Berti, Russell H Swerdlow, Alberto Pupi, Ranjan Duara, and Mony de Leon. "Maternal Transmission of Alzheimer's Disease: Prodromal Metabolic Phenotype and the Search for Genes." *Human Genomics* 4, no. 3 (February 2010): 170–93.
- Mouillet-Richard, S, M Ermonval, C Chebassier, J L Laplanche, S Lehmann, J M Launay, and O Kellermann. "Signal Transduction through Prion Protein." *Science (New York, N.Y.)* 289, no. 5486 (September 15, 2000): 1925–28.
- Mutter, Joachim, Annika Curth, Johannes Naumann, Richard Deth, and Harald Walach. "Does Inorganic Mercury Play a Role in Alzheimer's Disease? A Systematic Review and an Integrated Molecular Mechanism." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 22, no. 2 (2010): 357–74. doi:10.3233/JAD-2010-100705.
- Naiki, H, and F Gejyo. "Kinetic Analysis of Amyloid Fibril Formation." *Methods in Enzymology* 309 (1999): 305–18.
- Näslund, J, V Haroutunian, R Mohs, K L Davis, P Davies, P Greengard, and J D Buxbaum. "Correlation between Elevated Levels of Amyloid Beta-Peptide in the Brain and Cognitive Decline." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 283, no. 12 (March 22, 2000): 1571–77.

- Nelson, Peter T, Irina Alafuzoff, Eileen H Bigio, Constantin Bouras, Heiko Braak, Nigel J Cairns, Rudolph J Castellani, et al. "Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes with Cognitive Status: A Review of the Literature." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71, no. 5 (May 2012): 362–81. doi:10.1097/NEN.0b013e31825018f7.
- Nelson, Peter T, Heiko Braak, and William R Markesbery. "Neuropathology and Cognitive Impairment in Alzheimer Disease: A Complex but Coherent Relationship." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68, no. 1 (January 2009): 1–14. doi:10.1097/NEN.0b013e3181919a48.
- Nieznanski, Krzysztof, Jin-Kyu Choi, Shugui Chen, Krystyna Surewicz, and Witold K Surewicz. "Soluble Prion Protein Inhibits Amyloid-B (A $\beta$ ) Fibrillization and Toxicity." *The Journal of Biological Chemistry* 287, no. 40 (September 28, 2012): 33104–8. doi:10.1074/jbc.C112.400614.
- Noguchi, Akihiko, Satoko Matsumura, Mari Dezawa, Mari Tada, Masako Yanazawa, Akane Ito, Manami Akioka, et al. "Isolation and Characterization of Patient-Derived, Toxic, High Mass Amyloid Beta-Protein (A $\beta$ ) Assembly from Alzheimer Disease Brains." *The Journal of Biological Chemistry* 284, no. 47 (November 20, 2009): 32895–905. doi:10.1074/jbc.M109.000208.
- Ott, A, R P Stolk, A Hofman, F van Harskamp, D E Grobbee, and M M Breteler. "Association of Diabetes Mellitus and Dementia: The Rotterdam Study." *Diabetologia* 39, no. 11 (November 1996): 1392–97.
- Parkin, Edward T, Nicole T Watt, Ishrut Hussain, Elizabeth A Eckman, Christopher B Eckman, Jean C Manson, Herbert N Baybutt, Anthony J Turner, and Nigel M Hooper. "Cellular Prion Protein Regulates Beta-Secretase Cleavage of the Alzheimer's Amyloid Precursor Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, no. 26 (June 26, 2007): 11062–67. doi:10.1073/pnas.0609621104.
- Parkyn, Celia J, Esmeralda G M Vermeulen, Roy C Mootosamy, Claire Sunyach, Christian Jacobsen, Claus Oxvig, Søren Moestrup, et al. "LRP1 Controls Biosynthetic and Endocytic Trafficking of Neuronal Prion Protein." *Journal of Cell Science* 121, no. Pt 6 (March 15, 2008): 773–83. doi:10.1242/jcs.021816.
- Pearson, Hugh A, and Chris Peers. "Physiological Roles for Amyloid Beta Peptides." *The Journal of Physiology* 575, no. Pt 1 (August 15, 2006): 5–10. doi:10.1113/jphysiol.2006.111203.
- Pike, C J, A J Walencewicz, C G Glabe, and C W Cotman. "In Vitro Aging of Beta-Amyloid Protein Causes Peptide Aggregation and Neurotoxicity." *Brain Research* 563, no. 1–2 (November 1, 1991): 311–14.
- Price, J L, D W McKeel Jr, and J C Morris. "Synaptic Loss and Pathological Change in Older Adults--Aging versus Disease?" *Neurobiology of Aging* 22, no. 3 (June 2001): 351–52.
- Price, J L, and J C Morris. "Tangles and Plaques in Nondemented Aging and 'Preclinical' Alzheimer's Disease." *Annals of Neurology* 45, no. 3 (March 1999): 358–68.
- Priller, Christina, Thomas Bauer, Gerda Mitteregger, Bjarne Krebs, Hans A Kretzschmar, and Jochen Herms. "Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, no. 27 (July 5, 2006): 7212–21. doi:10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006.
- Prusiner, S B. "Prions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 23 (November 10, 1998): 13363–83.
- Prusiner, S B, D C Bolton, D F Groth, K A Bowman, S P Cochran, and M P McKinley. "Further Purification and Characterization of Scrapie Prions." *Biochemistry* 21, no. 26 (December 21, 1982): 6942–50.
- Puckett, C, P Concannon, C Casey, and L Hood. "Genomic Structure of the Human Prion Protein Gene." *American Journal of Human Genetics* 49, no. 2 (August 1991): 320–29.

- Puzzo, Daniela, and Ottavio Arancio. "Amyloid-B Peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?" *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 33 Suppl 1 (2013): S111–120. doi:10.3233/JAD-2012-129033.
- Puzzo, Daniela, Lucia Privitera, Elena Leznik, Mauro Fà, Agnieszka Staniszewski, Agostino Palmeri, and Ottavio Arancio. "Picomolar Amyloid-Beta Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28, no. 53 (December 31, 2008): 14537–45. doi:10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008.
- Querfurth, Henry W, and Frank M LaFerla. "Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine* 362, no. 4 (January 28, 2010): 329–44. doi:10.1056/NEJMra0909142.
- Raina, Parminder, Pasqualina Santaguida, Afisi Ismaila, Christopher Patterson, David Cowan, Mitchell Levine, Lynda Booker, and Mark Oremus. "Effectiveness of Cholinesterase Inhibitors and Memantine for Treating Dementia: Evidence Review for a Clinical Practice Guideline." *Annals of Internal Medicine* 148, no. 5 (March 4, 2008): 379–97.
- Rambold, Angelika S, Veronika Müller, Uri Ron, Nir Ben-Tal, Konstanze F Winklhofer, and Jörg Tatzelt. "Stress-Protective Signalling of Prion Protein Is Corrupted by Scrapie Prions." *The EMBO Journal* 27, no. 14 (July 23, 2008): 1974–84. doi:10.1038/emboj.2008.122.
- Ray, I, A Chauhan, H M Wisniewski, J Wegiel, K S Kim, and V P Chauhan. "Binding of Amyloid Beta-Protein to Intracellular Brain Proteins in Rat and Human." *Neurochemical Research* 23, no. 10 (October 1998): 1277–82.
- Renner, Marianne, Pascale N Lacor, Pauline T Velasco, Jian Xu, Anis Contractor, William L Klein, and Antoine Triller. "Deleterious Effects of Amyloid Beta Oligomers Acting as an Extracellular Scaffold for mGluR5." *Neuron* 66, no. 5 (June 10, 2010): 739–54. doi:10.1016/j.neuron.2010.04.029.
- Resenberger, Ulrike K, Anja Harmeier, Andreas C Woerner, Jessica L Goodman, Veronika Müller, Rajaraman Krishnan, R Martin Vabulas, et al. "The Cellular Prion Protein Mediates Neurotoxic Signalling of B-Sheet-Rich Conformers Independent of Prion Replication." *The EMBO Journal* 30, no. 10 (May 18, 2011): 2057–70. doi:10.1038/emboj.2011.86.
- Resenberger, Ulrike K, Konstanze F Winklhofer, and Jörg Tatzelt. "Cellular Prion Protein Mediates Toxic Signaling of Amyloid Beta." *Neuro-Degenerative Diseases* 10, no. 1–4 (2012): 298–300. doi:10.1159/000332596.
- Riek, R, S Hornemann, G Wider, R Glockshuber, and K Wüthrich. "NMR Characterization of the Full-Length Recombinant Murine Prion Protein, mPrP(23-231)." *FEBS Letters* 413, no. 2 (August 18, 1997): 282–88.
- Riemenschneider, M, N Klopp, W Xiang, S Wagenpfeil, C Vollmert, U Müller, H Förstl, T Illig, H Kretschmar, and A Kurz. "Prion Protein Codon 129 Polymorphism and Risk of Alzheimer Disease." *Neurology* 63, no. 2 (July 27, 2004): 364–66.
- Rogaeva, Ekaterina, Yan Meng, Joseph H Lee, Yongjun Gu, Toshitaka Kawarai, Fanggeng Zou, Taiichi Katayama, et al. "The Neuronal Sortilin-Related Receptor SORL1 Is Genetically Associated with Alzheimer Disease." *Nature Genetics* 39, no. 2 (February 2007): 168–77. doi:10.1038/ng1943.
- Roher, A E, J D Lowenson, S Clarke, A S Woods, R J Cotter, E Gowing, and M J Ball. "Beta-Amyloid-(1-42) Is a Major Component of Cerebrovascular Amyloid Deposits: Implications for the Pathology of Alzheimer Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 22 (November 15, 1993): 10836–40.
- Rushworth, Jo V, Heledd H Griffiths, Nicole T Watt, and Nigel M Hooper. "Prion Protein-Mediated Toxicity of Amyloid-B Oligomers Requires Lipid Rafts and the Transmembrane LRP1." *The Journal of Biological Chemistry* 288, no. 13 (March 29, 2013): 8935–51. doi:10.1074/jbc.M112.400358.

- Saijo, Eri, Stephen W Scheff, and Glenn C Telling. "Unaltered Prion Protein Expression in Alzheimer Disease Patients." *Prion* 5, no. 2 (June 2011): 109–16.
- Saiki, R K, D H Gelfand, S Stoffel, S J Scharf, R Higuchi, G T Horn, K B Mullis, and H A Erlich. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase." *Science (New York, N.Y.)* 239, no. 4839 (January 29, 1988): 487–91.
- Sambrook, Joseph. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Schmidt, Vanessa, Anje Sporbert, Michael Rohe, Tatjana Reimer, Armin Rehm, Olav M Andersen, and Thomas E Willnow. "SorLA/LR11 Regulates Processing of Amyloid Precursor Protein via Interaction with Adaptors GGA and PACS-1." *The Journal of Biological Chemistry* 282, no. 45 (November 9, 2007): 32956–64. doi:10.1074/jbc.M705073200.
- Schwarze-Eicker, Katja, Kathy Keyvani, Nicole Görtz, David Westaway, Norbert Sachser, and Werner Paulus. "Prion Protein (PrPc) Promotes Beta-Amyloid Plaque Formation." *Neurobiology of Aging* 26, no. 8 (September 2005): 1177–82. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.10.004.
- Selkoe, D J. "Clearing the Brain's Amyloid Cobwebs." *Neuron* 32, no. 2 (October 25, 2001): 177–80.
- . "The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease." *Neuron* 6, no. 4 (April 1991): 487–98.
- Sepulveda-Falla, Diego, Jakob Matschke, Christian Bernreuther, Christian Hagel, Berta Puig, Andres Villegas, Gloria Garcia, et al. "Deposition of Hyperphosphorylated Tau in Cerebellum of PS1 E280A Alzheimer's Disease." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 21, no. 4 (July 2011): 452–63. doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00469.x.
- Shah, Sanjiv, Sheu-Fen Lee, Katsuhiko Tabuchi, Yi-Heng Hao, Cong Yu, Quincey LaPlant, Haydn Ball, Charles E Dann 3rd, Thomas Südhof, and Gang Yu. "Nicastrin Functions as a Gamma-Secretase-Substrate Receptor." *Cell* 122, no. 3 (August 12, 2005): 435–47. doi:10.1016/j.cell.2005.05.022.
- Shankar, Ganesh M, Brenda L Bloodgood, Matthew Townsend, Dominic M Walsh, Dennis J Selkoe, and Bernardo L Sabatini. "Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid-Beta Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, no. 11 (March 14, 2007): 2866–75. doi:10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007.
- Shankar, Ganesh M, Shaomin Li, Tapan H Mehta, Amaya Garcia-Munoz, Nina E Shepardson, Imelda Smith, Francesca M Brett, et al. "Amyloid-Beta Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer's Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory." *Nature Medicine* 14, no. 8 (August 2008): 837–42. doi:10.1038/nm1782.
- Sim, Valerie L., and Byron Caughey. "Prion Disease Therapy: Trials and Tribulations." In *Protein Misfolding Diseases*, edited by Marina Ramirez-Alvarado, Jeffery W. Kelly, and Christopher M. Dobson, 259–303. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010. <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470572702.ch13>.
- Sinha, S, and I Lieberburg. "Cellular Mechanisms of Beta-Amyloid Production and Secretion." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, no. 20 (September 28, 1999): 11049–53.
- Smith, P K, R I Krohn, G T Hermanson, A K Mallia, F H Gartner, M D Provenzano, E K Fujimoto, N M Goeke, B J Olson, and D C Klenk. "Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid." *Analytical Biochemistry* 150, no. 1 (October 1985): 76–85.
- Snyder, Eric M, Yi Nong, Claudia G Almeida, Surojit Paul, Timothy Moran, Eun Young Choi, Angus C Nairn, et al. "Regulation of NMDA Receptor Trafficking by

- Amyloid-Beta." *Nature Neuroscience* 8, no. 8 (August 2005): 1051–58. doi:10.1038/nn1503.
- "State of Aggregation." *Nature Neuroscience* 14, no. 4 (April 2011): 399. doi:10.1038/nn0411-399.
- Steele, Andrew D, Jason G Emsley, P Hande Ozdinler, Susan Lindquist, and Jeffrey D Macklis. "Prion Protein (PrPc) Positively Regulates Neural Precursor Proliferation during Developmental and Adult Mammalian Neurogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 9 (February 28, 2006): 3416–21. doi:10.1073/pnas.0511290103.
- Strittmatter, Warren J, and Carol Bova Hill. "Molecular Biology of Apolipoprotein E." *Current Opinion in Lipidology* 13, no. 2 (April 2002): 119–23.
- Sunderland, Trey, Gary Linker, Nadeem Mirza, Karen T Putnam, David L Friedman, Lida H Kimmel, Judy Bergeson, et al. "Decreased Beta-amyloid1-42 and Increased Tau Levels in Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer Disease." *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 289, no. 16 (April 23, 2003): 2094–2103. doi:10.1001/jama.289.16.2094.
- Suzuki, Kenichi G N, Takahiro K Fujiwara, Fumiyuki Sanematsu, Ryota Iino, Michael Edidin, and Akihiro Kusumi. "GPI-Anchored Receptor Clusters Transiently Recruit Lyn and G Alpha for Temporary Cluster Immobilization and Lyn Activation: Single-Molecule Tracking Study 1." *The Journal of Cell Biology* 177, no. 4 (May 21, 2007): 717–30. doi:10.1083/jcb.200609174.
- Suzuki, N, T Iwatsubo, A Odaka, Y Ishibashi, C Kitada, and Y Ihara. "High Tissue Content of Soluble Beta 1-40 Is Linked to Cerebral Amyloid Angiopathy." *The American Journal of Pathology* 145, no. 2 (August 1994): 452–60.
- Taylor, David R, Edward T Parkin, Sarah L Cocklin, James R Ault, Alison E Ashcroft, Anthony J Turner, and Nigel M Hooper. "Role of ADAMs in the Ectodomain Shedding and Conformational Conversion of the Prion Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 284, no. 34 (August 21, 2009): 22590–600. doi:10.1074/jbc.M109.032599.
- Terry, R D. "Morphological Changes in Alzheimer's Disease-Senile Dementia: Ultrastructural Changes and Quantitative Studies." *Research Publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* 57 (1979): 99–105.
- Terry, R D, E Masliah, D P Salmon, N Butters, R DeTeresa, R Hill, L A Hansen, and R Katzman. "Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment." *Annals of Neurology* 30, no. 4 (October 1991): 572–80. doi:10.1002/ana.410300410.
- Thies, William, Laura Bleiler, and Alzheimer's Association. "2013 Alzheimer's Disease Facts and Figures." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 9, no. 2 (March 2013): 208–45. doi:10.1016/j.jalz.2013.02.003.
- Thinakaran, G, D R Borchelt, M K Lee, H H Slunt, L Spitzer, G Kim, T Ratovitsky, et al. "Endoproteolysis of Presenilin 1 and Accumulation of Processed Derivatives in Vivo." *Neuron* 17, no. 1 (July 1996): 181–90.
- Thinakaran, Gopal, and Edward H Koo. "Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function." *The Journal of Biological Chemistry* 283, no. 44 (October 31, 2008): 29615–19. doi:10.1074/jbc.R800019200.
- Tomaselli, Simona, Veronica Esposito, Paolo Vangone, Nico A J van Nuland, Alexandre M J J Bonvin, Remo Guerrini, Teodorico Tancredi, Piero A Temussi, and Delia Picone. "The Alpha-to-Beta Conformational Transition of Alzheimer's Abeta-(1-42) Peptide in Aqueous Media Is Reversible: A Step by Step Conformational Analysis Suggests the Location of Beta Conformation Seeding." *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 7, no. 2 (February 2006): 257–67. doi:10.1002/cbic.200500223.
- Towbin, H, T Staehelin, and J Gordon. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some

- Applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, no. 9 (September 1979): 4350–54.
- Tyan, Sheue-Houy, Ann Yu-Jung Shih, Jessica J Walsh, Hiroko Maruyama, Floyd Sarsoza, Lawrence Ku, Simone Eggert, Patrick R Hof, Edward H Koo, and Dara L Dickstein. "Amyloid Precursor Protein (APP) Regulates Synaptic Structure and Function." *Molecular and Cellular Neurosciences* 51, no. 1–2 (August 2012): 43–52. doi:10.1016/j.mcn.2012.07.009.
- Uchihara, T, C Duyckaerts, F Lazarini, K Mokhtari, D Seilhean, P Amouyel, and J J Hauw. "Inconstant Apolipoprotein E (ApoE)-like Immunoreactivity in Amyloid Beta Protein Deposits: Relationship with APOE Genotype in Aging Brain and Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica* 92, no. 2 (August 1996): 180–85.
- Um, Ji Won, Haakon B Nygaard, Jacqueline K Heiss, Mikhail A Kostylev, Massimiliano Stagi, Alexander Vortmeyer, Thomas Wisniewski, Erik C Gunther, and Stephen M Strittmatter. "Alzheimer Amyloid-B Oligomer Bound to Postsynaptic Prion Protein Activates Fyn to Impair Neurons." *Nature Neuroscience* 15, no. 9 (September 2012): 1227–35. doi:10.1038/nn.3178.
- Uversky, Vladimir N. "Intrinsic Disorder in Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14 (2009): 5188–5238.
- Vassar, R, B D Bennett, S Babu-Khan, S Kahn, E A Mendiaz, P Denis, D B Teplow, et al. "Beta-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE." *Science (New York, N.Y.)* 286, no. 5440 (October 22, 1999): 735–41.
- Vassar, Robert. "Beta-Secretase, APP and Abeta in Alzheimer's Disease." *Subcellular Biochemistry* 38 (2005): 79–103.
- Vincent, B, E Paitel, P Saftig, Y Frobert, D Hartmann, B De Strooper, J Grassi, E Lopez-Perez, and F Checler. "The Disintegrins ADAM10 and TACE Contribute to the Constitutive and Phorbol Ester-Regulated Normal Cleavage of the Cellular Prion Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 276, no. 41 (October 12, 2001): 37743–46. doi:10.1074/jbc.M105677200.
- Voigtländer, T, S Klöppel, P Birner, C Jarius, H Flicker, S Verghese-Nikolakaki, T Sklaviadis, M Guentchev, and H Budka. "Marked Increase of Neuronal Prion Protein Immunoreactivity in Alzheimer's Disease and Human Prion Diseases." *Acta Neuropathologica* 101, no. 5 (May 2001): 417–23.
- Walsh, D M, D M Hartley, Y Kusumoto, Y Fezoui, M M Condron, A Lomakin, G B Benedek, D J Selkoe, and D B Teplow. "Amyloid Beta-Protein Fibrillogenesis. Structure and Biological Activity of Protofibrillar Intermediates." *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 36 (September 3, 1999): 25945–52.
- Walsh, Dominic M, Igor Klyubin, Julia V Fadeeva, William K Cullen, Roger Anwyl, Michael S Wolfe, Michael J Rowan, and Dennis J Selkoe. "Naturally Secreted Oligomers of Amyloid Beta Protein Potently Inhibit Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo." *Nature* 416, no. 6880 (April 4, 2002): 535–39. doi:10.1038/416535a.
- Wang, Hai-Wei, Joseph F Pasternak, Helen Kuo, Helen Ristic, Mary P Lambert, Brett Chromy, Kirsten L Viola, et al. "Soluble Oligomers of Beta Amyloid (1-42) Inhibit Long-Term Potentiation but Not Long-Term Depression in Rat Dentate Gyrus." *Brain Research* 924, no. 2 (January 11, 2002): 133–40.
- Wang, J, D W Dickson, J Q Trojanowski, and V M Lee. "The Levels of Soluble versus Insoluble Brain Abeta Distinguish Alzheimer's Disease from Normal and Pathologic Aging." *Experimental Neurology* 158, no. 2 (August 1999): 328–37. doi:10.1006/exnr.1999.7085.
- Ward, R V, K H Jennings, R Jepras, W Neville, D E Owen, J Hawkins, G Christie, et al. "Fractionation and Characterization of Oligomeric, Protofibrillar and Fibrillar Forms of Beta-Amyloid Peptide." *The Biochemical Journal* 348 Pt 1 (May 15, 2000): 137–44.

- Watson, A A, D P Fairlie, and D J Craik. "Solution Structure of Methionine-Oxidized Amyloid Beta-Peptide (1-40). Does Oxidation Affect Conformational Switching?" *Biochemistry* 37, no. 37 (September 15, 1998): 12700–706. doi:10.1021/bi9810757.
- Weidemann, A, G König, D Bunke, P Fischer, J M Salbaum, C L Masters, and K Beyreuther. "Identification, Biogenesis, and Localization of Precursors of Alzheimer's Disease A4 Amyloid Protein." *Cell* 57, no. 1 (April 7, 1989): 115–26.
- Weinreb, Paul H., Joseph T. Jarrett, and P. T. Lansbury. "Peptide Models of a Hydrophobic Cluster at the C-Terminus of the .beta.-Amyloid Protein." *Journal of the American Chemical Society* 116, no. 23 (November 1, 1994): 10835–36. doi:10.1021/ja00102a079.
- Welander, Hedvig, Jenny Frånberg, Caroline Graff, Erik Sundström, Bengt Winblad, and Lars O Tjernberg. "Abeta43 Is More Frequent than Abeta40 in Amyloid Plaque Cores from Alzheimer Disease Brains." *Journal of Neurochemistry* 110, no. 2 (July 2009): 697–706. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06170.x.
- Westaway, David, and Jack H Jhamandas. "The P's and Q's of Cellular PrP-A $\beta$  Interactions." *Prion* 6, no. 4 (October 2012): 359–63. doi:10.4161/pri.20675.
- Wiechelmann, K J, R D Braun, and J D Fitzpatrick. "Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation." *Analytical Biochemistry* 175, no. 1 (November 15, 1988): 231–37.
- Willnow, Thomas E, and Olav M Andersen. "Sorting Receptor SORLA--a Trafficking Path to Avoid Alzheimer Disease." *Journal of Cell Science* 126, no. Pt 13 (July 1, 2013): 2751–60. doi:10.1242/jcs.125393.
- Wilquet, Valérie, and Bart De Strooper. "Amyloid-Beta Precursor Protein Processing in Neurodegeneration." *Current Opinion in Neurobiology* 14, no. 5 (October 2004): 582–88. doi:10.1016/j.conb.2004.08.001.
- Wisniewski, T., E. M. Castano, A. Golabek, T. Vogel, and B. Frangione. "Acceleration of Alzheimer's Fibril Formation by Apolipoprotein E in Vitro." *The American Journal of Pathology* 145, no. 5 (November 1994): 1030–35.
- Wu, Jessica W, Leonid Breydo, J Mario Isas, Jerome Lee, Yuri G Kuznetsov, Ralf Langen, and Charles Glabe. "Fibrillar Oligomers Nucleate the Oligomerization of Monomeric Amyloid Beta but Do Not Seed Fibril Formation." *The Journal of Biological Chemistry* 285, no. 9 (February 26, 2010): 6071–79. doi:10.1074/jbc.M109.069542.
- Yamamoto, Naoki, Etsuro Matsubara, Sumihiro Maeda, Hirohisa Minagawa, Akihiko Takashima, Wakako Maruyama, Makoto Michikawa, and Katsuhiko Yanagisawa. "A Ganglioside-Induced Toxic Soluble Abeta Assembly. Its Enhanced Formation from Abeta Bearing the Arctic Mutation." *The Journal of Biological Chemistry* 282, no. 4 (January 26, 2007): 2646–55. doi:10.1074/jbc.M606202200.
- Yang, Kai, Jillian Belrose, Catherine H Trepanier, Gang Lei, Michael F Jackson, and John F MacDonald. "Fyn, a Potential Target for Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 27, no. 2 (2011): 243–52. doi:10.3233/JAD-2011-110353.
- Yatin, S M, M Aksenova, M Aksenov, W R Markesbery, T Aulick, and D A Butterfield. "Temporal Relations among Amyloid Beta-Peptide-Induced Free-Radical Oxidative Stress, Neuronal Toxicity, and Neuronal Defensive Responses." *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 11, no. 3 (December 1998): 183–97. doi:10.1385/JMN:11:3:183.
- You, Haitao, Shigeki Tsutsui, Shahid Hameed, Thomas J Kannanayakal, Lina Chen, Peng Xia, Jordan D T Engbers, Stuart A Lipton, Peter K Stys, and Gerald W Zamponi. "A $\beta$  Neurotoxicity Depends on Interactions between Copper Ions, Prion Protein, and N-Methyl-D-Aspartate Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, no. 5 (January 31, 2012): 1737–42. doi:10.1073/pnas.1110789109.
- Younan, Nadine D, Claire J Sarell, Paul Davies, David R Brown, and John H Viles. "The Cellular Prion Protein Traps Alzheimer's A $\beta$  in an Oligomeric Form and

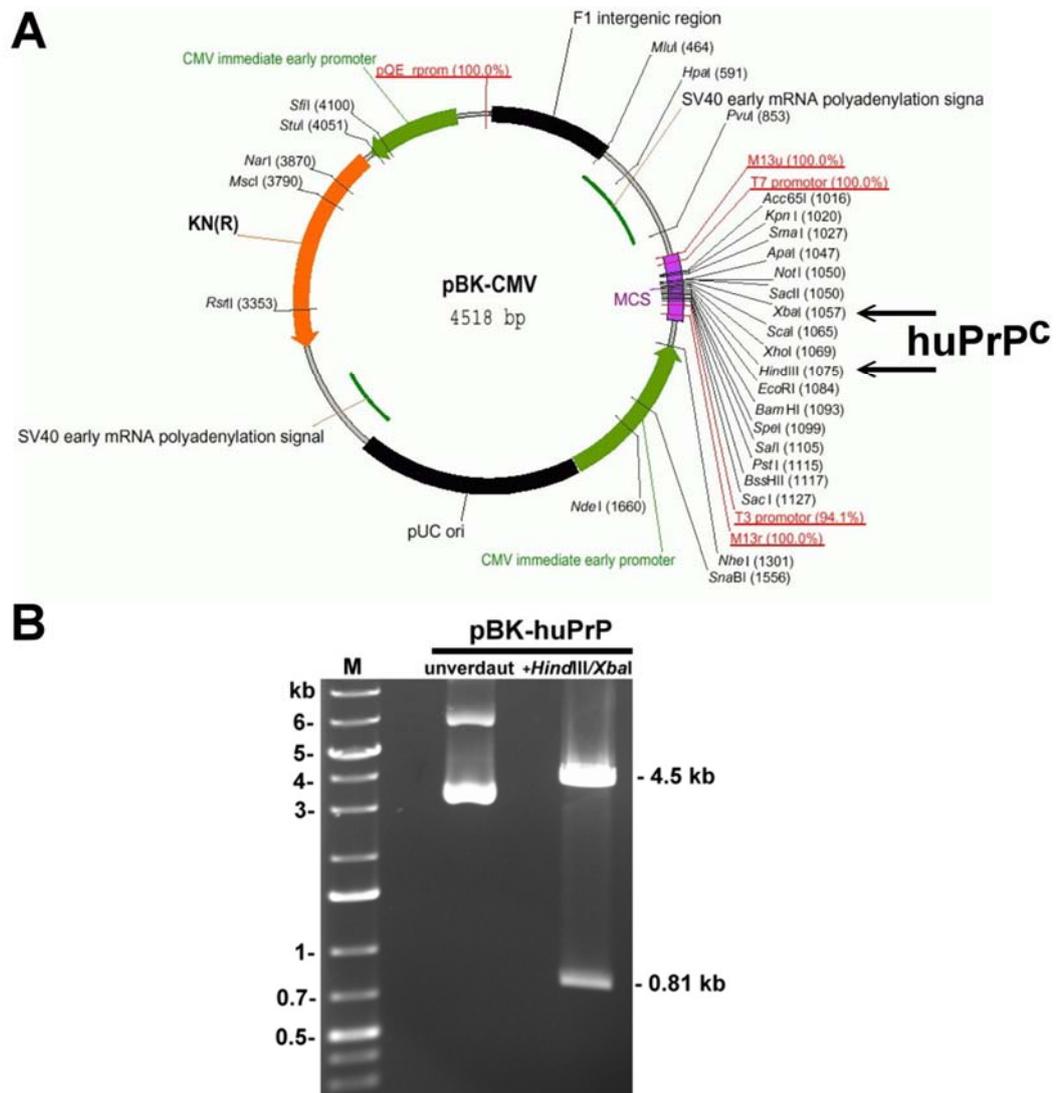
- Disassembles Amyloid Fibers." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, no. 5 (May 2013): 1847–58. doi:10.1096/fj.12-222588.
- Yu, Liping, Rohinton Edalji, John E Harlan, Thomas F Holzman, Ana Pereda Lopez, Boris Labkovsky, Heinz Hillen, et al. "Structural Characterization of a Soluble Amyloid Beta-Peptide Oligomer." *Biochemistry* 48, no. 9 (March 10, 2009): 1870–77. doi:10.1021/bi802046n.
- Yu, Xiang, and Jie Zheng. "Polymorphic Structures of Alzheimer's B-Amyloid Globulomers." *PLoS One* 6, no. 6 (2011): e20575. doi:10.1371/journal.pone.0020575.
- Zahs, Kathleen R, and Karen H Ashe. "B-Amyloid Oligomers in Aging and Alzheimer's Disease." *Frontiers in Aging Neuroscience* 5 (2013): 28. doi:10.3389/fnagi.2013.00028.
- Zhao, Wei-Qin, Fernanda G De Felice, Sara Fernandez, Hui Chen, Mary P Lambert, Michael J Quon, Grant A Krafft, and William L Klein. "Amyloid Beta Oligomers Induce Impairment of Neuronal Insulin Receptors." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22, no. 1 (January 2008): 246–60. doi:10.1096/fj.06-7703com.
- Zou, Wen-Quan, Xiangzhu Xiao, Jue Yuan, Gianfranco Puoti, Hisashi Fujioka, Xinglong Wang, Sandy Richardson, et al. "Amyloid-beta42 Interacts Mainly with Insoluble Prion Protein in the Alzheimer Brain." *The Journal of Biological Chemistry* 286, no. 17 (April 29, 2011): 15095–105. doi:10.1074/jbc.M110.199356.
- Zou, Wen-Quan, Xiaochen Zhou, Jue Yuan, and Xiangzhu Xiao. "Insoluble Cellular Prion Protein and Its Association with Prion and Alzheimer Diseases." *Prion* 5, no. 3 (September 2011): 172–78. doi:10.4161/pri.5.3.16894.

## **VII. Anhang**

Übersicht zu den im Anhang befindlichen Abbildungen:

- VII.I**            **Isolierung humaner PrP<sup>C</sup>-cDNA aus pBK-CMV.**
  
- VII.II**           **Histologie der Patientenkohorte.**
  
- VII.III**          **Normierung der sA $\beta$ 42o-Fraktionen im APIA.**
  
- VII.IV**          **Einfluss von Einfrier-/ Abtauzyklen auf die Interaktion.**
  
- VII.V**            **Co-Immunopräzipitation mit 3F4 von S2-Fraktionen.**

## VII.I Isolierung humaner PrP<sup>C</sup>-cDNA aus pBK-CMV



**Abb. VII.I:** Isolierung humaner PrP<sup>C</sup>-cDNA aus pBK-CMV.

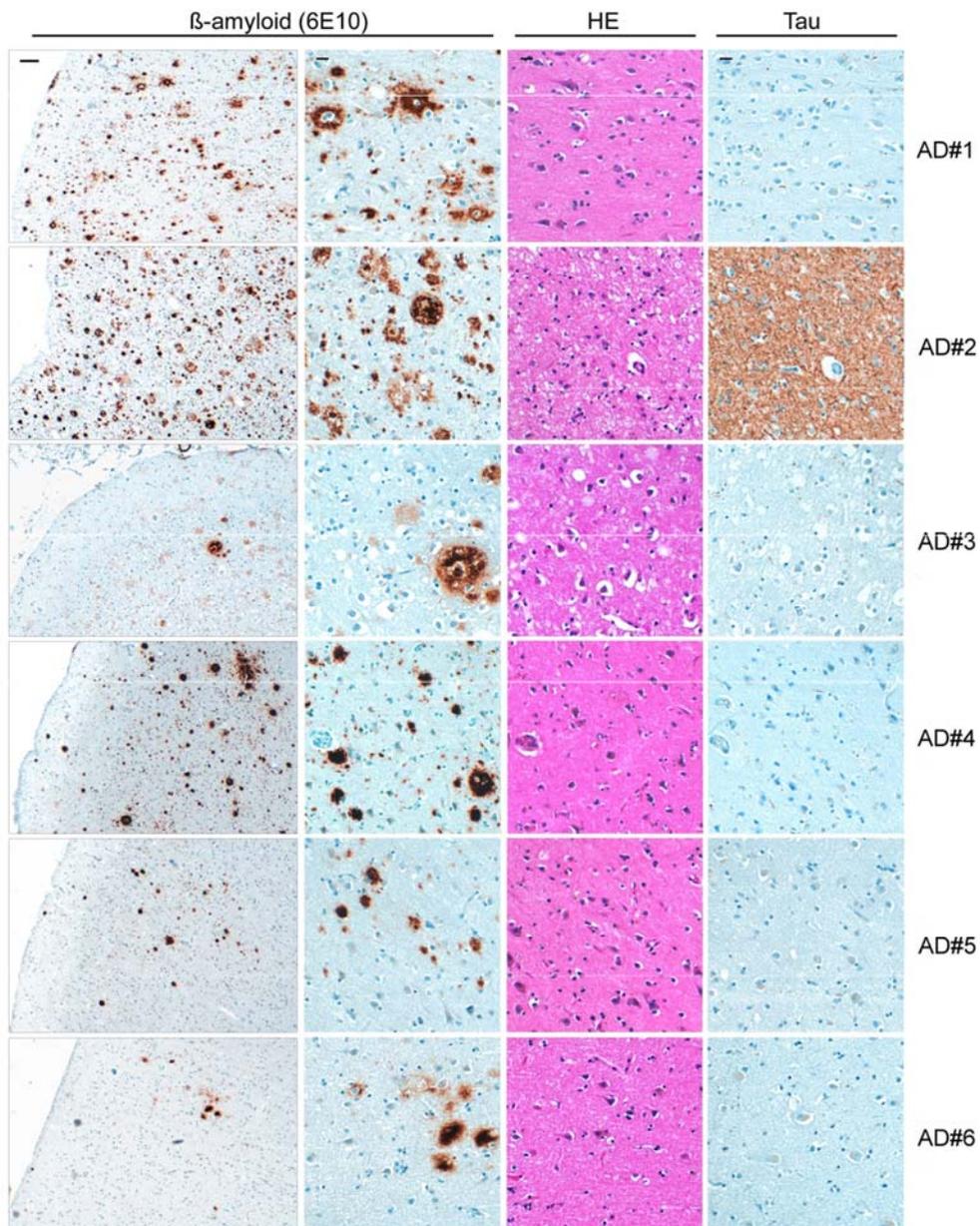
PrP<sup>C</sup>-cDNA lag kloniert im pBK-CMK Klonierungsvektor (Stratagene) vor und konnte durch *XbaI*/*HindIII*-Doppelverdau ausgeschnitten werden. **A** Aufbau des pBK-CMK Klonierungsvektor. Schwarze Pfeile zeigen die Schnittstellen für *XbaI* und *HindIII* in der MCS (*multiple cloning site*) des Vektors. **B** Ergebnis des Doppelverdaus. Es zeigen sich die erwarteten Banden bei ~0,8 kb (huPrP<sup>C</sup>) und 4,5 kb (Vektor-backbone). M= DNA-Größenstandard.

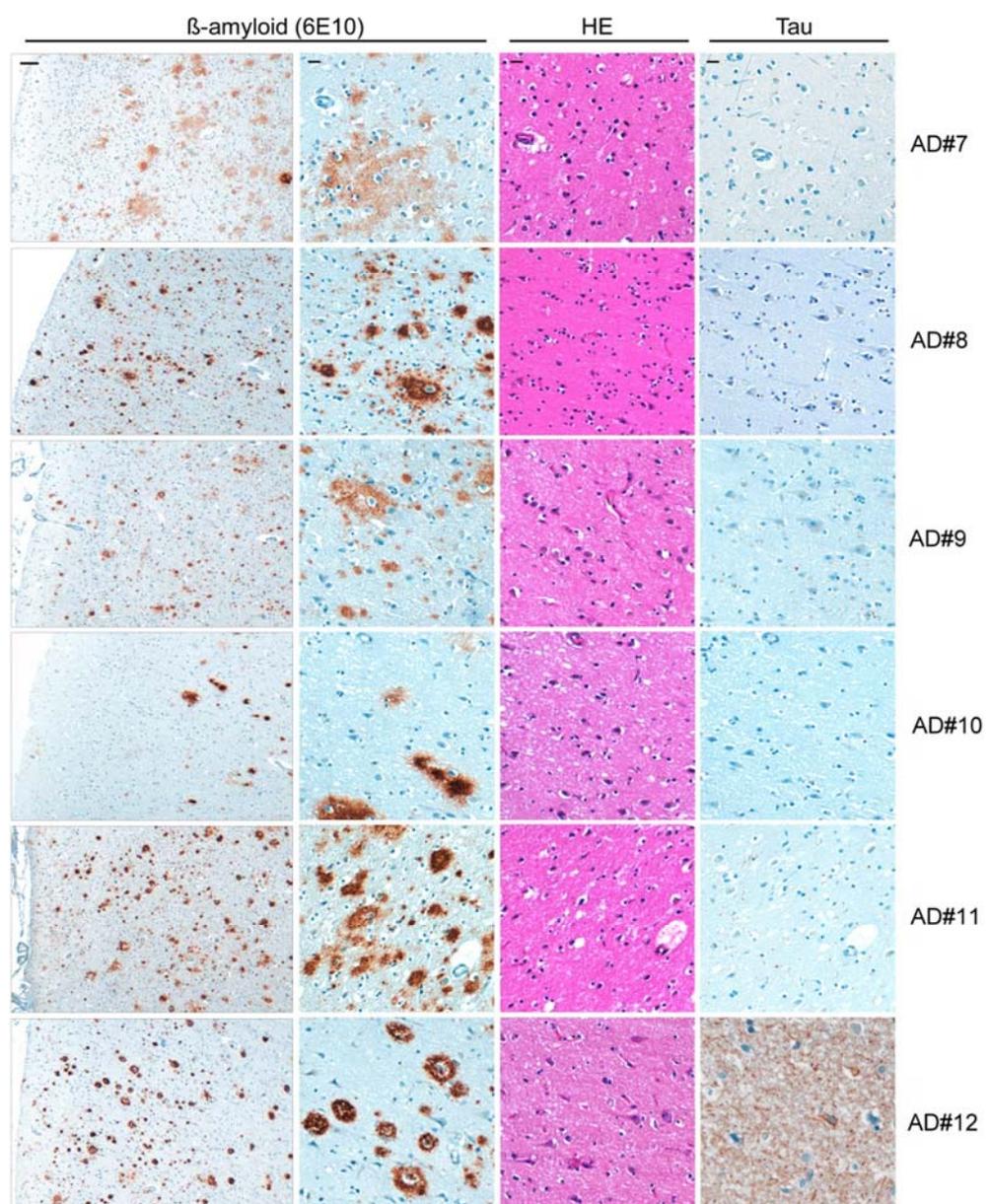
Banden bei 0,8 kb (huPrP<sup>C</sup>) wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Wizard<sup>®</sup> PCR DNA Clean Up Kit (Promega) aufgereinigt. Die isolierte huPrP<sup>C</sup>-DNA wurde durch Sequenzierung (MWG Operon, Ebersberg) bestätigt.

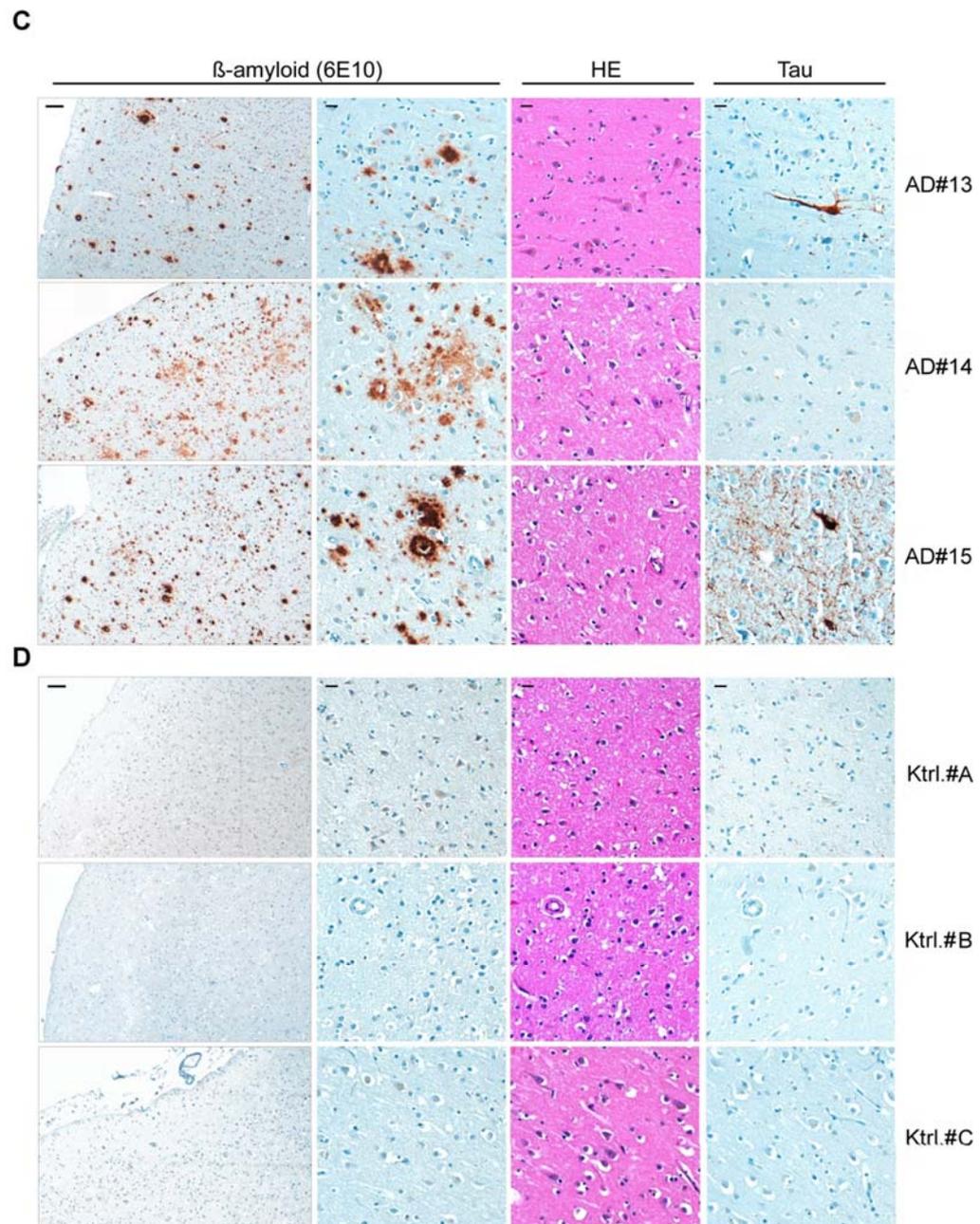
## VII.II Histologie der Patientenkohorte

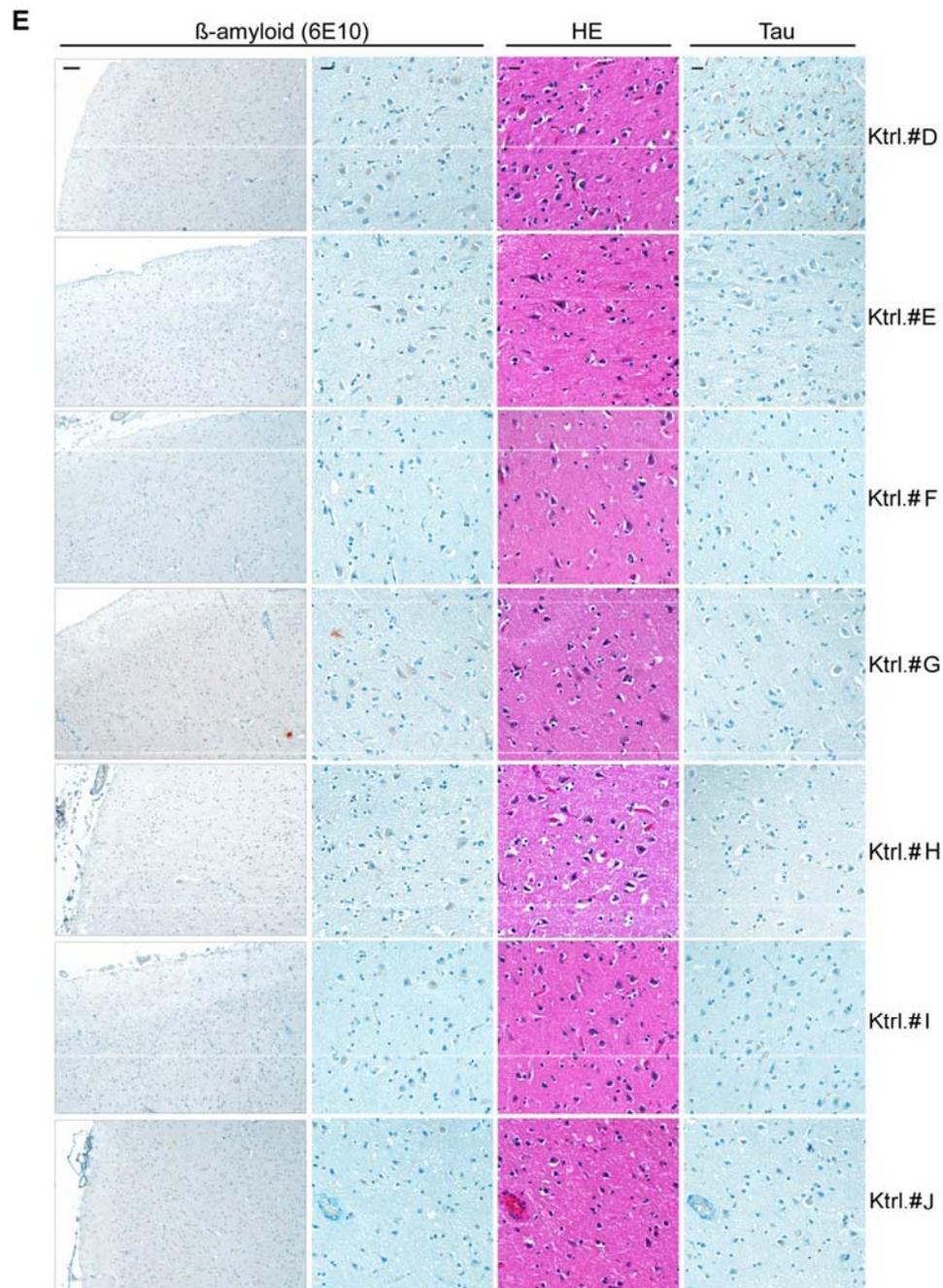
Zur Bestätigung der klinischen Diagnose wurden die in der Interaktionsstudie verwendeten Alzheimer- und Kontrollpatienten histologisch untersucht und bewertet. Zur postmortalen Diagnosestellung der Alzheimer-Erkrankung wurden spezifische Antikörper gegen Amyloid-Ablagerungen und abnorm phosphoryliertes Tau verwendet. Alzheimer-Patienten wurden aufgrund der vorliegenden Plaque-Morphologie in Gruppen mit neuritischen, diffusen oder gemischten Plaques aufgeteilt.

**A**



**B**

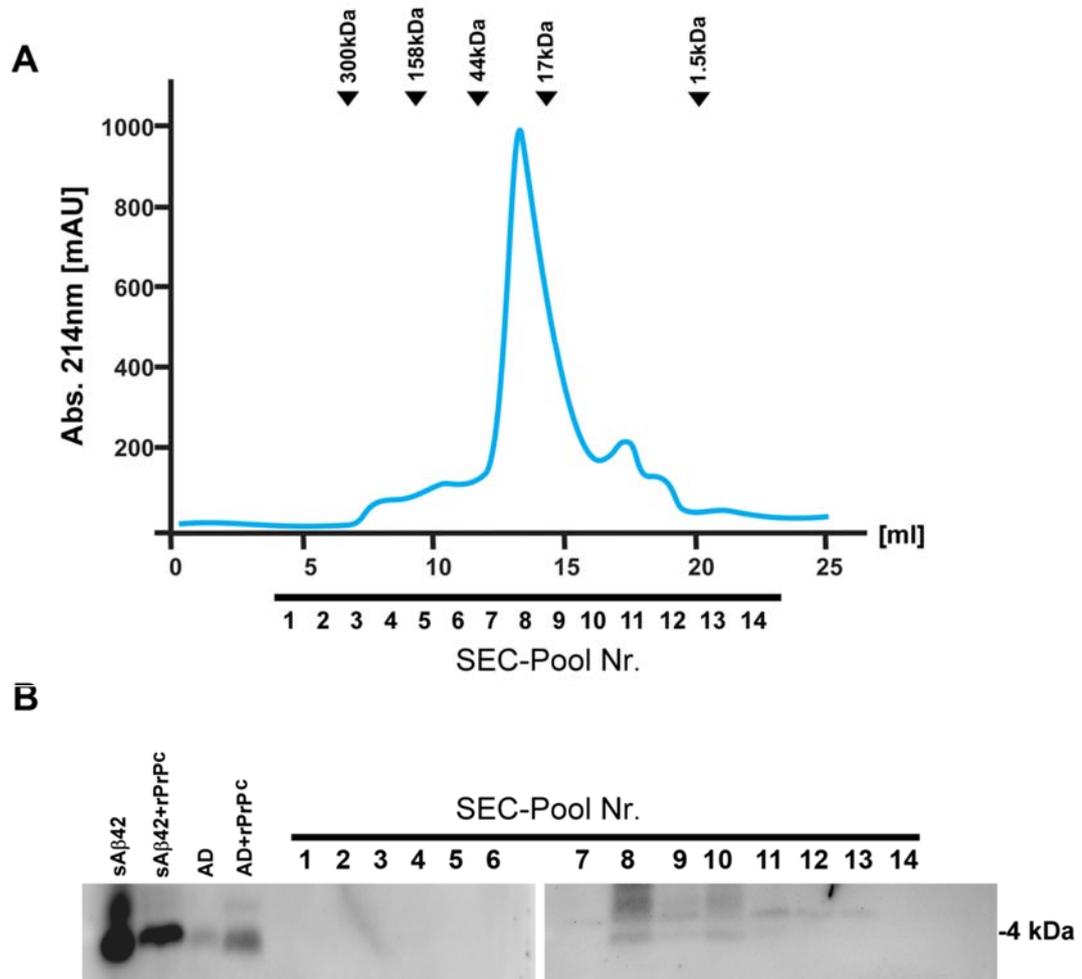




**Abb. VII.II: Histologie der Patientenkohorte.**

Frontaler Kortex von 15 Alzheimer (AD)- und 10 Kontrollpatienten (Ktrl.) wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE), dem  $A\beta$ -spezifischen Antikörper 6E10 und einem Antikörper gegen Tau angefärbt. **A bis C** Die 15 Alzheimer Fälle zeigen in der Immunhistochemie die für die Erkrankung charakteristischen Amyloid-Plaques sowie hyperphosphoryliertes Tau der neurofibrilliären Bündel. **D bis E** Bei Kontrollpatienten finden sich nur vereinzelt, sehr schwach ausgeprägte Amyloid-Ablagerungen und Signale von hyperphosphoryliertem Tau. Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m.  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen werden zur Übersicht in 10facher Vergrößerung dargestellt. Die detaillierte Darstellung der Plaque-Morphologie bei 20facher Vergrößerung. HE und Tau ist ebenso bei 20facher Vergrößerung dargestellt

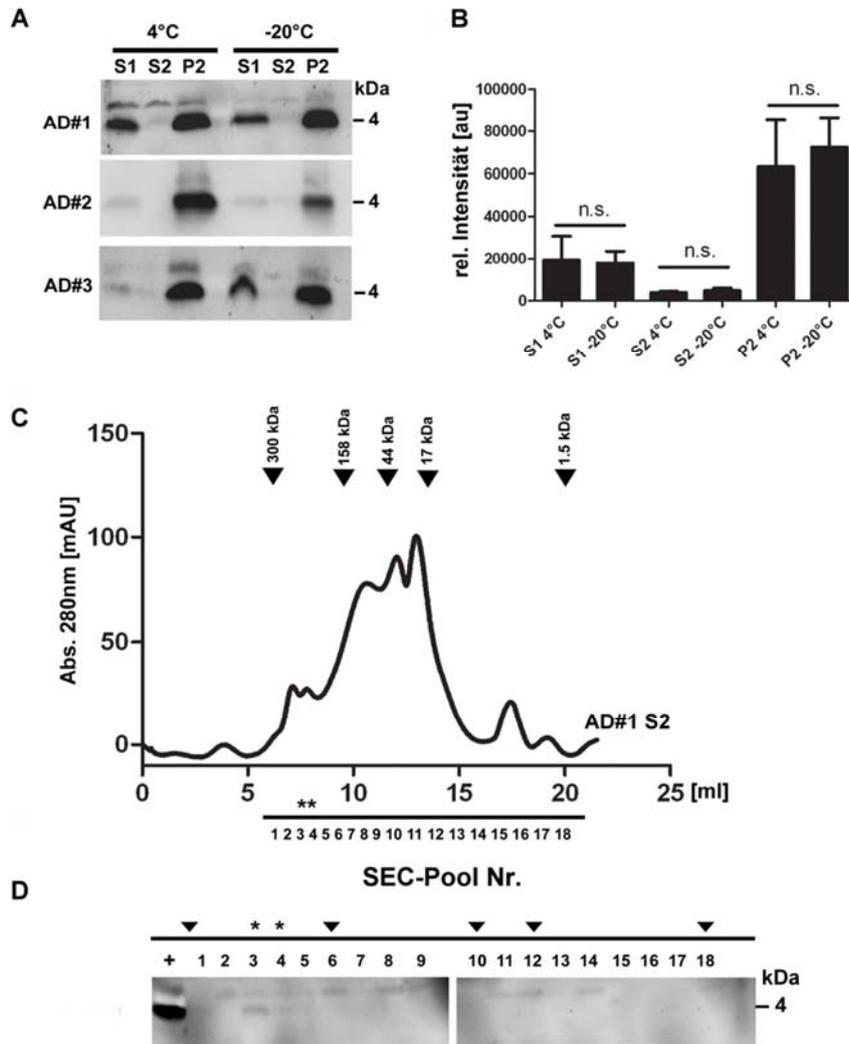
### VII.III Normierung der sA $\beta$ 42o-Fractionen im APIA



**Abb. VII.III: Normierung eluierter sA $\beta$ 42o-Fractionen.**

Nach Gelfiltration wurden die eluierten Peptide auf die niedrigste A $\beta$ -Konzentration in den zu testenden Fraktionen durch Verdünnungen angeglichen und via APIA getestet. **A** Chromatogramm von sA $\beta$ 42o. **B** APIA zeigt auch nach Verdünnung der A $\beta$ - Fraktionen, dass die beste Bindung an rPrP<sup>C</sup> von Oligomeren mit einem Mw von 8 bis ~21 kDa ausgeht.

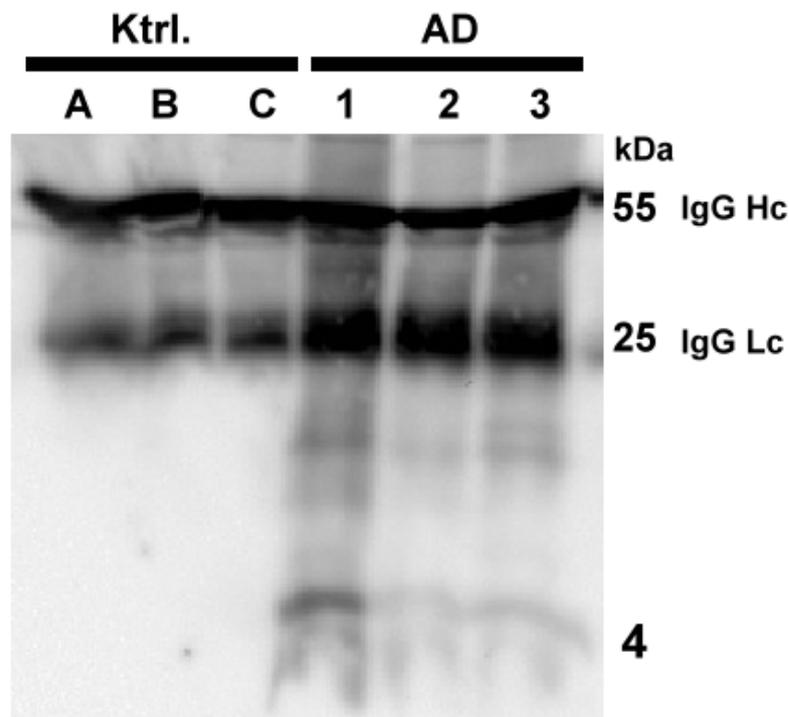
## VII.IV Einfluss von Einfrier-/ Abtauzyklen auf die Interaktion



**Abb. VII.IV: Der Einfluss von Einfrier-/ Abtauzyklen auf die Interaktion.**

Homogenate des frontalen Kortex von drei Alzheimer-Patienten (AD) wurden in Lysepuffer angefertigt. Die S1-Fractionen wurden in zwei Teile aufgeteilt. Ein Teil wurde auf Eis inkubiert, die andere Hälfte mehreren Einfrier-/ Abtauzyklen unterzogen. Danach wurden beide Präparationen zur Gewinnung der S2- und P2-Fractionen gleich weiterbehandelt und via APIA getestet. **A** Ergebnis der Western-Blot-Analyse durch 6E10 für beide Gruppen der drei Alzheimer-Proben. **B** Densitometrische Quantifizierung der 4 kDa Bande zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied der Bindekapazität durch die unterschiedliche Vorbehandlung gibt. **C** Chromatogramm der Gelfiltration einer S2-Fraktion, die mehrfach Einfrier-/ Abtauzyklen erfahren hat. **D** Eluierte Proteinfractionen wurden via APIA getestet. Es zeigt sich eine Interaktion von PrP<sup>C</sup> mit HMW<sub>o</sub> >158 kDa.

## VII.V Co-Immunopräzipitation mit 3F4 von S2-Fractionen



**Abb. VII.V: Co-IP Experimente mit 3F4 in S2-Fractionen.**

S2-Homogenatfraktionen des frontalen Kortex von drei Kontrollen (Ktrl.) und drei Alzheimer-Patienten (AD) wurden in einer Co-IP mit dem Prion-spezifischen AK 3F4 getestet. Nur die Alzheimer Patienten zeigen die für die Interaktion spezifische Bande bei einer Größe von 4 kDa. IgG Hc (*immunoglobulin heavy chain*; schwere Proteinkette des Immunoglobulins), IgG Lc (*immunoglobulin light chain*, leichte Proteinkette des Immunoglobulins).

**Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation  
mit dem Titel:**

**„Die Interaktion zwischen zellulärem Prion-Protein und  $\beta$ -Amyloid Oligomeren in der  
Alzheimer-Erkrankung“**

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift