

Die neuroprotektive Rolle des exosomalen Prion-Proteins im Kontext der Alzheimer Erkrankung

Dissertationsschrift zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

im Fachbereich Biologie

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität

Hamburg

vorgelegt von

M.Sc. Alexander Hartmann

aus Berlin

Hamburg, 13.12.2019

Vorsitz der Prüfungskommission:

PD Dr. Hartwig Lüthen

Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Julia Kehr

Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg

2. Prof. Dr. Markus Glatzel

Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Tag der Disputation:

22.05.2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
1. Einleitung	7
1.1 Die Alzheimer-Erkrankung	7
1.1.1 Historie der Alzheimer-Erkrankung.....	7
1.1.2 Prävalenz, Epidemiologie und Ätiologie der Alzheimer-Erkrankung	8
1.1.3 Neuropathologie der Alzheimer-Erkrankung.....	10
1.1.4 Therapie der Alzheimer-Erkrankung.....	11
1.2 Amyloid-beta	11
1.2.1 Amyloid-Vorläuferprotein	11
1.2.2 APP-Prozessierung	12
1.2.3 Amyloid-beta ₁₋₄₂	13
1.2.4 molekulare Mechanismen der A β ₁₋₄₂ -Neurotoxizität	14
1.3 Das zelluläre Prion-Protein (PrP^C)	16
1.3.1 Struktur und Funktion.....	16
1.3.2 PrP ^C in der Alzheimer-Erkrankung.....	17
1.4 Exosomen	18
1.4.1 Biogenese und Definition von Exosomen.....	18
1.4.2 Die Rolle von Exosomen in neurodegenerativen Erkrankungen	20
1.5 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Laborgeräte und Materialien	25
2.1.1 Laborgeräte.....	25
2.1.2 Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Chemikalien und Enzyme.....	28
2.1.4 Antikörper und Farbstoffe.....	28
2.1.5 Kits.....	30
2.1.6 Agentien	30
2.1.7 Software	31
2.2. Zellbiologische Methoden	31
2.2.1 Zelllinien.....	31
2.2.2 Nährmedien	32
2.2.3 Subkultivierung eukaryontischer Zellen	32

2.2.4 Zellzahlbestimmung.....	32
2.2.5 Kryokonservierung und Aussaat eukaryontischer Zellen.....	32
2.2.6 Isolation von Exosomen.....	33
2.2.7 Nanopartikel-tracking-Analyse	35
2.2.8 Bildgebende Durchflusszytometrie	35
2.2.9 Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	36
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	37
2.3.1 Proteinisolierung.....	37
2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	37
2.3.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
2.3.4 SDS-PAGE in 4 – 12%igen Bis-Tris-Gradientengelen.....	39
2.3.5 Western-Blot	40
2.3.6 Präparation des synthetischen A β ₁₋₄₂ (sA β ₁₋₄₂) -Peptide.....	41
2.3.7 sA β ₁₋₄₂ -Exosomen-Bindungsassay.....	42
2.3.8 Größenaufschlusschromatographie (SEC).....	42
2.3.9 ATR-FTIR	42
2.3.10 Small angle X-ray scattering (SAXS).....	43
2.3.11 MALDI-TOF.....	44
2.4 Fotochemische Funktionalisierung von Exosomen.....	44
2.4.1 Funktionalisierung von Exosomen	44
2.4.2 Exosomen-uptake-Assay	45
2.5 Tierversuche.....	46
2.5.1 stereotaktische Injektion.....	46
2.5.2 Immunhistochemie von Hirngewebe.....	46
3. Ergebnisse	48
3.1 Über die molekularen Funktionen des ePrP^c in der Alzheimer-Erkrankung.....	48
3.1.1 Die Rolle des Exosomen-A β ₁₋₄₂ -Komplexes <i>in vivo</i>	49
3.1.2 Die Rolle des Exosomen-A β ₁₋₄₂ -Komplexes im CSF von Patienten unterschiedlicher AD-Risikogruppen.....	55
3.2 Der Einfluss des ePrP^c auf die Aβ₁₋₄₂-Aggregationskinetik.....	60
3.2.1 Die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂	60
3.2.2 Der Einfluss von ePrP ^c auf die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂	65
3.3 Etablierung eines fotochemischen Membranlabels auf Exosomen	71
3.3.1 Entwicklung des Färbeprotokolls für den R87-Membranfarbstoff.....	72
3.3.2 Fotochemische Verankerung des R87-Membranfarbstoffs.....	75

3.3.3 Optimierung des Färbeprotokolls	77
3.3.4 Etablierung des R87-Membranfarbstoffs.....	79
4. Diskussion	83
4.1 Die Rolle des Exosomen-Aβ₁₋₄₂-Komplexes <i>in vivo</i>.....	83
4.2 Die Rolle des Exosomen-Aβ₁₋₄₂-Komplexes im CSF von Patienten unterschiedlicher AD-Risikogruppen.....	85
4.3 Der Einfluss des ePrP^c auf die Aβ₁₋₄₂-Aggregationskinetik.....	86
4.4 Etablierung eines fotochemischen Membranlabels auf Exosomen	88
Literaturverzeichnis.....	91
Abkürzungsverzeichnis.....	100
Abbildungsverzeichnis	101
Tabellenverzeichnis	103
Danksagung	104
Eidesstaatliche Erklärung	105

Zusammenfassung

In der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung (AD) spielt Amyloid-beta₁₋₄₂ (A β ₁₋₄₂) eine zentrale Rolle. Es gilt als eines der neuropathologischen Hauptmerkmale der AD und ist Hauptbestandteil der Amyloid-Plaques. Des Weiteren zeigen bestimmte Aggregations-Intermediate von A β ₁₋₄₂ neurotoxische Eigenschaften vermittelt durch die Bindung an das Prion-Protein (PrP^C). PrP^C wird auf der Membran von Exosomen verstärkt exprimiert. Dort ist es in der Lage mit A β ₁₋₄₂ zu interagieren und einen Komplex zu bilden.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Analyse der Rolle des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes in der Pathogenese der AD. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex *in vivo* im Gehirn von Mäusen zu einer Rekrutierung von Mikroglia-Zellen führt. Diese führen zu einer gesteigerten Degradation des Komplexes. Der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex ließ sich des Weiteren in humanen Liquor-Proben von Patienten verschiedener AD-Risikogruppen nachweisen, wobei sich keine direkte Korrelation der Menge des im Liquor nachgewiesenen Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes mit dem Verlauf der AD-Pathogenese darstellte. Die Menge an Exosomen nimmt im Liquor mit fortschreitendem AD-Krankheitsverlauf tendenziell ab. Begründet könnte dies durch eine reduzierte Drainage von A β ₁₋₄₂ aus dem Gehirn im Verlauf der AD-Pathogenese sein, welches Ablagerung von A β ₁₋₄₂ im Gehirn fördern würde.

Das exosomale Prion-Protein (ePrP^C) ist maßgeblich an der Bildung des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes beteiligt. Mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuungs-Messungen und ATR-Infrarotspektroskopie konnte gezeigt werden, dass ePrP^C einen direkten Einfluss auf die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂ hat. Es fördert die Bildung von Amyloid-Fibrillen in β -Faltblatt-Strukturen über spezifische A β -Aggregations-Intermediate. Exosomen ohne ePrP^C zeigten keine vergleichbare Einflussnahme auf die A β ₁₋₄₂-Aggregationskinetik. Um ein gezieltes Tracking des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes in biologischen Systemen zu ermöglichen wurde in Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur longitudinal stabilen Funktionalisierung von Exosomen etabliert.

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Erkrankung

Aufgrund des demografischen Wandels in unserer modernen Gesellschaft erhöht sich die Inzidenz neurodegenerativer Erkrankungen vor allem in den älteren Bevölkerungsschichten ¹. Zu den neurodegenerativen Erkrankungen gehören beispielsweise die Alzheimer-Erkrankung (AD = *engl.: alzheimer's disease*), die Parkinson-Erkrankung, Motoneuronen-Erkrankungen wie die amyotrophe Lateralsklerose und darüber hinaus Prion-Erkrankungen wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, wobei die Prion-Erkrankungen nicht mit dem Alter zunehmen. All diesen Erkrankungen ist die Aggregation und Ablagerung fehlgefalteter, endogener Proteine und der daraus resultierende progressive und irreversible Untergang von Neuronen gemein ^{2,3}. Patienten neurodegenerativer Erkrankungen zeigen verschiedene Formen von kognitiven, neurologischen und psychiatrischen Symptomen ⁴.

Die AD stellt mit etwa 25 Millionen Patienten weltweit die am häufigsten auftretenden Form der Demenz dar ^{5,6}. Neuropathologisch gekennzeichnet ist diese Erkrankung durch extrazelluläre Amyloid-beta-Plaques (A β -Plaques) sowie intrazellulären Anreicherungen von hyperphosphoreliertem Tau-Protein-Aggregaten (Tangles), welche zu einem Absterben von Neuronen führen ⁷. Aufgrund der kontinuierlich steigenden Lebenserwartung kommt es vermutlich bis zum Jahr 2050 zu einer rasanten Zunahme der Anzahl an Neuerkrankungen auf ca. 135 Millionen Patienten ⁸. Aktuell liegt für die AD keine Kausaltherapie vor, weshalb die Erkrankung sowohl für die Patienten und deren Angehörigen als auch für unser Gesundheitssystem eine hohe Belastung darstellt. Die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung sind von großer Bedeutung, um die Ursache der Krankheit zu verstehen und neue Therapieansätze zu entwickeln.

1.1.1 Historie der Alzheimer-Erkrankung

Erstmals beschrieben wurde die AD 1907 von dem deutschen Nervenarzt und Neuropathologen Alois Alzheimer in einer Abhandlung mit dem Titel „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ ⁹. Darin beschrieb er den Fall der 1901 in eine psychiatrische Klinik in Frankfurt am Main eingewiesenen Patientin Auguste Deter (51

Jahre). A. Alzheimer untersuchte und dokumentierte ihren Krankheitsverlauf über 5 Jahre. Er beschrieb progressive Gedächtnisstörungen, Halluzinationen, Apraxien (neurologische Bewegungsstörungen) sowie sensorische und motorische Aphasien (schwere Sprach- und soziale Verhaltensstörungen). Nach ihrem Tod im Jahre 1906 wurde eine Autopsie durchgeführt, bei welcher eine schwere Atrophie des Gehirns sowie intrazelluläre neurofibrilläre Tangles und extrazelluläre Proteinablagerungen beobachtet werden konnten. Auguste Deter war somit der erste beschriebene Fall für die heute als Alzheimer-Erkrankung bekannte Form der Demenz ¹⁰.

1.1.2 Prävalenz, Epidemiologie und Ätiologie der Alzheimer-Erkrankung

Demenzen stellen, neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Bluthochdruck und Diabetes, eine der Haupttodesursachen in den westlichen Ländern dar. Die AD ist die am häufigsten auftretende Form der Demenz und Hochrechnungen beschreiben, dass sich die Prävalenz dieser Erkrankung ungefähr alle 5 Jahre verdoppelt ^{11,12}.

Die AD kann vereinfacht in zwei Subtypen unterteilt werden. Die früh einsetzende Form der AD (EOAD, *engl.: early onset AD*) tritt vor dem 60. – 65. Lebensjahr auf. Etwa 10% der AD Fälle sind diesem Subtyp zuzuordnen. Der zweite Subtyp wird als spät auftretende AD (LOAD, *engl.: late onset AD*) bezeichnet, welche rund 90% der AD Fälle ausmacht ¹³. Hier tritt die Symptomatik nach Erreichen des 60. – 65. Lebensjahres auf. Darüber hinaus kann die AD eine sporadische oder genetische Ursache aufweisen. Die sporadische AD (SAD) wird wahrscheinlich durch multiple genetische Ursachen und/oder Umweltfaktoren ausgelöst. Dies gilt vor allem für die LOAD ¹⁴. Bei der EOAD hingegen können bis zu 60% der auftretenden AD Fälle auf eine vererbte genetische Ursache (familiäre AD = FAD) zurückgeführt werden ¹⁵. Beispiele hierfür sind Mutationen des Präsenilin-1- oder Präsenilin-2-Gens sowie Mutationen im Gen des Amyloid-Vorläuferproteins (APP, *engl.: amyloid precursor protein*) ^{14,16}. Diese Mutationen fördern unter anderem die Aggregation von aus APP entstehendem A β sowie die Bildung neurofibrillärer Tangles ¹⁷.

Darüber hinaus gibt es verschiedene Risikofaktoren, die eine Erkrankung an Alzheimer begünstigen. Der physiologische Hauptrisikofaktor ist das Alter. Bei der Bevölkerungsgruppe der unter 65-Jährigen ist die Prävalenz mit 1:1000 relativ niedrig. Dies ändert sich drastisch bei der Betrachtung der über 65-Jährigen, bei welchen die Prävalenz bereits bei 1:20 ¹⁸ liegt. Der genetische Hauptrisikofaktor ist das Apolipoprotein E (ApoE). Dieser Lipid-Transporter liegt beim Menschen in drei

verschiedenen Isoformen (ApoE2, ApoE3, ApoE4) vor, welche in unterschiedlicher Verteilung in der Bevölkerung auftreten ¹⁹. Für die Isoform ApoE2 konnte gezeigt werden, dass sie den Ausbruch der FAD deutlich verzögert ²⁰. Die Isoform ApoE3 konnte nicht in Verbindung mit der Entwicklung einer AD gebracht werden und liegt homozygot bei ca. 60% der Bevölkerung vor ²¹. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer SAD besteht für die Träger der Isoform ApoE4 ²¹. Des Weiteren wurden die Gene PLD3 (*engl.: phospholipase D3*) und TREM2 (*engl.: triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) als weitere genetische Risikofaktoren für die SAD identifiziert ^{22–24}. Weitere Studien beschreiben, dass in Reaktion auf A β -Ablagerungen im Gehirn die Aktivität von Mikroglia-Zellen beeinflusst wird, welche sich auf die AD-Pathogenese auswirkt ²⁵.

Je nach Stadium der AD, in welcher die Diagnose gestellt wird, variiert die Überlebenszeit der betroffenen Patienten zwischen 8 und 10 Jahren. Da sich eine AD unterschiedlich schnell entwickelt und der Ausbruch der ersten deutlichen Symptome von Fall zu Fall variiert, kommt es zu unterschiedlich ausgeprägten Progressionszeiten ²⁶. Aktuell ist die Erkrankung einige Jahre vor den ersten auftretenden Symptomen, durch die Kombination verschiedener Testverfahren, nachweisbar ^{27,28}. Eingesetzt werden hierbei psychometrische Tests (Feststellung der Gedächtnisleistung), bildgebende Verfahren (Feststellung von Veränderungen im Gehirn), Liquordiagnostik und Gentests ²⁹

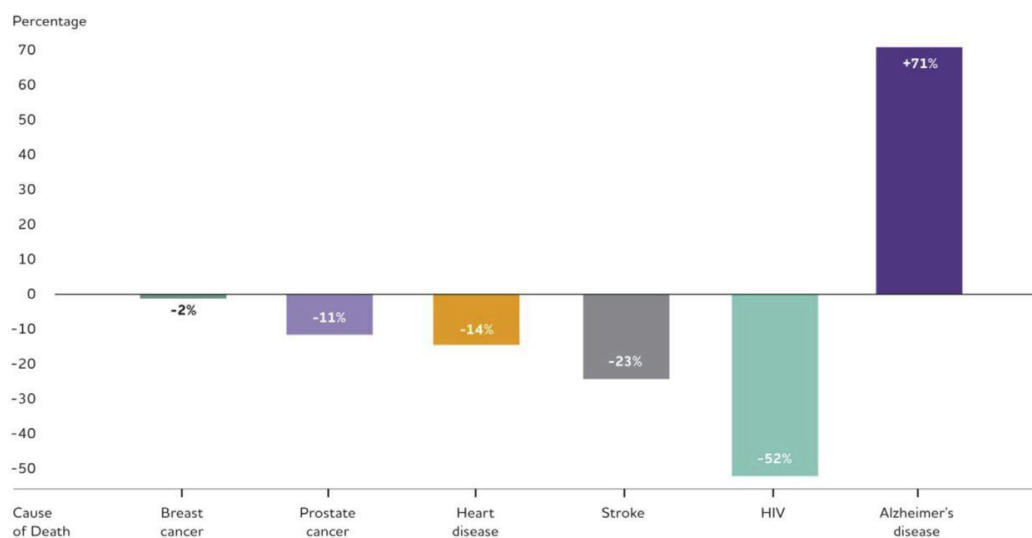


Abbildung 1.1: Auftreten ausgewählter Todesursachen aller Altersgruppen in den Jahren 2000 – 2013 ¹².

Es zeigt sich eine deutliche Zunahme der AD (71%) als Todesursache im Vergleich zu anderen prominenten Erkrankungen wie HIV (humanes Immundefizienz-Virus), Schlaganfällen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und verschiedenen Tumoren. (entnommen aus Gaugler *et al.*, 2016)

1.1.3 Neuropathologie der Alzheimer-Erkrankung

Neuropathologisch zeichnet sich die AD durch den Untergang von Neuronen vorwiegend im zerebralen Cortex aus. Besonders betroffen sind dabei der mediale Temporallappen einschließlich des Hippocampus sowie die Parietal- und Frontallappen. In Folge dessen tritt eine kortikale Atrophie sowie eine Schrumpfung der Hirnrinde und eine Erweiterung der Ventrikel (Liquorräume) auf ^{30,31}. Ein neuropathologisches Hauptmerkmal der AD ist wie bereits zuvor erwähnt das Auftreten mikroskopisch nachweisbarer extra- und intrazellulärer Proteinablagerungen. Extrazellulär kommt es zur Bildung von senilen A β -Plaques, intrazellulär zu einer Bildung neurofibrillärer Tangles bestehend aus hyperphosphoreliertem Tau-Protein ⁷. Des Weiteren lassen sich häufig Neuropilfäden, dystrophische Neuriten, eine zerebrale Inflammation sowie eine assoziierte Astrogliose beobachten ³².

Nach der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ wurde lange angenommen, dass A β -Fibrillen und dessen Plaques das neurotoxische Agens sind ³³. Aktuell hingegen tendiert die Wissenschaft hingegen zu der Annahme, dass lösliche A β -Oligomere zum Untergang von Neuronen beitragen und die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins begünstigen ^{34,35}.

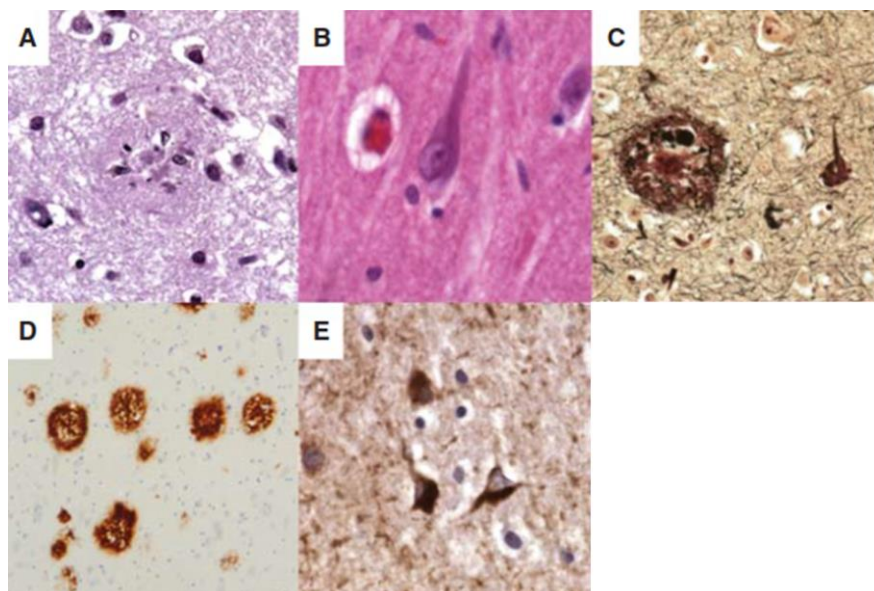


Abbildung 1.2: Neuropathologische Merkmale der AD, mikroskopisch nachweisbare extra- und intrazelluläre Proteinablagerungen.

(A) A β -Plaques im frontalen Cortex in einer H&E-Färbung. (B) Intraneurales Tau-Tangle im Hippocampus in einer H&E-Färbung. (C) Durch Silberfärbung hervorgehobener A β -Plaques neben einem Tau-Tangle. (D) A β -Plaques in einer immunhistochemischen Färbung gegen A β . (E) Tau-Tangle in einer immunhistochemischen Färbung gegen das Tau-Protein. (modifiziert aus A. Serrano-Pozo *et al.*, 2011³²)

1.1.4 Therapie der Alzheimer-Erkrankung

Eine Kausaltherapie der AD ist aktuell nicht möglich und die pharmakologische Behandlung ihrer Symptome ist nur begrenzt wirksam sowie mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ³⁶.

Zur pharmakologischen Behandlung der AD sind aktuell nur vereinzelte Präparate zugelassen, Beispiele hierfür sind: ein Cholinesterase-Inhibitor sowie ein N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptorantagonist. Diese zielen darauf ab, kognitive und weitere Verhaltensauffälligkeiten zu lindern. Der Einsatz dieser Medikamente verzögert den Krankheitsverlauf jedoch nicht. Des Weiteren zeigen sie Nebenwirkungen, welche kontrovers diskutiert werden ^{36–39}. Weitere pharmakologische Behandlungsansätze zielen auf den Abbau von A β ₁₋₄₂ und hyperphosphoreliertem Tau ab ⁴⁰.

Nichtpharmakologische Behandlungsmethoden für AD-Patienten oder anderer Demenzformen sind ein unterstützender Therapieansatz. Dazu zählen Übungen zur Erhaltung motorischer Fähigkeiten, kognitives Training, sowie das Verwenden moderner Technik (virtuelle Realität) für interaktive Therapiespiele. Allerdings ist deren klinische Relevanz bisher nicht bewiesen ³⁶.

1.2 Amyloid-beta

A β -Plaques, bestehend aus dicht gepacktem fibrillärem A β , sie sind neben den Tangles eines der neuropathologischen Hauptmerkmale der AD ^{41,42}. A β entsteht durch die proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) ^{7,43}. Die Menge des im Gehirn vorhandenem A β -Proteins wird beeinflusst durch eine verstärkte Produktion und einem eventuell verringertem Abbau des Proteins ⁴⁴.

1.2.1 Amyloid-Vorläuferprotein

Das Amyloid-Vorläuferprotein ist ein integrales 110 – 135 kDa großes Typ-1-Transmembranprotein, bestehend aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, einer singulären Transmembranregion und einer kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne ⁴⁵. Es wird ubiquitär im Zentralnervensystem (ZNS) von Neuronen, Astrozyten, Mikroglia-Zellen, Endothelzellen und einigen nicht neuronalen Zelltypen exprimiert ^{46,47}. Zusammen mit den APP-ähnlichen Proteinen APLP-1 and -2 (*engl.: APP-like proteins 1, 2*) gehört es zu einer hoch konservierten Proteinfamilie ^{48,49}. Welche physiologische Funktion APP erfüllt, ist aktuell nicht klar definiert ⁴⁵.

Studien zeigen einen Einfluss bzw. eine Beteiligung an Prozessen wie der Zellproliferation und -differenzierung, dem Wachstum von Neuriten, der Zellmigration und -adhäsion, der Synaptogenese sowie einiger neuroprotektiver Prozesse⁵⁰⁻⁵⁴.

1.2.2 APP-Prozessierung

APP kann auf unterschiedlichen Wegen prozessiert werden. Aus dem nicht-amyloidogenem Weg entstehen Produkte, denen neuroprotektive Wirkungen zugeschrieben werden. Bei der amyloidogenen APP-Prozessierung hingegen entsteht unter anderem das neurotoxische A β ₁₋₄₂. Im physiologischen Zustand koexistieren beide Wege⁵⁵.

Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung (α -sekretorische Prozessierung) kommt es zuerst zu einer Spaltung mittig der A β -Sequenz an den Aminosäuren (AS) 16 - 17 durch die Aktivität einer α -Sekretase⁵⁶. Die hierbei beteiligten Metalloproteasen mit α -Sekretase-Aktivität sind Mitglieder der ADAM- (*engl.: a disintegrin and metalloproteinase domain*) Familie (ADAM10 und ADAM17/TACE)^{57,58}. Aus dem ersten Prozessierungsschritt entsteht das an der Plasmamembran verankerte 83 AS große C-terminale-Fragment α CTF (auch C83), sowie das lösliche N-terminale-Fragment sAPP α (*engl.: soluble APP*), welches in den extrazellulären Raum entlassen wird und in seiner physiologischen Funktion am Wachstum von Neuriten und Axonen beteiligt ist^{59,60}. Das α CTF wird anschließend durch eine γ -Sekretase in einer Intramembranproteolyse zu dem sezernierten P3-Peptid und dem zytosolischen AICD (*engl.: APP intracellular domain*) umgesetzt^{7,56,61,62}. AICD ist in der Lage im Zellkern als Transkriptionsfaktor zu fungieren oder im Komplex mit anderen Proteinen Einfluss auf die Signaltransduktion zu nehmen⁶³.

Bei der amyloidogenen Prozessierung von APP (β -sekretorische Prozessierung) erfolgt innerhalb der N-terminalen extrazellulären APP-Domäne zuerst eine Spaltung durch die β -Sekretase Aspartylprotease BACE1 (*engl.: beta-site APP-cleaving enzyme 1*). Hierbei entstehen zwei Spaltprodukte: das in den extrazellulären Raum entlassene lösliche sAPP β sowie das membranständige C99-Fragment⁵⁵. Die weitere Spaltung des C99-Fragmentes erfolgt in einer Intramembranproteolyse durch eine γ -Sekretase, identisch zur nicht-amyloidogenen Prozessierung, wodurch extrazellulär A β und intrazellulär das AICD-Fragment entsteht⁶⁴. Diese finale Spaltung des C99-Fragmentes ist nicht präzise und kann zwischen den AS 37 – 43 erfolgen. Daraus resultierend entstehen A β -Peptide verschiedener Längen⁶⁵. Die Hauptprodukte

hierbei sind $A\beta_{1-40}$ (~ 90%), das in der AD beteiligte neurotoxische $A\beta_{1-42}$ (~ 5 – 10%) sowie kleinere Peptide wie $A\beta_{1-37}$ und $A\beta_{1-38}$ (~ 5%)⁶⁶.

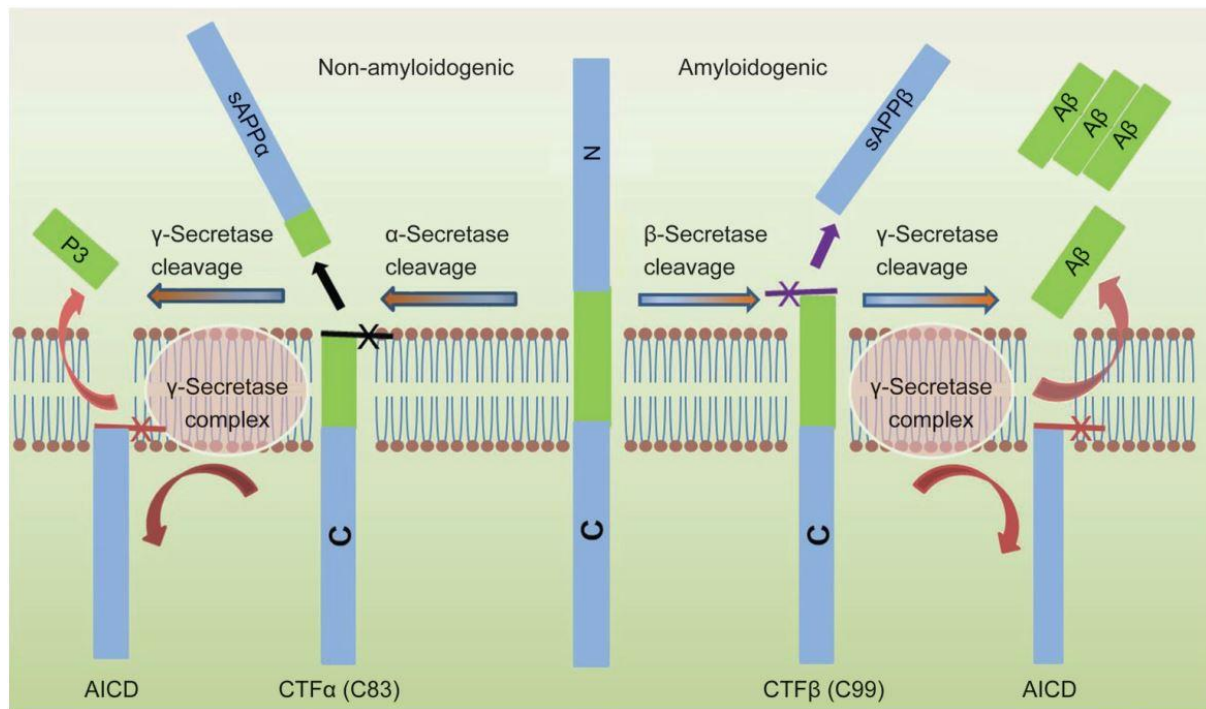


Abbildung 1.3: Prozessierungen des human APP⁶⁷.

In der nicht amyloidogenem Prozessierung von APP (links), kommt es durch α - und γ -Sekretaseaktivität zur Bildung des extrazellulären sAPP α - und P3-Peptides. Bei der amyloidogenem Prozessierung (rechts) hingegen führt die β - und γ -Sekretaseaktivität zur Bildung von extrazellulärem sAPP β sowie verschieden großen, teils neurotoxischen, $A\beta$ -Spezies. (entnommen aus Chen GF *et al.*, 2017)

1.2.3 Amyloid-beta₁₋₄₂

$A\beta_{1-42}$ ist die dominante Spezies in den $A\beta$ -Plaques und spielt vermutlich eine zentrale Rolle in der AD-Pathogenese^{68,69}. Im Vergleich zu anderen $A\beta$ -Spezies zeigt $A\beta_{1-42}$ die höchste Tendenz zur Aggregation und weist potente neurotoxische Eigenschaften auf^{44,70}. Strukturell bestehen $A\beta_{1-42}$ -Peptide aus α -Helices sowie aus parallelen und antiparallelen β -Faltblattstrukturen. Die ausgebildete C-terminale Hydrophobizität des Peptides wird in Verbindung mit seiner Toxizität und dem Aggregationsverhaltens von $A\beta_{1-42}$ gebracht⁷¹⁻⁷³. Das durch die amyloidogene APP-Prozessierung gebildete $A\beta_{1-42}$ -Monomer unterliegt einer Aggregationskaskade, welche in zwei Phasen erfolgt: der Nukleationsphase und der Elongationsphase. In der Nukleationsphase kommt es durch eine Konformationsänderung des $A\beta_{1-42}$ -Monomers zu einer gesteigerten Tendenz der Selbstaggregation. Es bilden sich die neurotoxischen $A\beta_{1-42}$ -Spezies von

Dimeren bis hin zu löslichen A β ₁₋₄₂-Oligomeren. Diese A β ₁₋₄₂-Oligomere dienen in der anschließenden, langsamer ablaufenden Elongationsphase als Keim für die Bildung von Protofibrillen und unlöslichen Amyloid-Fibrillen. Bei diesem Prozess werden A β ₁₋₄₂-Monomere für das weitere Wachstum der Amyloid-Fibrillen rekrutiert. Die Nukleationsphase findet unter energetisch ungünstigen Verhältnissen statt und schreitet daher im Vergleich zur Elongationsphase deutlich langsamer voran ⁷⁴.

Im Gegensatz zur 1992 aufgestellten „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“, welche einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Amyloid-Fibrillen in senilen Plaques und den fortschreitenden neurodegenerativen Prozesse der AD beschreibt ⁷⁵, liegen die neurotoxischen Eigenschaften des A β ₁₋₄₂ aus heutiger Sicht bei den kleinen löslichen A β ₁₋₄₂-Oligomeren ⁷⁶. Dies wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass die Bildung und das Auftreten von senilen Plaques einige Zeit vor dem Auftreten erster Symptomatik bei AD-Patienten nachweisbar sind ⁷⁷. Die monomere Form des A β ₁₋₄₂ hingegen hat keine nachgewiesenen neurotoxischen Eigenschaften ⁷⁸.

1.2.4 molekulare Mechanismen der A β ₁₋₄₂-Neurotoxizität

Für A β ₁₋₄₂ ist eine hohe Diversität an toxischen Wirkungsmechanismen beschrieben, welche in Bezug auf die AD sowohl *in vitro* als auch *in vivo* experimentell nachgewiesen werden können ^{79,80}. Allerdings sind die genauen physiologischen und pathologischen sowie die Vermittlung der Toxizität von A β ₁₋₄₂ in der AD-Pathogenese nicht bekannt ⁸⁰. Die bisher in Studien beschriebenen Effekte, welche durch A β ₁₋₄₂ ausgelöst werden, sind in diverse Mechanismen unterteilt. Beschrieben sind beispielsweise Zusammenhänge mit oxidativem Stress, Funktionsstörungen von Mitochondrien, synaptische Dysfunktion, Veränderungen der Membranpermeabilität, Inflammation und Excitotoxizität durch die Beeinflussung von Rezeptoren, welche mit Neurotransmittern interagieren ⁸⁰⁻⁸⁵.

A β ₁₋₄₂ hat darüber hinaus einen direkten Einfluss auf den oxidativen Stress im Gehirn, welches nur geringe Kapazitäten aufweist, mit diesem umzugehen. Interaktionen von A β ₁₋₄₂ und redoxaktiven Metallen können Kaskaden auslösen, welche zur Bildung von oxidativem Stress und chemisch modifizierten Formen von A β ₁₋₄₂ führen ⁸⁶.

Die Anreicherung von A β ₁₋₄₂ führt des Weiteren an Nervenzellen zur Beeinträchtigung der Regulation der Langzeit-Potenzierung (LTP) sowie der Langzeit-Depression (LTD). Der durch die pathologische Akkumulation von A β ₁₋₄₂ forcierte Untergang von Synapsen wird auf eine Reduzierung der glutaminergischen Transmission an den

Synapsen zurückgeführt^{87–90}. Verschiedene Studien zeigen, dass der Einfluss von $A\beta_{1-42}$ auf die LTP/LTD durch eine Desensibilisierung des NMDA-Rezeptors (NMDAR) zustande kommt. Die NMDAR regulieren die Menge des intrazellulären Calciumlevels und spielen dadurch eine zentrale Rolle beim Einleiten der LTP bzw. LTD^{90,91}.

Neben NMDAR sind weitere Rezeptoren und Signaltransduktionswege beschrieben, mit denen $A\beta_{1-42}$ interagiert. Zu diesen gehören die AMPA-Rezeptoren (*engl. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*), deren Anzahl an der Postsynapse durch $A\beta_{1-42}$ reduziert wird^{80,92}. Cholinerge Rezeptoren, wie der $\alpha 7$ -Nikotin Rezeptor, spielen eine wichtige Rolle bei der Internalisierung von $A\beta_{1-42}$ in cholinerge Neuronen und tragen somit zur selektiven Toxizität von $A\beta_{1-42}$ in der AD bei^{80,93}. Einer der prominentesten Rezeptoren auf Neuronen, mit dem $A\beta_{1-42}$ interagiert ist das zelluläre Prion-Protein (PrP^C). Diese Interaktion führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase Fyn sowie zur Aktivierung von NMDAR. In beiden Fällen werden Signalkaskaden ausgelöst, die zum Untergang von Neuronen führen können⁹⁴. Weitere Rezeptoren, die durch die Bindung von $A\beta_{1-42}$ zu der Auslösung von zellschädigenden Signalkaskaden führen, sind der Insulin-Rezeptor, Toll-ähnliche Rezeptoren und RAGE (*engl. receptor for advanced glycation endproducts*)⁸⁰.

Des Weiteren führt die Interaktion von $A\beta_{1-42}$ mit Neuronen zu einer Störung der Translokation und Phosphorylierung des Tau-Proteins in den Dendriten und somit zur Bildung von neurofibrillären Tangles, zur Dysregulation der Calcium-Homöostase und verstärkt zu oxidativen Stress⁹⁰. Zudem kommt es durch die Anreicherung von $A\beta_{1-42}$ zur Fehlregulation der Mitochondrien und Neuroinflammation aufgrund einer anomalen Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten^{90,95}.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen negative Effekten von $A\beta_{1-42}$, welche zumeist mit einer pathologischen $A\beta_{1-42}$ -Expressionserhöhung einhergehen, zeigen verschiedenen Studien positive Eigenschaften von $A\beta_{1-42}$. Beschrieben wurde hierbei, dass $A\beta_{1-42}$ in geringen Mengen antioxidative Wirkmechanismen unterstützt, neuroprotektive Effekte aufweist und die LTP fördert⁸⁰.

1.3 Das zelluläre Prion-Protein (PrP^C)

1.3.1 Struktur und Funktion

PrP^C ist ein membranassoziertes Glykoprotein, welches auf Neuronen stark exprimiert wird. Geringere Mengen PrP^C finden sich auch auf anderen Zelltypen wie lymphoiden Zellen und Myozyten^{96–98}. Für PrP^C sind unterschiedliche physiologischen Funktionen in verschiedenen Zell- und Gewebetypen in der Literatur beschrieben worden⁹⁹. Dazu gehört die Beteiligung am Entwicklungsprozess von Zellen und Geweben^{100,101}, an der Zelladhäsion^{102,103}, dem Wachstum von Neuriten, die axonale Differenzierung und die Entstehung von Synapsen^{99,104–108}. Des Weiteren ist bekannt, dass PrP^C eine Rolle bei der Neuroprotektion spielt^{109–111}, an der Regulation des Rhythmus¹¹² sowie an der Aufrechterhaltung der Myelinscheiden beteiligt ist¹¹³. Darüber hinaus erfüllt PrP^C vielfältige Funktionen in verschiedenen Signaltransduktionswegen^{99,114,115}.

Strukturell besteht PrP^C aus einer unstrukturierten N-terminalen Domäne, welche eine neurotoxische Domäne, einen hydrophoben Kern und eine *Oktarepeat*-Region aufweisen. An der *Oktarepeat*-Region kommt es zu einer Bindung mit Cu²⁺, welche Interaktionen mit β -Faltblatt-reichen Proteinen vermittelt. Des Weiteren besteht PrP^C aus einer globulären strukturierten C-terminalen Untereinheit, welche hauptsächlich aus α -helikalen Bestandteilen aufgebaut ist und zwei variabel besetzte Glykosylierungsstellen trägt. Für die Verankerung in der äußeren Schicht der Zellmembran dient C-Terminal ein GPI- (*engl.: glycosylphosphatidylinositol*) Anker. Lokalisiert ist PrP^C in cholesterinreichen Domänen auf der Zelloberfläche, sogenannten Lipid-Rafts^{98,116,117}. PrP^C durchläuft wie APP eine proteolytisch Prozessierung, welche hochkonserviert ist. Die dadurch entstehenden Fragmente stehen in Verbindung mit den bereits erwähnten physiologischen Funktionen sowie zu neurodegenerativen Erkrankungen¹¹⁸.

Das wohl bekannteste Beispiel für die Beteiligung des PrP^C in einer neurodegenerativen Erkrankung sind die Prion-Erkrankungen, zu welchen die humane Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder auch die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) zählt. PrP^C ist dabei der grundlegende Bestandteil und das Substrat im Prozess der Fehlfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc}, welcher den übertragbaren Prion-Erkrankungen zu eigen ist^{99,119–121}. Durch eine Fehlfaltung der physiologischen Form des PrP^C entsteht das infektiöse PrP^{Sc} (*engl.: Scrapie Prion-Protein*), welches sich durch einen selbst propagierenden Mechanismus auszeichnet. PrP^{Sc} hat die Eigenschaft das

physiologische PrP^C zu rekrutieren und in diesem die Fehlfaltung zu PrP^{Sc} zu initiieren. Dies führt zu einer Vervielfachung des Proteins, seiner Aggregation und Ablagerung im Gehirn ¹²².

Doch auch PrP^C in seiner Funktion als Rezeptor auf der Zellmembran von Neuronen ist an verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. So führt die Bindung von toxischen Oligomeren wie PrP^{Sc} (Prion-Erkrankung), A β ₁₋₄₂ (Alzheimer-Erkrankung) oder α -Synuclein (Parkinson-Erkrankung) zur Auslösung neurotoxischer Signalkaskaden ^{94,99,123,124}.

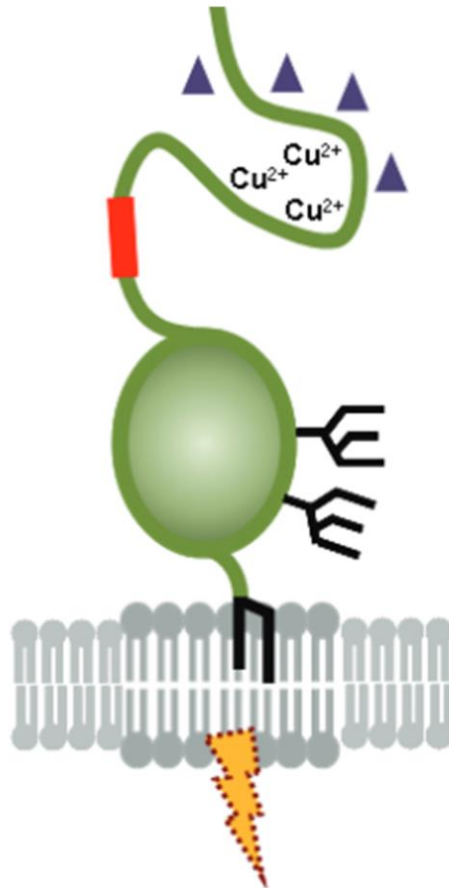


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des zellulären Prion-Proteins.

PrP^C tritt verstärkt in Lipid-Rafts (Mikrodomänen in Membranen eukaryotischer Zellen) auf und ist mittels eines GPI-Ankers in die oberste Lage der Zellmembran verankert. Der C-terminale Teil des Proteins hat eine globuläre Struktur und weist zwei Glykosylierungsstellen auf. Der flexible N-terminus enthält eine neurotoxische Domäne (rot). Des Weiteren ist er in der Lage Kupferionen sowie A β -Oligomere (lila Dreiecke) zu binden. (modifiziert aus H. Altmepfen *et al.*, 2012 ¹¹⁸)

1.3.2 PrP^C in der Alzheimer-Erkrankung

Pathophysiologisch ist PrP^C vielfältig an verschiedenen Ebenen der AD beteiligt ¹²⁵. Einige Daten weisen darauf hin, dass PrP^C an der Formation von Amyloid-Plaques

beteiligt sein könnte und mit ihnen kolokalisiert^{126,127}. Des Weiteren wurde ein direkter Einfluss auf die EOAD und die Amyloid-Plaques-Belastung festgestellt¹²⁸. PrP^C beeinflusst zudem die APP-Prozessierung, wobei eine PrP^C-Überexpression zu einer Inhibierung der β -Sekretase und somit zu einer geringeren Bildung von A β ₁₋₄₂ führt. Bei Abwesenheit von PrP^C hingegen steigen die extrazellulären A β ₁₋₄₂-Mengen an¹²⁹. Wie bereits beschrieben ist der flexible N-Terminus von PrP^C in der Lage, Interaktionen mit β -Faltblatt-reichen Proteinen einzugehen. Zu diesen Proteinen gehören mit hoher Affinität die neurotoxischen Formen der A β ₁₋₄₂-Oligomere. A β ₁₋₄₂-Monomere oder Fibrillen hingegen zeigen diesen Effekt nicht¹²³. Für murines PrP^C wurden zwei Bindestellen an den AS 95 – 100 und den AS 23 – 27 identifiziert¹³⁰. Die Bindung der A β ₁₋₄₂-Oligomere führt zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase Fyn und von NMDAR. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung neurotoxischer Signalkaskaden⁹⁴. Des Weiteren kommt es durch die A β ₁₋₄₂-PrP^C-Interaktion zur Unterdrückung der LTP¹³¹. Darüber hinaus konnte für die AD ein Zusammenhang zwischen PrP^C und Exosomen beschrieben werden¹³².

1.4 Exosomen

1.4.1 Biogenese und Definition von Exosomen

Die Informationen in dem hier folgenden Abschnitt wurden in dem Review „Exosomes and the Prion Protein: More than One Truth“ in dem Journal *Frontiers in Neuroscience* publiziert⁹⁸.

Exosomen sind kleine extrazelluläre Vesikel, welche von den verschiedensten Zelltypen freigesetzt werden und in vielen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin oder der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF, *engl.: cerebrospinal fluid*) vorkommen können. Ihre Größe liegt im Bereich von 50 – 150 nm im Durchmesser¹³³.

Die Biogenese von Exosomen erfolgt durch die Bildung von intraluminalen Vesikeln (ILVs, *engl.: intraluminal vesicles*). Im ersten Schritt kommt es zu einer Invagination der Plasmamembran, wodurch intrazellulär das frühe Endosom (*engl.: early endosome*) entsteht. Durch Vesikelknospungen in das Lumen des frühen Endosoms reift dieses zu dem multivesikulären Endosom (MVBs, *engl.: multivesicular bodies*). Dieser Vorgang wird reguliert durch den ESCRT-Proteinkomplex (*engl.: endosomal sorting complex required for transport*). Die MVBs können anschließend entweder mit

dem Lysosom fusionieren und degradiert werden oder mit der Plasmamembran fusionieren, wodurch es zur Freisetzung der ILVs als Exosomen in den extrazellulären Raum kommt. Hierbei ist zu beachten, dass nicht alle Prozesse in der Biogenese von Exosomen vollständig verstanden sind. Studien zeigen, dass MVBs ohne Beteiligung des ESCRT-Proteinkomplexes in der Lage sind, ILVs auszubilden^{98,132–134}.

Die Unterscheidung von Exosomen zu anderen Vesikeltypen, wie beispielsweise zu Mikrovesikeln, ist nicht trivial. Im Gegensatz zu Exosomen entstehen die meisten Vesikeltypen durch die direkte Ausstülpung und Abschnürung der Plasmamembran in den extrazellulären Raum. Zudem ähneln sich verschiedene Typen in ihrer Morphologie und Größe. In Bezug auf die publizierte Literatur wird in dieser Arbeit der Begriff Exosom zur Beschreibung von Vesikeln verwendet, welche definiert sind durch ihre Größe, ihrer Proteinkomposition, ihre Form und ihre Separation im Sukrosegradienten^{98,132}. Die am häufigsten genutzte Methode zur Isolation von Exosomen aus Zellkulturmedium oder Körperflüssigkeiten ist die differentielle Zentrifugation¹³⁵. Die Charakterisierung der Exosomen erfolgt über kennzeichnende Proteine, welche aus dem MVBs stammen wie CD9, CD63, CD81 oder TSG101. Allerdings schwankt deren Auftreten und Konzentration in Abhängigkeit des sezernierenden Zelltyps und dem aktuellen physiologischen Status der Zellen¹³⁶. Selbst nach der Ultrazentrifugation und der weiteren Aufreinigung durch einen Sukrosegradienten ist die isolierte Vesikelpopulation nicht homogen in ihrer Größe und Proteinkomposition. Daher beinhaltet die Vesikelpopulation nach der Isolation von Exosomen immer einen Anteil nicht exosomaler Vesikel. Man spricht von einer Exosomen angereicherten Vesikelpopulation^{98,135,137–141}. Die Proteinsignatur von Exosomen ist charakterisiert durch eine Überrepräsentation von plasmamembranständigen Proteinen, zytosolischen Proteinen und Transportproteinen und zeigt ihre Abstammung aus der Zellmembran. Auch PrP^C, welches kein für Exosomen kennzeichnendes Protein darstellt, ist stark auf Exosomen vertreten und scheint aktiv und gezielt in Exosomen sortiert zu werden^{98,132,142}. Exosomales-PrP^C oder -PrP^{Sc} wird im Weiteren als ePrP^C bzw. ePrP^{Sc} beschrieben. Exosomen erfüllen darüber hinaus physiologische Funktionen als Transportvesikel für Proteine, Lipide und Nukleinsäuren von ihrem Ursprungsort auf kurze und lange Distanzen in gerichteter Art und Weise zu ihren Bestimmungsorten¹⁴³. Sie dienen daher der intrazellulären Kommunikation und ermöglichen die Kommunikation

zwischen Neuronen und Gliazellen im ZNS, unterstützen das Wachstum und die Reparatur von Neuronen, dienen als Regulatoren der Immunantwort und der Präsentation verschiedener Antigene^{98,143–146}.

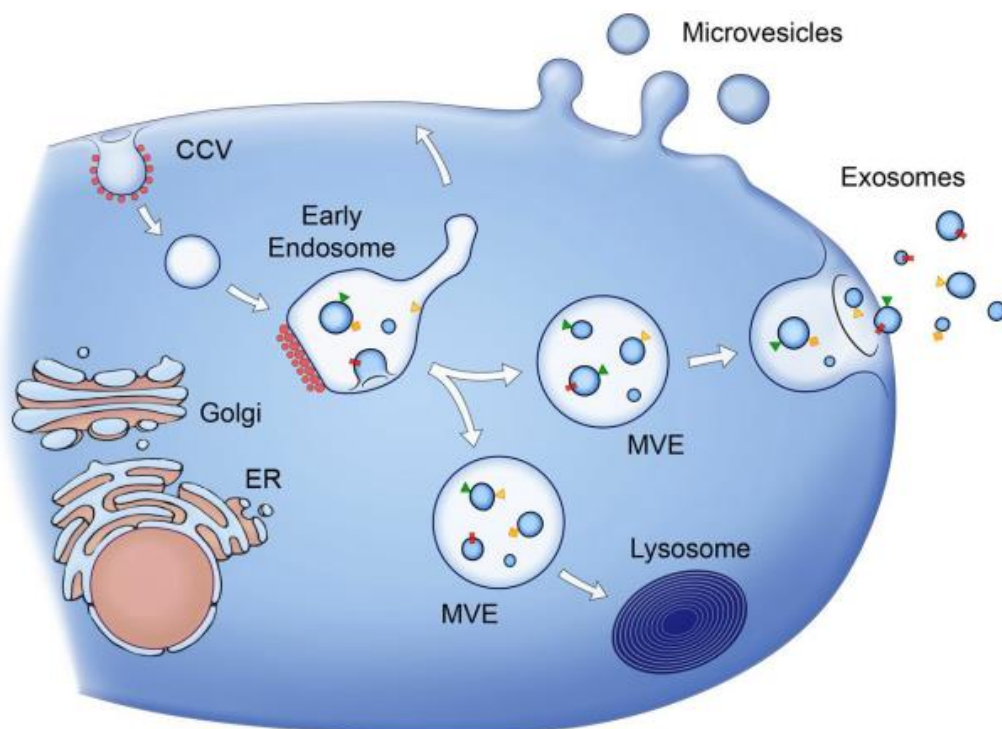


Abbildung 1.5: Schemata der Biogenese und Sekretion von Exosomen¹³³.

Die Invagination der Plasmamembran führt zur Bildung des frühen Endosoms, in dem sich Vesikel ins Lumen abschnüren. Dadurch entsteht das multivisikuläre Endosom. Dieses fusioniert zum einem mit dem Lysosom, was zur Degradation führt, oder es verschmilzt mit der Plasmamembran was zur Abgabe der Exosomen in den extrazellulären Raum führt. ER= endoplasmatisches Retikulum, MVE= multivisikuläres Endosom (entnommen aus Raposo und Stoorvogel, 2013)

1.4.2 Die Rolle von Exosomen in neurodegenerativen Erkrankungen

Exosomen sind an neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD oder der Prion-Erkrankung, auf verschiedene Art und Weise beteiligt und rücken daher aktuell in den Fokus als attraktive Ziele für diagnostische Untersuchungen^{98,147,148}. In der Pathophysiologie dieser Krankheiten können Exosomen sowie ePrP^C krankheitsfördernde Funktionen als auch protektive Eigenschaften einnehmen⁹⁸.

Dass ePrP^C eine Rolle in Prion-Erkrankungen spielt, ist bekannt und gewinnt immer mehr an Aufmerksamkeit. *In vitro* Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Exosomen und PrP^{Sc} im Zellkulturmedium infektiöser Zellen^{98,149}. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass Exosomen und Retroviruspartikel mit PrP^{Sc} assoziiert sind und zu dessen Ausbreitung beitragen¹⁵⁰, wobei sich der Einfluss der

Retroviruspartikel auf die Ausbreitung von PrP^{Sc} *in vivo* nicht bestätigen ließ^{151,152}. Eine weitere Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen der Biogenese von Exosomen und der Prioninfektiosität durch das Entlassen von PrP^{Sc} aus der Zelle. Durch die Inhibierung des ESCRT-Proteinkomplexes in der Biogenese der Exosomen konnte unter anderem die Infektiosität gesenkt werden. Die Stimulation der Exosomen-Freisetzung durch Monensin hingegen zeigte eine gesteigerte Infektiosität. Exosomen die aus infektiösen *in vitro* Kulturen isoliert werden, führen zu einer Übertragung der Prion-Erkrankung *in vivo*^{98,146,153,154}. Ähnliche Effekte zeigten sich bei der Untersuchung von Prion-infizierten neuronalen Zelllinien *in vitro*. Das von diesen Zellen abgenommene Zellkulturmedium übertrug die Infektion auf vorher nicht infizierte neuronale Zellen und die Isolation und Injektion der Exosomen aus diesen Zellen führten zu einer Übertragung der Prion-Erkrankung auf Mäuse *in vivo*¹⁵⁵. Des Weiteren sind Exosomen im Blut von Prion-infizierten Mäusen infektiös und können die Erkrankung nach Injektion in gesunde Mäuse erfolgreich übertragen¹⁵⁶.

ePrP^{Sc} könnte durch seine Beteiligung in Prion-Erkrankungen des Weiteren ein hilfreiches diagnostisches Mittel sein. In Ihrer klinischen Präsentation unterscheiden sich die verschiedenen humanen Prion-Erkrankungen mitunter deutlich. Spezifische PrP^{Sc}-Isoformen sind assoziiert mit humanen Prion-Erregerstämmen, welche unterschiedliche Manifestationen und Krankheitsverläufe aufweisen^{98,157,158}. Die Diagnose des vorliegenden Prion-Erregerstamms einer Prion-Erkrankung war lange Zeit nur postmortem möglich. Neue Diagnosemethoden basierend auf der Vorgeschichte des Patienten, klinischen Symptomen und Analysen von Körperflüssigkeiten (Blut oder CSF) ermöglichen heutzutage eine Bestimmung des Prion-Erregerstamms am lebendem Patienten^{159–162}. Weitere Techniken ermöglichen es, minimale Konzentrationen an PrP^{Sc} im Blut nachzuweisen^{163–165}. Möglicherweise trägt ePrP^{Sc} zur Ausbreitung von Prion-Erkrankungen bei und ist in Körperflüssigkeiten nachweisbar. Dies könnte zur Entwicklung neuer Diagnosemethoden, welche es erlauben den spezifischen Prion-Erregerstamm am lebenden Patienten zu diagnostizieren, beitragen⁹⁸.

Mittlerweile geht der Großteil der Studien davon aus, dass in der AD die löslichen A β ₁₋₄₂-Oligomere für die synaptischen Fehlfunktionen verantwortlich sind. In fortgeschrittenen Stadien der AD reichern sich A β ₁₋₄₂-Fibrillen in A β -Plaques an, allerdings sind die toxischen A β ₁₋₄₂-Oligomere weiterhin präsent^{98,166}. Exosomale

Proteine akkumulieren in A β -Plaques von AD Patienten. Daher wird vermutet, dass Exosomen an der AD-Pathogenese beteiligt sind ¹⁶⁷. Eine Studie zeigte, dass die Inhibition der Exosomen in AD-Mausmodellen zu einer Reduktion des A β ₁₋₄₂-Spiegels und der A β -Plaquetformation führt ¹⁶⁸. Auch eine direkte Interaktion zwischen A β ₁₋₄₂ und Exosomen konnte demonstriert werden ¹³². In Gegenwart von Exosomen zeigte sich eine Reduzierung der durch extrazelluläre lösliche A β ₁₋₄₂-Oligomere verursachten Synaptotoxizität durch die Induktion der Aggregation von A β ₁₋₄₂ in nicht toxische Fibrillen *in vitro* ^{169,170}. Um die beschriebenen Effekte zu ermöglichen, müssen Exosomen in der Lage sein, direkt mit A β ₁₋₄₂ zu interagieren. Prinzipiell kann auf den Exosomen die Prozessierung von APP zu A β ₁₋₄₂ stattfinden ¹⁷¹. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass von Zellen sezerniertes extrazelluläres A β ₁₋₄₂ mit Exosomen interagiert ⁹⁸. Wie diese Interaktion vermittelt werden könnte, ist zentraler Bestandteil des folgenden Abschnitts.

Das ePrP^C bindet spezifisch A β ₁₋₄₂-Oligomere ¹³². Dies ist sehr interessant, da die Bindung von löslichen A β ₁₋₄₂-Oligomeren an neuronales PrP^C zur Aktivierung neurotoxischer Signalkaskaden führt ^{123,172}. Dies erweitert die A β -Rezeptorhypothese um eine weitere Facette und könnte erklären, warum die Anreicherung von PrP^C auf Exosomen mit der Fähigkeit dieser korreliert, toxische A β ₁₋₄₂-Oligomere zu binden und zu detoxifizieren ⁹⁸. Zusätzlich zeigte sich, dass kleine lösliche A β ₁₋₄₂-Oligomere, welche die neurotoxischen A β ₁₋₄₂-Identitäten sind, bevorzugt an neuronales sowie an exosomales PrP^C binden ^{98,123,132,172}. Wir konnten zeigen, dass die Bindung von neurotoxischen A β ₁₋₄₂-Oligomeren an ePrP^C eine beschleunigte Aggregation dieser in nicht neurotoxischen A β ₁₋₄₂-Fibrillen vermittelt. Exosomen isoliert aus PrP^C-*knock-out* neuronaler Zellkultur hingegen zeigten keinen Einfluss auf die A β ₁₋₄₂-Aggregation. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Exosom-A β ₁₋₄₂-Interaktion durch ePrP^C vermittelt wird ¹³². Die Interaktion von Exosomen und A β ₁₋₄₂ in der AD wurden in verschiedenen Publikationen thematisiert. Die Injektion von Exosomen in das Gehirn von AD-Mausmodellen zeigte, dass diese mit A β interagieren und die Pathologie der AD verlangsamt werden konnte ¹⁷⁰. In diesen Studien wurde allerdings vermutet, dass die Exosom-A β ₁₋₄₂-Interaktion durch Glykosphingolipide und nicht durch ePrP^C vermittelt wird ¹⁷³.

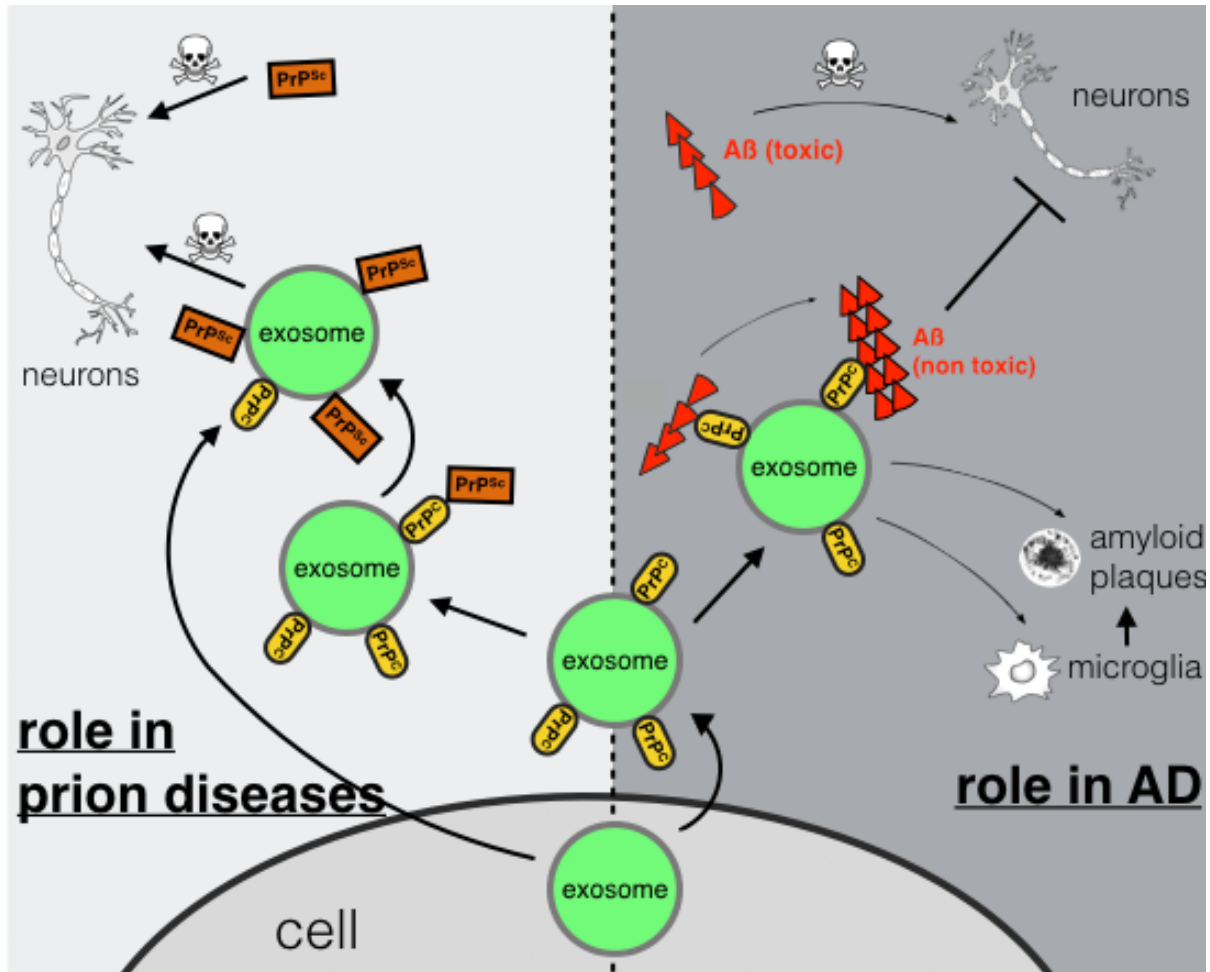


Abbildung 1.6: Die unterschiedlichen Beteiligungen von ePrP^C in neurodegenerativen Erkrankungen ⁹⁸.

Am Beispiel der Rolle von ePrP^C in Prion-Erkrankungen (links) und in der AD (rechts). In Prion-Erkrankungen wird PrP^{Sc} von Prion-infizierten Zellen über Exosomen sekretiert, oder extrazelluläre PrP^{Sc} bindet an ePrP^C und wandelt dieses in PrP^{Sc} um. Dadurch tragen Exosomen zur Transmission und Verbreitung von PrP^{Sc} bei. In der AD trägt ePrP^C zur Detoxifizierung neurotoxischer Aβ₁₋₄₂-Oligomere und weist einen neuroprotektiven Charakter auf. Der Exosomen-Aβ₁₋₄₂-Komplex spielt vermutlich eine Rolle in der Aβ₁₋₄₂-Plaquetformierung oder fördert die Degradation des Komplexes durch Mikroglia-Zellen. (entnommen aus Hartmann *et al.*, 2017)

1.5 Zielsetzung

Aus den bisher bekannten Funktionen des Prion-Proteins in der AD, wird eine duale Rolle des Prion-Proteins in der AD postuliert¹³². Einerseits konnte gezeigt werden, dass die Bindung von toxischen A β ₁₋₄₂-Oligomeren an neuronales PrP^C die Induktion neurotoxischer Signalkaskaden vermittelt. Andererseits führt die Interaktion von toxischen A β ₁₋₄₂-Oligomeren mit ePrP^C zu einer beschleunigten Aggregation der A β ₁₋₄₂-Oligomere in nicht toxische A β ₁₋₄₂-Fibrillen^{98,132}. Dies kann entweder zu einer verstärkten Degradation von A β ₁₋₄₂ durch Mikroglia-Zellen führen¹⁷⁴ oder die Deposition der A β ₁₋₄₂-Fibrillen in A β -Plaques fördern¹⁶⁷. Das exosomale Prion-Protein könnte daher eine spezifische Rolle in der Pathogenese der AD einnehmen. Dabei ist bis zum heutigen Zeitpunkt unklar, ob das exosomale Prion-Protein die Progression der AD fördert oder hemmt. Aufgrund unserer Vorergebnisse vermuten wir, dass das exosomale Prion-Protein die Toxizität von A β ₁₋₄₂ reduziert und somit einen hemmenden Effekt auf die AD-Pathogenese ausübt. PrP^C ist in der Lage mit A β ₁₋₄₂ zu interagieren, inwieweit ePrP^C die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂ beeinflusst ist bisher noch weitgehend unbekannt. Des Weiteren fokussierte sich die Arbeit auf die biologische Etablierung eines Verfahrens zur fotochemischen Funktionalisierung von Exosomen. Dabei soll ein Fotoaffinitätslabel in der exosomalen Membran longitudinal stabil verankert werden und eine Diffusion des Labels aus der Membran der Exosomen verhindern.

Daraus leiten sich die nachfolgenden Hauptfragestellungen für die vorliegende Arbeit ab:

- 1) Führt die Injektion des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes in der Maus *in vivo* zu einer A β ₁₋₄₂-Ablagerung im Gewebe oder wird der Komplex durch Mikroglia-Zellen aufgenommen und degradiert?
- 2) Lässt sich der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex in humanen CSF nachweisen und korreliert dessen Konzentration mit der AD-Pathogenese?
- 3) Wie beeinflusst das ePrP^C die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂?
- 4) Ist eine longitudinal stabile Funktionalisierung von Exosomen mit einem Fotoaffinitätslabel möglich und verhindert dies die Diffusion des eingebrachten Labels aus der exosomalen Membran?

2. Material und Methoden

2.1 Laborgeräte und Materialien

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 2.1: verwendete Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Autoklav	Technoklav50	Technorama, Fernwald
Bildgebendes Durchflusszytometer	Amnis Image Stream [®] X Mark II	Merck, Darmstadt
Block-Heizgerät	Thermo-Mixer C	Eppendorf (Hamburg)
Blotting Modul	Mini Protean	BioRad, München
Blotting Modul	Mini Trans	BioRad, München
Durchflusszytometer	Aria IIu	BD Bioscience, USA
Durchflusszytometer	Canto II	BD Bioscience, USA
Drucker	P93D	Mitsubishi, Ratingen
Feinwaage	CP3202S	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	ApoTome	Zeiss, Oberkochen
Fraktionssammler	Frac-950	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Gel Imaging System	Odyssey [®] CLx	Licor, Bad Homburg
Größenaufschluss-chromatographie	ÄKTAexplorer	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Größenaufschluss-chromatographie	Superose 12 10/300 GL Superose 6 5/150 GL	GE Healthcare, UK
Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR)	Vortex 70	Bruker, USA
Inkubator	Heraeus	Thermo Scientific, Schwerte
Invers-Mikroskop	Axiovert S100	Zeiss, Oberkochen
Konfokalmikroskop	TCS SP8	Leica
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5804R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge	Eppendorf F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Allegra X-22R	Beckman-Coulter, USA
Magnetrührer	RCT basic IKAMAG	IKA-Werke GmbH, Staufen
Microplate Reader	Safire ²	TECAN, Männedorf
Microplate Reader	Tecan Infinite M200	Tecan Group AG, Schweiz
Mikrowelle	Micromat	AEG, Frankfurt am Main
Nano-tracking-analysis	NonoSight LM10	Malvern Panalytical, UK
Netzgerät (Proteingele)	Power Pac Basis	BioRad, München
pH-Meter	CG 840	Schott, Mainz
Fotometer	BioFotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetteboy	Integra Bioscience
Pipette reference	100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference	10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette reference	1 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank	Heraeus® HERASafe®	Thermo Scientific, USA
Speed Vac	Savant™ SPD121P	Thermo Scientific, USA
Tiefkühler (-80°C)	UF80-450S	Colora Messtechnik GmbH
Tiefkühler (-80°C)	TSX Serie	Thermo Scientific, Schwerte
Tischzentrifuge	Mini MC 6	Sarstedt, Nürnbrecht
Sonifikator	Sonifier 250	Branson, Deutschland
Ultrazentrifuge (Rotoren SW40Ti, SW60Ti)	Optima L100XP	Beckmann Coulter, USA
UV-Flächenstrahler	N90	Benda, Wiesloch
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Western Blot Imaging System	ChemiDoc XRS	Bio-Rad, USA
Zellzähler (automatisiert)	Countess™ II	Thermo Scientific, Schwerte
Überkopfschüttler	Rotator	LabMarket, Mannheim

2.1.2 Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: verwendete Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6 well-plate	Thermo Scientific, Schwerte
12 well-plate	Thermo Scientific, Schwerte
48 well-plate	Thermo Scientific, Schwerte
96 Micro Well Optical Bottom Plates	Nunc, Wiesbaden
96 Well Platten Nunc MaxiSorb	Thermo Scientific, Schwerte
μ -slide VI ^{0,4} ibiTreat	ibidi, München
8 well chamber, removable, glass slide	ibidi, München
Einfrierröhrchen Cryo Pure Tubes	Sarstedt, Nürnberg
Einwegpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Bioscience, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikrotiterplatten für qRT-PCR MicroAmp®	Applied Biosystems, Darmstadt
Nitrocellulose-Membran	BioRad, München
PCR-Reaktionsgefäße	Rapidozym, Berlin
Pipettenspitzen (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l) Low Binding Barrier Pipet Tipps	Corning, USA
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
Reaktionsgefäße 300K Filter (1,5 ml)	Pall Life Sciences, USA
Reaktionsgefäße Protein LoBind (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Protein LoBind (2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterile Filter (30 μ m)	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt
Spritzenfilter (0,22 μ m)	Roth, Karlsruhe
Spritzenfilter (0,10 μ m)	Merck, USA
Corning®Costar® Transwell Culture Assay, Porengröße 8 μ m	Merck, USA

Whatman-3 MM Papier	Whatman, Maidstone/UK
Zellkulturflasche T75	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflasche T175	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugen Filter Ultracel-15 (100K)	Merck, USA
Zentrifugen Röhren (14 x 95 mm) Polypropylene / Ultra-Clear	Beckmann Coulter, USA
Zentrifugen Röhren (11 x 60mm) Polypropylene / Ultra-Clear	Beckmann Coulter, USA

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, stammten von den folgenden Firmen: Fermentas (St. Leon-Rot), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Promega (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Hamburg) SouthernBiotech (USA) und Thermo Scientific (Schwerte).

2.1.4 Antikörper und Farbstoffe

Tabelle 2.3: verwendete Primär- und Sekundäntikörper

Bezeichnung	Firma	Kat.Nr / Quelle
Primäntikörper		
anti-mouse		
anti-Actin, clone C4	Merck	MAB1501
anti-Calnexin	BD Bioscience	610523
anti-Flottelin1	BD Bioscience	610820
anti-GM130	BD Bioscience	610822
anti-LSAMP	avivasysbio	41089
anti-POM1	A. Aguzzi, Schweiz	175
anti-POM2	A. Aguzzi, Schweiz	175
anti-TSG101	GeneTex	GTX70255
anti-6E10	Covance	SIG-39320-500
Mob 410	Diagnostic BioSystems	MOB410
anti-rabbit		
anti-CD9	Santa Cruz	SC-18869

anti-CD9-FITC	eBioscience	11-0091-81
anti-CD63	Santa Cruz	SC-15363
anti-CD81 (TAPA1)	Abcam	ab109201
anti-CD81-PE (TAPA1)	Invitrogen	16-0811-82
anti-Histon H3	Cell signaling	9715
anti-LGALS3BP	Abcam	ab156081
anti-LRP1	Abcam	ab92544
anti-mGluR5	Abcam	ab76316
anti-NMDAR2B	Millipore	ab1557
anti-PDI	Stress Marq	SPC-114
anti-Iba1	Wako	013-27691
anti-goat		
anti-GFP	Novus	NB100-1770
anti-rat		
anti-mGluR1-5	Invitrogen	PA1-4663
anti-human		
anti-CD9-FITC	BioLegend	312103
anti-CD63-FITC	BioLegend	353005
anti-CD81-FITC	BioLegend	349503
	Sekundärantikörper	
donkey-anti-mouse Alexa 790	Invitrogen	A11371
goat-anti-mouse Alexa 680	Invitrogen	A28183
goat-anti-rabbit Alexa 680	Invitrogen	A21109
goat-anti-rabbit Alexa 790	Invitrogen	A27041
chicken-anti-rabbit Alexa 647	Invitrogen	A21441
donkey-anti-goat Alexa 555	Invitrogen	A21432
donkey-anti-mouse Alexa 488	Invitrogen	A21202
rabbit-anti-goat Alexa 680	Thermo Fisher	A27020

Tabelle 2.4: verwendete Farbstoffe

Bezeichnung	Fluorochrom	Firma
PKH26	PKH26	Merck, USA
R87	Rohdamin B	Can GmbH, Hamburg

2.1.5 Kits

Tabelle 2.5: verwendete Kits

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
MWGF200-1KT Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12000 – 200000 Da	Gelchromatografie	Sigma-Aldrich, USA
qEVOoriginal Size Exclusion Columns	Vesikelisolation	IZON science, Neuseeland
Zenon™Alexa Fluor™ 647 Mouse IgG1 Labeling Kit	Fluoreszenzskopplung primärer Antikörper	Thermo Scientific, Schwerte
Zenon™Alexa Fluor™ 750-Allophycocyanin Mouse IgG1 Labeling Kit	Fluoreszenzskopplung primärer Antikörper	Thermo Scientific, Schwerte

2.1.6 Agentien

Für die im Folgenden beschriebenen zellbiologischen Experimente wurden die nachfolgenden Agentien verwendet:

Tabelle 2.6: verwendete Agentien

Bezeichnung	Hersteller
rekombinantes humanes A β ₁₋₄₂	GenicBio, China
rekombinantes humanes A β ₁₋₄₂	rPeptide, USA
Protease-Inhibitor (cOmplete Tablets, Mini EDTA-free, EASYpack)	Roche, Schweiz

2.1.7 Software

Zur Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden die folgende Software verwendet:

- AxioVision (Zeiss)
- Excel 2016 (Microsoft)
- FACS Diva 6 (BD Pharmingen)
- Fiji (GPL v2)
- IDEAS® 6.2 (Merck)
- Image Studio 5.2 (Licor)
- IMARIS (Bitplane)
- INSPIRE® (Merck)
- LAS X (Leica)
- NTA 3.0 0064 (Malvern Instruments Ltd.)
- Powerpoint 2016 (Microsoft)
- Primusqt (ATSAS Team, EMBL, Hamburg)
- Prism5 (GraphPad)
- PyMOL (Schrödinger)
- SciDAVis 1.23 (Tilman Benkert)
- Word 2016 (Microsoft)
- QuantStudio™ (Thermo Fisher Scientific)

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tabelle 2.7: murine Zelllinien

Zelllinie	Spezifität	Medium
Neuro2a (N2a-WT)	albino Neuroblastoma-Zellen	DMEM + 10% FBS
N2a-WT-GFP	stabile Transfektion mit GFP	DMEM + 10% FBS
N2a-PrP ^{0/OT} -GFP	Prion-Protein <i>knock-out</i> (TALEN), stabile Transfektion mit GFP	DMEM + 10% FBS
N2a-PrP ^{0/0}	Prion-Protein <i>knock-out</i> (Crisper Cas)	DMEM + 10% FBS
N9-WT	immortalisierte Mikroglia-Zellen	RPMI mit GlutaMAX™ + 10% FBS

2.2.2 Nährmedien

Für die Kultivierung muriner N2a-Zellen wurde DMEM (1x) (Dulbeccos's Modified Eagle Medium, gibco® by Life Technologies™) genutzt. Zur Kultivierung von murinen N9.WT-Zellen wurde 1x RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, GlutaMAX™) verwendet. Die Medien basieren auf einer Lösung aus Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen sowie für die Zellen wichtigen Inhaltsstoffen wie Mineralien und Hormonen. Dem Medium wurden 10 % FBS (Fetal Bovin Serum High Quality, PAA Laboratories GmbH) zugesetzt. Für die Isolation von Exosomen wurde für die Medien 10 %iges Exo-FBS™ (Exosome-Depleted Fetal Bovine Serum, ATLAS Biologicals) genutzt. Die Medien enthalten des Weiteren den pH-Indikator Phenolrot, mit dessen Hilfe der pH-Wert extrapoliert werden kann.

2.2.3 Subkultivierung eukaryontischer Zellen

Nach Erreichen einer relativen Zelldichte in den Zellkulturflaschen wurden diese passagiert. Hierzu wurde das verbrauchte Medium mit Hilfe einer Glaspipette und einer Absaugvorrichtung von den Zellen entfernt. Diese wurden im nächsten Schritt mit 5 – 10 ml 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Die Zugabe von 1 ml einer 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technologies) und einer Inkubation von etwa 2 min bei 37°C und 5 % CO₂ führt zu einer Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche. Die Zellsuspension wurde in einer definierten Menge Medium aufgenommen und für die anschließende Subkultivierung mit einer spezifischen Zellzahl auf eine neue, mit frischem Medium vorgelegte Zellkulturflasche gegeben und nach vorsichtigem Schwenken im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung spezifischer Zellmengen wurde mit Hilfe eines automatisierten Zellzählers durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich eine Trypan Blau Färbung (0,4 %, life technologies) durchgeführt, welche Informationen zur Zellvitalität liefert.

2.2.5 Kryokonservierung und Aussaat eukaryontischer Zellen

Zur längerfristigen Lagerung der verwendeten Zelllinien erfolgte eine Kryokonservierung bei -80°C. Hierfür wurde das Nährmedium abgenommen, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mittels 1 ml 1x 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden die in frisches Medium aufgenommenen Zellen bei 1000 UpM für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde

vom Zellsediment abgenommen und die Zellsuspension in Medium, welches 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) und 50 % FBS enthält, resuspendiert. Dieses wurde in Kryoröhrchen (1,5 ml oder 2 ml) überführt und in einem speziellen Behälter (Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing Container, NALGENE) mit Isopropylalkohol bei -80°C eingefroren. Das im Kryomedium enthaltene DMSO schützt die Zellen, indem es die Bildung von Eiskristallen im Zelllumen verhindert.

Das Auftauen von Zellen erfolgte in möglichst kurzer Zeit, da das im Medium enthaltene DMSO zu einer Zellschädigung führen kann. Die kryokonservierten Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und schnellstmöglich in 10 ml frisches DMSO-freies Nährmedium aufgenommen. Es folgt eine Zentrifugation bei 1000 UpM für 5 min, wobei der Überstand verworfen und das Zellsediment in frischem Medium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen gegeben wurde. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.2.6 Isolation von Exosomen

2.2.6.1 aus eukaryontischer Zellkultur

Exosomen gehören zu den extrazellulären Vesikeln und werden von den kultivierten Zellen in das Kulturmedium sezerniert. Die Zellkultivierung erfolgte für 48 h in DMEM + 10% Exo-FBS™. Daraufhin wurde das Medium in 50 ml Falcon-Tubes gesammelt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Das Medium wurde bei 1000 Upm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Falcon-Tube überführt und einer weiteren Zentrifugation bei 4.500 x g für 10 min unterzogen. Anschließend wurde das Medium durch einen 0,22 µm und einen 0,1 µm PVDF Spritzenfilter filtriert und in ein neues 50 ml Falcon-Tube überführt. Wenn nötig, erfolgte eine Konzentration des Mediums mit Hilfe von 100K Zentrifugationsfiltern, um das Volumen des Mediums zu verringern. Das vorbehandelte Medium wurde in Pollyallomer Zentrifugationsröhrchen überführt und einer Ultrazentrifugation bei 100.000 x g für 70 min unterzogen, um die Exosomen zu pelettieren. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Exosomenpellets in 1mM HEPES mit Protease-Inhibitor resuspendiert. Die isolierten Exosomen wurden daraufhin mittels einer Nanopartikel-tracking-Analyse quantifiziert. Die Lagerung der Exosomen erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

2.2.6.2 aus Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor, CSF), Blutserum und Blutplasma

Die Isolation von Exosomen aus den angegebenen Körperflüssigkeiten erfolgte auf Eis bzw. bei 4°C. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:2 mit 1mM HEPES verdünnt und einer 2.000 x g Zentrifugation unterzogen. Der Überstand wurde in ein neues Probengefäß überführt und bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nacheinander über einen 0,22 µm und einen 0,1 µm PVDF Spritzenfilter filtriert. Es erfolgte eine Konzentration der Probenlösung auf ca. 0,5 ml mit Hilfe des Zentrifugen Filter Ultracel-15 (100K) (Merck, USA) bei 5.000 x g für 15 min. Daraufhin erfolgte die Auftrennung von Vesikeln und Proteinen mittels „qEVoriginal Size Exclusion Columns“ (IZON science, Neuseeland) nach Angaben des Herstellers. Vesikel enthaltende Fraktionen wurden vereint und einer Ultrazentrifugation bei 120.000 x g für 2 h unterzogen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Exosomenpellets in 1mM HEPES mit Protease-Inhibitor resuspendiert. Die isolierten Exosomen wurden daraufhin mittels einer Nanopartikel-tracking-Analyse quantifiziert. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

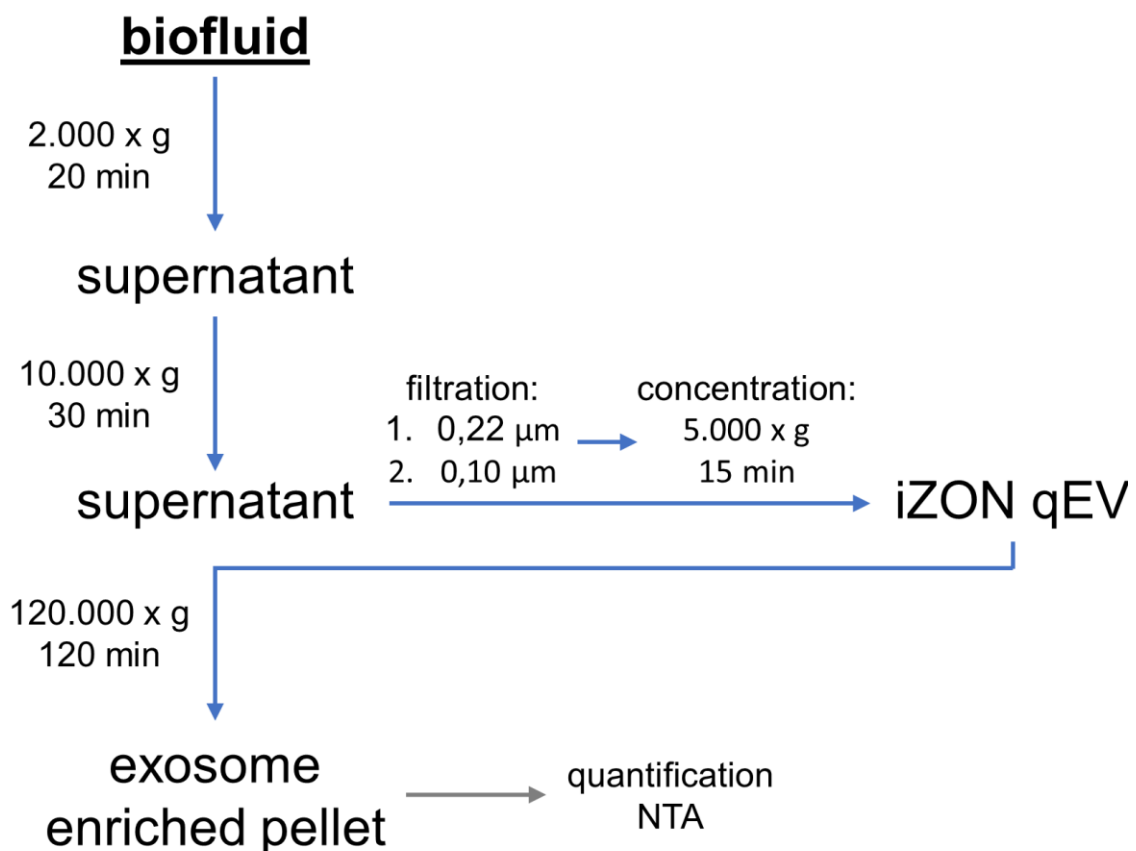


Abbildung 2.1: Ablaufschema der Isolation von Exosomen aus Körperflüssigkeiten.

(modifiziert nach Akers *et al.*, 2016) ¹⁷⁶

2.2.7 Nanopartikel-tracking-Analyse

Zur Quantifizierung und Charakterisierung von isolierten Exosomen wurde eine Nanopartikel-tracking-Analyse, mit Hilfe des NanoSight LM10 (Malvern Instruments, NanoSight NTA 3.0 Build 0064) durchgeführt. Dieses ist mit einem 638 nm Laser und einer Marlin F-033B IRF Kamera ausgestattet. Die zu quantifizierende Probe wurde zunächst auf eine Konzentration zwischen 1×10^6 - 2×10^9 Partikel/ml verdünnt. Dies entspricht einer Konzentration, mit welchen Analysen am NanoSight durchgeführt werden können. Hierbei wurden die Größe (Messbereich: 10 nm – 1000 nm) und die Partikelmenge/ml bestimmt. Eine zu hohe oder zu niedrige Konzentration der Proben führt zu stark verfälschten Ergebnissen. Mindestens 300 μ l der verdünnten Probenlösung wurde mit Hilfe einer 1-ml-Spritze in die Messkammer injiziert und Videos der Proben bei einer Kameraintensität von 16 aufgenommen. Die Anzahl und Länge der aufgenommenen Videos hängt von der Partikelkonzentration der zu vermessenden Probe ab. Es wurden mindestens fünf Videos mit einer Länge von 10 s, 30 s. oder 60 s aufgezeichnet und in einem Batch-Prozess ausgewertet.

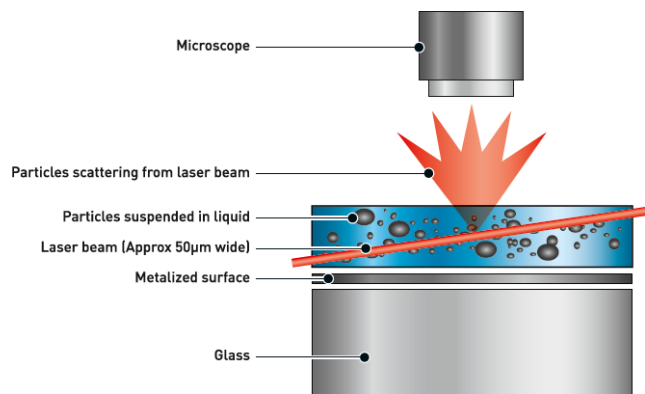
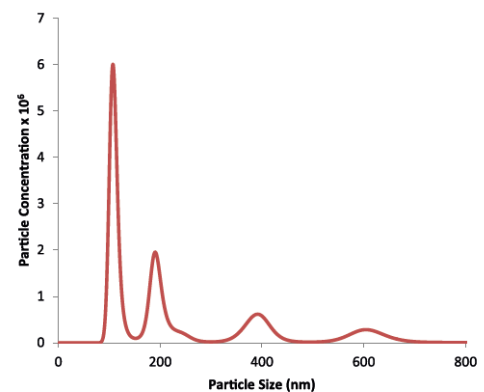


Diagram of the NanoSight NTA system.



Graph showing NTA particle size and concentration measurement of a sample, with distinct peaks at 100 nm, 200 nm, 400 nm and 600 nm.

Abbildung 2.2: Funktionsgrafik NanoSight

(Malvern Instruments Limited © 2016 MRK 1984-03)

2.2.8 Bildgebende Durchflusszytometrie

Für die Analyse der isolierten Exosomen und dem Nachweis des A β ₁₋₄₂-Exosomen Komplexes wurde die bildgebende Durchflusszytometrie (Image Stream[®]X Mark II, Merk, USA) verwendet. Die isolierten Exosomen (2.2.6) wurden mittels NTA (2.2.7) analysiert. Pro Einzelprobe wurden 1×10^9 - 11 Exosomen verwendet und entsprechende

Triplikate vorbereitet. Die Färbung der Exosomen erfolgte mittels spezifischer FITC gekoppelten Antikörpern gegen exosomale Oberflächenproteine (human = CD9, CD63, CD81; murine = CD9 (2.1.4). A β ₁₋₄₂ wurde mittels des primären 6E10 Antikörpers (2.1.4) nachgewiesen. Der 6E10 Antikörper wurde zuvor mit Hilfe des Zenon™Alexa Fluor™ 647 oder 750 Mouse IgG1 Labeling Kit (Thermo Scientific, Schwerte; 2.1.5) direkt fluoreszent gekoppelt. Das Volumen der Exosomenproben wurde auf 15 μ l eingestellt, dazu wurden 3 μ l der jeweiligen Antikörper und des 0,22 μ m filtriertem 1mM HEPES Puffers mit 8% Exosomen freiem FCS verwendet. Die Inkubation der Antikörper erfolgte für 45 min bei RT im Dunklen. In einem 300K Filter Reaktionsgefäß (Pall Life Sciences, USA) wurden 500 μ L eines 0,22 μ m filtrierten 1mM HEPES Puffers mit 2% Exosomen freiem FCS vorgelegt und die Proben dazugegeben. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4500 x g für 10 min bei 4°C. Die Exosomen wurden vom Filter in 25 μ L des 0,22 μ m filtriertem 1mM HEPES Puffers mit 2% Exosomen freiem FCS aufgenommen und für die bildgebende Durchflusszytometrie verwendet. Es wurden 3.000 – 5.000 Exosomen pro Probe vermessen und mit der IDEAS-Software quantifiziert.

2.2.9 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zunächst wurden 4.000 der zu untersuchenden Zellen in einem μ -Slide VI^{0,4} (ibidi) oder 6.000 Zellen in einen 8-well-chamber-Slide (ibidi) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen zunächst dreimal mit 1x PBS gewaschen und mittels 4% PFA für 20 min bei 37°C fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit 1x PBS gewaschen. Für die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte eine Inkubation der Zellen mit 0,2% Triton X-100 für 10 min auf einem Schüttler. Danach wurden die Zellen mit 1x TBST gewaschen. Um unspezifische Bindestellen zu sättigen erfolgte das Blocken mit Blocking Puffer (Protein-Free Blocking Buffer - TBST GBioscience, USA) für 1 h auf einem Schüttler. Anschließend wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit 1x TBST für jeweils 10 min gewaschen und anschließend mit einem Sekundärantikörper für 90 min inkubiert. Die Zellen werden 10 min in 1x TBST gewaschen. Die nun gefärbten Proben wurden mit Flouromount-G® (SouthernBiotch), welches DAPI zur Zellkernfärbung enthält, eingedeckelt. Die Dokumentation der Proben erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie (TCS SP8, Leica). Die Daten wurden mittels der Software Fiji quantifiziert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Proteinisolierung

Die Zellen wurden geerntet, abzentrifugiert (10 min bei 1.000 x g) und aus dem Zellpellet ein Zelllysate nach dem folgenden Ansatz erstellt:

Ansatz Proteinisolierung

<i>RIPA</i>	<i>90 µl</i>
<u><i>10x Protease- und Phosphatase-Inhibitor (Roche)</i></u>	<u><i>10 µl</i></u>
	<i>100 µl</i>

Dafür wurde das Zellpellet in dem Proteinisolierungspuffer resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C für 15 min mit 13.000 rpm. Die Proteine befanden sich im Überstand, welcher in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde.

RIPA-Puffer (Lagerung bei 4°C)

<i>Tris (1 M, pH 7,2)</i>	<i>5 ml</i>
<i>NaCl (5 M)</i>	<i>3 ml</i>
<i>SDS (10%)</i>	<i>1 ml</i>
<i>Natriumdeoxycholat</i>	<i>1 g</i>
<u><i>Triton X-100</i></u>	<u><i>1 ml</i></u>
<i>ddH₂O</i>	<i>ad 100 ml</i>

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Hiermit lässt sich die quantitative Gesamtproteinkonzentration des Proteinisolates bestimmen. Dies erfolgte mittels einer spektrofotometrischen Bestimmung des Farbstoffes Triphenylmethan (Comassie-Brilliant-Blau G-250) bei 595 nm. In einem sauren Milieu bilden sich Komplexe mit kationischen sowie hydrophoben Seitenketten der Proteine. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des ungebundenen Farbstoffes von 470 auf 595 nm, welche mit Hilfe eines ELISA-Reader (Safire² (Tecan)) gemessen werden kann und als Maß für die Proteinkonzentration

dient. Anhand des Vergleichs mit einem parallel gemessenen Konzentrationsstandard kann der Proteingehalt der Probe bestimmt werden.

Hierfür wurde die *Quick Start Bradford Protein standard solution* (Bio-Rad) verwendet. Die Bestimmung erfolgte in einer Dreifachbestimmung. 1 µl des Zellysats wurde 1:10 mit ddH₂O verdünnt und 200 µl Bradford-Reaktionslösung zugesetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT, woraufhin die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt wurde. Die Eichkurve wurde mit einer Konzentrationsreihe des Albumin-Standards (BSA, Thermo Scientific) erstellt.

2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine spezielle Form der Gelelektrophorese. Isoelektrisch fokussierte Proteine werden hierbei in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteine werden mittels Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und negativ geladen. Die so aufgetrennten Proteine können anschließend für weitere Detektionsmethoden, wie z.B. den Western Blot, verwendet werden.

Die genutzten Gele bestehen aus zwei Komponenten: dem Sammel- und dem Trenngel. Zunächst wurden 7,5 ml Trenngel in die Kammer gegossen, mit Isopropanol überschichtet und auspolymerisiert. Das Isopropanol wurde abgenommen und die Gelkammer bis zum oberen Rand mit dem Sammelgel aufgefüllt sowie ein Probenkamm vorsichtig eingesteckt. Dieser wird nach der Polymerisierung des Gels entfernt. Das Gel kann nun mit den Proben, welche zuvor mit 10x CVL-Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert wurden, beladen werden. Zusätzlich wurde ein Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) zur Bestimmung der Proteingröße mitgeführt. Die SDS-PAGE wurde mit einer konstanten Spannung von 60 V bis zum Erreichen des Trenngels gestartet. Daraufhin erfolgte die Erhöhung der Spannung auf 100 V. Die Zusammensetzung der Gele und Puffer ist im folgendem aufgelistet:

10x SDS-Laufpuffer

<i>Tris</i>	<i>30 g</i>
<i>Glycin</i>	<i>144 g</i>
<u><i>SDS (Pellets)</i></u>	<u><i>10 g</i></u>
<i>ddH₂O</i>	<i>ad 1000 ml</i>

Sammelgel-PufferTris (1,5 M) 60,55 gddH₂O *ad 1000 ml*Trenngel-PufferTris (1,5 M) 181,65 gddH₂O *ad 1000 ml*SDS-Probenpuffer (10xCVL)

Tris/HCl (pH: 6,8) 10 mM

SDS 2,00 %

Glycerol 10,00 %

 β -Mercaptoethanol 5,00 %

Bromphenolblau 0,01 %

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der 1D-Gele

Substanz	Sammelgel (4%)	Trenngel (8%)	Trenngel (12%)
Acrylamid (40%)	1,3 ml	2,66	4 ml
Sammelgelpuffer	2,5 ml	-	-
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml
<i>A.dest</i>	6,1 ml	4,69 ml	3,35 ml
SDS	-	100 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l
APS (10%)	100 μ l	100 μ l	100 μ l

2.3.4 SDS-PAGE in 4 – 12%igen Bis-Tris-Gradientengelen

Soll ein hohes Größenspektrum an Proteinen in einer SDS-Page aufgetrennt werden, können die 4%- oder 8%-Gele nicht verwendet werden. Für eine Detektionsbereich von Proteinen von 3,5 – 160 kDa eignet sich die Verwendung von 4 – 12%igen Bis-Tris-Gradientengelen (Novex®) unter Verwendung eines MES/SDS-Laufpuffers. Die Probenvorbereitung erfolgte hierbei analog der Standard-SDS-PAGE. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200 V in einer mit MES/SDS-Laufpuffer gefüllten Gelkammer.

Tabelle 2.9: MES/SDS-Laufpuffer

Substanz	
MES	1 M
Tris-Base	1 M
SDS	69,3 mM
EDTA	20,5 mM
Deoxycholate	0,5 %
A. dest (ph:7,8)	1 L

2.3.5 Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens wird es ermöglicht spezifische Proteine nach einer erfolgreichen SDS-PAGE nachzuweisen. Die aufgetrennten Proteine werden mittels eines *Tank-Blot-Systems* von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine 0,2 µm Nitrocellulose-Membran übertragen. Durch spezifische primäre und Fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern wurden die Proteine im *Odyssey[®] CLx* (Licor) visualisiert. Zunächst wurden die Nitrozellulose-Membran, das Whatman[®]-Filterpapiers sowie des SDS-Gels in 1x Transfer-Puffer äquilibriert. Das *Tank-Blot-System* wurde wie vom Hersteller (BioRad) vorgeschrieben, aufgebaut. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte für 70 min konstant bei 250 mA bei einem Gel oder 400 mA bei zwei Gelen. Sollte das Aβ-Protein detektiert werden, wurde die Nitrocellulose-Membran im Anschluss für 3 min in kochendem 1x TBS (*Tris buffered saline*) zur weiteren Denaturierung inkubiert. Es erfolgt ein Blocken der Membran zur Reduktion unspezifischer Bindestellen für 60 min in 1x Roti-Block-Lösung (Licor, Bad Homburg) in 1x TBST (*Tris buffered saline with Tween[®] 20*) oder alternativ 5%iger Milchlösung in 1x TBST. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem spezifischen Primärantikörper in 1x Roti-Block-Lösung inkubiert. Es folgte ein dreimaliges waschen der Membran mit 1x TBS für jeweils 5 min. Daraufhin wird der Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper in 1x Roti-Block-Lösung für 90 min bei 4°C auf der Membran inkubiert, gefolgt von einem weiteren dreifachen Waschschrift mit 1x TBS. Die so behandelte Membran wurde anschließend im *Odyssey[®] CLx* visualisiert.

1x Transfer-Puffer

<i>Tris</i>	5,82 g
<i>Glycin</i>	2,93 g
<u><i>Methanol</i></u>	<u>200,00 ml</u>
<i>ddH₂O</i>	<i>ad 1000,00 ml</i>

10x TBS/TBST (pH 7,6)

<i>Tris</i>	24,2 g
<i>NaCl</i>	80,0 g
<u><i>Tween® 20 (nur für TBST)</i></u>	<u>1 %</u>
<i>ddH₂O</i>	<i>ad 1000 ml</i>

2.3.6 Präparation des synthetischen A β ₁₋₄₂ (sA β ₁₋₄₂) -Peptide

Lyophilisiertes synthetisches HFIP vorbehandeltes A β ₁₋₄₂-Peptid wurde von rPeptide (USA) bzw. GenicBio (China) verwendet.

2.3.6.1 Präparation von sA β ₁₋₄₂-Monomeren (sA β ₁₋₄₂M)

Zur Herstellung einer bevorzugt monomeren sA β ₁₋₄₂-Lösung wurden 1 mg des lyophilisierten Peptides in 110 μ l DMSO gelöst und für 15 min bei RT in einem Wasserbad mittels Ultraschall sonifiziert. Das gelöste sA β ₁₋₄₂M (2 mM) wurde direkt verwendet oder aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.6.2 Präparation von sA β ₁₋₄₂-Oligomeren (sA β ₁₋₄₂O)

Für die Präparation einer sA β ₁₋₄₂O-Lösung wurde 1 mg des lyophilisierten Peptides zunächst in 500 μ l (2 mg/ml) bzw. 1 ml (1 mg/ml) in 1 mM HEPES/dH₂O-Puffer mit 0,12% Nh₄OH gelöst und für 15 min bei RT in einem Wasserbad mittels Ultraschall sonifiziert. Es folgte eine Inkubation der Probe bei 37°C und 1400 rpm in einem Heizblock für 1h. Des Weiteren erfolgte eine Inkubation über 24 h bei RT. Abschließend wurde die sA β ₁₋₄₂O-Lösung dreimal bei -80°C eingefroren und anschließend aufgetaut. In der so vorbehandelten Probe liegen alle Aggregationsformen von A β ₁₋₄₂ vor. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Verwendung.

2.3.7 sA β ₁₋₄₂-Exosomen-Bindungsassay

Mit dieser Methode wird die Bindung von sA β ₁₋₄₂ an exosomales PrP_C forciert. Eine spezifische, zuvor bestimmte Anzahl an isolierten Exosomen werden mit einer spezifischen Konzentration sA β ₁₋₄₂M bzw. sA β ₁₋₄₂O in 500 μ l 1mM HEPES-Puffer mit Protease-Inhibitor gemischt. Hierbei wurden spezielle Protein LoBind (1,5 ml) Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Der Ansatz wurde für mind. 16 h in einem Rotator bei 4°C und 15 rpm inkubiert. Um ungebundenes sA β ₁₋₄₂ aus der Probenlösung zu entfernen, wurde eine Zentrifugation der Proben durch einen 300K Filter (Pall Life Sciences, USA) für 10 min mit 15 rpm bei 4°C durchgeführt. Exosomen sowie an die Exosomen gebundenes sA β ₁₋₄₂ kann den Filter nicht passieren. Der sA β ₁₋₄₂-Exosomen-Komplex wurde in 25 μ l 1 mM HEPES-Puffer mit Protease-Inhibitor resuspendiert. Für die direkte Verwendung des sA β ₁₋₄₂-Exosomen-Komplex in einer SDS-Page erfolgte die Resuspension mittels 50 μ l RIPA-Puffer.

2.3.8 Größenaufschlusschromatographie (SEC)

Bei der Größenaufschlusschromatographie (SEC, engl.: *Size Exclusion Chromatography*) werden die Proteine nach ihrer Größe bzw. ihrem hydrodynamischen Radius aufgetrennt. Es wurde ein Äkta-Explorer System (GE Healthcare) bzw. 1260 Infinity Bio-Inert HPLC/FPLC (Agilent, USA) mit einer Superose™ 12 10/300 GL Säule oder einer „Superose™ 6 5/150 increase“-Säule verwendet. Größere Proteine können nicht in die Säulenmatrix eindringen und eluieren daher zuerst. Kleinere Partikel dringen in die Säulenmatrix ein, werden länger in der Säule zurückgehalten und eluieren zu einem späteren Zeitpunkt. Anhand von Proteinen mit standardisiertem Molekulargewicht wurde eine Kalibrierungskurve erstellt (MWGF200-1KT *Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12.000 – 200.000 Da*, Sigma-Aldrich), welche Rückschlüsse auf das Molekulargewicht aufgrund des Elutionszeitpunktes zulässt.

2.3.9 ATR-FTIR

Die ATR (engl. *attenuated total reflection*) -Infrarotspektroskopie wurde an einem Vertex 70 (Bruker, USA) mit einer Standard-Infrarotquelle und einem mit flüssigem Stickstoff gekühltem Detektor durchgeführt. Ausgestattet ist dieser mit einer temperaturkontrollierten Zinkselenid-Kristall Bio-ATR II Zelle. Messungen wurden mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} unter Verwendung einer Blackman-Harris-3-

Apodisierungsfunktion im Bereich von $4.000 - 900 \text{ cm}^{-1}$ durchgeführt, wobei der Durchschnitt 128 Scans pro Spektrum betrug und das Signal einer Leermessung davon abgezogen wurde. Als Proben dienten hierbei $sA\beta_{1-42}M$ und $sA\beta_{1-42}O$ (siehe 2.4.6) sowie Exosomen welche aus N2a.WT und N2a-PrP^{0/0} isoliert wurden. $sA\beta_{1-42}O$ Proben wurden nach Protokoll angesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten der Oligomerisierung vermessen. Mit $sA\beta_{1-42}M$ wurden $sA\beta_{1-42}$ -Exosomen-Bindungsassays (siehe 2.4.7) durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten der Oligomerisierung vermessen.

2.3.10 Small angle X-ray scattering (SAXS)

Kleinwinkel-Röntgenstreuungs-Messungen wurden am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Zusammenarbeit mit dem European Molecular Biology Laboratory (EMBL) an der Beamline P12 in Hamburg durchgeführt. Als Strahlenquelle diente der Petra III Speicherring mit einem Elektronenstrom von 89,7 mA. Für die Probenanalysen wurde entweder der Stapelverarbeitungsmodus mit einem automatischen Probenwechsler (Arinax) oder der SEC-SAXS-Modus (on-line Agilent 1260 Infinity Bio-Inert HPLC/FPLC System) mit einem Detektorabstand von 3,1 m verwendet. Die Fotonenenergie lag bei 10 keV entsprechend einer Wellenlänge von 0,124 nm. Der Strahlquerschnitt an der Probe betrug $0,35 \times 0,35 \text{ mm}$. Dies resultierte in einen Streuungsvektorbereich von $1,71 * 10^{-2} < s < 7,25 \text{ nm}^{-1}$, kalibriert durch einen Silberbehenat-Standard. Die Messungen erfolgten unter Verwendung eines 1,7 mm Quarzglas kapillargefäßes bei 20°C. Zur Detektion wurde ein Pilatus 6M Foton-counting Detektor mit einer Energieschwelle von 5 keV verwendet. Die Streuungsintensität wurde anhand der Standardstreuung von Wasser kalibriert. Die Belichtungszeit der Proben im Stapelverarbeitungsmodus lag bei $100 \times 0,05 \text{ s}$ Frames integriert in 5 s bei einer Flussrate von 40 – 50 μl der Probe durch die Kapillare mit automatischer Überprüfung auf Strahlenschädigung der Probe. Im SEC-SAXS-Modus betrug die Belichtungszeit 1 s pro Frame. Die initiale online Datenverarbeitung erfolgte durch SASFLOW und die vorläufige Datenevaluation unter Verwendung von PRIMUS und der ATSAS suite.

Als Proben dienten hierbei $sA\beta_{1-42}M$ und $sA\beta_{1-42}O$ (siehe 2.4.6) sowie Exosomen, welche aus N2a-WT und N2a-PrP^{0/0} isoliert wurden. $sA\beta_{1-42}O$ Proben wurden nach Protokoll angesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten der Oligomerisierung schockgefroren und im Batchmodus sowie im SEC-SAXS-Modus vermessen. Mit

sA β ₁₋₄₂M wurden sA β ₁₋₄₂-Exosomen-Bindungsassays (siehe 2.4.7) durchgeführt und zu verschiedenen Zeitpunkten der Aggregation schockgefroren. Die Exosomen wurden hierbei vor der Messung der Probe durch eine Zentrifugation der Proben durch einen 300K Filter für 15 min und 15 rpm für 15 min abgetrennt. Die so vorbereiteten Proben wurden im Batchmodus sowie im SEC-SAXS-Modus vermessen.

2.3.11 MALDI-TOF

MALDI-TOF Messungen wurden durch die MS-Abteilung (MS = Massenspektrometrie) der Universität Hamburg durchgeführt. Die Proben wurden nach den Angaben der MS-Abteilung vorbereitet und am MALDI TOF-TOF Bruker UltrafleXtreme Smartbeam II Laser vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die MestreNova 10.0 (ESI) und Bruker flexanalysis 3.3 (MALDI) Software.

2.4 Fotochemische Funktionalisierung von Exosomen

Das Fotoaffinitäts Label R87 wurde von dem Fraunhofer-Zentrum für Angewandte Nanotechnologie CAN entwickelt, erstellt und bezogen. Experimente zur Fotochemischen Funktionalisierung von Exosomen wurden am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für Neuropathologie in Kooperation mit Dr. O. Dabrowski (CAN) durchgeführt.

2.4.1 Funktionalisierung von Exosomen

Für die longitudinale stabile Funktionalisierung der Oberfläche von Exosomen wurden die Fotoaffinitätslabel R51 und R87 verwendet. Die verwendeten Exosomen wurden von N2a-WT-Zellen sezerniert und isoliert. Der lipophile Charakter des R51 und R87 Moleküls ermöglicht die Integration des Fotoaffinitätslabels in die exosomale Membran. Zur Überprüfung der Eigenschaften dieser diente der etablierte Membranfarbstoff PKH26 als Vergleich.

Die Färbung der Exosomen mit PKH26 erfolgte zunächst nach Angaben des Herstellers. Die Verwendung von R51 und R87 (0,3 μ M je 1×10^8 Exosomen) wurde an dieses Protokoll angepasst. Die wesentlichen Schritte hierbei waren:

- 1) Inkubation der Exosomen mit Diluent C
- 2) Zugabe des Farbstoffs (PKH26, R87)
- 3) blocken der Reaktion mit fetalem Kälberserum (FCS)
- 4) Aufreinigung des Ansatzes mittels OptiPrep™ Dichtegradienten
- 5) Isolation der gefärbten Exosomen aus den entsprechenden Fraktionen mittels Ultrazentrifugation

Für die Färbung wurde eine Anzahl $2,3 \times 10^9$ N2a-WT-Exosomen verwendet.

Zur fotochemischen Verankerung von R51 und R87 erfolgte eine Bestrahlung der Ansätze mit UV-A bzw. UV-C Strahlung zwischen den Schritten 3) und 4). Die Bestrahlung erfolgte in einer Quarzglasküvette in einem Fotoreaktor (Eigenbau des CAN; vier Leuchtmittel PL-S 9W BLB/2P (Philips, Niederlande) mit je 1.65 W UV-A Leistung 18%) bei konstant 37°C bzw. einer Sterilwerkbank, welche mit einer UV-Quelle (HNS 15W OFR (Osram, München) mit einer UV-C Leistung von 4 W 27%) ausgestattet ist bei RT. Die Bestrahlung erfolgte in unterschiedlicher Dauer.

Im Verlauf der Arbeit erfolgte eine Optimierung des Färbeprotokolls. Die Inkubation mit Diluent C, das Blocken mit FCS und der Dichtegradient wurden hierbei nicht durchgeführt. Die *fotochemische* Verankerung erfolgte unter UV-C Strahlung bei unterschiedlicher Dauer. Die gefärbten Exosomen wurden mittels NTA und konfokaler Mikroskopie analysiert.

2.4.2 Exosomen-uptake-Assay

Zur Überprüfung, ob das Fotoaffinitätslabel longitudinale stabil an die exosomale Membran verankert ist, wurden N2a-WT-Zellen (bzw. N2a-WT-palm-GFP) mit den funktionalisierten Exosomen inkubiert. In einem μ -Slide VI0,4 (ibiTreat) wurden pro Kanal wurden $4,5 \times 10^3$ N2a-WT-Zellen ausgesät, über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend mit $2,5 \times 10^8$ gefärbten Exosomen über Nacht inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für die immunfluoreszente Mikroskopie, wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben, vorbereitet. Für die Färbung der N2a-WT-Zellen wurde der Primärantikörper anti-POM2 (1:100) und der Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 (1:50) verwendet. Eingedeckelt wurden die gefärbten Zellen mit DAPI Fluoromount-G®.

2.5 Tierversuche

2.5.1 stereotaktische Injektion

Die stereotaktischen Injektionen wurden von Prof. M. Glatzel und Dr. S. Krasemann entsprechend veröffentlichten Protokollen ausgeführt^{23,177}. Die Betäubung der Mäuse erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamine (100 mg/kg⁻¹), Xylazine (10 mg/kg⁻¹) and Acepromazine (3 mg/kg⁻¹). Stereotaktische Injektionen erfolgten in das *Cauda/Putamen* von C57BL/6 Mäusen in beide Hemisphären anhand der folgenden Koordinaten ausgehend vom Bregma: 0,8 mm anterior-posterior, 2,2 und -2,2 mm medial-lateral, sowie 3,6 mm dorsal-ventral. Injiziert wurden 2,5 µl einer Exosomen-, Aβ₁₋₄₂- oder Exosomen + Aβ₁₋₄₂-Lösung in 1mM HEPES. Zur Fixierung und Ausrichtung der Mäuse wurde ein stereotaktischer Rahmen verwendet. Injiziert wurde mit einer 26-gauge Mikroliterspritze (Hamilton, Reno, Nevada). Anschließend wurde die Wunde vernäht. Nachdem sich die Tiere von der Operation erholt haben, wurden sie für 6 h bzw. 16 h zurück in ihren Käfig gesetzt. Die Euthanasierung der Mäuse erfolgte durch O₂/CO₂-Gasgemisch mit anschließender zervikaler Dislokation. Es erfolgte eine Präparation des Gehirns, welches anschließend in 4% Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen wurde. Des Weiteren wurden eine Dehydrierung und eine Einbettung in Paraffin vorgenommen.

Tabelle 2.10: Verwendete Probenansätze *in vivo*

	Probenansatz
1	Aβ ₁₋₄₂ (aged)
2	N2a-WT-GFP-Exosomen
3	N2a-PrP ^{0/0T} -GFP-Exosomen
4	N2a-WT-GFP + Aβ ₁₋₄₂ (nach Bindungs-Assay)
5	N2a-PrP ^{0/0T} -GFP + Aβ ₁₋₄₂ (nach Bindungs-Assay)

2.5.2 Immunhistochemie von Hirngewebe

Hirnschnitte von 2 – 5 µm dicke wurden in der Core Facility für Mauspathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf auf Glasobjektträgern vorbereitet. Ausgewählte Objektträger wurden einer H&E-Färbung nach Standardprotokoll durch die diagnostische Abteilung des Instituts für Neuropathologie am Universitätsklinikum

Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Die Färbung des Gewebes erfolgte nach etablierten Protokollen²³. Die folgenden primären Antikörper wurden verwendet aus Tabelle 2.3 wurden verwendet: anti-GFP (Exosomen); anti-Iba1 (Mikroglia-Zellen); Mob410 (A β ₁₋₄₂). Die Detektion erfolgte mit folgenden sekundären Antikörpern aus Tabelle 2.3: Alexa 647; Alexa 555; Alexa 488.

Die Analyse der Antikörpersignale erfolgte mit ImageJ/Fiji und dem Plugin Coloc 2.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Rolle des ePrP^C in der Pathogenese der AD. Zum einen wurde die Rolle der Interaktion von ePrP^C und A β ₁₋₄₂ sowie dem daraus resultierenden Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes *in vivo* analysiert. Bisher ist ungeklärt, welche Funktion dieser Komplex in der Pathogenese der AD hat. Dabei fokussierten sich die Versuche auf die Fragestellung, ob der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex gezielt im Gehirn abgebaut wird oder zur Ablagerung von A β ₁₋₄₂ (A β -Plaques) im Gewebe beiträgt.

Des Weiteren sollte gezeigt werden, ob der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex in Geweben oder Körperflüssigkeiten während der humanen AD-Pathogenese nachweisbar ist und somit zur Diagnose der AD eingesetzt werden könnte. Für diese Untersuchungen wurden CSF-Proben von Patienten unterschiedlicher AD-Risikogruppen mit Hilfe der bildgebenden Durchflusszytometrie analysiert.

Der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex zeichnet sich durch eine verstärkte Aggregation von A β ₁₋₄₂ aus. Inwieweit die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂ durch ePrP^C beeinflusst wird, sollte mit Hilfe von SAXS und ATR-FTIR analysiert werden.

Um den Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex gezielt nachweisen zu können, beschäftigt sich diese Arbeit des Weiteren mit der Etablierung eines nicht aus der Zellmembran diffundieren Membranfarbstoffes.

3.1 Über die molekularen Funktionen des ePrP^C in der Alzheimer-Erkrankung

In Vorversuchen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ePrP^C in der Lage ist, neurotoxische A β ₁₋₄₂-Oligomere zu binden und deren Aggregation in nicht toxische A β ₁₋₄₂-Spezies zu fördern¹³². In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Interaktionen zwischen ePrP^C und A β ₁₋₄₂ *in vivo* untersucht. Hierfür wurde analysiert, ob der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex im Hirn von Wildtyp-Mäusen zu einer verstärkten A β ₁₋₄₂-Ablagerung im Gewebe führt oder ob der Komplex durch Mikroglia-Zellen aufgenommen und degradiert wird. Zum anderem wurde die Fragestellung betrachtet, ob der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex in der Pathogenese der AD beim Menschen eine Rolle spielt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Liquor-Proben (CSF) von Patienten in verschiedenen Stadien der AD untersucht.

3.1.1 Die Rolle des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes *in vivo*

Durch die Bindung von neurotoxischen A β -Oligomeren an ePrP^C und die beschleunigte Aggregation dieser in nicht toxische fibrilläre A β -Spezies entstehen Exosomen-A β -Komplexe im extrazellulären Raum des Gehirns. In diesem Experiment sollte ermittelt werden, welche Rolle dieser Komplex im Gehirn spielt.

In Abbildung 3.1 ist die Abhängigkeit zur Bildung des Exosomen-A β -Komplexes zum ePrP^C dargestellt. Aus murinen immortalisierten Zellen isolierte N2a-WT- und N2a-PrP^{0/0}-Exosomen wurden für ein A β ₁₋₄₂-Bindungs-Assay verwendet und mit Hilfe von FACS und Proteinanalysen untersucht. Dabei zeigte sich, dass ePrP^C zu einer höheren Bindungseffektivität von A β ₁₋₄₂ an die Exosomen führt. N2a-WT-Exosomen banden A β ₁₋₄₂ bevorzugt und wiesen eine signifikant höhere Population an Exosomen mit gebundenen A β ₁₋₄₂ auf als N2a-PrP^{0/0}-Exosomen (3.1 A). Im Western Blot (WB) konnte eine höhere Signalintensität für A β ₁₋₄₂ nach dem Bindungs-Assay beobachtet werden (3.1 B). FACS- und WB-Experimente wurden mit den in Abbildung 3.1 C gezeigten und durch NTA analysierten Exosomenpopulationen durchgeführt. Es bestätigt sich, dass ePrP^C eine zentrale Rolle zur Bildung des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes spielt.

Für die Durchführung der *in-vivo*-Versuche wurden Exosomen aus murinen Kulturzellen *in vitro* (N2a-WT-GFP, N2a-PrP^{0/0T}-GFP) isoliert und einem A β ₁₋₄₂-Bindungs-Assay unterzogen. Die Exosomen wurden intrazerebral in das Cauda/Putamen von C57BL/6 Mäusen stereotaktisch injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 6 h bzw. 16 h erfolgte eine immunhistochemische Analyse der Injektionskanäle und dem in unmittelbarer Umgebung befindlichen Gewebe auf Exosomen, A β ₁₋₄₂ und Mikroglia-Zellen. In Tabelle 2.10 ist dargestellt, welche Ansätze den Versuchsgruppen injiziert wurden. Für alle Gruppen wurden jeweils 1×10^{10} Exosomen eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie. Analysiert wurde die Ausbreitung der Exosomen, von A β ₁₋₄₂ und Mikroglia-Zellen sowie deren Kolokalisation untereinander.

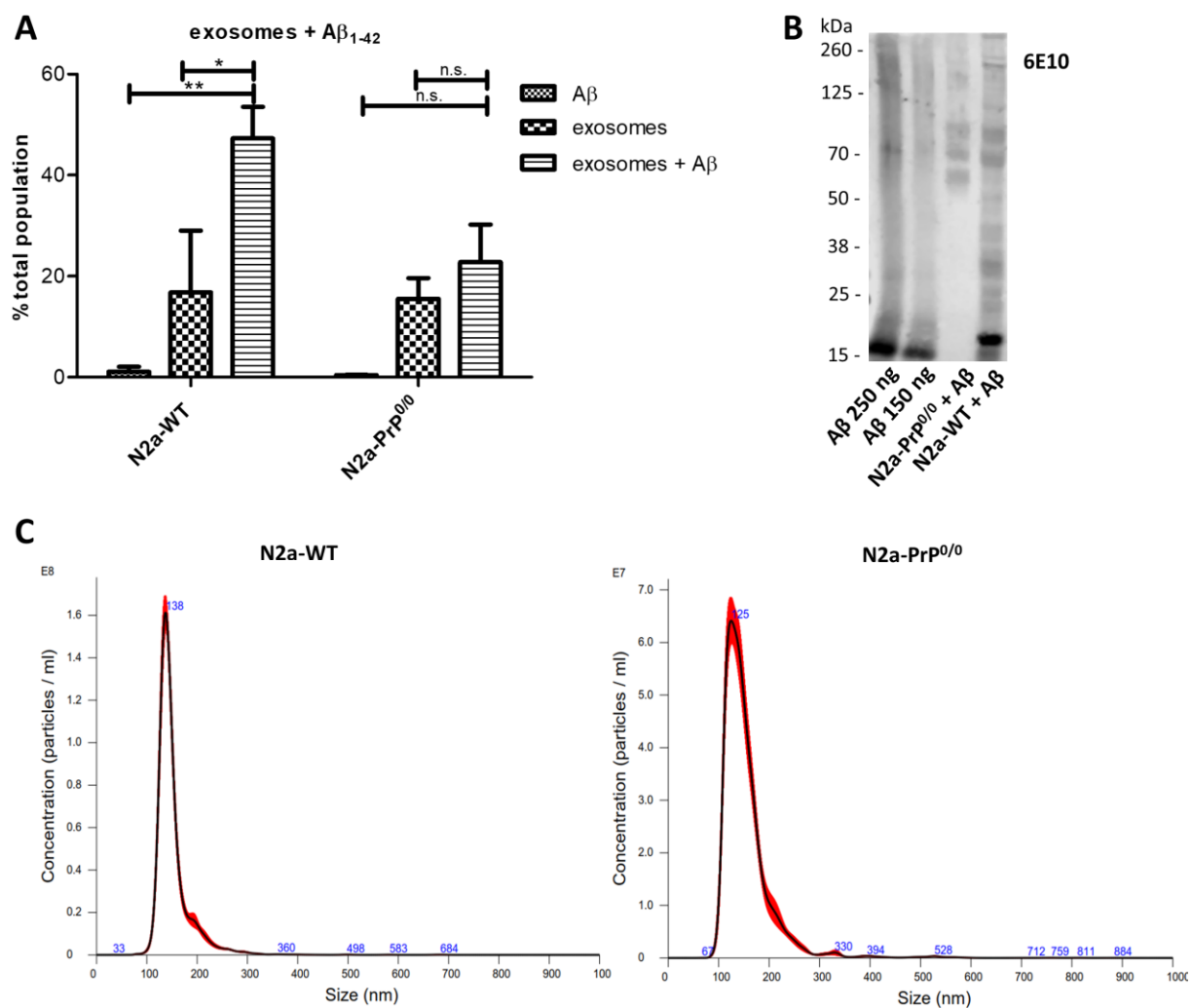


Abbildung 3.1: Analyse des Exosomen-A β_{1-42} Bindungs-Assays.

(A) Prozentualer Anteil der Exosomenpopulation nach Durchführung des A β_{1-42} -Bindungs-Assays mit N2a-WT- und N2a-PrP^{0/0}-Exosomen analysiert mit Hilfe der Durchflusszytometrie. N2a-WT-Exosomen zeigen eine signifikant größere Population von Exosomen die A β_{1-42} gebunden haben im Vergleich zu N2a-PrP^{0/0}-Exosomen. (eingesetzte Menge an Exosomen = 1×10^9 ; n = 2; n.s. = P > 0.05, * = P < 0.05, ** = P < 0,01) (B) WB- Analyse der A β_{1-42} -Bindung an Exosomen. Stärkere Signalintensität für A β_{1-42} (6E10) bei N2a-WT-Exosomen im Vergleich zu N2a-PrP^{0/0}-Exosomen. (eingesetzte Menge an Exosomen = 1×10^9) (C) Nanoparticle-tracking-Analysen (NTA) der für (A) und (B) verwendeten Exosomenisolationen. (N2a-WT: 1:2000, mode = 137.2 +/- 1.0 nm; $1,278 \times 10^{13}$ Partikel/ml; N2a-PrP^{0/0}: 1:500, mode = 130.6 +/- 13,7 nm; $2,225 \times 10^{11}$ Partikel/ml; 1mM HEPES Puffer)

In Abb. 3.2 sind exemplarische Abschnitte der Injektionskanäle nach Verabreichung von N2a-WT-GFP-Exosomen + A β_{1-42} und N2a-PrP^{0/0}-GFP-Exosomen + A β_{1-42} nach 6 h und 16 h Inkubationszeit abgebildet. Die Injektion von N2a-WT-GFP-Exosomen + A β_{1-42} zeigt nach einer 6-stündigen Inkubationszeit (A) eine Verteilung der Exosomen (rot) und von A β_{1-42} (grün) am Rand des Injektionskanals. Hier sind des Weiteren Bereiche erkennbar, bei denen beide Signale kolokalisiert auftreten. Darüber hinaus sind Exosomen im unmittelbaren und peripheren Gewebe sowie am Injektionskanal zu erkennen. Mikroglia-Zellen (weiß) befinden sich in geringer Anzahl direkt am

Injektionskanal. Der Großteil dieser Zellen ist im peripheren Gewebe des Injektionskanals lokalisiert. Nach 16-stündiger Inkubationszeit (C) ist eine verstärkte Kolokalisation von Exosomen und $A\beta_{1-42}$ am Injektionskanal festzustellen. Zusätzlich kann ein sehr geringer Anteil an freien $A\beta_{1-42}$ -Signalen detektiert werden. Exosomen sind weiterhin in unmittelbarer Umgebung des Injektionskanals zu erkennen, wobei die Mikroglia-Zellen vollständig zur Injektionsstelle migriert sind. Die Injektion von N2a-PrP^{0/0T}-GFP-Exosomen + $A\beta_{1-42}$ zeigte nach 6 h (B) eine Verteilung von Exosomen und $A\beta_{1-42}$ im Injektionskanal, mit einer teilweisen schwachen Kolokalisation dieser. Exosomen sind im nahen und peripheren Gewebe erkennbar. Mikroglia-Zellen befinden sich direkt am Injektionskanal und in unmittelbarer Umgebung dieses. Nach 16-stündiger Inkubation (D) sind Exosomen sowie $A\beta_{1-42}$ am Rand des Injektionskanals lokalisiert. Vereinzelt treten Bereiche mit einer Kolokalisation beider Signale auf. Im Gewebe sind Bereiche erkennbar, an denen $A\beta_{1-42}$ -Ablagerungen beobachtet werden können. Exosomen umgeben diese Bereiche und sind frei im Gewebe nachzuweisen. Mikroglia befinden sich direkt am Injektionskanal und in der nahen Umgebung.

Zunächst wurde analysiert, ob durch die Injektion der unterschiedlichen Probenansätze eine Rekrutierung von Mikroglia-Zellen begünstigt wird. Dies wäre ein Hinweis auf den Abbau von $A\beta_{1-42}$ bzw. des Exosomen- $A\beta_{1-42}$ -Komplexes durch Mikroglia-Zellen (Abb. 3.3). 6 h nach der Injektion zeigt sich am Injektionskanal eine gleichmäßige Verteilung der Mikroglia-Zellen in allen Versuchsgruppen. Es kann keine verstärkte Rekrutierung von Mikroglia-Zellen aufgrund von $A\beta_{1-42}$ bzw. des Exosomen- $A\beta_{1-42}$ -Komplexes festgestellt werden. Die Exosomen-Kontrollgruppen (N2a-WT-GFP und N2a-PrP^{0/0T}-GFP) weisen keine Unterschiede zu den weiteren Versuchsgruppen auf (A links). Im nahegelegenen Gewebe zum Injektionskanal zeigt sich eine erhöhte Mikroglia-Zahl nach Injektion der N2a-PrP^{0/0T}-GFP-Exosomen. Alle weiteren Versuchsgruppen zeigen keinen signifikanten Unterschied zur $A\beta_{1-42}$ -Kontrollgruppe (B links). Im peripheren Gewebe kommt es zu einer erhöhten Rekrutierung von Mikroglia-Zellen durch die Injektion von N2a-WT-GFP-Exosomen + $A\beta_{1-42}$. Alle weiteren Versuchsgruppen ergeben keinen signifikanten Unterschied zur $A\beta_{1-42}$ -Kontrollgruppe (C links). Nach einer Inkubationszeit von 6 h zeigt sich in allen untersuchten Bereichen eine relativ geringe Attraktion von Mikroglia-Zellen durch die Injektion der verschiedenen Probenansätze.

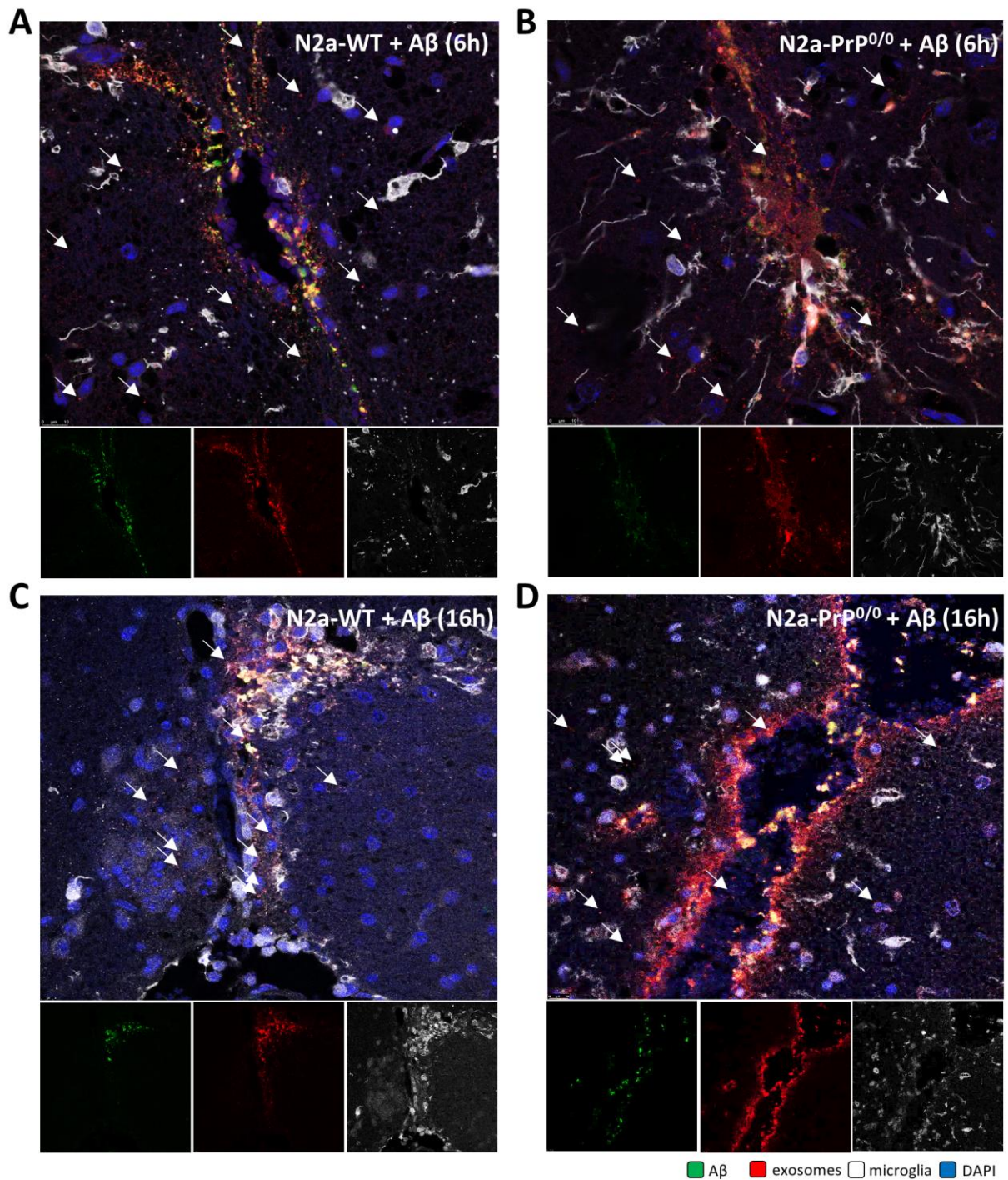


Abbildung 3.2: Konfokale Mikroskopie der Injektionskanäle der Probenansätze 4 und 5 nach einer Inkubationszeit von 6 h und 16 h.

(A) N2a-WT-GFP-Exosomen + Aβ₁₋₄₂ nach 6 h Inkubationszeit. Hohe Signalintensität für Exosomen (rot) und Aβ₁₋₄₂ (grün) direkt am Injektionskanal (Ic), diese sind teils als auch zusammen lokalisiert. Vereinzelt Exosomen sind im Gewebe, um den Ic herum vorzufinden (Pfeile). Mikroglia-Zellen (weiß) infiltrieren das direkt am Ic gelegene Gewebe. **(B)** N2a-PrP^{0/0}-GFP-Exosomen + Aβ₁₋₄₂ nach 6 h Inkubationszeit. Exosomen und Aβ₁₋₄₂ befinden sich am Ic und im umgebenen Gewebe. Mikroglia-Zellen infiltrieren das Gewebe direkt am Ic und im umgebenden Gewebe. **(C)** N2a-WT-GFP-Exosomen + Aβ₁₋₄₂ nach 16 h Inkubationszeit. Starke Kolokalisation von Exosomen und Aβ₁₋₄₂ am Ic. Mikroglia-Zellen im unmittelbaren Umfeld zum Ic. Regionen am Ic, welche einen Mikroglia-Exosomen-Aβ₁₋₄₂ Komplex aufweisen. **(D)** N2a-PrP^{0/0}-GFP-Exosomen + Aβ₁₋₄₂ nach 16 h Inkubationszeit. Signale für Exosomen am Ic und im umgebenen Gewebe nachweisbar. Aβ₁₋₄₂-Ablagerungen am Ic und teilweise im Gewebe erkennbar. Verteilung der Mikroglia-Zellen im Gewebe und am Ic. (konfokale Mikroskopie 63x; rot = Exosomen; grün = Aβ₁₋₄₂; weiß = Mikroglia-Zellen; blau = Zellkern; Maßstabsbalken 10 μm)

Am Injektionskanal zeigte sich nach 16 h eine deutlich gesteigerte Mikroglia-Aktivität nach Verabreichung der unterschiedlichen Probenansätze (A rechts). Die stärkste Rekrutierung ist bei der Injektion von N2a-WT-GFP-Exosomen und N2a-PrP^{0/0T}-GFP-Exosomen + A β ₁₋₄₂ festzustellen, wobei die Injektion von N2a-PrP^{0/0T}-GFP-Exosomen zur geringsten Attraktion von Mikroglia-Zellen führte. Im nahegelegenen Gewebe zeigt sich eine deutlich veränderte Rekrutierung der Mikroglia-Zellen (B rechts). Hier ist die stärkste Attraktion von Mikroglia bei der Injektion von A β ₁₋₄₂ sowie bei N2a-WT-GFP-Exosomen + A β ₁₋₄₂ zu beobachten. Alle weiteren Probenansätze zeigen eine signifikant geringere Rekrutierung von Mikroglia-Zellen. Im peripheren Gewebe ist weiterhin die höchste Rekrutierung durch die Injektion von A β ₁₋₄₂ zu beobachten (C rechts). Alle weiteren Versuchsgruppen weisen eine signifikant schwächere Rekrutierung von Mikroglia-Zellen auf.

Im Allgemeinen ist zu erkennen, dass eine Inkubationszeit von 16 h vor allem am Injektionskanal und dem nahen gelegenen Gewebe zu einer erhöhten Mikroglia-Attraktion führt. Hierbei zeigen sich deutliche Unterschiede in Abhängigkeit zur Entfernung vom Injektionskanal. Es ist eine generelle Abnahme der Mikroglia-Aktivität mit zunehmender Entfernung festzustellen. Dieser Effekt kann für die Inkubationszeit von 6 h nicht beobachtet werden. In allen Versuchsgruppen ist eine Rekrutierung von Mikroglia-Zellen festzustellen. Diese steigt mit zunehmendem Abstand zum Injektionskanal im Gewebe an.

Des Weiteren wurde die Kolokalisation zwischen Mikroglia-Zellen und Exosomen, Mikroglia-Zellen und A β ₁₋₄₂ sowie zwischen Exosomen und A β ₁₋₄₂ im Gewebe am Ic, nahe dem Ic und im peripherem Gewebe nach 6 h und 16 h Inkubationszeit untersucht (Abb. 3.4). Die Injektion von N2a-WT-GFP-Exosomen zeigte zu beiden Zeitpunkten eine hohe Kolokalisation von Mikroglia-Zellen und Exosomen am Ic, sowie eine signifikante Kolokalisation nach 16-stündiger-Inkubation nahe dem Ic. Im peripherem Gewebe kann keine Kolokalisation in den Vergleichsgruppen beobachtet werden (A). Ähnliche Ergebnisse erzielte die Injektion von N2a-PrP^{0/0T}-GFP-Exosomen, wobei die Intensität der Kolokalisation zwischen Mikroglia-Zellen und Exosomen nach 16 h Inkubationszeit nahe dem Ic deutlich geringer ist (B).

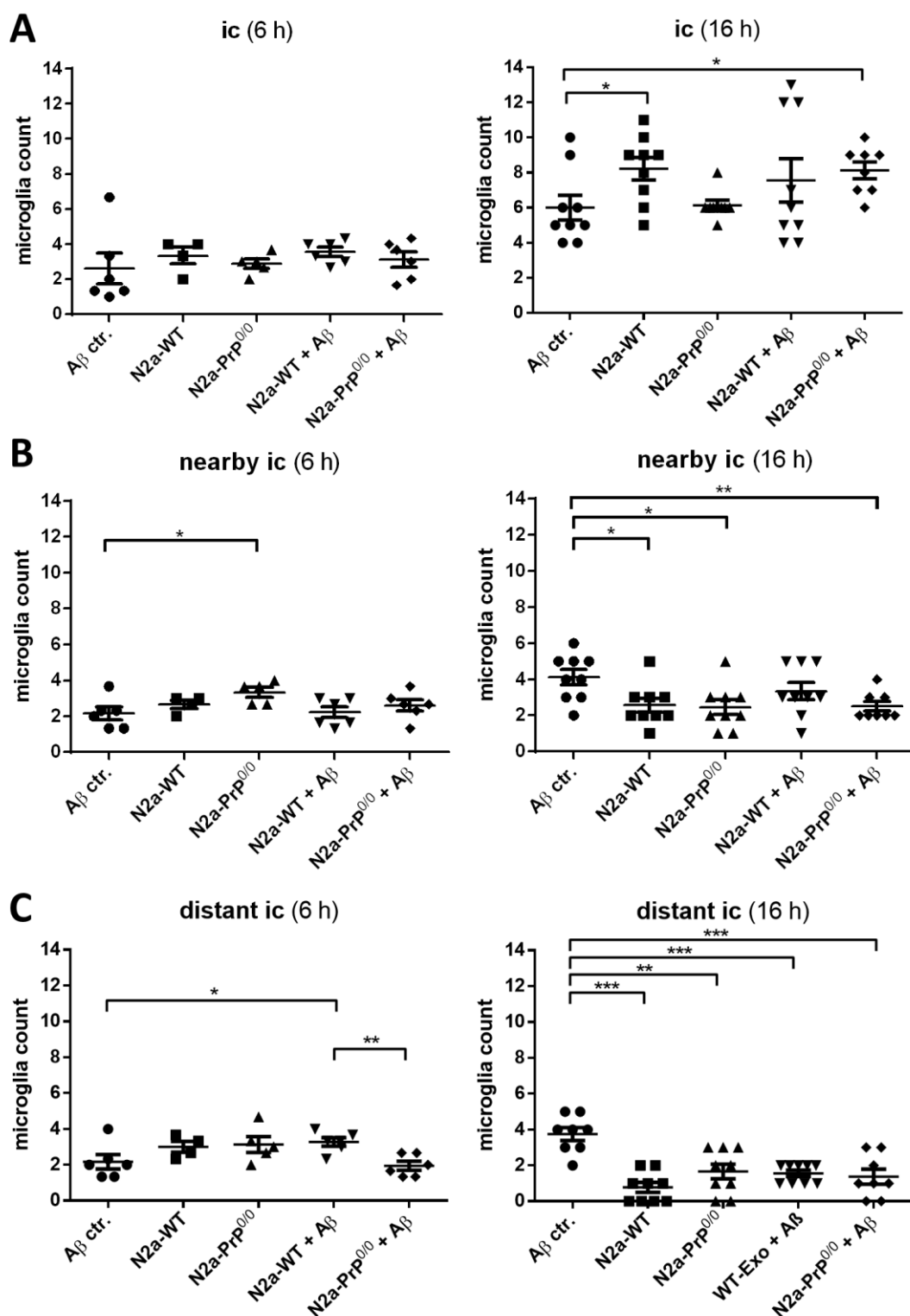


Abbildung 3.3: Attraktion von Mikroglia-Zellen durch die intrazerebrale Injektion von Exosomen und A β_{1-42} . (A) Gleichbleibende geringe Attraktion von Mikroglia-Zellen zu Ic nach 6 h Inkubationszeit (links). Nach 16 h Inkubationszeit signifikanter Anstieg der Rekrutierung von Mikroglia-Zellen (rechts). Höchste Anzahl von Mikroglia am Ic in den Gruppen N2a-WT-GFP, N2a-WT-GFP + A β_{1-42} and N2a-PrP^{0/0}-GFP + A β_{1-42} . (B) Geringe Attraktion von Mikroglia-Zellen im Gewebe in naher Umgebung zum Ic nach 6 h. Unverändert nach Injektion von N2a-PrP^{0/0}-GFP-Exosomen. Signifikant höhere Mikroglia-Anzahl nach 16 h nach Injektion von A β_{1-42} und N2a-WT-GFP + A β_{1-42} . (C) Höhere Rekrutierung von Mikroglia-Zellen im peripheren Gewebe zum Ic durch N2a-WT-GFP + A β_{1-42} Injektion nach 6 h. Nach 16 h stärkste Attraktion im peripheren Gewebe durch A β_{1-42} Injektion im Vergleich zu allen Probenansätzen. (ROI's = ~ 3500 μm^2)

Die Injektion von A β ₁₋₄₂ zeigt keine Kolokalisation für alle Gruppen in den untersuchten Regionen zu beiden Inkubationszeitpunkten (C). Nach der Injektion von N2a-WT-GFP-Exosomen und A β ₁₋₄₂ zeigt sich im Vergleich der Regionen eine signifikant hohe Kolokalisation aller Vergleichsgruppen nach einer Inkubationszeit von 6 h am Ic. Nahe dem Ic ist eine schwache Kolokalisation von Exosomen und A β ₁₋₄₂ nachweisbar. Im peripherem Gewebe tritt keine weitere Kolokalisation auf. Nach 16 h Inkubationszeit nimmt die Signalintensität für alle Vergleichsgruppen am Ic ab. Eine Kolokalisation ist zwischen Mikroglia-Zellen und Exosomen sowie zwischen Exosomen und A β ₁₋₄₂ nachweisbar. Nahe am Ic zeigt sich eine schwache Kolokalisation von Exosomen und A β ₁₋₄₂ (D). Die Injektion von N2a-PrP^{0/0T}-GFP-Exosomen und A β ₁₋₄₂ führt zu einer Kolokalisation aller Vergleichsgruppen am Ic nach 6 h und 16 h Inkubationszeit. Mikroglia-Zellen und Exosomen sowie Exosomen und A β ₁₋₄₂ erreichen vergleichbare Signalintensitäten zu beiden Zeitpunkten. Die Intensität des Signals für Mikroglia-Zellen und A β ₁₋₄₂ ist am Ic nach 16 h deutlich schwächer. In den weiteren Regionen ist keine Kolokalisation nach 6 h Inkubationszeit messbar. Nach 16 h tritt eine leichte Kolokalisation nahe dem Ic für Mikroglia-Zellen und Exosomen sowie Exosomen und A β ₁₋₄₂ auf. Im peripherem Gewebe ist keine Kolokalisation der Vergleichsgruppen erkennbar (E). Die N2a-WT-GFP-Exosomen und A β ₁₋₄₂ Versuchsgruppe zeigt im Vergleich zur N2a-PrP^{0/0T}-GFP-Exosomen und A β ₁₋₄₂ Versuchsgruppe am Ic zu beiden Zeitpunkten eine höhere Signalintensität sowohl von A β ₁₋₄₂ und Exosomen untereinander als auch beider zu den Mikroglia-Zellen.

3.1.2 Die Rolle des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes im CSF von Patienten unterschiedlicher AD-Risikogruppen

Die Bindung von A β ₁₋₄₂ an ePrP^C konnte bereits *in vitro*¹³² sowie deren Effekte *in vivo* (3.1.1) gezeigt werden. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob dieser Komplex im CSF von unterschiedlichen AD-Risikogruppen im Menschen nachgewiesen werden kann und ob eine Korrelation der Menge des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes im CSF mit dem AD-Risiko der Patienten hergestellt werden kann.

Die Aufreinigung der Exosomen aus dem CSF von Patienten erfolgte nach einem im Laufe der Doktorarbeit entwickeltem Isolationsprotokoll (2.2.6.2). Die Analysen der Exosomenpopulationen erfolgte mit Hilfe des NTA und der bildgebenden Durchflusszytometrie.

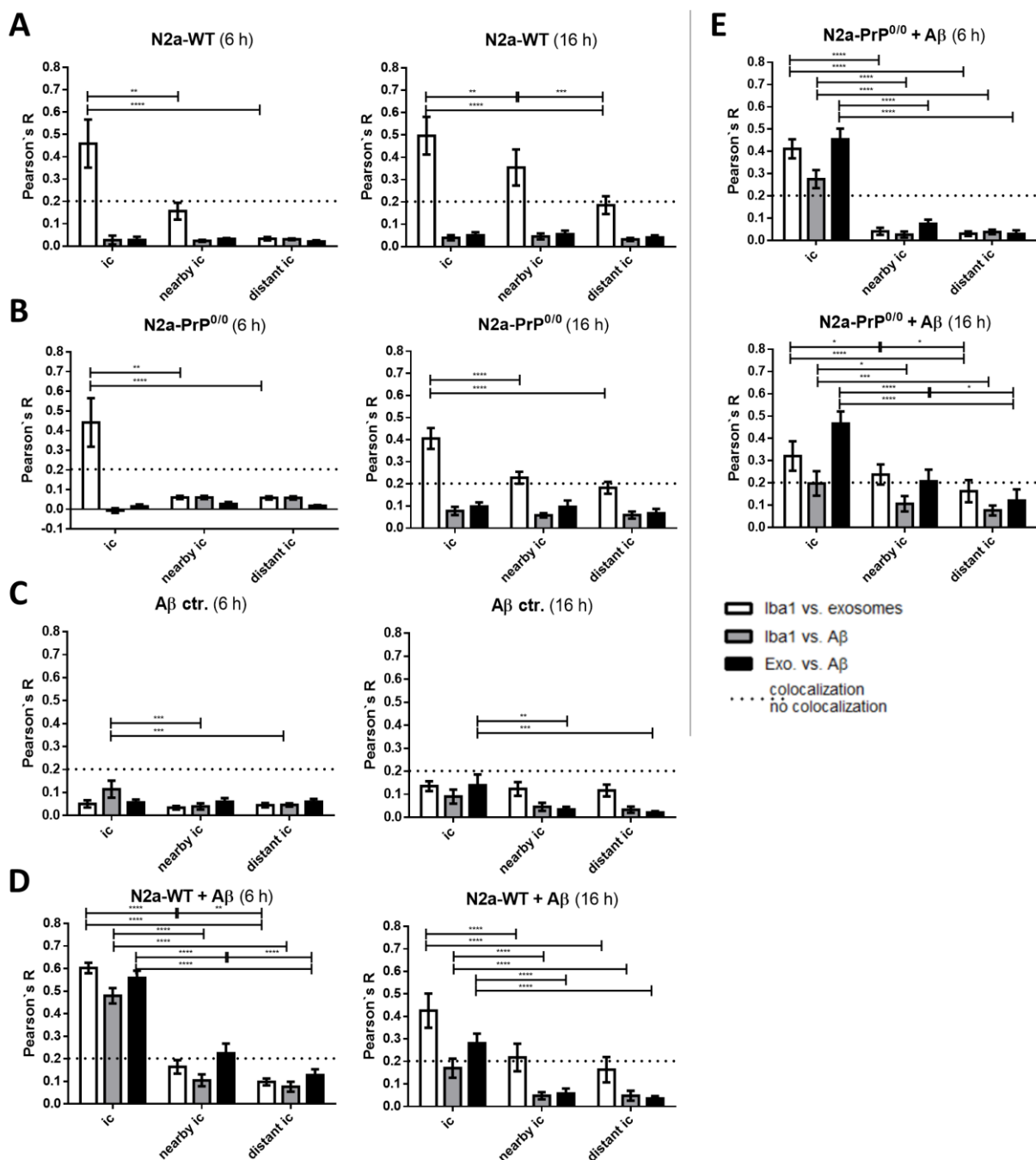


Abbildung 3.4: Analyse der Kolokalisation von Exosomen, A β_{1-42} und Mikroglia-Zellen.

(A) Injektion von N2a-WT-GFP-Exosomen nach 6 h (links) und 16 h (rechts) Inkubationszeit. Kolokalisation der Mikroglia-Zellen + Exosomen am Ic in beiden Zeitpunkten sowie im Gewebe nahe dem Ic nach 16 h. **(B)** Injektion von N2a-PrP^{0/0}-GFP-Exosomen. Vergleichbare Effekte zu (A) mit einer geringeren Signalintensität nach 16 h Inkubationszeit. **(C)** A β_{1-42} führt zu schwachen Signalintensitäten für alle Gruppen zu beiden Zeitpunkten. Höchste Intensitäten für Mikroglia-Zellen + A β_{1-42} nach 6 h und für Exosomen + A β_{1-42} nach 16 h am Ic. **(D)** Injektion von N2a-WT-GFP-Exosomen + A β_{1-42} führt zu einer signifikant erhöhten Kolokalisation aller untersuchten Signale am Ic nach 6 h im Vergleich zu den anderen Regionen. Nahe dem Ic Kolokalisation von Exosomen + A β_{1-42} . Nach 16 h ist am Ic und nahe dem Ic die Kolokalisation von Mikroglia + Exosomen nachweisbar. Exosomes + A β_{1-42} zeigen nur Kolokalisation am Ic. **(E)** Injektion von N2a-PrP^{0/0}-GFP-Exosomen + A β_{1-42} . Kolokalisation aller Signale nach 6 h und 16 h Inkubationszeit am Ic. Nahe dem Ic nach 16 h Kolokalisation von Mikroglia + Exosomen und Exosomen + A β_{1-42} . (ROI's = ~ 690 μm^2 ; Aufgrund der Intensität der Hintergrundsignale wurden nur Werte > 0,2 der Pearson's R Werte als Kolokalisation definiert.)

Zunächst erfolgte eine Analyse des CSF der Patienten auf ihren $A\beta_{1-42}$ -Gehalt und der Menge an enthaltenen Exosomen. In allen Proben ist $A\beta_{1-42}$ in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar. Eine Korrelation des $A\beta_{1-42}$ -Gehalts in den CSF-Proben mit dem Alter der untersuchten Patienten lässt sich nicht ableiten (Abb. 3.5, A). Die Analyse der Exosomenkonzentration zeigt, dass in allen Proben Exosomen nachweisbar sind. Des Weiteren ergibt sich eine Aufteilung der CSF-Proben in zwei Gruppen. Eine Gruppe zeigt eine erhöhte Anzahl an Exosomen im CSF. Die zweite Gruppe hingegen weist eine geringere Exosomenkonzentration auf, welche nicht vom Alter der Patienten abhängig ist (Abb. 3.5, B).

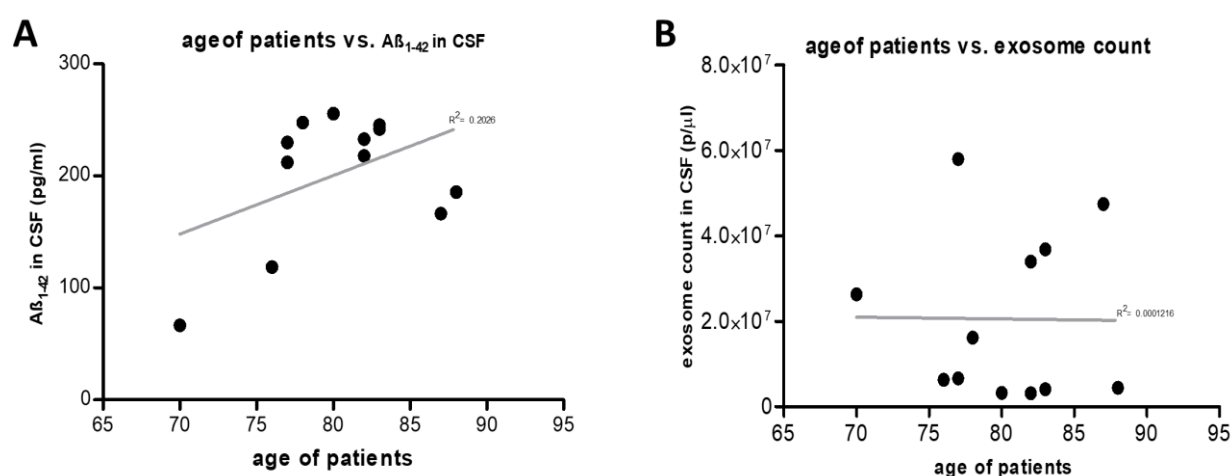


Abbildung 3.5: Korrelation des Alters der Patienten mit der Menge an $A\beta_{1-42}$ und der Anzahl an Exosomen im CSF.

(A) Tendenzialer Anstieg der $A\beta_{1-42}$ Konzentration im CSF mit steigendem Alter der Patienten. ($R^2 = 0,2026$) (B) Keine Korrelation der Exosomenkonzentration und dem Alter der Patienten. ($R^2 = 0,0001216$)

Für die weiteren Untersuchungen wurden die Patienten nach ihrem AD-Risiko eingeteilt. Die Gruppierung erfolgte anhand der durch eine Biopsie erhaltenen Daten. Die Biopsie und deren Auswertung erfolgte am „Kuopio University Hospital“ (Kuopio, Finnland) in der Abteilung für Neurochirurgie. Bei der Kontrollgruppe ohne AD-Risiko konnte in der Hirnbiopsie weder $A\beta_{1-42}$ noch Tau nachgewiesen werden. Ein wahrscheinliches AD-Risiko wird durch den positiven Nachweis von $A\beta_{1-42}$ und fehlendem Tau definiert. Sind die Patienten sowohl $A\beta_{1-42}$ und Tau positiv, liegt eine neuropathologische AD vor.

Die aus dem CSF isolierten Exosomen sowie der $A\beta_{1-42}$ -Exosomen-Komplex wurde mit Hilfe der bildgebenden Durchflusszytometrie (2.2.8) analysiert. In allen Patientenproben konnte der $A\beta_{1-42}$ -Exosomen-Komplex in unterschiedlichen

Konzentrationen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich in den AD-Risikogruppen generell ein höherer Anteil des $A\beta_{1-42}$ -Exosomen-Komplexes im Vergleich zum nicht AD-Patientenpool (Abb. 3.6, A). Die Konzentration an Exosomen, welche $A\beta_{1-42}$ gebunden haben, korreliert nicht mit der Menge an $A\beta_{1-42}$, welche im Hirngewebe festgestellt wurde (B). Allerdings zeigt sich ein Unterschied im Vergleich der Konzentration von $A\beta_{1-42}$ im Hirngewebe mit dem Risiko der Patienten an der AD zu erkranken. Im Hirngewebe von Patienten mit einem mutmaßlichen Risiko an der AD zu erkranken, zeigte sich eine signifikant erhöhte $A\beta_{1-42}$ Konzentration im Vergleich zu Patienten mit neuropathologischer AD. Die Konzentration von $A\beta_{1-42}$ oder des $A\beta_{1-42}$ -Exosomen-Komplexes im CSF zeigt keine signifikante Korrelation zu dem Risiko an der AD zu erkranken oder bereits erkrankt zu sein (D, E). Die absolute Menge an Exosomen im CSF der Patienten zeigt einen tendenziell negativen Trend. Dies weist auf eine Reduktion der Exosomenzahl mit steigendem AD-Risiko hin (F). Mit den zu Verfügung stehenden Mitteln konnte kein Zusammenhang zwischen der Konzentration des $A\beta_{1-42}$ -Exosomen-Komplexes im CSF von Patienten mit dem Risiko an der AD zu erkranken, nachgewiesen werden.

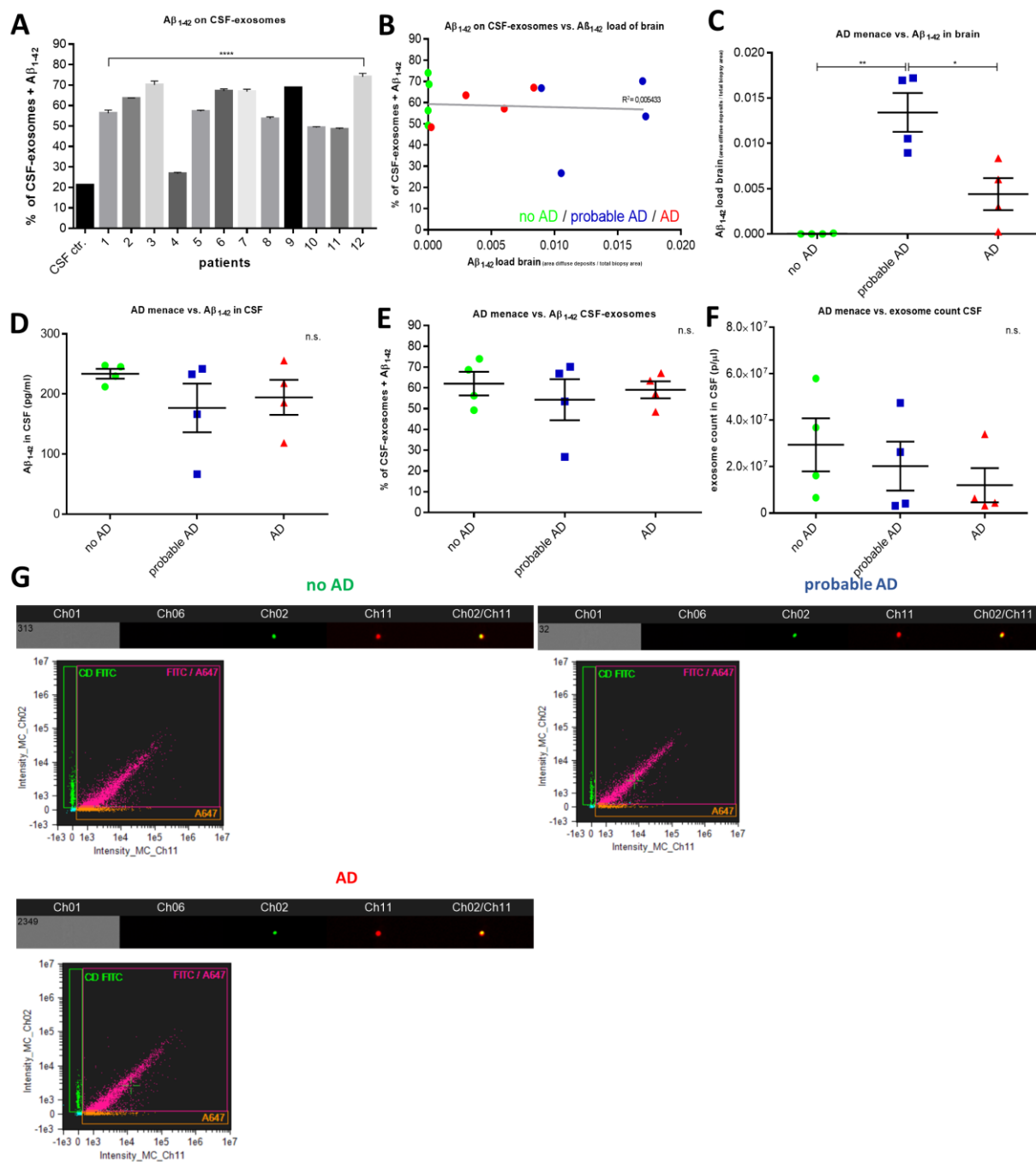


Abbildung 3.6: Bildgebende Durchflusszytometrie der AD-Risikogruppen zur $A\beta_{1-42}$ -Menge im Hirngewebe sowie auf Exosomen und der absoluten Anzahl an Exosomen im CSF.

AD-Risikogruppen definiert durch Biopsie: $A\beta_{1-42}$ und Tau negativ = keine AD; $A\beta_{1-42}$ positiv und Tau negativ = wahrscheinliches AD-Risiko; $A\beta_{1-42}$ und Tau positiv = neuropathologische AD (A) $A\beta_{1-42}$ -Exosomen-Komplex in allen Patienten-CSF-Proben durch bildgebende Durchflusszytometrie messbar. (B) Keine Korrelation der Menge des $A\beta_{1-42}$ -Exosomen-Komplexes im CSF mit der $A\beta_{1-42}$ -Konzentration im Hirngewebe der Patienten. ($R^2 = 0,005433$) (C) AD-Risikogruppen im Vergleich zur $A\beta_{1-42}$ -Konzentration im Hirngewebe. Bei mutmaßlichem AD-Risiko signifikant höhere $A\beta_{1-42}$ -Konzentrationen im Hirngewebe messbar als bei keiner AD Erkrankung oder neuropathologischer AD. (D) AD-Risikogruppen im Vergleich zur absoluten Konzentration an $A\beta_{1-42}$ im CSF (ELISA). Kein signifikanter Unterschied zwischen den AD-Risikogruppen. (E) AD-Risikogruppen im Vergleich zur Menge am $A\beta_{1-42}$ -Exosomen-Komplex im CSF zeigt keine signifikante Varianz. (F) Die Konzentration an Exosomen sinkt tendenziell mit steigendem AD-Risiko (nicht signifikant). (G) Beispieldatensätze für die bildgebende Durchflusszytometrie Analyse einzelner Exosomen der AD-Risikogruppen. (Ch01 = brightfield; Ch06 = side scatter; Ch02 = Exosomen (FITC); Ch11 = $A\beta_{1-42}$ (A647); Ch02/Ch11 = Überlagerung Exosomen/ $A\beta_{1-42}$)

3.2 Der Einfluss des ePrP^C auf die A β ₁₋₄₂-Aggregationskinetik

Das ePrP^C beschleunigt die Bildung von A β ₁₋₄₂-Fibrillen indem es die neurotoxischen A β -Oligomere sequestriert, dadurch nimmt es eine neuroprotektive Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung ein¹³². In diesem Teil der Arbeit soll spezifisch auf den Einfluss von ePrP^C auf die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂ eingegangen werden.

3.2.1 Die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂

In diesem Projekt wurde die Kinetik der Aggregation von A β ₁₋₄₂ ohne den Einfluss von ePrP^C untersucht. Die Hauptmethode zur Charakterisierung des A β ₁₋₄₂-Systems war Synchrotron-SAXS. Hierbei wird die intensive Röntgenstrahlung, die von Elektronen in einem Speicherring emittiert wird, verwendet, um die makromolekulare Struktur in Lösung zu untersuchen und Informationen über die Strukturgruppen zu liefern, die das Protein in Lösung bei einer Auflösung im Nanometerbereich annimmt. SAXS bietet nicht nur allgemeine Parameter, wie den Umlaufradius oder die maximale Größe, sondern auch niedrig aufgelöste Formen. Mit der Synchrotron-SAXS-Messung können Prozesse im Zeitrahmen von ms bis hin zu h analysiert werden. Dies ermöglicht die Durchführung und Beobachtung biologischer Prozesse in Lösung in ihrem Zeitverlauf, z.B. die Analyse der A β ₁₋₄₂-Aggregation und -Amyloidformation. Als komplementäre Methode wurde die Infrarotspektroskopie (ATR-FTIR) verwendet, welche molekulare Vibrationen zur Charakterisierung der Sekundärstrukturen verwendet. Dadurch lässt sich bestimmen ob die Fraktionen der Polypeptidketten in α -Helix-, β -Faltblatt- oder ungeordneten Konformationen vorliegen. Zur grundlegenden Analyse der vorhandenen Größenfraktionen in der A β ₁₋₄₂-Proben-Lösung zu verschiedenen Zeitpunkten des Aggregationsprozesses wurde die Größenaufschlusschromatographie (SEC, engl.: *Size Exclusion Chromatography*) eingesetzt.

Die SEC differentiell gealterter A β ₁₋₄₂-Proben-Lösungen (2 mg/ml; Superose 6 5/150; Inkubationszeiten: 1,5 h; 2,5 h; 3,5 h; 4,5 h; 6,5 h; 8,5 h; 10,5 h; 16,5 h; 22,5 h) zeigt in allen gemessenen Zeitpunkten mehrere Peaks (Ausschläge im Chromatogramm). Die A β ₁₋₄₂-Proben-Lösungen enthalten unterschiedliche A β ₁₋₄₂-Größenpopulationen in den gemessenen Inkubationszeiten. Nach kurzer Inkubationszeit (1,5 h) sind bereits Peaks für größere A β ₁₋₄₂-Oligomere und -Aggregate erkennbar (Elutionszeit 0 – 10 min), welche im gesamten Zeitverlauf mit unterschiedlicher Intensität erhalten bleiben. Die Peaks für A β ₁₋₄₂-Monomere und kleiner lösliche A β ₁₋₄₂-Oligomere nimmt mit der

Zeit ab (Abb. 3.7, A). Für ein tieferes Verständnis der Aggregationskinetik wurden die durch die SEC erhaltenen Daten in zwei Gruppen eingeteilt: Stage I (1,5 h – 4,5 h) und Stage II (6,5 h – 22,5 h). An diesen Daten wurde eine 2D-GPC (engl.: *Two-Dimensional Correlation Gel Permeation Chromatography*) basierte Auswertung der Daten vorgenommen. Bei dieser werden positive und negative Korrelationen der aus der SEC erhaltenen Peaks untereinander analysiert. Stage I (< 4,5 h) zeigt eine hohe positive Korrelation der A β ₁₋₄₂-Größenpopulation mit einer Elutionszeit von 6 min (B) mit den benachbarten höher und niedriger molekularen Größenpopulationen (HMW, engl.: *high molecular weight*; LMW, engl.: *low molecular weight*). Die Daten weisen darauf hin, dass die Größenpopulation B auf Kosten von A β ₁₋₄₂-Monomeren und teils größerer A β ₁₋₄₂-Oligomerspezies wächst (Abb. 3.7, B). In Stage II (> 4,5 h) bestätigten sich die Daten aus Stage I mit einer geringeren Beteiligung der LMW und einer stetigen Variation der Größenpopulation B verursacht durch Wachstum, Koaleszenz oder Fragmentation von A β ₁₋₄₂-Fibrillen (Abb. 3.7, C).

Abbildung 3.8 (A) zeigt die Größenpopulationen in der SEC der Inkubationszeiten der Stage I-Gruppe. Es lassen sich 5 Hauptgrößenpopulationen daraus ableiten: LMW, D, C, B und F (für Fibrillen). Diese können aus sich überlappenden Populationen bestehen. Anhand der 2D-GPC wurde eine schematische Darstellung der Korrelation der 5 Hauptgrößenpopulationen in der A β ₁₋₄₂-Aggregationskinetik erstellt (Abb. 3.8, B). Die Aggregation von A β ₁₋₄₂ erfolgt über Zwischenstufen, unter denen eine permanente Interaktion herrscht, wobei die Größenpopulation B eine zentrale Rolle einnimmt. In geringer Anzahl können diese Zwischenstufen auch umgangen werden, wodurch es zu einer direkten Korrelation von LMW zu Fibrillen kommt. Die kleinen löslichen A β ₁₋₄₂-Oligomere sind die Grundbausteine der höheren oligomeren A β ₁₋₄₂-Spezies. Der Zerfall von diesen höheren A β ₁₋₄₂-Oligomeren hingegen trägt zur Entstehung von kleinen löslichen A β ₁₋₄₂-Oligomeren bei. Kleinere A β ₁₋₄₂-Oligomere werden zum einem zum Aufbau der HMW-Oligomere und A β ₁₋₄₂-Fibrillen benötigt, können zum anderem aber auch durch Fragmentierung dieser wieder entstehen.

Zeitaufgelöste SAXS-Messungen wurden mit A β ₁₋₄₂-Proben-Lösungen zu differentiellen Zeitpunkten der A β -Aggregation (Inkubationszeiten: ~ 0 min; 5 min; 10 min; 15 min; 30 min; 60 min, 120 min; 10 h; 24 h) durchgeführt.

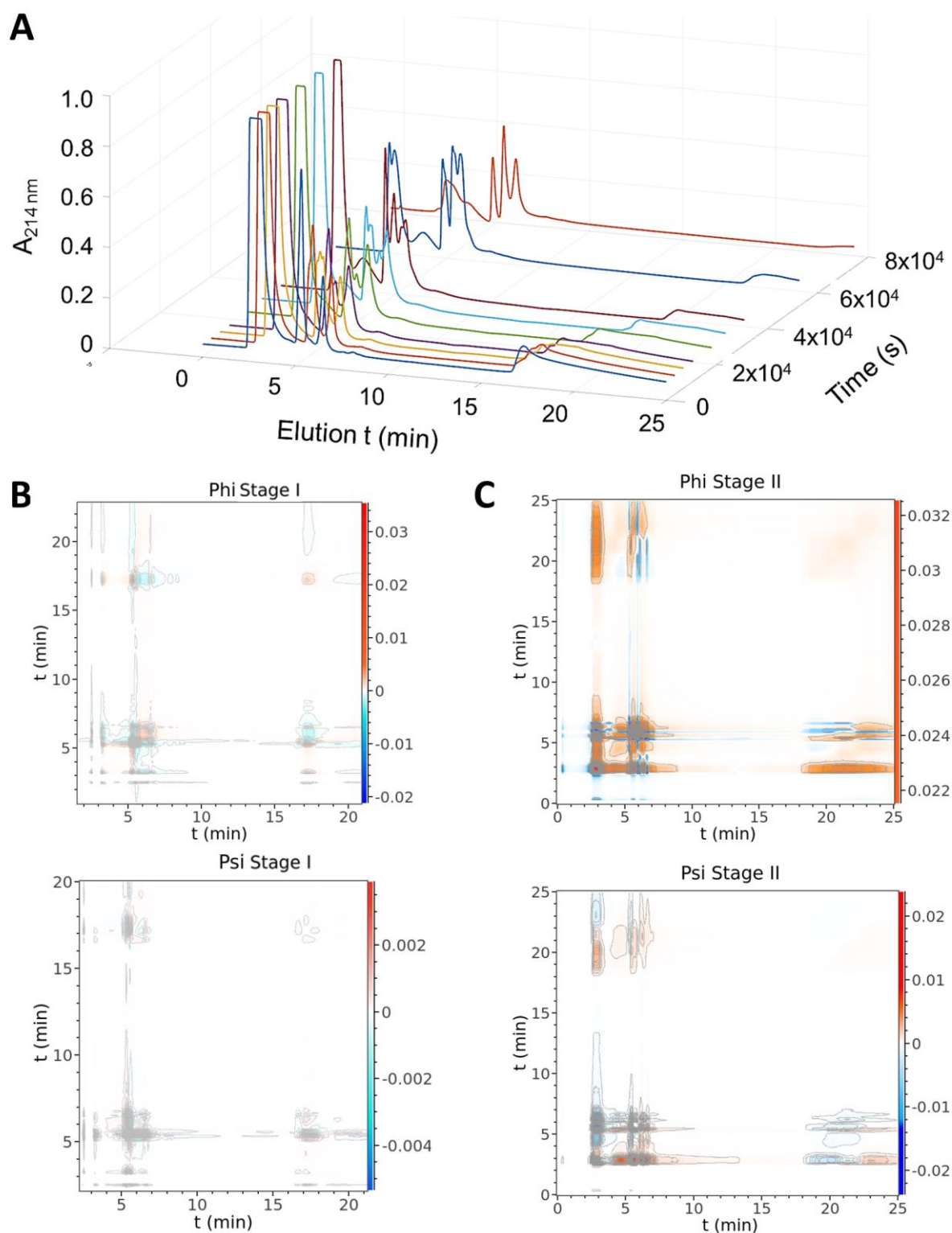


Abbildung 3.7: Zeitaufgelöste SEC der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen.

(A) Chromatogramm der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen zu differentiellen Inkubationszeitpunkten. Signale für unterschiedliche $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen ableitbar: $A\beta_{1-42}$ -Monomere und -LMW's, -HMW's und für fibrilläres $A\beta_{1-42}$. Bereits zu frühen Zeitpunkten der Aggregation sind Signale für HMW's und fibrilläres $A\beta_{1-42}$ vorhanden. **(B)** 2D-GPC der Stage I Inkubationszeitpunkte ($< 4,5$ h). Positive Korrelationen (Psi) der $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen untereinander, geringe negative Korrelationen (Psi) der dominierenden der $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen. **(C)** 2D-GPC der Stage II Inkubationszeitpunkte ($> 4,5$ h). Positive Korrelationen (Psi) der dominierenden $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen untereinander. Abnahme der positiven und negativen Korrelation der LMW's mit weiteren $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen.

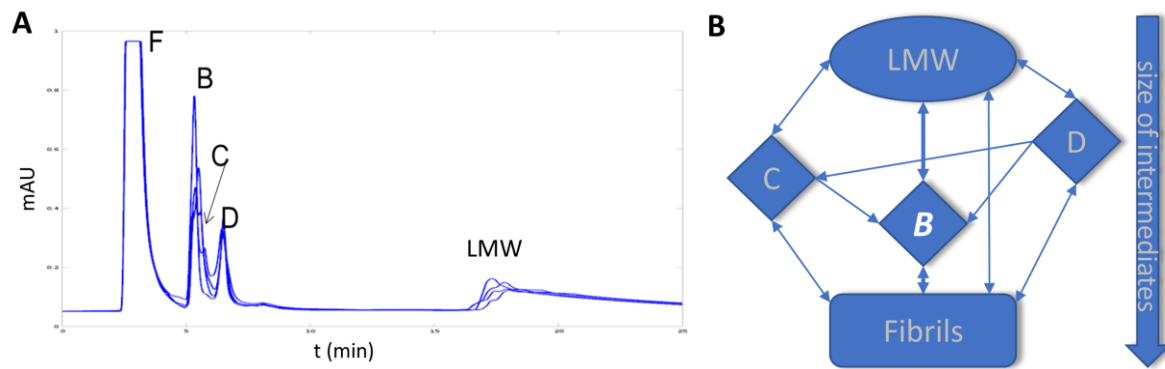


Abbildung 3.8: Interaktionsschema der dominierenden $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen.

(A) Chromatogramm der Stage I Inkubationszeitpunkte und der dominierenden $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen. (B) Abhängigkeitsdiagramm der dominierenden $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen auf Grundlage der 2D-GPC Auswertung der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen zu differentiellen Inkubationszeitpunkten. Die Größenpopulation B nimmt eine zentrale Rolle in der $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetic ein, B zeigt positive Korrelationen zu den benachbarten HMW und LMW $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen. Die Fragmentierung der $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen führt zum Wachstum der $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen B.

Aufgrund des Auftretens höherer $A\beta_{1-42}$ -Oligomerspezies nach 1,5 h Inkubationszeit in den vorangegangenen Experimenten wurden für die SAXS-Messungen frühere Zeitpunkte der $A\beta_{1-42}$ -Aggregation berücksichtigt. Die Messungen zeigen eine sich entwickelnde Mischung aus $A\beta_{1-42}$ -Monomeren, -Oligomeren und großen fibrillären Spezies. Während der 24-stündigen Inkubation nimmt die gestreute Intensität bei den niedrigsten Winkeln zu, was die zunehmende Menge großer $A\beta_{1-42}$ -Spezies widerspiegelt (Abb. 3.9, A). Das frühe Stadium der $A\beta_{1-42}$ -Aggregation (0 min – 120 min) wird von ungefalteten $A\beta_{1-42}$ -Spezies dominiert, während sich die kompakteren strukturierten Fibrillen später ausbilden. In den $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen wurden zwei Hauptkomponenten identifiziert. Diese sind zum einen kleinere $A\beta_{1-42}$ -Aggregationsintermediate (*building blocks*) und zum anderen reife $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen. Durch das Anpassen des Datensatzes an eine lineare Kombination der beiden Spezies wurde die Kinetik der Formation der Fibrillen hinsichtlich ihrer Massenfraktionen dargestellt (Abb. 3.9, B). ATR-FTIR-Messungen der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen zu differentiellen Zeitpunkten der $A\beta$ -Aggregation ergaben einen Anstieg des Gehalts an β -Faltblatt-Strukturen und ein Rückgang von α -Helix-Konformationen mit steigender Inkubationszeit. Dies bestätigt die Bildung von HMW-Strukturen und $A\beta$ -Fibrillen mit steigender Inkubationszeit (Abb. 3.9, C). Die strukturelle Charakterisierung der in der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen befindlichen $A\beta$ -Spezies lieferte repräsentative Modelle für die *building blocks*, welche mit nativ ungefalteten $A\beta_{1-42}$ -Oligomeren übereinstimmen sowie ein Modell für die Fibrillen (Abb. 3.9, D). Für die Modellierung der Strukturen

wurde die ab-initio-SAXS-Modellierung¹⁷⁸ und die Ensemble-Optimierungsmethode¹⁷⁹ verwendet. Modelliert wurden repräsentative Zufallskettenmodelle (Abb. 3.9, D1) und Pseudoatom-Modelle (Abb. 3.9, D2) für die ungefalteten Oligomere und ein durchschnittliches Pseudoatom-Modell für große fibrilläre Aggregate (Abb. 3.9, D3). Die Anzahl der $A\beta_{1-42}$ -Einheiten, welche die *building blocks* benötigen um die gesammelten Daten angemessen anzupassen, betrug 4 - 6 $A\beta_{1-42}$ -Einheiten, was mit einem kürzlich veröffentlichten Bericht über die frühen Stadien der $A\beta_{1-42}$ -Oligomerisierung auf der Grundlage der Neutronenstreuung und der analytischen Ultrazentrifugation übereinstimmt¹⁸⁰.

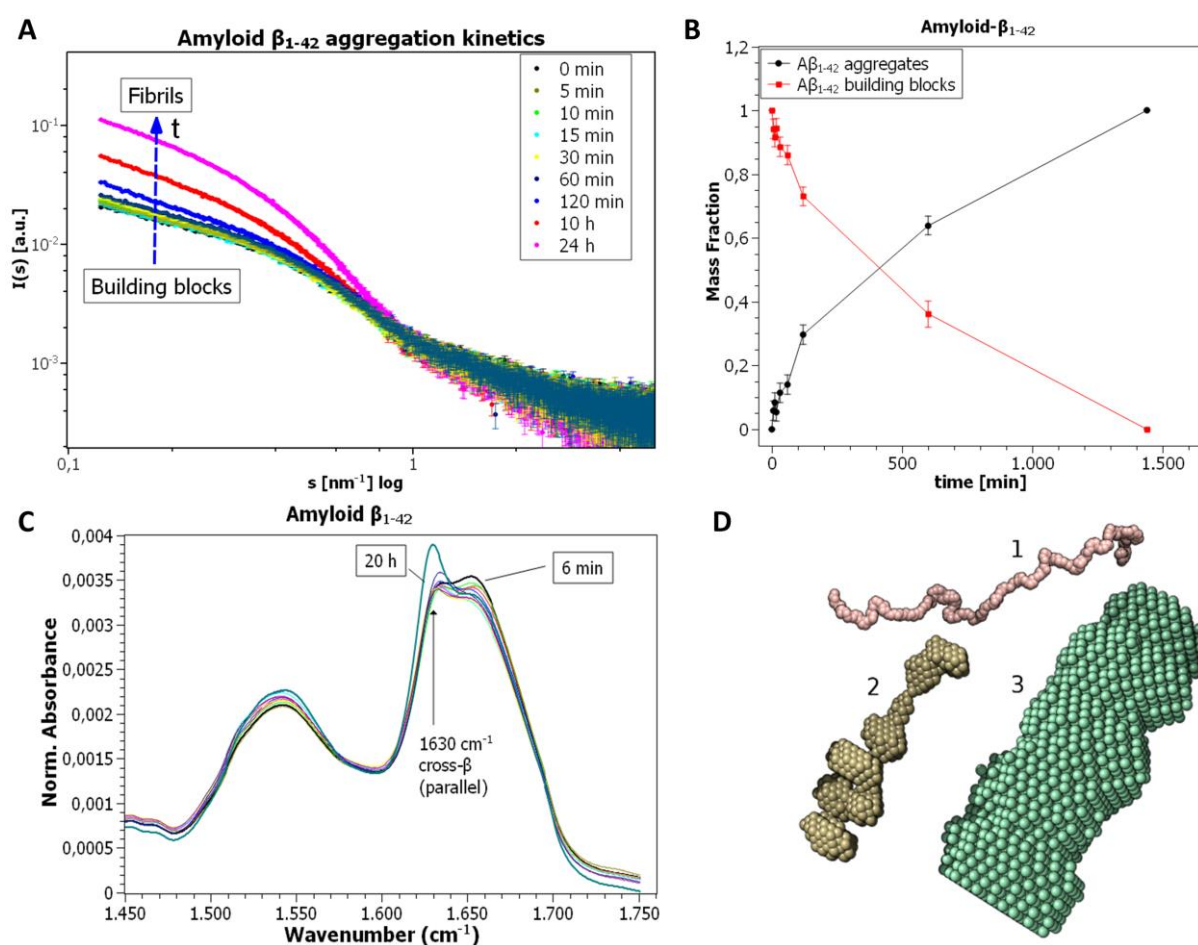


Abbildung 3.9: SAXS-Messungen der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen zu verschiedenen inkubationszeitpunkten.

(A) Zeitaufgelöste SAXS-Profile während einer 24-stündigen Inkubation der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung. Zunahme der Streuungsintensität im Bereich niedriger Winkel. Zunahme großer $A\beta_{1-42}$ -Spezies mit steigender Inkubationszeit. (B) Zeitliche Entwicklung der zwei Hauptkomponenten in der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung ($A\beta_{1-42}$ -*building blocks*, höhere $A\beta_{1-42}$ -Aggregate). Im Verlauf der $A\beta_{1-42}$ -Aggregation nimmt die Anzahl der $A\beta_{1-42}$ -*building blocks* stetig ab, komplementär dazu nimmt die Menge an höheren $A\beta_{1-42}$ -Aggregationsstufen zu. (C) Komplementäre zeitaufgelöste ATR-FTIR-Messungen der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung zeigen eine Zunahme der intermolekularen β -Faltblattstrukturen, sowie eine Abnahme der Signale für α -Helices mit steigender Inkubationszeit. (D) Strukturmodelle der $A\beta_{1-42}$ -Spezies in der Proben-Lösung. Repräsentative Zufallskettenmodelle und Pseudoatom-Modelle stellen ungefaltete $A\beta_{1-42}$ -Oligomere dar (1; 2) und ein durchschnittliches Pseudoatom-Modell zur Darstellung von fibrillären $A\beta_{1-42}$ -Spezies.

3.2.2 Der Einfluss von ePrP^C auf die Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂

Nachdem die Untersuchung der Aggregationskinetik von A β ₁₋₄₂ abgeschlossen werden konnte, wurden Exosomen aus den N2a-WT- und N2a-PrP^{0/0}-Zelllinien gewonnen und der A β ₁₋₄₂-Proben-Lösung beigefügt. N2a-WT-Exosomen tragen ePrP^C auf ihrer Oberfläche, N2a-PrP^{0/0}-Exosomen hingegen nicht. Die Analyse des Einflusses der Exosomen auf die A β ₁₋₄₂-Aggregationskinetik wurde mittels SEC, SAXS und ATR-FTIR untersucht.

Die SEC-Daten der A β ₁₋₄₂-N2a-WT-Proben-Lösung (2 mg/ml A β ₁₋₄₂; 1x10⁹ Exosomen/ml) differentieller Zeitpunkte der Aggregationskinetik zeigen vier prominente Größenpopulation, deren Intensität im Zeitverlauf in den Proben-Lösungen variiert (Abb. 3.10, A). Vor der Durchführung der SEC wurden die A β ₁₋₄₂-N2a-WT-Proben-Lösung durch einen 300K Filter filtriert, um die Exosomen aus der Proben-Lösung zu entfernen. An die Exosomen gebundene A β -Spezies wurden durch diesen Schritt entfernt. Die 2D-GPC-Analyse zeigt sowohl positive als auch negative Korrelationen der vier Größenpopulationen zueinander (Abb. 3.10, B). Die Größenpopulation C ist in allen Zeitpunkten der A β ₁₋₄₂-Aggregationskinetik in Gegenwart von N2a-WT-Exosomen am prominentesten vertreten. Das Wachstum der Größenpopulation C korreliert über die Zeit mit der Abnahme der Größenpopulationen A und B, welche kleine A β ₁₋₄₂-Oligomerspezies unter dem Verbrauch der Größenpopulation D repräsentieren.

Der Vergleich der SEC-Profile der Inkubation einer 2 mg/ml A β ₁₋₄₂-Proben-Lösung mit N2a-WT bzw. N2a-PrP^{0/0} (1x10⁹ Exosomen/ml) für 22 h zeigt einen Unterschied in der Intensität der Signale für die Größenpopulation D. Die Population C ist nach 22 h Inkubation nicht mehr erkennbar. D zeigt eine deutlich höhere Intensität bei einer Inkubation mit N2a-WT-Exosomen im Vergleich zu den N2a-PrP^{0/0}-Exosomen. In der A β ₁₋₄₂-N2a-WT-Proben-Lösung sind in Gegenwart von N2a-WT-Exosomen höhere Konzentrationen an größeren A β ₁₋₄₂-Aggregationsstufen enthalten (Abb. 3.10, C).

Zeitaufgelöste SAXS-Messungen wurden mit A β ₁₋₄₂-Proben-Lösungen +/- N2a-WT- oder N2a-PrP^{0/0}-Exosomen zu differentiellen Zeitpunkten der A β -Aggregation (Inkubationszeiten: ~ 10 min; 30 min; 60 min; 90 min; 2:45 h; 3:45 h; 4:45 h; 5:45 h; 7:45 h; 9:45 h; 14 h; 17:45 h; 22 h; 26:30 h; 30:15 h; 34:45 h; 39:45 h) durchgeführt.

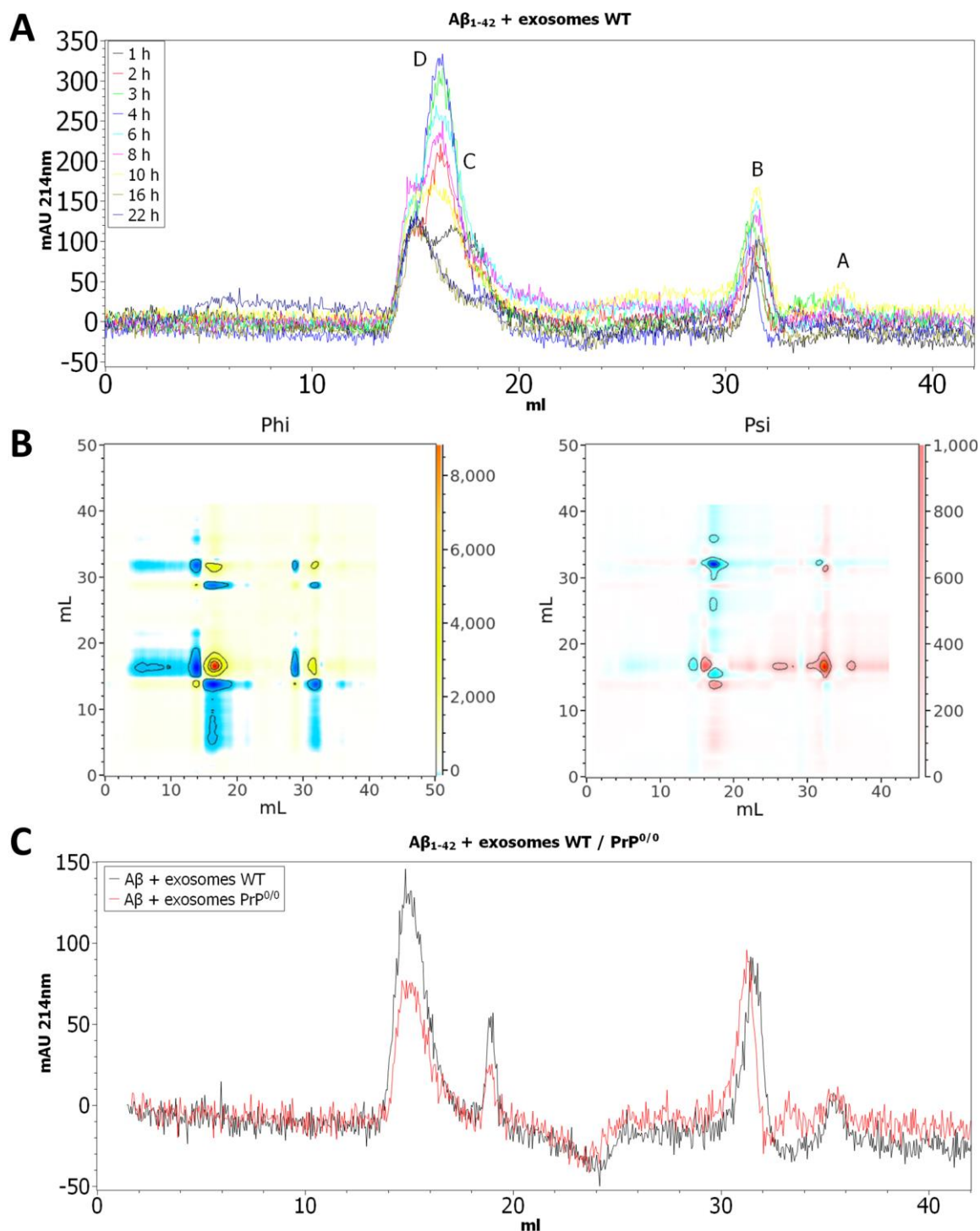


Abbildung 3.10: Zeitaufgelöste SEC der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen + N2a-WT- oder N2a-PrP^{0/0}-Exosomen.

(A) Chromatogramm der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen + N2a-WT-Exosomen zu differentiellen Inkubationszeitpunkten. Signale für unterschiedliche $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen ableitbar: $A\beta_{1-42}$ -Monomere und -LMW's (A, B), -HMW's und für fibrilläres $A\beta_{1-42}$ (C, D). Bereits zu frühen Zeitpunkten der Aggregation sind Signale für HMW's und fibrilläres $A\beta_{1-42}$ vorhanden. Signalintensität der Größenpopulation D steigt mit Inkubationszeit, C nimmt komplementär dazu ab. A Signalintensität nimmt mit Inkubationszeit ab, wobei B nahezu unverändert ist. (B) 2D-GPC des gesamten Zeitverlaufs. Positive Korrelationen (Psi) der $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen untereinander, geringe negativen Korrelationen (Psi) der dominierenden der $A\beta_{1-42}$ -Größenpopulationen. Wachstum von D korreliert mit der Abnahme der Intensität von A und B. (C) SEC-Chromatogramm der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen + N2a-WT- bzw. N2a-PrP^{0/0}-Exosomen nach 24 h Inkubation. Deutlich stärkeres Signal für HMW's und fibrilläre Spezies nach Inkubation mit N2a-WT-Exosomen.

Die $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen ohne Exosomenzugabe zeigt eine Zunahme höherer $A\beta_{1-42}$ -Oligomerspezies im Zeitverlauf. Schon in frühen Inkubationszeitpunkten sind fibrillenartige Signale zu erkennen und keine deutlichen Signale für $A\beta_{1-42}$ -Monomere oder LMW's (Abb. 3.11, A). N2a-WT-Exosomen führen zu einem früheren Auftreten der Signale für $A\beta_{1-42}$ -Oligomerspezies im Zeitverlauf (grau $A\beta_{1-42}$ -Referenz (A); farbig $A\beta_{1-42}$ + N2a-WT-Exosomen). Zum Ende der Inkubationszeit werden deutlich höhere Signalintensitäten für Oligomerspezies und fibrilläre Strukturen erzielt (Abb. 3.11, B). Die Inkubation mit N2a-PrP^{0/0}-Exosomen führt zu keiner Veränderung der Aggregationskinetik der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen. Es zeigt sich keine Separation der SAXS-Signale mit und ohne Exosomeninkubation (grau $A\beta_{1-42}$ -Referenz (A); farbig $A\beta_{1-42}$ + N2a-PrP^{0/0}-Exosomen) (Abb. 3.11, C). Die Aggregationskinetik der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen unter Einfluss der N2a-WT-Exosomen separiert sich deutlich von den sich überlagernden Signalen der Aggregationskinetik ohne Exosomen oder mit N2a-PrP^{0/0}-Exosomen. Diese Separation zeigt sich auch nach Berechnung des Streumassenradius (Rg; *engl: radius of gyration*). In allen Probenansätzen ist der Rg im Querschnitt unverändert. Es zeigt sich eine geringe Zunahme des Rg im Zeitverlauf. Bei der Gegenwart von N2a-WT-Exosomen ist der Rg systematisch größer als in den weiteren Probenansätzen (Abb. 3.11, D). Das ePrP^C begünstigt die Aggregationskinetik der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen.

Als komplementäres Experiment wurden ATR-FTIR-Messungen der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen mit und ohne Inkubation von N2a-WT- oder N2a-PrP^{0/0}-Exosomen durchgeführt. Die Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aggregationskinetik vermessen. Die $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung ohne Inkubation mit Exosomen zeigt eine Zunahme der Signale bei 1630 cm⁻¹ (β -Faltblattstrukturen) unter Abnahme der Signale für α -Helices mit steigender Inkubationszeit (Abb. 3.12, A). In der Gegenwart von N2a-WT-Exosomen in der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung zeigt sich in der Aggregationskinetik eine frühere Abnahme der α -Helices-Signale, sowie ein früherer Zuwachs der Signalintensität für β -Faltblattstrukturen. N2a-WT-Exosomen fördern die Bildung von HMW's und fibrilläre Strukturen (Abb. 3.12, B). Dieser Effekt kann für N2a-PrP^{0/0}-Exosomen nicht beobachtet werden. Hierbei ist die Aggregationskinetik ähnlich der reinen $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung (Abb. 3.12, C). Das ePrP^C fördert die Aggregationskinetik der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung.

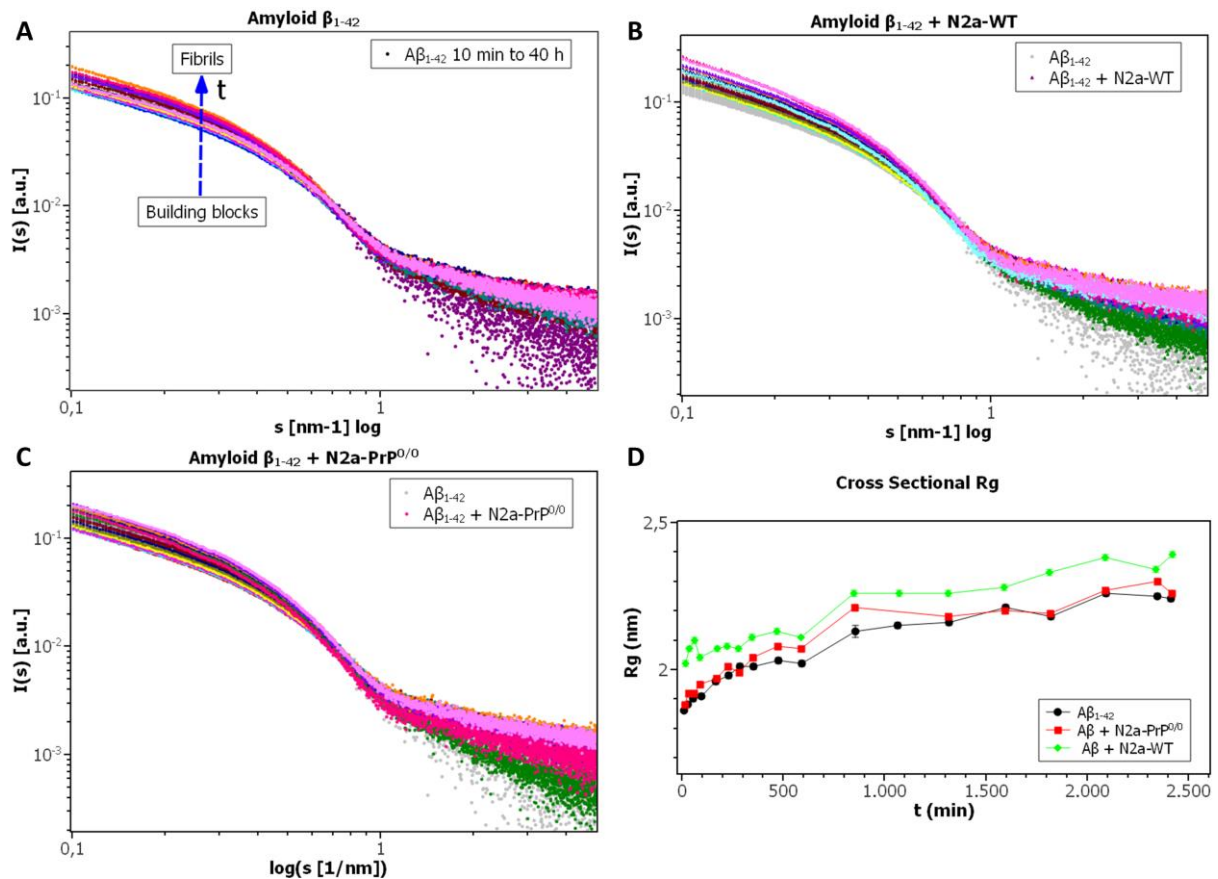


Abbildung 3.11: Zeitaufgelöste SAXS-Messungen der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen + N2a-WT- oder N2a-PrP^{0/0}-Exosomen.

(A) Zeitaufgelöste SAXS-Profile während einer ~40-stündigen Inkubation der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung. Zunahme der Streuungsintensität im Bereich niedriger Winkel. Hohe Streuungsintensität zu frühen Inkubationszeitpunkten. Zunahme großer $A\beta_{1-42}$ -Spezies mit steigender Inkubationszeit. (B) SAXS-Profile bei Inkubation der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung mit N2a-WT-Exosomen. Starke Zunahme der Streuungsintensität im Bereich niedriger Winkel bei Exosomeninkubation (farbig). Deutliche Separation zu $A\beta_{1-42}$ ohne Exosomenzugabe (grau). Förderung der Aggregationskinetik durch N2a-WT-Exosomen. (C) SAXS-Profile bei Inkubation der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung mit N2a-PrP^{0/0}-Exosomen (farbig). Kein Einfluss auf die Aggregationskinetik von $A\beta_{1-42}$. (D) $A\beta_{1-42}$ Rg in Gegenwart von N2a-WT-Exosomen erhöht. N2a-PrP^{0/0}-Exosomen zeigen vergleichbaren $A\beta_{1-42}$ Rg zu $A\beta_{1-42}$ ohne Exosomenzugabe.

Die Signalintensität bei 1630 cm^{-1} ist zu Beginn der Aggregationskinetik bei allen Probenansätzen gleich. Nach ~ 60-minütiger Inkubation zeigt die Inkubation mit N2a-WT-Exosomen einen stärkeren Zuwachs für β -Faltblattstrukturen und eine Separation zu $A\beta_{1-42}$ ohne bzw. mit N2a-PrP^{0/0}-Exosomen. Die $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung erreicht nach ca. 3,5 h ein Plateau bei $\Delta_{\text{absorbance}} 1629\text{ cm}^{-1}$. N2a-PrP^{0/0}-Exosomen führen zu einem Anstieg der $\Delta_{\text{absorbance}} 1629\text{ cm}^{-1}$ über den Inkubationszeitraum. Den stärksten Signalzuwachs weist die $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung bei Inkubation mit N2a-WT-Exosomen auf (Abb. 3.12, D).

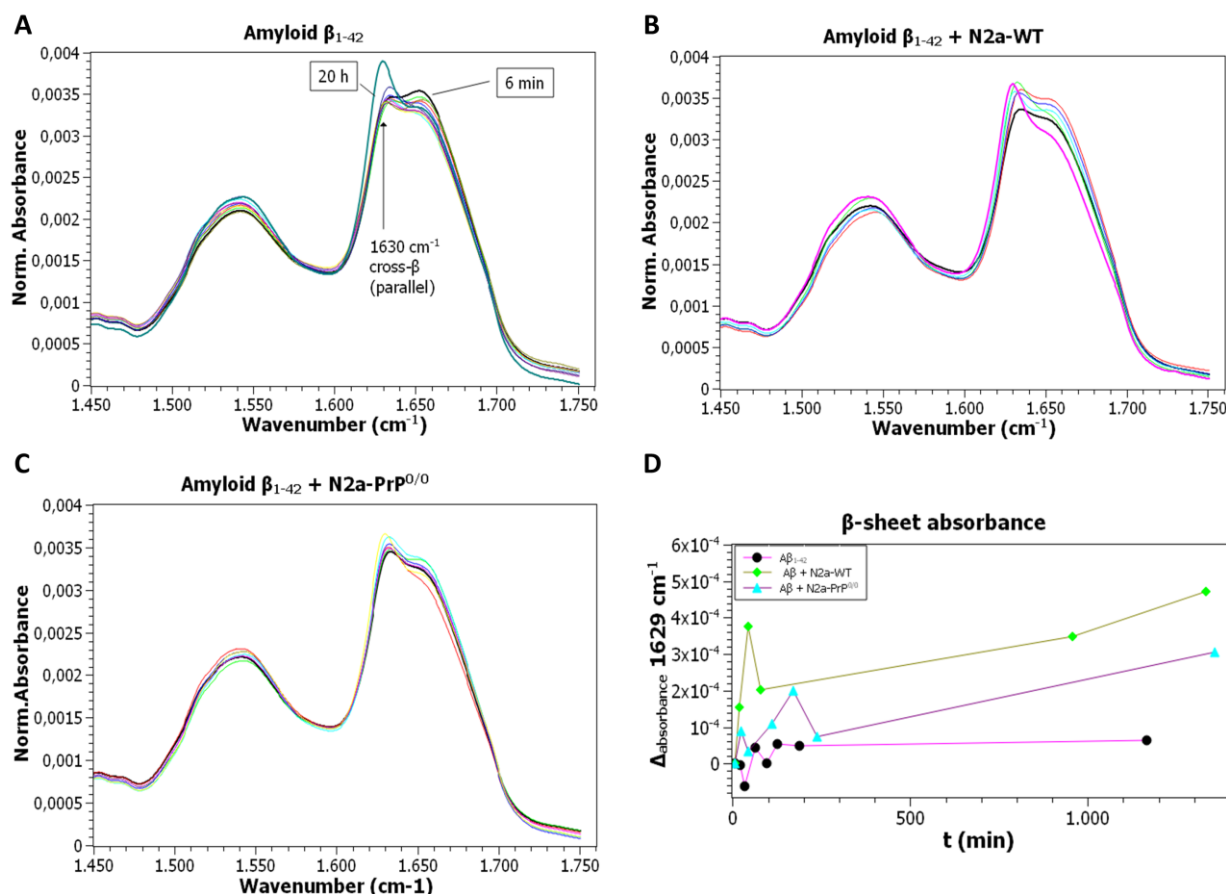


Abbildung 3.12: Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Messungen der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen + N2a-WT- oder N2a-PrP $^{0/0}$ -Exosomen. (A) Zunahme der Signalintensität bei 1630 cm^{-1} (β -Faltblattstrukturen) unter Abnahme der Signalintensitäten für α -Helices im Verlauf der $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetik. (B) N2a-WT-Exosomen führen zu einer Förderung der $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetik. Höherer Zuwachs der Signalintensitäten für β -Faltblattstrukturen unter Abnahme der Signalintensität für α -Helices. (C) N2a-PrP $^{0/0}$ -Exosomen zeigen keinen Einfluss auf die $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetik. Signalintensitäten für β -Faltblattstrukturen und α -Helices vergleichbar zu A. (D) Vergleich der Δ absorbance 1629 cm^{-1} aller Probenansätze. Zuwachs der Signalintensität für N2a-WT-Exosomen bereits nach ca. 60 min Inkubationszeit im Vergleich zu $A\beta_{1-42}$ +/- N2a-PrP $^{0/0}$ -Exosomen. Höhere Signalintensitäten über den Inkubationszeitraum für $A\beta_{1-42}$ in Gegenwart von N2a-WT-Exosomen.

Die Analyse der Massenfraktionen (Aggregate und *building blocks*) einer weiteren SAXS-Messung, der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen nach Inkubation mit N2a-WT- oder N2a-PrP $^{0/0}$ -Exosomen, zeigt eine deutlich frühere Abnahme der *building blocks* und Zunahme der Aggregate im Inkubationszeitraum von 0 min bis 500 min bei N2a-WT-Exosomen. Die Aggregationskinetik wird in diesem Zeitraum durch die N2a-WT-Exosomen zugunsten der Aggregation von $A\beta_{1-42}$ beeinflusst. Dieser Effekt zeigt sich nicht bei der Inkubation der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen mit N2a-PrP $^{0/0}$ -Exosomen (Abb. 3.13).

Alle durchgeführten Experimente zur $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetik zeigen eine deutliche Förderung der $A\beta_{1-42}$ -Aggregation in Gegenwart von N2a-WT-Exosomen. Dieser Effekt kann bei Inkubation der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung mit N2a-PrP^{0/0}-Exosomen nicht beobachtet werden. ePrP^C vermittelt die $A\beta_{1-42}$ -Aggregation zugunsten der Ausbildung strukturierter β -Faltblattstrukturen.

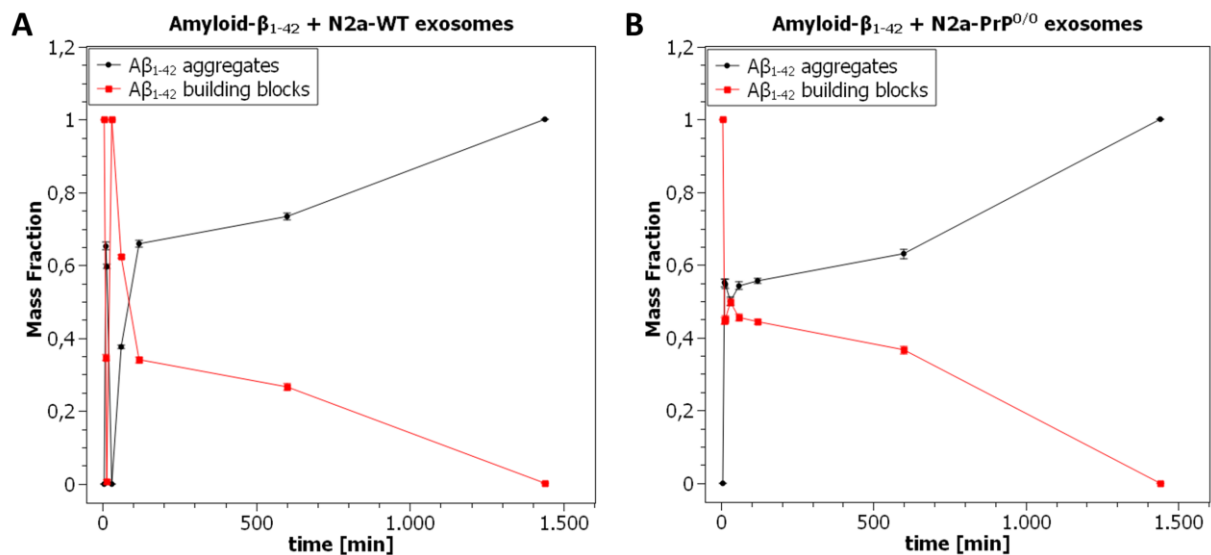


Abbildung 3.13: Zeitliche Entwicklung der zwei Hauptkomponenten in der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung.

($A\beta_{1-42}$ -building blocks, höhere $A\beta_{1-42}$ -Aggregate) **(A)** Im Verlauf der $A\beta_{1-42}$ -Aggregation + N2a-WT-Exosomen nimmt die Anzahl der $A\beta_{1-42}$ -building blocks stetig ab, komplementär dazu nimmt die Menge an höheren $A\beta_{1-42}$ -Aggregationsstufen zu. **(B)** In Gegenwart von N2a-PrP^{0/0}-Exosomen in der $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösung ist ein deutlich langsames Wachstum der $A\beta_{1-42}$ -Aggregate zu beobachten. Das Wachstum erfolgt unter Abnahme der $A\beta_{1-42}$ -building blocks.

3.3 Etablierung eines fotochemischen Membranlabels auf Exosomen

Das im Folgendem dargestellte Projekt wurde in Kooperation mit dem Fraunhofer-Zentrum für Angewandte Nanotechnologie (CAN GmbH) durchgeführt. Hierbei erfolgte eine gleichwertige praktische Durchführung des Projekts durch M.Sc. Alexander Hartmann und Dr. Oliver Dabrowski. Die Ergebnisse dieses Projektes sind Teil der Dissertationen von M.Sc. A. Hartmann und Dr. O. Dabrowski.

Ziel dieses Projekts war die Entwicklung und Etablierung eines Verfahrens zur fotochemischen Funktionalisierung von Exosomen. Dies ermöglicht die Kopplung von Markern wie beispielsweise Farbstoffen oder Wirkstoffen an die Exosomen. Diese fungieren hierbei als Transportvehikel. Die verwendeten Fotoaffinitätslabel wurden von Dr. Dabrowski im Rahmen seiner Dissertation entwickelt, synthetisiert und bereitgestellt. Am Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erfolgte unter der Leitung von M.Sc. A. Hartmann die biologische Einführung des Verfahrens, mit welchem die Fotoaffinitätslabel in der exosomalen Membran longitudinal stabil verankert werden können. Dazu gehört die Etablierung eines Protokolls und der optimalen Reaktionsbedingungen sowie die Überprüfung der Exosomen-Funktionalität.

Das entwickelte Fotoaffinitätslabel besitzt einen lipophilen Charakter mit einer Rhodamin-Kopfgruppe, welche gegen DNA- oder RNA-Fragmente, Peptidsequenzen, Medikamente oder andere Farbstoffe ausgetauscht werden kann. Zusätzlich verfügt die Struktur über eine fotoaktivierbare Gruppe, welche unter milden Bedingungen zur Reaktion gebracht werden kann und dadurch kovalente Bindungen ausbildet ¹⁸¹.

Konventionelle lipophile Membranfarbstoffe, wie die PKH-Farbstoffe, sind nicht kovalent in der Zellmembran verankert. Im Anwendungsbereich auf Exosomen führt dies zu dem Problem der Diffusion des Membranfarbstoffs innerhalb einer Membran und zwischen benachbarten Membranen und somit zu unspezifischen Signalen. Diese Diffusion soll mit Hilfe der Ausbildung einer kovalenten Bindung behoben werden und somit longitudinal stabil funktionalisierte Exosomen verfügbar machen. Zum Vergleich dient der konventionelle PKH26-Membranfarbstoff (Merck, USA).

Zu Beginn der Versuche lagen zwei Versionen des Fotoaffinitätslabels vor: R51 mit einer Alkylkette und R87 mit zwei Alkylketten ¹⁸¹.

In einer 40 μM Lösung zeigten sich deutliche Unterschiede in deren Eigenschaften. Die R51-Lösung wies eine deutliche Oberflächenspannung auf, welche bei der R87-Lösung durch seine stärkeren tensidischen Eigenschaften nicht vorhanden war ¹⁸¹.

3.3.1 Entwicklung des Färbeprotokolls für den R87-Membranfarbstoff

Zu Beginn der Versuche mit N2a-WT-Exosomen wurde das Färbeprotokoll nach Herstellerangaben des PKH26-Membranfarbstoffs für R51, R87 und PKH26 verwendet. Die gefärbten Exosomen wurden mittels OptiPrep™-Dichtegradienten und Ultrazentrifugation aufgereinigt, wobei die analysierten Fraktionen ein Volumen von 1 ml aufwiesen (siehe 2.5.1).

Im OptiPrep™-Dichtegradienten konzentrieren sich die Exosomen in den Fraktionen 7, 8 und 9. Der Nachweis der Exosomen erfolgte mittels WB gegen Flotillin 1. Des Weiteren wurde eine Bestimmung der Exosomenmenge und Partikelgröße in den Fraktionen durch NTA durchgeführt. Die mit PKH26 oder R87 behandelten Exosomen sind in scharfen farblichen Banden konzentriert. Dies konnte mit R51 aufgrund einer geringeren Interkallationsneigung deutlich schwächer beobachtet werden. Daher wurde R51 an dieser Stelle verworfen und die Arbeit auf R87 konzentriert. Die höchste Exosomenkonzentration konnte bei denen mit R87 behandelten Exosomen in Fraktion # 9 mit $2,98 \times 10^8$ p/ml und bei PKH26 in Fraktion # 7 mit $2,57 \times 10^8$ p/ml gemessen werden. Die am häufigsten vertretenen Partikelgrößen waren ca. 170 nm bei R87 und 143 nm bei PKH26 im Durchmesser. In beiden Behandlungen verteilten sich die Exosomen auf die Fraktionen # 7 - # 10. In allen anderen Fraktionen konnten keine Partikel im NTA gemessen werden und auch im WB zeigten sich nur sehr schwache (PKH26) bis keine (R87) Banden für Flotillin 1 (Abb. 3.14) ¹⁸¹. [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Die isolierten, gefärbten und aufgereinigten Exosomen wurden anschließend für das Exosome-uptake-Assay verwendet. Hierfür wurden $4,5 \times 10^3$ N2a-WT-GFP-Zellen mit $2,5 \times 10^8$ funktionalisierten Exosomen über Nacht inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie behandelt (siehe 2.5.2).

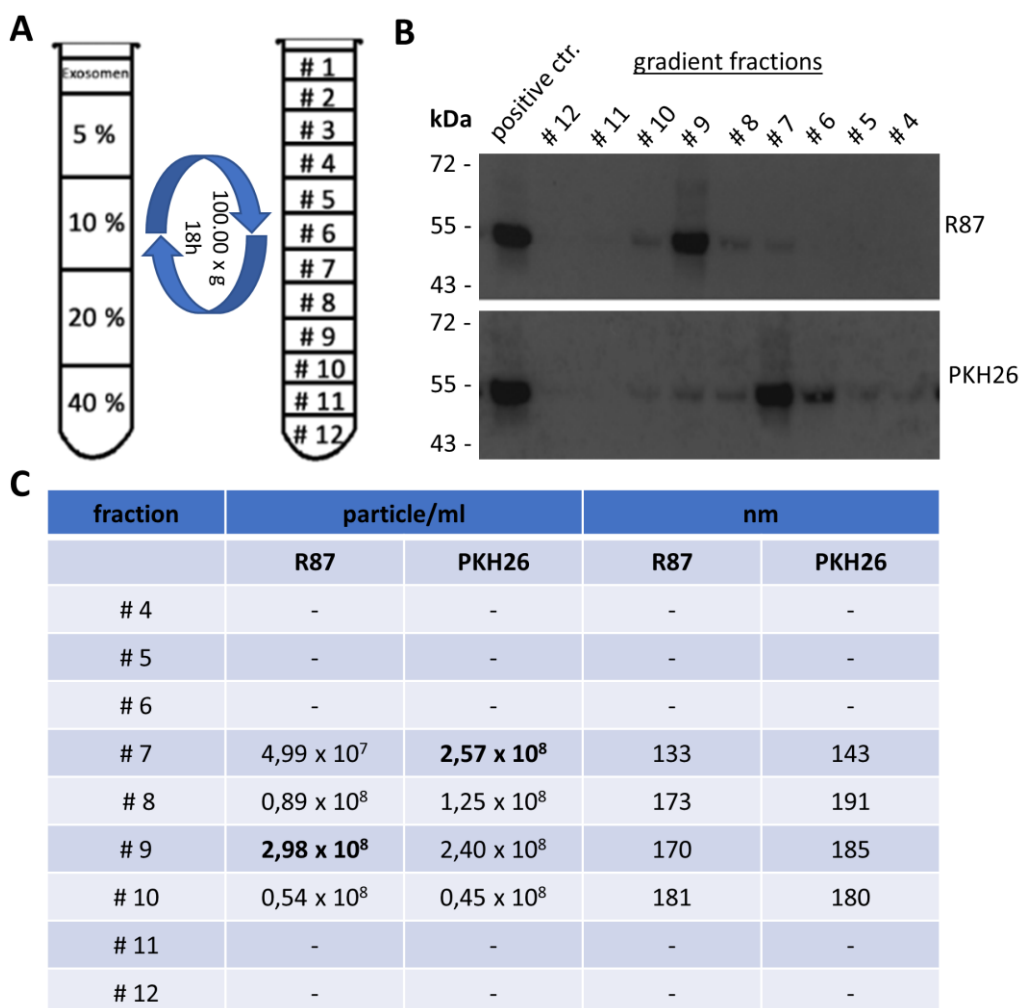


Abbildung 3.14: Analyse der Fraktionen des OptiPrep™-Dichtegradient nach Ultrazentrifugation der R87 und PKH26 behandelten Exosomen.

(A) Schema des Aufbaus des des OptiPrep™-Dichtegradient sowie Darstellung der analysierten Fraktionen. (B) WB der Fraktionen nach der Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation mit Detektion gegen Flotillin 1, ein auf Exosomen prominent vertretenes Membranprotein. Es konnte ein Signal für Flotillin 1 bei R87- und PKH26-Behandlung in den Fraktionen # 7, # 8, # 9 und # 10 detektiert werden. Stärkstes Signal nach der R87-Behandlung erkennbar in Fraktion # 9 sowie bei PKH26-Behandlung in Fraktion # 7. Für die positiv Kontrolle wurden 1×10^9 N2a-WT-Exosomen eingesetzt. (C) NTA-Analyse der gewonnenen Fraktionen aus dem Gradienten. Nach beiden Behandlungen waren nur in den Fraktionen # 7 - # 9 messbare Mengen an Exosomen zu detektieren. Hier konnten die höchsten Konzentrationen bei der R87-Behandlung in Fraktion # 9 und nach PKH26-Behandlung in Fraktion # 7 gemessen werden. Die Größenverteilung der Exosomen liegt zwischen 133 nm – 181 nm bei den R87-Exosomen und 143 nm – 191 nm bei den PKH26-Exosomen. [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Zur Überprüfung der Eigenschaften der verwendeten Membranfarbstoffe wurden N2a-WT-GFP-Zellen mit den Farbstoffen behandelt. Die Menge des verwendeten Membranfarbstoffes ist hierbei äquivalent zur Exosomenbehandlung gewählt worden. Die Membranfarbstoffe wurden dem Zellkulturmedium beigegeben und über Nacht inkubiert. R87 sowie PKH26 interkalieren in die Zellmembran. Bei beiden Membranfarbstoffen konnte eine homogene Färbung der Zellmembran erzielt werden

(Abb. 3.15, A). Die Zellen, welche mit R87 oder PKH26 behandelten Exosomen inkubiert wurden, zeigten in beiden Ansätzen eine Interkalation der Membranfarbstoffe in die Zellmembran. R87 diffundiert aus den Exosomen und führt zu einer homogenen Färbung der Zellmembran der N2a-WT-GFP-Zellen. Auch der PKH26-Membranfarbstoff diffundiert aus der exosomalen Membran in die Zellmembran der Akzeptorzellen. Allerdings ist die Verteilung des PKH26-Membranfarbstoffs ungleichmäßig (Abb. 3.15, B). Beide Membranfarbstoffe interkalieren in die Zellmembran der Akzeptorzellen. Des Weiteren zeigte sich in beiden Ansätzen eine Diffusion des Membranfarbstoffs aus der exosomalen Membran zu den N2a-WT-GFP-Zellen. ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

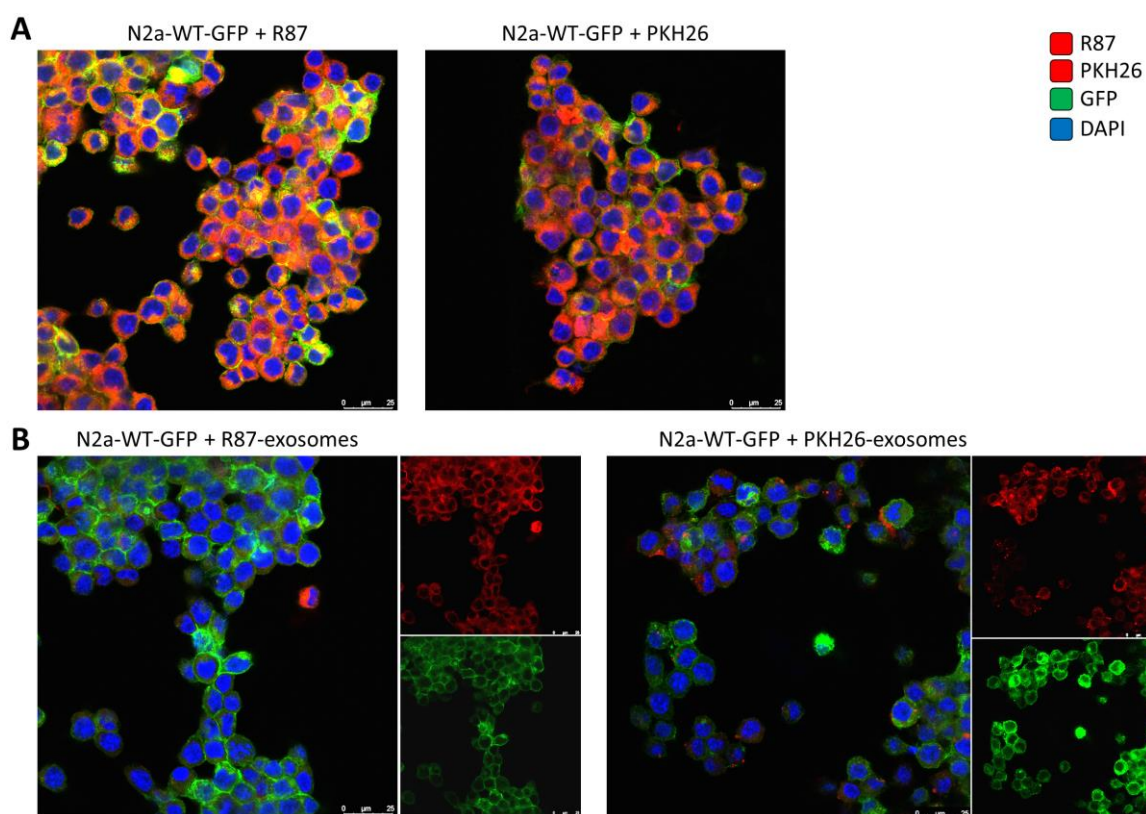


Abbildung 3.15: Exosome-uptake-Assay der mit den Membranfarbstoffen R87 bzw. PKH26 behandelten Exosomen auf N2a-WT-GFP-Zellen.

(A) Konfokalmikroskopische Aufnahme von N2a-WT-GFP-Zellen nach Behandlung mit den Membranfarbstoffen R87 bzw. PKH26. Beide Farbstoffe interkalieren gleichmäßig in die Zellmembran der Akzeptorzellen. (B) Konfokalmikroskopische Aufnahme von N2a-WT-GFP-Zellen nach Behandlung mit R87 bzw. PKH26 gefärbten Exosomen ($2,5 \times 10^8$). Die Membranfarbstoffe diffundieren aus der exosomalen Membran in die Zellmembran der Akzeptorzellen. R87 führt hierbei zu einer gleichmäßigen Verteilung des Membranfarbstoffes. PKH26 verteilt sich ungleichmäßig in die Zellmembran der N2a-WT-GFP-Zellen. ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Somit konnte das Färbeprotokoll nach Herstellungsangaben von PKH26 erfolgreich auf den R87-Membranfarbstoff übertragen werden.

3.3.2 Fotochemische Verankerung des R87-Membranfarbstoffs

Nach der Inkubation der Exosomen mit dem R87-Membranfarbstoff wurden diese mit UV-Licht bestrahlt. Diese Bestrahlung führt zu einer longitudinalen stabilen Verankerung von R87 in die exosomale Membran durch die Ausbildung kovalenter Bindungen. Die mit PKH26 behandelten Exosomen wurden ebenfalls mit UV-Licht bestrahlt. Hierbei erfolgte die Bestrahlung zwischen Schritt 3) und 4) nach dem Standardprotokoll. Die fotochemische Verankerung des R87-Membranfarbstoffs in die Membran von Exosomen wurde zunächst mit UV-A-Bestrahlung in einem durch die CAN GmbH konstruiertem Fotoreaktor bei 37°C durchgeführt ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.].

R87 zeigte eine geringe Absorption im UV-A-Bereich, wodurch längere Bestrahlungszeiten zur fotochemischen Verankerung benötigt wurden. Im Exosomen-*uptake-Assay* konnte bei einer Bestrahlungsdauer der Exosomen von 1 h eine Aggregation der mit R87 und PKH26 behandelten Exosomen beobachtet werden. Des Weiteren diffundiert der R87-Membranfarbstoff in die Zellmembran der N2a-WT-GFP-Zellen. Nach 1 h Bestrahlung der mit R87 behandelten Exosomen konnte keine fotochemische Verankerung erzielt werden (Abb. 3.16, A). PKH26-Exosomen zeigten eine Neigung zur Aggregation und eine Diffusion des Membranfarbstoffs in die Zellmembran der Akzeptorzellen (Abb. 3.16, B). ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Für eine effektivere fotochemische Verankerung wurde in den weiteren Bestrahlungsexperimente Licht im UV-C-Bereich verwendet. Die Bestrahlung der gefärbten Exosomen erfolgte in einer Sterilwerkbank, welche mit einer UV-Quelle (UV-C-Leistung von 4 W, 27%) ausgestattet ist in einer Quarzglasküvette bei RT. Die Bestrahlung wurde in unterschiedlicher Dauer durchgeführt und begann direkt nach Zugabe des Membranfarbstoffes zu den Exosomen. Die Exosomen wurden mit dem R87-Membranfarbstoff behandelt und für 5 min, 10 min, 20 min oder 30 min mit UV-A- oder UV-C-Licht bestrahlt. Die bestrahlten Exosomen wurden anschließend für das Exosome-*uptake-Assay* mit N2a-WT-Zellen eingesetzt.

Die im Fotoreaktor mit UV-A bestrahlten Exosomen zeigen bereits bei einer Bestrahlungsdauer von 5 min eine Aggregationsneigung.

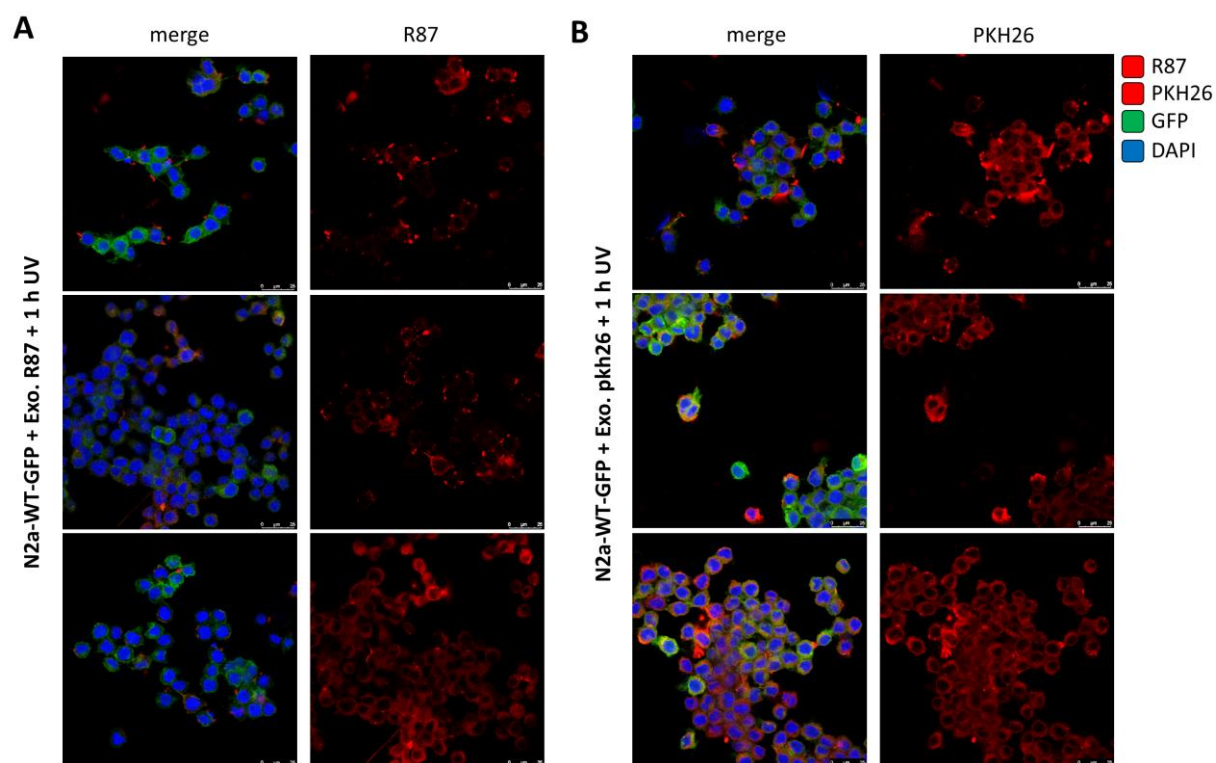


Abbildung 3.16: Exosome-uptake-Assay der mit den Membranfarbstoffen R87 bzw. PKH26 behandelten Exosomen auf N2a-WT-GFP-Zellen nach UV-A-Bestrahlung.

(A) Konfokalmikroskopische Aufnahme von N2a-WT-GFP-Zellen nach Behandlung mit den Membranfarbstoffen R87 nach 1 h Bestrahlung im Fotoreaktor. Es ist eine Aggregation der Exosomen zu beobachten. Des Weiteren diffundiert der R87-Membranfarbstoff in die Zellmembran der Donorzellen. **(B)** Mit PKH26 behandelte und bestrahlte Exosomen zeigen die Bildung von Aggregaten. PKH26 diffundiert in die in die Zellmembran der Donorzellen. ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Nach 20-minütiger Bestrahlung bilden sich deutlich sichtbare Exosomenaggregate. Zudem ist in allen Zeitpunkten eine starke Diffusion des Membranfarbstoffs zu beobachten (Abb. 3.17, A). Die Bestrahlung der Exosomen in der Sterilwerkbank mit UV-C führt in allen Zeitpunkten zu einer Aggregation der Exosomen. Im Vergleich zu den mit UV-A bestrahlten Exosomen ist in den UV-C bestrahlten Exosomen eine deutlich geringere Diffusion von R87 zu erkennen (Abb. 3.17, B). Die fotochemische Verankerung von R87 konnte durch die Bestrahlung mit dem energiereicheren Licht des UV-C-Bereichs erzielt werden. ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

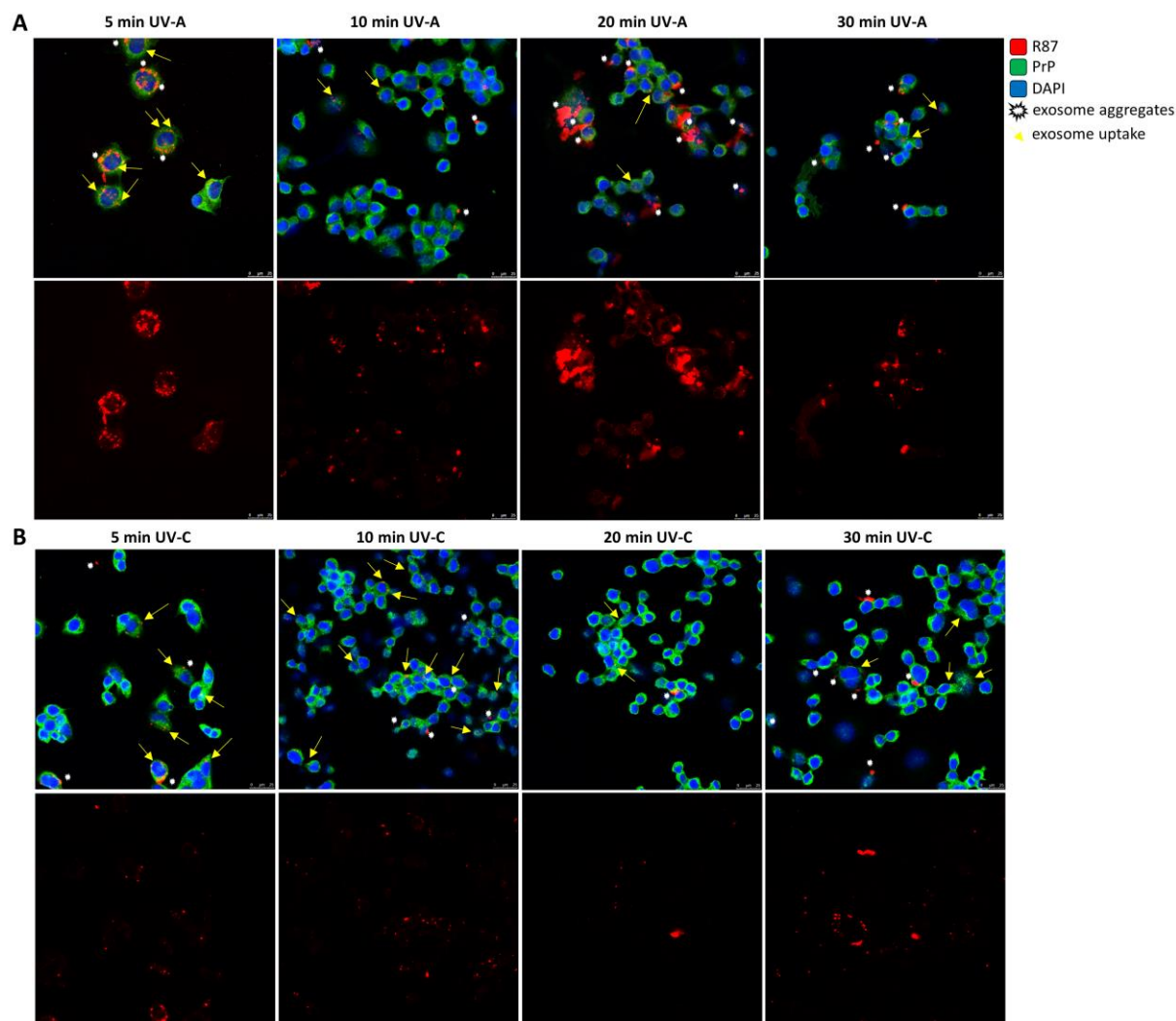


Abbildung 3.17: Exosome-uptake-Assay der mit R87 behandelten Exosomen auf N2a-WT-Zellen nach UV-A- und UV-C-Bestrahlung in unterschiedlicher Dauer.

(A) Konfokalmikroskopische Aufnahme von N2a-WT-Zellen nach Behandlung mit R87 nach Bestrahlung mit UV-A-Licht. Zu allen Zeitpunkten ist eine Aggregation der Exosomen zu beobachten. Des Weiteren diffundiert der R87-Membranfarbstoff in die Zellmembran der Akzeptorzellen. **(B)** Bestrahlung der R87-Exosomen mit UV-C-Licht. Zu allen Zeitpunkten ist eine Aggregation der Exosomen zu beobachten. Die Diffusion von R87 konnte deutlich reduziert werden. ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

3.3.3 Optimierung des Färbeprotokolls

Die Färbung der Exosomen nach dem verwendeten Protokoll erfordert die Behandlung der isolierten Exosomen mit Diluent C und FCS. Diluent C dient der temporären Desintegration der exosomalen Zellmembran und unterstützt die Interkalation der Membranfarbstoffe in die Membran. Der Prozess wird durch die Zugabe von FCS geblockt. Dies führt zu einer Verunreinigung der isolierten Exosomen und erfordert eine Aufreinigung durch einen OptiPrep™-Dichtegradienten.

Die Analyse der gefärbten und aufgereinigten Exosomen mittels MALDI-TOF ergab eine Verunreinigung der Probe mit Iodixanol (Bestandteile des OptiPrep™-Dichtegradienten. Bei 1550,735 M/z (Masse pro Ladung) wurde das Signal für M+H⁺ nachgewiesen (Abb. 3.18, A). Das erhaltene Isotopenmuster zeigt Natrium- und Kaliumaddukte, sowie den Austausch von Iod und passt zu den theoretischen Werten, die für Iodixanolderivate zu erwarten sind. Die Daten weisen auf eine verfahrensbedingte Fragmentierung hin (Abb. 3.18, B). ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

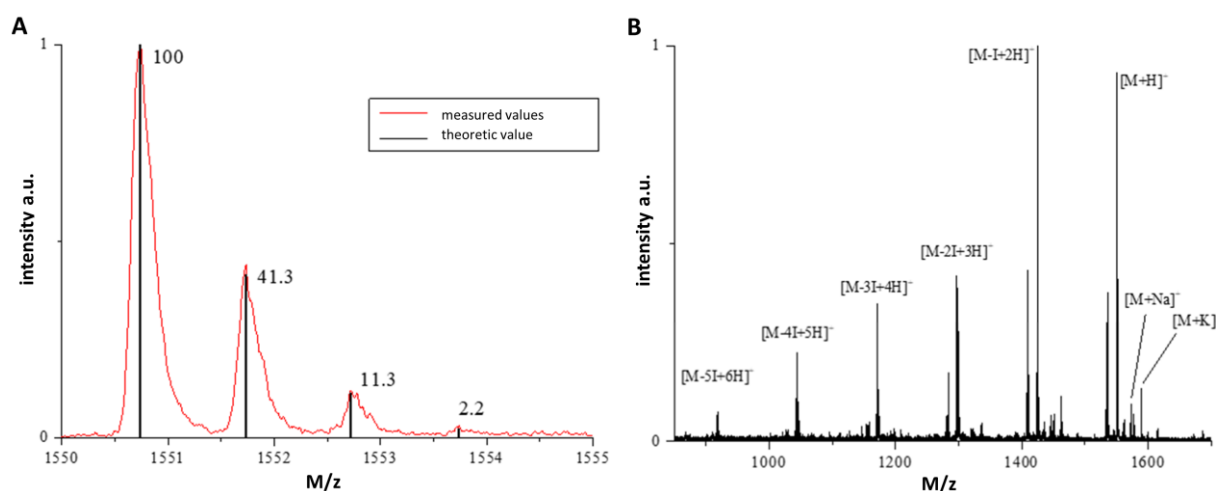


Abbildung 3.18: MALDI-TOF Analyse von Iodixanol (A) und Iodixanolderivaten (B) ¹⁸¹
[Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Zur Vermeidung der Verunreinigung der gefärbten Exosomen wurde das Färbeprotokoll weiter optimiert. Die Behandlung der Exosomen mit Diluent C, FCS und dem OptiPrep™-Dichtegradienten entfielen hierbei (siehe 2.5.1).

Der Vergleich beider Methoden erfolgte für R87 und PKH26 durch die folgenden Parameter jeweils nach Durchführung des Färbeprotokolls: Exosomenausbeute, Exosomengröße und -größenverteilung mittels NTA.

Die Exosomenausbeute nach der Behandlung der Exosomen mit dem R87-Membranfarbstoff konnte von 50% (nicht optimiertes Protokoll) auf 70% (optimiertes Protokoll) gesteigert werden. Des Weiteren zeigt sich bei der Behandlung der Exosomen mit dem optimierten Färbeprotokoll eine geringere Standardabweichung in der Größenverteilung der gefärbten Exosomen (Tab. 3.1). ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Tabelle 3.1: Vergleich der Färbeprotokolle (nicht optimiert vs. optimiert).

NTA-Analysen der Exosomen vor und nach Durchführung der unterschiedlichen Färbeprotokolle. [Tabelle übernommen und modifiziert aus ¹⁸¹; Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

	Ausgangswerte	nicht optimiert	optimiert
Exosomengröße [nm]	120 ± 2,3	140 ± 1,0	136 ± 2,5
Standardabweichung [nm]	61 ± 2,3	108 ± 9,7	72 ± 3,5
Ausbeute [%]	100	50	70

Die nach dem optimierten Färbeprotokoll behandelten Exosomen wurde für das Exosomen-*uptake*-Assay mit N2a-WT-GFP-Zellen verwendet. Die mit R87 behandelten Exosomen führen zu einer Diffusion des Membranfarbstoffs in die Zellmembran der Akzeptorzellen. Im Unterschied zu der homogenen Diffusion von R87, welche im nicht optimierten Färbeprotokoll zu beobachten war, führt das optimierte Protokoll zu einer granulären Verteilung von R87 in der Zellmembran der Akzeptorzellen. Die Färbung von Exosomen mit dem PKH26-Membranfarbstoff ist mit dem optimierten Protokoll nicht möglich. ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

3.3.4 Etablierung des R87-Membranfarbstoffs

Zur Etablierung des R87-Färbeprotokolls wurden die Exosomen mit UV-C-Licht bestrahlt. Hierfür wurde das optimierte Färbeprotokoll verwendet. In den Vorexperimenten zeigte sich bereits ab einer Bestrahlungsdauer der Exosomen von 5 min eine Aggregation der R87-Exosomen im Exosomen-*uptake*-Assay.

Im weiteren Verlauf wurde die Bestrahlungsdauer auf 1 min, 2 min oder 3 min verkürzt. Als Kontrolle dienen nicht bestrahlte mit R87 behandelte Exosomen (0 min). Des Weiteren wurde die eingesetzte Menge des R87-Membranfarbstoffs zu Färbung der Exosomen variiert. Bisher wurden alle Experimente mit einer R87-Konzentration von 0,3 µM je 1 x 10⁸ Exosomen verwendet. Dies entspricht der Konzentration des PKH26-Membranfarbstoffs nach Herstellerangaben. Getestet wurde die Reduktion der R87-Konzentration auf 50% und 25%. ¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Die Reduktion des Farbstoffes ermöglicht in allen Konzentrationen die direkte Anfärbung der Zellen. Hierbei wurde der R87-Membranfarbstoff direkt zum Zellkulturmedium der N2a-WT-Zellen gegeben (Abb. 3.19, R87 ctr.). Die Bestrahlung

der Exosomen führt bereits ab einer Dauer von 1 min zu einer deutlichen Blockade der Diffusion des R87-Membranfarbstoffs. Im Gegensatz zu den Zellen, welche mit unbestrahlten R87-Exosomen behandelt wurden (0 min). Nach allen Bestrahlungszeiten sind die markierten Exosomen als diskrete puncta in den Akzeptorzellen zu erkennen. Vereinzelt ist eine leichte Aggregation erkennbar, welche mit steigender Bestrahlungsdauer zunimmt (Abb. 3.19). Die Reduktion der R87-Konzentration ermöglicht die Färbung der Exosomen in beiden getesteten Varianten. Die Reduktion der Farbstoffkonzentration um 50% führt zu einer minimal veränderten Effektivität der Exosomenmarkierung. Die Behandlung der Exosomen mit 25% der Farbstoffkonzentration zeigt ein vermindertes R87-Signal im Exosomen-*uptake*-Assay. Des Weiteren sind die markierten Exosomen in den Akzeptorzellen nachweisbar (Abb. 3.19).¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

Die longitudinal stabile Funktionalisierung von Exosomen konnte somit erreicht werden. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass isolierte Exosomen mit dem R87-Membranfarbstoff in einer Konzentration von 0,15 μM je 1×10^8 Exosomen inkubiert und für 1 min mit Licht im UV-C-Bereich bestrahlt werden. Dies ermöglicht die fotochemische Verankerung von R87 in die Exosomen und verhindert die Diffusion von R87. Das hier etablierte Protokoll kann wie in Abbildung 3.20 gezeigt angewendet werden.

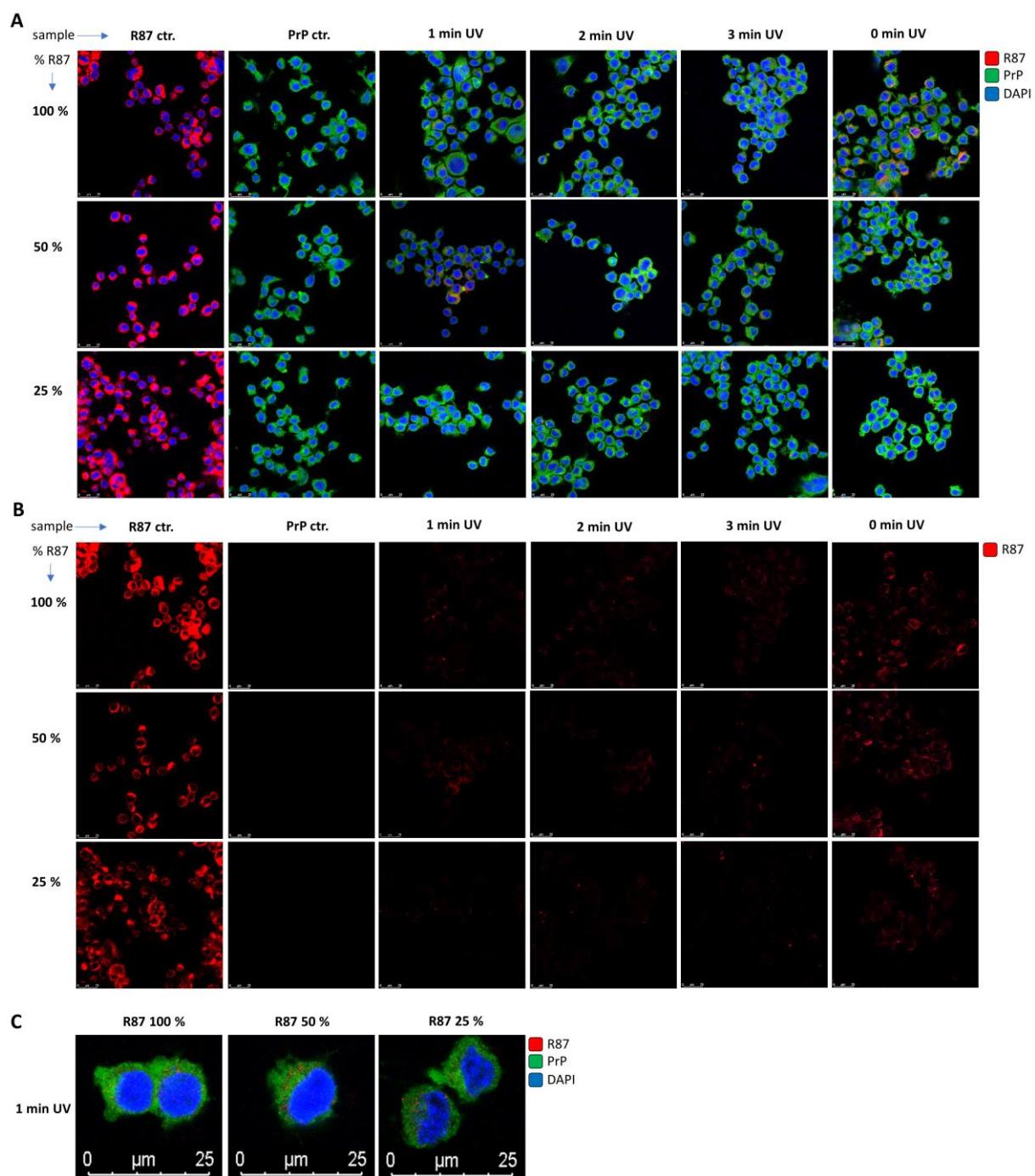


Abbildung 3.19: Exosome-uptake-Assay von R87-Exosomen nach UV-C-Bestrahlung auf N2a-WT-Zellen.

(A) Konfokalmikroskopische Aufnahme von N2a-WT-Zellen nach Behandlung mit R87-Exosomen nach UV-C-Bestrahlung. R87 ctr. zeigt eine gleichmäßige Verteilung von R87 auf die Zellmembran (ohne Exosomen). PrP ctr. dient zur Anfärbung der Zellmembran. 1 min – 3 min Bestrahlung der R87-Exosomen mit UV-C-Licht führte zur Unterdrückung der Diffusion von R87 in die Zellmembran der Akzeptorzellen. Aggregationsbildung mit steigender Bestrahlungsdauer wurde nachgewiesen. Nicht bestrahlte R87-Exosomen führen zu einer Diffusion des R87-Membranfarbstoffs. Klare R87-Signale auch bei Reduktion der R87-Konzentration. (B) Darstellung von R87 allein von (A). (C) Darstellung von R87 markierten Exosomen in N2a-WT-Zellen. Bei Reduktion der R87-Konzentration sind die markierten Exosomen als distinkte puncta in den Zellen detektierbar.¹⁸¹ [Durchführung durch A. Hartmann und O. Dabrowski zu gleichen Teilen.]

isolated exosomes + R87 (0,15 μ M / 1×10^8 exosomes)

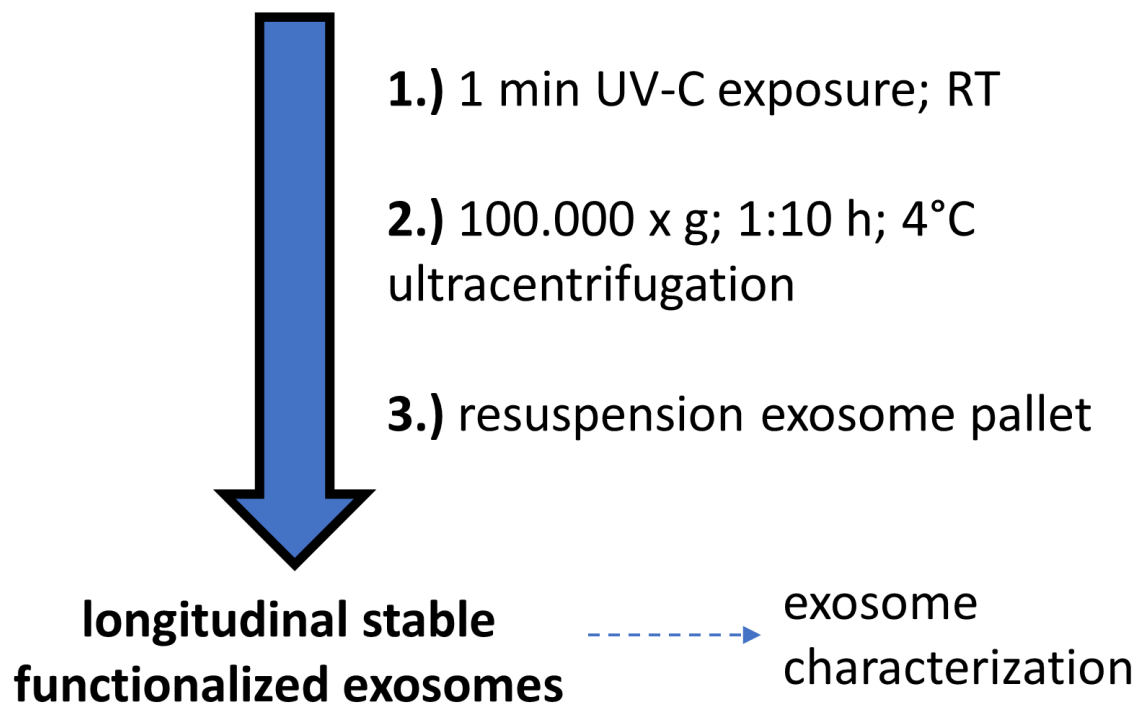


Abbildung 3.20: Schematische Darstellung des Protokolls zur longitudinal stabilen Funktionalisierung von Exosomen mit dem R87-Membranfarbstoff.

Die isolierten Exosomen werden mit dem R87-Membranfarbstoff in einer Konzentration von 0,15 μ M je 1×10^8 Exosomen inkubiert und für 1 min mit Licht im UV-C-Bereich bestrahlt. Die Aufreinigung der markierten Exosomen erfolgt durch ein Ultrazentrifugation des Ansatzes. Die markierten Exosomen können im gewünschten Puffer resuspendiert und für weitere Experimente verwendet werden.

4. Diskussion

4.1 Die Rolle des Exosomen-A β_{1-42} -Komplexes *in vivo*

Dieser Teil der Arbeit fokussierte sich auf den Einfluss der Interaktionen zwischen ePrP^C und A β_{1-42} im Kontext der AD *in vivo*. Zunächst wurde untersucht, welche Effekte die Injektion des Exosomen-A β_{1-42} -Komplexes in Mäusen *in vivo* aufweist. Dabei lag der Fokus auf der Fragestellung, ob der Exosomen-A β_{1-42} -Komplex zur Ablagerung von A β_{1-42} im Gewebe beiträgt oder gezielt durch Mikroglia-Zellen im Gehirn phagozytiert und degradiert wird.

Dass Exosomen in der AD-Pathogenese eine Rolle spielen, ist bekannt. Bei Untersuchungen von A β -Plaques wurden exosomal assoziierte Proteine nachgewiesen¹⁶⁷. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion toxischer A β_{1-42} -Oligomere mit Exosomen in der AD-Pathogenese stattfindet^{132,169,170,173}.

Wie bereits in unserem Paper von 2016 gezeigt¹³², ist die Bildung des Exosomen-A β_{1-42} -Komplexes ePrP^C abhängig. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Bindung von A β_{1-42} an die Exosomen ist signifikant stärker in Gegenwart von ePrP^C im Vergleich zu Prion-Protein-*knock-out*-Exosomen. Die These, dass ePrP^C eine entscheidende Rolle bei der Bildung eines Exosomen-A β_{1-42} -Komplexes spielen könnte, wurde bereits 2013 aufgestellt¹⁷⁴. Des Weiteren ist bekannt, dass die Injektion von Exosomen in das Gehirn eines AD-Mausmodells eine Reduktion der AD-Pathogenese zur Folge hat¹⁷³. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass Exosomen im extrazellulären Raum bevorzugt neurotoxische kleinere A β_{1-42} -Oligomere binden und die Aggregation in nicht toxische A β_{1-42} -Fibrillen fördern¹³². A β_{1-42} -Plaques können daher als Ablagerungsort dieser A β_{1-42} -Fibrillen dienen und somit die Menge an freiem extrazellulären toxischen A β_{1-42} -Oligomeren reduzieren¹⁸². Diese Daten unterstützen die These, dass der Exosomen-A β_{1-42} -Komplex die Bildung von A β_{1-42} -Plaques in der AD-Pathogenese fördert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es nach der stereotaktischen Injektion des Exosomen-A β_{1-42} -Komplexes in das Cauda/Putamen von C57BL/6-Mäusen nach den getesteten Inkubationszeiten (6 h/ 16 h) zu einer minimalen Detektion des Exosomen-A β_{1-42} -Komplexes im peripherem oder entferntem Gewebe zum Injektionskanal kommt. Vermehrt ist eine Kolokalisation von Exosomen und A β_{1-42} am Injektionskanal vorzufinden. Darüber

hinaus konnte eine Ausbreitung und Ablagerung der Exosomen mit gebundenem A β ₁₋₄₂ in das umliegende Gewebe beobachtet werden. Dies ist eine Grundvoraussetzung zur exosomal geförderten A β ₁₋₄₂-Plaquebildung. Im Gegensatz dazu kommt es zu einer höheren Anzahl von Mikroglia-Zellen nach Injektion des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes am Injektionskanal und im peripheren Gewebe im Vergleich zur Injektion von ePrP^C-*knock-out*-Exosomen mit A β ₁₋₄₂. Der ePrP^C bedingte Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex führt daher zu einer Rekrutierung von Mikroglia-Zellen. Dies bestätigt die Beobachtung, dass durch neuronale Exosomen gebildete A β ₁₋₄₂-Fibrillen zu einer erhöhten Aufnahme und Abbau dieser durch Mikroglia-Zellen führen¹⁶⁹. Der Effekt der Mikroglia-Rekrutierung kommt erst nach einer Inkubationszeit von 16 h zu tragen. Nach 6 h Inkubationszeit kann zwischen den verschiedenen Probenansätzen kein Unterschied in der Rekrutierung von Mikroglia-Zellen festgestellt werden. Die stereotaktische Injektion selbst führt zu einer Rekrutierung von Mikroglia und könnte zu diesem Zeitpunkt einen stärkeren Rekrutierungseffekt herbeiführen als das A β ₁₋₄₂ bzw. des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes. Mikroglia-Zellen reagieren innerhalb von Minuten auf die Schädigung des Gewebes im Hirn und bilden Prozesse in Richtung der Gewebeschädigung aus, welche unter anderem als eine Barriere zum gesunden Gewebe dienen¹⁸³. *In-vivo*-Untersuchungen von Mikroglia-Zellen in AD-Mausmodellen zeigten eine verringerte Mikroglia-Beweglichkeit und Phagozytoseaktivität mit steigender A β -Konzentration im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen¹⁸⁴. In dem hier durchgeführten Versuchsaufbau wurden C57BL/6-Mäuse verwendet. Daher kann der beobachtete Effekt der Mikroglia-Rekrutierung nach 16 h Inkubationszeit durch das injizierte A β ₁₋₄₂ bzw. des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes verursacht werden. Die Injektion von fibrillärem A β ₁₋₄₂ führt zur stärksten Rekrutierung von Mikroglia-Zellen im peripheren und nahegelegenen Gewebe zum Injektionskanal. Die Induktion der Phagozytose von A β ₁₋₄₂-Fibrillen durch Mikroglia-Zellen ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mehrfach demonstriert worden¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Mikroglia-Zellen sekretierte Exosomen *in vitro* aufnehmen und somit zu einem Abbau von an diesen Exosomen gebundenem A β ₁₋₄₂ im Gehirn beitragen könnten^{168,169,188}. Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit eine Rekrutierung von Mikroglia-Zellen zum Injektionskanal und dem umliegenden Gewebe in Abhängigkeit vom Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex. Es kommt zu einer minimalen Invasion des Gewebes durch den Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex. Eine A β ₁₋₄₂-

Plaquebildung konnte in diesem Zeitraum nicht beobachtet werden. Die Bildung von A β ₁₋₄₂-Plaques verläuft über einen längeren Zeitraum und könnte in einem Langzeitexperiment genauer analysiert werden.

4.2 Die Rolle des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes im CSF von Patienten unterschiedlicher AD-Risikogruppen

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex in der humanen AD-Pathogenese nachweisbar und ob eine Korrelation zum Krankheitsverlauf erkennbar ist. Dafür wurden CSF-Proben von Patienten aus verschiedenen AD-Risikogruppen verwendet und auf den Gehalt des Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes analysiert. ePrP^C könnte eine physiologische Funktion in der AD erfüllen. Dies zeigte eine Analyse von Vella *et al.* Es wird demonstriert, dass PrP^C auf Exosomen, welche aus dem CSF von Schafen isoliert wurden, stark exprimiert wird¹⁴². Exosomen konnten in allen untersuchten Gruppen (AD-Risikogruppen, nicht-AD Kontrollgruppe) nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass Exosomen im humanen CSF an der Pathologie neurologischer Erkrankungen, wie der AD, beteiligt sind und zur Verbreitung toxischer Proteine wie A β ₁₋₄₂ beitragen könnten^{189,190}. Ein solcher Effekt ist für die Prion-Erkrankung beschrieben worden. Hier führen Exosomen zu der Verbreitung des toxischen PrP-*scrapie in vitro* als auch *in vivo*^{146,150,153-155}. Die Konzentration von A β ₁₋₄₂ im CSF der hier untersuchten AD-Risikogruppen ist tendenziell geringer als die A β ₁₋₄₂-Konzentration der Kontrollgruppe. Eine Reduktion der A β ₁₋₄₂-Konzentration im CSF wurde im Verlauf der AD-Pathologie in klinischen Studien bereits dargestellt, wobei dies nicht für die absolute Menge an A β ₁₋₄₂ im Gehirn gilt¹⁹¹. In den hier durchgeführten Experimenten unterscheidet sich die Menge an absolutem A β ₁₋₄₂ im Gehirn deutlich von der im CSF nachgewiesene A β ₁₋₄₂-Konzentration. Die Anreicherung von A β ₁₋₄₂ im Gehirn im Verlauf der AD-Pathogenese wird mit einem vermindertem Abbau von A β ₁₋₄₂ in Verbindung gebracht¹⁹². In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte zudem eine tendenzielle Abnahme der absoluten Exosomen-Konzentration im CSF mit steigendem AD-Risiko gezeigt werden. Die Menge des nachgewiesenen Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplexes im CSF hingegen ist in den AD-Risikogruppen nahezu unverändert. Liegt keine AD-Erkrankung vor, ist eine Ablagerung von A β ₁₋₄₂ im Gehirn der Patienten nicht nachweisbar, im CSF hingegen ist der Exosomen-A β ₁₋₄₂-Komplex detektierbar. Dies

deutet darauf hin, dass die Bindung von $A\beta_{1-42}$ an ePrP^C im Gehirn zu einer Drainage der potenziell neurotoxischen $A\beta_{1-42}$ -Spezies aus dem Gehirn in das CSF führt und somit einen neuroprotektiven Effekt haben könnte. Die in dieser Arbeit dargestellten Werte für die Menge des Exosomen- $A\beta_{1-42}$ -Komplexes im CSF entspricht dem prozentualen Anteil der absoluten Exosomenmenge. Da diese mit fortschreitender AD-Pathogenese abnimmt, nimmt auch die Menge des Exosomen- $A\beta_{1-42}$ -Komplexes im CSF im Verlauf der AD ab. Gegen diese Hypothese spricht, dass die Reduktion der Exosomenzahl in einem 5XFAD AD-Mausmodell *in vivo* zu einer verringerten Amyloid-Plaquebildung führten¹⁶⁸. In dieser Arbeit wurden die $A\beta_{1-42}$ -Level im CSF jedoch nicht untersucht. Für die weitere Evaluierung der Rolle von ePrP^C in der AD-Pathogenese sollten die Anzahl an Probanden pro Versuchsgruppe erhöht werden. Dadurch könnte erörtert werden, ob der Exosomen- $A\beta_{1-42}$ -Komplex im CSF potenziell als Biomarker zur Diagnose einer AD in Frage kommt.

4.3 Der Einfluss des ePrP^C auf die $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetik

Bisher wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Exosomen- $A\beta_{1-42}$ -Komplexes *in vivo* im Gehirn von Mäusen und im humanem CSF näher beleuchtet. Eine Grundvoraussetzung für die Bildung des Exosomen- $A\beta_{1-42}$ -Komplexes ist der Einfluss von ePrP^C auf die Aggregationskinetik von $A\beta_{1-42}$. Dieser wurde in diesem Teil der Arbeit genauer analysiert. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Exosomen, welche ePrP^C auf ihrer Membran tragen, die Aggregation von $A\beta_{1-42}$ beschleunigen und dadurch einen neuroprotektiven Effekt *in vitro* zeigen¹³². Aus diesem Grund sollte in diesem Teil der Arbeit der Einfluss von ePrP^C auf die $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetik mit Hilfe von SEC-, SAXS- und ATR-FTIR-Analysen genauer beleuchtet werden.

Als Vergleichsmodell wurde zunächst die Aggregation von $A\beta_{1-42}$ unter gleichen Bedingungen (Puffer, Temperatur, Inkubationszeiten) ohne die Zugabe von Exosomen analysiert. In der SEC von $A\beta_{1-42}$ -Proben-Lösungen zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten zeigte sich, dass die Aggregation über verschiedene intermediäre Spezies unterschiedlicher $A\beta_{1-42}$ -Aggregationsstufen abläuft. Diese korrelieren in den Phasen der Aggregationskinetik positiv oder negativ miteinander. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei das Intermediat B ($A\beta_{1-42}$ -Oligomere und nativ ungefaltete $A\beta_{1-42}$ -Oligomere) ein, welches am stärksten mit allen weiteren

intermediären Spezies korreliert. Zu Beginn der Aggregationskinetik findet das Wachstum der $A\beta_{1-42}$ -Oligomere unter Verbrauch der $A\beta_{1-42}$ -Monomere, LMW und teils auch HMW statt. Zu späteren Phasen reduziert sich deren Einfluss und die Aggregation findet unter Kovalenz und Fragmentation von $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen statt. Cohen *et al.* zeigten, dass sobald in der Aggregationskinetik von $A\beta_{1-42}$ eine geringe kritische Menge an $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen entsteht, toxische $A\beta_{1-42}$ -Oligomere prädominant aus $A\beta_{1-42}$ -Monomeren durch sekundäre Nukleation katalysiert von $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen gebildet werden. Dies bezeichnen die Gruppe um Cohen *et al.* als „feedback loop“ der Interaktionen von monomeren und fibrillären Spezies, welche die $A\beta_{1-42}$ -Aggregation vorantreiben¹⁹³. Die Analyse der SEC-Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Annahme. Das Konzept der Nukleation-abhängigen Polymerisation von Amyloid-Fibrillen unterscheidet die Aggregationskinetik in zwei Phasen, der Nukleations- und der Elongationsphase^{74,194–196}. Die Nukleationsphase stellt sich in dieser Arbeit als Stage I und die Elongationsphase als Stage II dar. Dass die Aggregation von $A\beta_{1-42}$ über verschiedene Aggregationsintermediate abläuft, bestätigte sich auch in den SAXS- und ATR-FTIR-Daten. Kleinere $A\beta_{1-42}$ -Aggregationsintermediate (*building blocks*) mit hohem α -Helix-Gehalt dominieren das frühe Stadium der Aggregation. Korrelierend mit der Abnahme der *building blocks* kommt es im weiteren Verlauf zu einer Zunahme von fibrillären β -Faltblatt-Strukturen reichen Aggregationsformen. Bei Inkubation mit N2a-WT-Exosomen zeigte sich des Weiteren eine Zunahme höherer $A\beta_{1-42}$ -Oligomerspezies in der Aggregationskinetik von $A\beta_{1-42}$ in SEC-, SAXS- und ATR-FTIR-Messungen. Es kommt zu einer deutlichen Reduktion der *building blocks* und Zunahme von Aggregaten im Bereich von 60 – 120 min. Dieser Effekt tritt bei der Inkubation mit N2a-PrP^{0/0}-Exosomen erst wesentlich später auf und ist vergleichbar mit der $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetik ohne Exosomenzugabe. In frühen Zeitpunkten der $A\beta_{1-42}$ -Aggregationskinetik sind vor allem kleine lösliche $A\beta_{1-42}$ -Oligomere vorhanden, welche bevorzugt an ePrP^C binden¹³². Diese Bindung scheint einen direkten Einfluss auf die Aggregationskinetik zu haben, da die Kinetik der $A\beta_{1-42}$ -Aggregation von Exosomen ohne PrP^C auf ihrer Oberfläche wesentlich geringer beeinflusst wird. Zu beachten ist hierbei, dass verschiedene Untersuchungen eine Beeinflussung der Aggregation von $A\beta_{1-42}$ durch Membranlipide wie Phospholipide, Sphingomyelin, Glycosphingolipide, GM1-Ganglioside und Cholesterol demonstrieren^{168,169,197–205}. Des Weiteren wurden Exosomen in der Literatur als potentielle Keime der

A β ₁₋₄₂-Aggregation beschrieben^{167,206}. Zusätzlich scheinen auch die physikalischen und biologischen Eigenschaften der Membran selbst die Aggregation von A β zu beeinflussen. Untersuchungen zeigten, dass die Aggregation von A β ₁₋₄₀ auf Membranen mit einer hohen Protein- zu Lipid-Rate und einer zusätzlichen Wölbung der Membran, wie sie auf Vesikeln vorzufinden sind, zu einer stabileren Bindung und erhöhten Aggregation von A β ₁₋₄₀ führen²⁰⁷. Veröffentlichungen berichten, dass PrP^C, welches an A β ₁₋₄₂ bindet, zu Konformationsänderungen der A β ₁₋₄₂-Oligomere führt²⁰⁸. In Gegenwart von N2a-WT-Exosomen ist der Streumassenradius (R_g) im Vergleich zu A β ₁₋₄₂ ohne bzw. mit N2a-PrP^{0/0}-Exosomen von Beginn an erhöht und liegt im Bereich der *building blocks*, welche aus ca. vier bis sechs A β ₁₋₄₂-Einheiten bestehen. Dies entspricht den Daten einer Veröffentlichung über die frühen Stadien der A β ₁₋₄₂-Oligomerisierung auf der Grundlage der Neutronenstreuung und der analytischen Ultrazentrifugation¹⁸⁰. Die in dieser Arbeit ermittelten Strukturdaten geben eine grobe Einsicht in die Aggregationskaskade von A β ₁₋₄₂. Um detaillierte Einsicht in die Struktur der Aggregationsintermediate zu bekommen, sollten die Experimente der vorliegenden Arbeit mit einer höheren Peptidkonzentration und homogeneren Proben wiederholt werden. Da A β ₁₋₄₂ eine hohe Tendenz zur Selbstaggregation aufweist, ist es experimentell sehr schwierig, homogene Proben spezifischer Aggregationsintermediate zu erzeugen, ohne chemisch oder physikalisch die Aggregation zu stoppen und somit die Sekundärstruktur künstlich zu manipulieren.

4.4 Etablierung eines fotochemischen Membranlabels auf Exosomen

In diesem Teil der Arbeit sollte eine fotochemische Funktionalisierung mit zuvor extern erstellten Fotoaffinitätslabeln erreicht und biologisch etabliert werden. Hierbei sollte eine longitudinal stabile Verankerung der Fotoaffinitätslabel in der Membran von Exosomen erreicht werden. Häufig verwendete Membranfarbstoffe zur Markierung von Exosomen und anderen Vesikeltypen sind nicht longitudinal stabil und neigen daher zur Diffusion innerhalb und zwischen anderen verfügbaren Membranen¹⁸¹. Ein in der Literatur häufig verwendeter Membranfarbstoff für die Markierung von Exosomen ist der Bisindolylmethin-Farbstoff PKH^{170,209–215}. Daher wurde dieser als Kontrolle verwendet. Bei Untersuchungen, die dem Tracking oder der Aufnahme von Exosomen durch Zellen dienen, kann die Diffusion des Membranfarbstoffs zu falschen Ergebnissen führen.

Zu Beginn der Arbeit wurde das etablierte Protokoll zur Färbung von Membranen des PKH-Membranfarbstoffs verwendet und für die Verwendung des R87-Membranfarbstoffs optimiert. Die gefärbten Exosomen sollten nach der Behandlung biologisch voll funktionell, mit einem stabil verankerten Membranlabel und möglichst ohne weitere Verunreinigungen vorliegen. Um die Manipulation der Membranzusammensetzung so gering wie möglich zu halten, wurde auf den Einsatz von Diluent C im Laufe des Experiments verzichtet. Dieser enthält verschiedene Detergenzien, welche einen lytischen Prozess begünstigen und die Membraneigenschaften beeinflussen können¹⁸¹. Des Weiteren muss die Aktivität von Diluent C durch die Zugabe von FCS unterbunden werden. FCS enthält verschiedene Proteine, Hormone, Enzyme, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Lipide, Vitamine und Spurenelemente sowie Kohlenhydrate und unterschiedliche Vesikeltypen^{211,216,217}. Die zuvor aufwendig aufgereinigten Exosomen werden durch die Zugabe von Diluent C und FCS stark verunreinigt und mussten erneut aufgereinigt werden, was zusätzlich zu einer weiteren Verminderung der Exosomenausbeute führte. Zudem können die im FCS enthaltenen Inhaltsstoffe ungewollte Effekte *in vitro* sowie *in vivo* mit den gefärbten Exosomen verursachen²¹⁸. Die zusätzlich nötige Aufreinigung durch einen OptiPrep™-Dichtegradienten führte zur Verunreinigung der Exosomenprobe. Mit dem optimierten und nicht optimierten Protokoll war die Färbung von Exosomen und Zellmembranen möglich. Eine Diffusion der Membranfarbstoffe war dabei zu beobachten. Zudem führte die Optimierung des Färbeprotokolls zu einer Steigerung der Ausbeute um 20%. Die fotochemische Verankerung von R87 konnte erfolgreich mit der Bestrahlung durch UV-C-Strahlung (200 – 280 nm²¹⁹) erzielt werden. UV-A-Strahlung (320 – 400 nm²¹⁹) führte zu einer zu geringen Absorption durch R87. Eine effiziente Verankerung konnte leider nur durch lange Bestrahlungszeiten erreicht werden, welche zur Schädigung der Exosomen führt¹⁸¹. Die Bestrahlung biologischer Membranen mit UV-Strahlung kann zum Verfall ungesättigter Fettsäuren führen. Dies hat eine Reorganisation der Membran zu Folge, welche eine Membranversteifung verursacht²²⁰. UV-A-Strahlung erhöht zudem die Peroxidation von Lipiden²²¹. Weitere UV-induzierte Veränderungen der Zellmembran betreffen die Veränderung der Membranproteine. Unter anderem wurde die Vernetzung (crosslinking) von Proteinen in der Membran untereinander beschrieben²²². Die UV-bedingte Vernetzung der Proteine auf der Membran von Exosomen stellt eine Erklärung, für die in den

Versuchen beobachtete Aggregatbildung bei längerer Bestrahlungszeit der Exosomen. Kurze Bestrahlungszeiten mit UV-C-Strahlung führten dagegen zu einer erfolgreichen Verankerung von R87 in der Membran der Exosomen und somit zu einer Unterdrückung der Diffusion des Fotoaffinitätslabels. Das hier verwendete Fotoaffinitätslabel mit lipophilem Charakter trägt als Kopfgruppe Rhodamin. Dies ermöglicht den Einsatz als Membranfarbstoff und der Überprüfung der longitudinal stabilen Verankerung des Fotoaffinitätslabels in der Membran von Exosomen. Die Kopfgruppe kann gegen andere Farbstoffe, Peptidsequenzen oder Wirkstoffe wie Medikamente ausgetauscht werden. Exosomen sind in der Lage die Bluthirnschranke zu überwinden²²³. Longitudinal stabil gekoppelte Wirkstoffe könnten somit in das ZNS über das Fotoaffinitätslabel eingebracht werden. Die Idee, Exosomen als Transportvesikel für medikamentöse Behandlungen zu verwenden, rückt immer stärker in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen^{224–230}. Hierbei wäre die Anwendung des Fotoaffinitätslabels zur Verankerung der Wirkstoffe auf nahezu allen Vesikelarten eine einfach durchzuführende Alternative. Des Weiteren wird für das hier etablierte Protokoll kein zusätzliches Equipment benötigt. Die in dieser Arbeit etablierte photochemische Verankerung des Fotoaffinitätslabels auf der Membran von Exosomen kann in einem Labor, welches über eine Sterilwerkbank mit einer UV-C-Quelle verfügt, durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

1. Prince, M. *et al.* The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's and Dementia* (2013). doi:10.1016/j.jalz.2012.11.007
2. Rubinsztein, D. C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature05291
3. Soto, C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* (2003). doi:10.1038/nrn1007
4. Levenson, R. W., Sturm, V. E. & Haase, C. M. *Emotional and Behavioral Symptoms in Neurodegenerative Disease: A Model for Studying the Neural Bases of Psychopathology*. SSRN (2014). doi:10.1146/annurev-clinpsy-032813-153653
5. Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C. & Aarsland, D. Alzheimer's disease - ProQuest. *Lancet* (2011). doi:10.1016/S0197-4572(05)80068-0
6. Brookmeyer, R., Johnson, E., Ziegler-Graham, K. & Arrighi, H. M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* (2007). doi:10.1016/j.jalz.2007.04.381
7. De Strooper, B. & Annaert, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J. Cell Sci.* (2000).
8. Alzheimer's Association, A. P. *et al.* 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* (2013). doi:10.1016/j.jalz.2013.02.003
9. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschrift für Psychiatr. und Psych. Medizin* (1907). doi:10.1002/ca.980080612
10. Jellinger, K. A. Alzheimer 100 - Highlights in the history of Alzheimer research. *Journal of Neural Transmission* (2006). doi:10.1007/s00702-006-0578-3
11. Prince, M., Albanese, E., Guerchet, M. & Prina, M. *World Alzheimer Report 2014: Dementia and risk reduction: an analysis of protective and modifiable factors*. *Alzheimer's Disease International* (2014). doi:10.1063/1.459249
12. Gaugler, J., James, B., Johnson, T., Scholz, K. & Weuve, J. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 12, 459–509 (2016).
13. Rocca, W. A. *et al.* Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: A collaborative study of 1980–1990 prevalence findings. *Ann. Neurol.* (1991). doi:10.1002/ana.410300310
14. Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D. & Tsuang, D. W. Review article: Genetics of Alzheimer disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* (2010). doi:10.1177/0891988710383571
15. Champion, D. *et al.* Early-Onset Autosomal Dominant Alzheimer Disease: Prevalence, Genetic Heterogeneity, and Mutation Spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* (1999). doi:10.1086/302553
16. Selkoe, D. J. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* (2001). doi:10.1016/S0896-6273(01)00475-5
17. He, Z. *et al.* Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat. Med.* (2018). doi:10.1038/nm.4443
18. Villars, H. *et al.* [Alzheimer's disease and syndromes related to the severe stage]. *Rev. Neurol. (Paris)*. 164 Spec No 2, F98-106 (2008).
19. Bertram, L. & Tanzi, R. E. The genetics of Alzheimer's disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 79–100 (2012). doi:10.1016/B978-0-12-385883-2.00008-4
20. Vélez, J. I. *et al.* APOE*E2 allele delays age of onset in PSEN1 E280A Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* (2016). doi:10.1080/1533290X.2016.1206777
21. Corder, E. H. *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* (80-.). (1993). doi:10.1126/science.8346443
22. Cruchaga, C. *et al.* Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature12825
23. Krasemann, S. *et al.* The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 47, 566-581.e9 (2017).
24. Guerreiro, R. *et al.* TREM2 Variants in Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* (2013). doi:10.1056/NEJMoa1211851
25. Escott-Price, V. *et al.* Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain* (2015). doi:10.1093/brain/awv268
26. Bracco, L. *et al.* Factors Affecting Course and Survival in Alzheimer's Disease: A 9-Year Longitudinal Study. *Arch. Neurol.* (1994). doi:10.1001/archneur.1994.00540240057016
27. Nelson, P. T. *et al.* Correlation of alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (2012).

- doi:10.1097/NEN.0b013e31825018f7
28. Nelson, P. T., Braak, H. & Markesbery, W. R. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: A complex but coherent relationship. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* (2009). doi:10.1097/NEN.0b013e3181919a48
 29. Albert, M. S. *et al.* The diagnosis of mild cognitive impairment 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 and Dementia* (2011). doi:10.1016/j.jalz.2011.03.008
 30. Du, A. T. *et al.* Different regional patterns of cortical thinning in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Brain* (2007). doi:10.1093/brain/awm016
 31. Terry, R. D. Morphological changes in Alzheimer's disease-senile dementia: ultrastructural changes and quantitative studies. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 57, 99–105 (1979).
 32. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E. & Hyman, B. T. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2011). doi:10.1101/cshperspect.a006189
 33. Selkoe, D. J. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol. Rev.* (2001). doi:10.1152/physrev.2001.81.2.741
 34. Forloni, G., Artuso, V., La Vitola, P. & Balducci, C. Oligomeropathies and pathogenesis of Alzheimer and Parkinson's diseases. *Movement Disorders* (2016). doi:10.1002/mds.26624
 35. Jin, M. *et al.* Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011). doi:10.1073/pnas.1017033108
 36. Zucchella, C. *et al.* The Multidisciplinary Approach to Alzheimer's Disease and Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment. *Front. Neurol.* 9, 1058 (2018).
 37. Birks, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease (Review). *Cochrane Libr.* (2006). doi:10.1002/14651858.CD005593
 38. Birks, J. S. & Evans, J. G. Rivastigmine for Alzheimer's disease (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.* (2015). doi:10.1002/14651858.CD001191.pub3.Copyright
 39. Wong, C. W. Pharmacotherapy for Dementia: A Practical Approach to the Use of Cholinesterase Inhibitors and Memantine. *Drugs and Aging* (2016). doi:10.1007/s40266-016-0372-3
 40. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* (2002). doi:10.1126/science.1072994
 41. Scheltens, P. *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet* 388, 505–517 (2016).
 42. Masters, C. L. *et al.* Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1985). doi:10.1073/pnas.82.12.4245
 43. Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P. & Yankner, B. A. Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1993). doi:10.1073/pnas.90.5.2092
 44. Haass, C. & Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2007). doi:10.1038/nrm2101
 45. Dawkins, E. & Small, D. H. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 129, 756–769 (2014).
 46. Arai, H. *et al.* Expression patterns of β -amyloid precursor protein (β -APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects. *Ann. Neurol.* 30, 686–693 (1991).
 47. Selkoe, D. J. *et al.* Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1988). doi:10.1073/pnas.85.19.7341
 48. Slunt, H. H. *et al.* Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse β -amyloid precursor protein (APP). *J. Biol. Chem.* (1994).
 49. Wasco, W. *et al.* Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid IB protein precursor. *Med. Sci.* (1992). doi:10.1073/pnas.89.22.10758
 50. Bolós, M., Hu, Y., Young, K. M., Foa, L. & Small, D. H. Neurogenin 2 mediates amyloid- β precursor protein-stimulated neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 289, 31253–61 (2014).
 51. Caillé, I. *et al.* Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173–81 (2004).
 52. Hu, Y. *et al.* Role of cystatin C in amyloid precursor protein-induced proliferation of neural stem/progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 288, 18853–62 (2013).
 53. Priller, C. *et al.* Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *J. Neurosci.* (2006). doi:10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006

54. Thinakaran, G. & Koo, E. H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry* (2008). doi:10.1074/jbc.R800019200
55. Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2012). doi:10.1101/cshperspect.a006270
56. Esch, F. S. *et al.* Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* (80-). (1990). doi:10.1126/science.2111583
57. Vincent, B. *et al.* The Disintegrins ADAM10 and TACE Contribute to the Constitutive and Phorbol Ester-regulated Normal Cleavage of the Cellular Prion Protein. *J. Biol. Chem.* (2001). doi:http://dx.doi:10.1074/jbc.M105677200
58. Taylor, D. R. *et al.* Role of ADAMs in the ectodomain shedding and conformational conversion of the prion protein. *J. Biol. Chem.* (2009). doi:10.1074/jbc.M109.032599
59. Schubert, D., Jin, L. W., Saitoh, T. & Cole, G. The regulation of amyloid β protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* (1989). doi:10.1109/ICMT.2011.6002725
60. Weidemann, A. *et al.* Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* (1989). doi:10.1016/0092-8674(89)90177-3
61. Wilquet, V. & Strooper, B. De. Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Current Opinion in Neurobiology* (2004). doi:10.1016/j.conb.2004.08.001
62. Haass, C. & Selkoe, D. J. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75, 1039–42 (1993).
63. Cao, X. & Südhof, T. C. A transcriptively active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* (80-). (2001). doi:10.1126/science.1058783
64. Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. & Goldstein, J. L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100, 391–8 (2000).
65. Chévez-Gutiérrez, L. *et al.* The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J.* (2012). doi:10.1038/emboj.2012.79
66. Jakob-Roetne, R. & Jacobsen, H. Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 3030–59 (2009).
67. Chen, G.-F. *et al.* Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 1205–1235 (2017).
68. Fändrich, M. On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2007). doi:10.1007/s00018-007-7110-2
69. Suzuki, N. *et al.* High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am. J. Pathol.* (1994).
70. Dahlgren, K. N. *et al.* Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M201750200
71. Bitan, G. *et al.* Amyloid -protein (A) assembly: A 40 and A 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003). doi:10.1073/pnas.222681699
72. Kim, W. & Hecht, M. H. Sequence determinants of enhanced amyloidogenicity of Alzheimer A β 42 peptide relative to A β 40. *J. Biol. Chem.* (2005). doi:10.1074/jbc.M505763200
73. Ball, K. A., Phillips, A. H., Wemmer, D. E. & Head-Gordon, T. Differences in β -strand populations of monomeric A β 40 and A β 42. *Biophys. J.* (2013). doi:10.1016/j.bpj.2013.04.056
74. Kumar, S. & Walter, J. Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany, NY)*. (2011). doi:10.18632/aging.100362
75. Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–5 (1992).
76. Walsh, D. M. & Selkoe, D. J. A β oligomers - A decade of discovery. *Journal of Neurochemistry* (2007). doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x
77. Perrin, R. J., Fagan, A. M. & Holtzman, D. M. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* (2009). doi:10.1038/nature08538
78. Ward, R. V. *et al.* Fractionation and characterization of oligomeric, protofibrillar and fibrillar forms of β -amyloid peptide. *Biochem. J.* (2000). doi:10.1042/0264-6021:3480137
79. Atwood, C. S. *et al.* Amyloid- β : A chameleon walking in two worlds: A review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Research Reviews* (2003). doi:10.1016/S0165-0173(03)00174-7
80. Carrillo-Mora, P., Luna, R. & Colín-Barenque, L. Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 795375 (2014).
81. Canevari, L., Clark, J. B. & Bates, T. E. β -Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett.* (1999). doi:10.1016/S0014-5793(99)01028-5
82. LIN, H., BHATIA, R. & LAL, R. Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's

- disease pathophysiology. *FASEB J.* (2001). doi:10.1096/fj.01-0377com
83. Rosales-Corral, S. *et al.* Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid- β onto the hippocampus in vivo. *J. Neuroimmunol.* (2004). doi:10.1016/j.jneuroim.2004.01.005
 84. Butterfield, D. A., Reed, T., Newman, S. F. & Sultana, R. Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine* (2007). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.037
 85. Parameshwaran, K., Dhanasekaran, M. & Suppiramaniam, V. Amyloid beta peptides and glutamatergic synaptic dysregulation. *Experimental Neurology* (2008). doi:10.1016/j.expneurol.2007.10.008
 86. Smith, D. G., Cappai, R. & Barnham, K. J. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid β peptide. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (2007). doi:10.1016/j.bbamem.2007.02.002
 87. Snyder, E. M. *et al.* Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* (2005). doi:10.1038/nn1503
 88. Tackenberg, C. *et al.* NMDA receptor subunit composition determines beta-amyloid-induced neurodegeneration and synaptic loss. *Cell Death Dis.* (2013). doi:10.1038/cddis.2013.129
 89. Tu, S., Okamoto, S. ichi, Lipton, S. A. & Xu, H. Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration* (2014). doi:10.1186/1750-1326-9-48
 90. Marttinen, M. *et al.* Molecular Mechanisms of Synaptotoxicity and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 12, 963 (2018).
 91. Lüscher, C. & Malenka, R. C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2012). doi:10.1101/cshperspect.a005710
 92. Gasparini, L. & Dityatev, A. β -amyloid and glutamate receptors. *Exp. Neurol.* (2008). doi:10.1016/j.expneurol.2008.03.005
 93. Oddo, S. *et al.* Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005). doi:10.1073/pnas.0408500102
 94. Resenberger, U. K. *et al.* The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of β 2-sheet-rich conformers independent of prion replication. *EMBO J.* 30, 2057–2070 (2011).
 95. De Strooper, B. & Karran, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* (2016). doi:10.1016/j.cell.2015.12.056
 96. Vassallo, N. & Herms, J. W. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *Journal of Neurochemistry* (2003). doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01882.x
 97. Aguzzi, A. & Lakkaraju, A. K. K. Cell Biology of Prions and Prionoids: A Status Report. *Trends in Cell Biology* (2016). doi:10.1016/j.tcb.2015.08.007
 98. Hartmann, A., Muth, C., Dabrowski, O., Krasemann, S. & Glatzel, M. Exosomes and the prion protein: More than one truth. *Front. Neurosci.* 11, 1–7 (2017).
 99. Linsenmeier, L. *et al.* Structural and mechanistic aspects influencing the ADAM10-mediated shedding of the prion protein. *Mol. Neurodegener.* 13, 18 (2018).
 100. Halliez, S. *et al.* To develop with or without the prion protein. *Front. Cell Dev. Biol.* (2014). doi:10.1016/S0079-6123(06)56014-5
 101. Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S. & Macklis, J. D. Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.0511290103
 102. Málaga-Trillo, E. *et al.* Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biol.* (2009). doi:10.1371/journal.pbio.1000055
 103. Schmitt-Ulms, G. *et al.* Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.* (2001). doi:10.1006/jmbi.2000.5183
 104. Graner, E. *et al.* Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Mol. Brain Res.* (2000). doi:10.1016/S0169-328X(99)00334-4
 105. Chen, S., Mangé, A., Dong, L., Lehmann, S. & Schachner, M. Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol. Cell. Neurosci.* (2003). doi:10.1016/S1044-7431(02)00014-3
 106. Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I. & Schachner, M. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* (2005). doi:10.1083/jcb.200409127
 107. Kanaani, J., Prusiner, S. B., Diacovo, J., Baekkeskov, S. & Legname, G. Recombinant prion

- protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J. Neurochem.* (2005). doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03469.x
108. Amin, L. *et al.* Characterization of prion protein function by focal neurite stimulation. *J. Cell Sci.* (2016). doi:10.1242/jcs.183137
 109. Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C. G. & LeBlanc, A. Prion Protein Protects Human Neurons against Bax-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* (2001). doi:10.1074/jbc.C100443200
 110. Roucou, X., Gains, M. & LeBlanc, A. C. Neuroprotective Functions of Prion Protein. *Journal of Neuroscience Research* (2004). doi:10.1002/jnr.10864
 111. Guillot-Sestier, M. V., Sunyach, C., Druon, C., Scarzello, S. & Checler, F. The α -secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* (2009). doi:10.1074/jbc.M109.051086
 112. Tobler, I. *et al.* Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* (1996). doi:10.1038/380639a0
 113. Bremer, J. *et al.* Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat. Neurosci.* (2010). doi:10.1038/nn.2483
 114. Mouillet-Richard, S. *et al.* Signal transduction through prion protein. *Science* (80-.). (2000). doi:10.1126/science.289.5486.1925
 115. Chiarini, L. B. *et al.* Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* (2002). doi:10.1093/emboj/cdf324
 116. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. & Wüthrich, K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* (1997). doi:10.1016/S0014-5793(97)00920-4
 117. Biasini, E., Turnbaugh, J. A., Unterberger, U. & Harris, D. A. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends in Neurosciences* (2012). doi:10.1016/j.tins.2011.10.002
 118. Altmepfen, H. C. *et al.* Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *Am. J. Neurodegener. Dis.* (2012).
 119. Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* (80-.). (1982). doi:10.1126/science.6801762
 120. Aguzzi, A. & Falsig, J. Prion propagation, toxicity and degradation. *Nature Neuroscience* (2012). doi:10.1038/nn.3120
 121. Collinge, J. Mammalian prions and their wider relevance in neurodegenerative diseases. *Nature* (2016). doi:10.1038/nature20415
 122. Telling, G. C. *et al.* Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* (80-.). (1996). doi:10.1126/science.274.5295.2079
 123. Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W. & Strittmatter, S. M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers. *Nature* 457, 1128–1132 (2009).
 124. Ferreira, D. G. *et al.* α -synuclein interacts with PrP C to induce cognitive impairment through mGluR5 and NMDAR2B. *Nat. Neurosci.* (2017). doi:10.1038/nn.4648
 125. Kellett, K. A. B. & Hooper, N. M. Prion protein and Alzheimer disease. in *Prion* (2009). doi:10.4161/pri.3.4.9980
 126. Voigtlander, T. *et al.* Marked increase of neuronal prion protein immunoreactivity in Alzheimer's disease and human prion diseases. *Acta Neuropathol.* (2001). doi:10.1007/s004010100405
 127. Schwarze-Eicker, K. *et al.* Prion protein (PrPc) promotes β -amyloid plaque formation. *Neurobiol. Aging* (2005). doi:10.1016/j.jneuroim.2015.12.016
 128. Del Bo, R. *et al.* Is M129V of PRNP gene associated with Alzheimer's disease? A case-control study and a meta-analysis. *Neurobiol. Aging* (2006). doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.025
 129. Parkin, E. T. *et al.* Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007). doi:10.1073/pnas.0609621104
 130. Chen, S., Yadav, S. P. & Surewicz, W. K. Interaction between human prion protein and amyloid- β ($A\beta$) oligomers: Role of N-terminal residues. *J. Biol. Chem.* (2010). doi:10.1074/jbc.M110.145516
 131. Gimbel, D. A. *et al.* Memory Impairment in Transgenic Alzheimer Mice Requires Cellular Prion Protein. *J. Neurosci.* (2010). doi:10.1523/JNEUROSCI.0395-10.2010
 132. Falker, C. *et al.* Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity. *J. Neurochem.* 137, 88–100 (2016).
 133. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383 (2013).
 134. Hessvik, N. P. & Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular*

- and Molecular Life Sciences* (2018). doi:10.1007/s00018-017-2595-9
135. Leblanc, P. *et al.* Isolation of exosomes and microvesicles from cell culture systems to study prion transmission. in *Methods in Molecular Biology* (2017). doi:10.1007/978-1-4939-6728-5_11
 136. Haraszti, R. A. *et al.* High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles* 5, 1–14 (2016).
 137. Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G. & Théry, C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J. Extracell. Vesicles* (2012). doi:10.3402/jev.v1i0.18397
 138. Lötvall, J. *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* (2014). doi:10.3402/jev.v3.26913
 139. Chernyshev, V. S. *et al.* Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 3285–3301 (2015).
 140. Kreimer, S. *et al.* Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: Lipidomics and proteomics. *J. Proteome Res.* 14, 2367–2384 (2015).
 141. Gardiner, C. *et al.* Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey. *J. Extracell. Vesicles* 5, 1–6 (2016).
 142. Vella, L. J., Greenwood, D. L. V., Cappai, R., Scheerlinck, J. P. Y. & Hill, A. F. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2008). doi:10.1016/j.vetimm.2008.04.002
 143. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* (2015). doi:10.3402/jev.v4.27066
 144. Krämer-Albers, E. M. & Hill, A. F. Extracellular vesicles: interneural shuttles of complex messages. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 101–107 (2016).
 145. Fröhlich, D. *et al.* Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: Impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* (2014). doi:10.1098/rstb.2013.0510
 146. Guo, B. B., Bellingham, S. A. & Hill, A. F. Stimulating the release of exosomes increases the intercellular transfer of prions. *J. Biol. Chem.* (2016). doi:10.1074/jbc.M115.684258
 147. Liu, C. G., Song, J., Zhang, Y. Q. & Wang, P. C. MicroRNA-193b is a regulator of amyloid precursor protein in the blood and cerebrospinal fluid derived exosomal microRNA-193b is a biomarker of Alzheimer's disease. *Mol. Med. Rep.* (2014). doi:10.3892/mmr.2014.2484
 148. Goetzl, E. J. *et al.* Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* (2015). doi:10.1212/WNL.0000000000001702
 149. Fevrier, B. *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2004). doi:10.1073/pnas.0308413101
 150. Alais, S. *et al.* Functional mechanisms of the cellular prion protein (PrP^C) associated anti-HIV-1 properties. *Cell. Mol. Life Sci.* (2012). doi:10.1007/s00018-011-0879-z
 151. Krasemann, S. *et al.* Persistent retroviral infection with MoMuLV influences neuropathological signature and phenotype of prion disease. *Acta Neuropathol.* (2012). doi:10.1007/s00401-012-0944-1
 152. Muth, C. *et al.* Activation of microglia by retroviral infection correlates with transient clearance of prions from the brain but does not change incubation time. *Brain Pathol.* (2017). doi:10.1111/bpa.12441
 153. Alais, S. *et al.* Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol. Cell* (2008). doi:10.1042/BC20080025
 154. Vilette, D. *et al.* Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* (2015). doi:10.1007/s00018-015-1945-8
 155. Vella, L. J. *et al.* Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J. Pathol.* (2007). doi:10.1002/path.2145
 156. Cervenakova, L. *et al.* Are prions transported by plasma exosomes? *Transfusion and Apheresis Science* (2016). doi:10.1016/j.transci.2016.07.013
 157. Wadsworth, J. D. F. & Collinge, J. Molecular pathology of human prion disease. *Acta Neuropathologica* (2011). doi:10.1007/s00401-010-0735-5
 158. Geissen, M., Krasemann, S., Matschke, J. & Glatzel, M. Understanding the natural variability of prion diseases. *Vaccine* (2007). doi:10.1016/j.bionut.2012.10.006
 159. Glatzel, M., Stoock, K., Seeger, H., Lühns, T. & Aguzzi, A. Human prion diseases: Molecular and clinical aspects. *Archives of Neurology* (2005). doi:10.1001/archneur.62.4.545
 160. Collins, S. J. *et al.* Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical

- spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* (2006). doi:10.1093/brain/awl159
161. Llorens, F. *et al.* Plasma total prion protein as a potential biomarker for neurodegenerative dementia: diagnostic accuracy in the spectrum of prion diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* nan.12573 (2019). doi:10.1111/nan.12573
162. Hermann, P. *et al.* Validation and utilization of amended diagnostic criteria in Creutzfeldt-Jakob disease surveillance. *Neurology* 91, e331–e338 (2018).
163. Arellano-Anaya, Z. E. *et al.* Prion strains are differentially released through the exosomal pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* (2015). doi:10.1007/s00018-014-1735-8
164. Berrone, E. *et al.* Detection of cellular prion protein in exosomes derived from ovine plasma. *J. Gen. Virol.* (2015). doi:10.1099/jgv.0.000291
165. Properzi, F., Ferroni, E., Poleggi, A. & Vinci, R. The regulation of exosome function in the CNS: Implications for neurodegeneration. *Swiss Medical Weekly* (2015). doi:10.4414/sm.w.2015.14204
166. Lesné, S. *et al.* A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature04533
167. Rajendran, L. *et al.* Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.0603838103
168. Dinkins, M. B., Dasgupta, S., Wang, G., Zhu, G. & Bieberich, E. Exosome reduction *in vivo* is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* (2014). doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.012
169. Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S. & Igarashi, Y. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia. *J. Biol. Chem.* (2012). doi:10.1074/jbc.M111.324616
170. Yuyama, K. *et al.* Decreased amyloid- β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J. Biol. Chem.* 289, 24488–24498 (2014).
171. Vella, L. J., Sharples, R. A., Nisbet, R. M., Cappai, R. & Hill, A. F. The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases. in *European Biophysics Journal* (2008). doi:10.1007/s00249-007-0246-z
172. Benilova, I., Karran, E. & De Strooper, B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nature Neuroscience* (2012). doi:10.1038/nn.3028
173. Yuyama, K. *et al.* A potential function for neuronal exosomes: Sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS Lett.* 589, 84–88 (2015).
174. An, K. *et al.* Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of A β assemblies *in vivo*. *Mol. Brain* 6, (2013).
175. Polymenidou, M. *et al.* The POM monoclonals: a comprehensive set of antibodies to non-overlapping prion protein epitopes. *PLoS One* 3, e3872 (2008).
176. Akers, J. C. *et al.* Comparative analysis of technologies for quantifying extracellular vesicles (EVs) in clinical cerebrospinal fluids (CSF). *PLoS One* 11, 1–11 (2016).
177. Szczytko, M. S. *et al.* Dopamine Production in the Caudate Putamen Restores Feeding in Dopamine-Deficient Mice. *Neuron* 30, 819–828 (2001).
178. Franke, D. & Svergun, D. I. DAMMIF, a program for rapid *ab-initio* shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* (2009). doi:10.1107/s0021889809000338
179. Tria, G., Mertens, H. D. T., Kachala, M. & Svergun, D. I. Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering. *IUCrJ* (2015). doi:10.1107/s205225251500202x
180. Wolff, M. *et al.* A β 42 pentamers/hexamers are the smallest detectable oligomers in solution. *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-02370-3
181. Dabrowski, O. Photochemische Funktionalisierung exosomaler Membranen mithilfe von Photoaffinitäts-Labeln. (2018).
182. Choi, Y. J. *et al.* Neurotoxic amyloid beta oligomeric assemblies recreated in microfluidic platform with interstitial level of slow flow. *Sci. Rep.* 3, 1921 (2013).
183. Davalos, D. *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758 (2005).
184. Krabbe, G. *et al.* Functional Impairment of Microglia Coincides with Beta-Amyloid Deposition in Mice with Alzheimer-Like Pathology. *PLoS One* 8, e60921 (2013).
185. Pan, X. *et al.* Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 6, 45 (2011).
186. Weldon, D. T. *et al.* Fibrillar β -Amyloid Induces Microglial Phagocytosis, Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase, and Loss of a Select Population of Neurons in the Rat CNS *In Vivo*. *J. Neurosci.* 18, 2161–2173 (2018).

187. Koenigsnecht-Talboo, J. Microglial Phagocytosis Induced by Fibrillar β -Amyloid and IgGs Are Differentially Regulated by Proinflammatory Cytokines. *J. Neurosci.* 25, 8240–8249 (2005).
188. Fitzner, D. *et al.* Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J. Cell Sci.* (2011). doi:10.1242/jcs.074088
189. Street, J. M. *et al.* Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J. Transl. Med.* 10, 5 (2012).
190. Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M. & Hill, A. F. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front. Physiol.* 3 MAY, 1–12 (2012).
191. Motter, R. *et al.* Reduction of β -amyloid peptide₄₂ in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 38, 643–648 (1995).
192. Mawuenyega, K. G. *et al.* Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330, 1774 (2010).
193. Cohen, S. I. A. *et al.* Proliferation of amyloid- β ₄₂ aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9758–63 (2013).
194. Jarrett, J. T. & Lansbury, P. T. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055–1058 (1993).
195. Harper, J. D. & Lansbury, P. T. MODELS OF AMYLOID SEEDING IN ALZHEIMER'S DISEASE AND SCRAPIE: Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 385–407 (1997).
196. Naiki, H. & Gejyo, F. Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol.* 309, 305–18 (1999).
197. Renner, M. *et al.* Deleterious Effects of Amyloid β Oligomers Acting as an Extracellular Scaffold for mGluR5. *Neuron* (2010). doi:10.1016/j.neuron.2010.04.029
198. Terzi, E., Hölzemann, G. & Seelig, J. Self-association of β -amyloid peptide (1-40) in solution and binding to lipid membranes. *J. Mol. Biol.* 252, 633–642 (1995).
199. Hane, F., Drolle, E., Gaikwad, R., Faught, E. & Leonenko, Z. Amyloid- β Aggregation on Model Lipid Membranes: An Atomic Force Microscopy Study. *J. Alzheimer's Dis.* 26, 485–494 (2011).
200. McLaurin, J. & Chakrabartty, A. Characterization of the Interactions of Alzheimer beta-Amyloid Peptides with Phospholipid Membranes. *Eur. J. Biochem.* 245, 355–363 (1997).
201. Yanagisawa, K. & Matsuzaki, K. Cholesterol-dependent aggregation of amyloid β -protein. in *Annals of the New York Academy of Sciences* (2002). doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04841.x
202. Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N. & Ihara, Y. GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein ($A\beta$): A possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 1, 1062–1066 (1995).
203. Atsuko Kakio, ‡, Sei-ichi Nishimoto, ‡, Katsuhiko Yanagisawa, §, Yasunori Kozutsumi, II, † and & Katsumi Matsuzaki*, II. Interactions of Amyloid β -Protein with Various Gangliosides in Raft-Like Membranes: Importance of GM1 Ganglioside-Bound Form as an Endogenous Seed for Alzheimer Amyloid†. (2002). doi:10.1021/BI0255874
204. Devanathan, S., Salamon, Z., Lindblom, G., Grobner, G. & Tollin, G. Effects of sphingomyelin, cholesterol and zinc ions on the binding, insertion and aggregation of the amyloid Abeta1-40 peptide in solid-supported lipid bilayers. *FEBS J.* 273, 1389–1402 (2006).
205. Tashima, Y. *et al.* The Effect of Cholesterol and Monosialoganglioside (GM1) on the Release and Aggregation of Amyloid β -Peptide from Liposomes Prepared from Brain Membrane-like Lipids. *J. Biol. Chem.* (2004). doi:10.1074/jbc.M308622200
206. Yuyama, K., Yamamoto, N. & Yanagisawa, K. Accelerated release of exosome-associated GM1 ganglioside (GM1) by endocytic pathway abnormality: Another putative pathway for GM1-induced amyloid fibril formation. *J. Neurochem.* (2008). doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05128.x
207. Sugiura, Y., Ikeda, K. & Nakano, M. High Membrane Curvature Enhances Binding, Conformational Changes, and Fibrillation of Amyloid- β on Lipid Bilayer Surfaces. *Langmuir* 31, 11549–11557 (2015).
208. Kostylev, M. A. *et al.* Liquid and Hydrogel Phases of PrP C Linked to Conformation Shifts and Triggered by Alzheimer's Amyloid- β Oligomers. *Mol. Cell* (2018). doi:10.1016/j.molcel.2018.10.009
209. Zhao, H. *et al.* Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife* 5, 1–27 (2016).
210. Lau, C. S. & Wong, D. T. W. Breast Cancer Exosome-like Microvesicles and Salivary Gland Cells Interplay Alters Salivary Gland Cell-Derived Exosome-like Microvesicles In Vitro. *PLoS One* 7, e33037 (2012).
211. Holder, B. *et al.* Macrophage Exosomes Induce Placental Inflammatory Cytokines: A Novel Mode of Maternal-Placental Messaging. *Traffic* (2016). doi:10.1111/tra.12352

212. Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J. & Gupta, R. C. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett.* (2016). doi:10.1016/j.canlet.2015.10.020
213. Svensson, K. J. *et al.* Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* (2013). doi:10.1074/jbc.M112.445403
214. Franzen, C. A. *et al.* Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. *Biomed Res. Int.* (2014). doi:10.1155/2014/619829
215. Hazan-Halevy, I. *et al.* Cell-specific uptake of mantle cell lymphoma-derived exosomes by malignant and non-malignant B-lymphocytes. *Cancer Lett.* (2015). doi:10.1016/j.canlet.2015.04.026
216. Brunner, D. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX* 53–62 (2010). doi:10.14573/altex.2010.1.53
217. Shelke, G. V., Lässer, C., Gho, Y. S. & Lötvall, J. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J. Extracell. Vesicles* 3, 24783 (2014).
218. Chowdhury, P., Sacks, S. H. & Sheerin, N. S. Toll-like receptors TLR2 and TLR4 initiate the innate immune response of the renal tubular epithelium to bacterial products. *Clin. Exp. Immunol.* 145, 346–56 (2006).
219. Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. & Robinson, R. K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry - A critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2000). doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1
220. Yeo, S. K. & Liong, M. T. Effects and applications of sub-lethal ultrasound, electroporation and UV radiations in bioprocessing. *Ann. Microbiol.* 63, 813–824 (2013).
221. Bose, B., Agarwal, S. & Chatterjee, S. N. UV-A induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Radiat. Environ. Biophys.* 28, 59–65 (1989).
222. Kochevar, I. E. UV-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. *Photochem. Photobiol.* 52, 795–800 (1990).
223. Wood, M. J., O'Loughlin, A. J. & Lakhali, S. Exosomes and the blood–brain barrier: implications for neurological diseases. *Ther. Deliv.* 2, 1095–1099 (2011).
224. Lakhali, S. & Wood, M. J. A. Exosome nanotechnology: An emerging paradigm shift in drug delivery: Exploitation of exosome nanovesicles for systemic in vivo delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers. *BioEssays* (2011). doi:10.1002/bies.201100076
225. Yang, T. *et al.* Exosome Delivered Anticancer Drugs Across the Blood-Brain Barrier for Brain Cancer Therapy in Danio Rerio. *Pharm. Res.* 32, 2003–2014 (2015).
226. Chen, C. C. *et al.* Elucidation of Exosome Migration Across the Blood–Brain Barrier Model In Vitro. *Cell. Mol. Bioeng.* 9, 509–529 (2016).
227. EL Andaloussi, S., Lakhali, S., Mäger, I. & Wood, M. J. A. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2013). doi:10.1016/j.addr.2012.08.008
228. EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O. & Wood, M. J. A. Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 347–357 (2013).
229. Das, C. K. *et al.* Exosome as a Novel Shuttle for Delivery of Therapeutics across Biological Barriers. *Molecular Pharmaceutics* (2019). doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00901
230. Zhuang, X. *et al.* Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol. Ther.* (2011). doi:10.1038/mt.2011.164

Abkürzungsverzeichnis

2D-GPC	=	<i>engl.: Two-Dimensional Correlation Gel Permeation Chromatography</i>
AD	=	Alzheimer-Erkrankung (<i>engl.: alzheimer's disease</i>)
ADAM	=	<i>engl.: a disintegrin and metalloproteinase domain</i>
AICD	=	<i>engl.: APP intracellular domain</i>
AMPAr	=	<i>engl. α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
APLP	=	APP ähnliche Proteine (<i>engl.: APP-like proteins</i>)
ApoE	=	Apolipoprotein E
APP	=	Amyloid-Vorläuferprotein (<i>engl.: amyloid precursor protein</i>)
AS	=	Aminosäure
Aβ	=	Amyloid-beta
BACE1	=	<i>engl.: beta-site APP-cleaving enzyme 1</i>
bzw.	=	beziehungsweise
CSF	=	Liquor / Zerebrospinalflüssigkeit (<i>engl.: cerebrospinal fluid</i>)
EOAD	=	früh einsetzende AD (<i>engl.: early onset AD</i>)
ePrP ^C	=	exosomales-PrP ^C
ePrP ^{Sc}	=	exosomales-PrP ^{Sc}
ESCRT	=	<i>engl.: endosomal sorting complex required for transport</i>
FAD	=	familiäre AD (<i>engl.: familiar AD</i>)
GPI	=	<i>engl.: glycosylphosphatidylinositol</i>
h	=	Stunde
HMW	=	<i>engl.: high molecular weight</i>
lc	=	Injektionskanal (<i>engl.: injection channel</i>)
ILVs	=	intraluminale Vesikel (<i>engl.: intraluminal vesicles</i>)
kDa	=	Kilodalton
LMW	=	<i>engl.: low molecular weight</i>
LOAD	=	spät einsetzende AD (<i>engl.: late onset AD</i>)
LTD	=	Langzeit-Depression
LTP	=	Langzeit-Potenzierung
min	=	Minute
ms	=	Millisekunde
MVBs	=	multivesikuläres Endosom (<i>engl.: multivesicular bodies</i>)
nm	=	Nanometer
NMDAr	=	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
PFA	=	Paraformaldehyd
PLD3	=	Phospholipase D3 (<i>engl.: phospholipase D3</i>)
PrP ^C	=	zelluläre Prion-Protein
PrP ^{Sc}	=	<i>engl.: Scrapie Prion-Protein</i>
RAGE	=	<i>engl. Receptor for advanced glycation</i>
Rg	=	Streumassenradius (<i>engl.: radius of gyration</i>)
s	=	Sekunde
SAD	=	sporadische AD (<i>engl.: sporadic AD</i>)
TACE	=	<i>engl.: TNF alpha converting enzyme</i>
TREM2	=	<i>engl.: triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
WB	=	Western Blot
ZNS	=	Zentralnervensystem (ZNS)
μl	=	Mikroliter
μM	=	Mikromolar

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Auftreten ausgewählter Todesursachen aller Altersgruppen in den Jahren 2000 – 2013 ¹²	9
Abbildung 1.2: Neuropathologische Merkmale der AD, mikroskopisch nachweisbare extra- und intrazelluläre Proteinablagerungen.	10
Abbildung 1.3: Prozessierungen des human APP ⁶⁷	13
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des zellulären Prion-Proteins.	17
Abbildung 1.5: Schemata der Biogenese und Sekretion von Exosomen ¹³³	20
Abbildung 1.6: Die unterschiedlichen Beteiligungen von ePrP ^C in neurodegenerativen Erkrankungen ⁹⁸	23
Abbildung 2.1: Ablaufschema der Isolation von Exosomen aus Körperflüssigkeiten.	34
Abbildung 2.2: Funktionsgrafik NanoSight	35
Abbildung 3.1: Analyse des Exosomen-A β ₁₋₄₂ Bindungs-Assays.	50
Abbildung 3.2: Konfokale Mikroskopie der Injektionskanäle der Probenansätze 4 und 5 nach einer Inkubationszeit von 6 h und 16 h.	52
Abbildung 3.3: Attraktion von Mikroglia-Zellen durch die intrazerebrale Injektion von Exosomen und A β ₁₋₄₂	54
Abbildung 3.4: Analyse der Kolokalisation von Exosomen, A β ₁₋₄₂ und Mikroglia-Zellen.	56
Abbildung 3.5: Korrelation des Alters der Patienten mit der Menge an A β ₁₋₄₂ und der Anzahl am Exosomen im CSF.	57
Abbildung 3.6: Bildgebende Durchflusszytometrie der AD-Risikogruppen zur A β ₁₋₄₂ -Menge im Hirngewebe sowie auf Exosomen und der absoluten Anzahl an Exosomen im CSF.	59
Abbildung 3.7: Zeitaufgelöste SEC der A β ₁₋₄₂ -Proben-Lösungen.	62
Abbildung 3.8: Interaktionsschema der dominierenden A β ₁₋₄₂ -Größenpopulationen.	63
Abbildung 3.9: SAXS-Messungen der A β ₁₋₄₂ -Proben-Lösungen zu verschiedenen inkubationszeitpunkten.	64
Abbildung 3.10: Zeitaufgelöste SEC der A β ₁₋₄₂ -Proben-Lösungen + N2a-WT- oder N2a-PrP ^{0/0} -Exosomen.	66
Abbildung 3.11: Zeitaufgelöste SAXS-Messungen der A β ₁₋₄₂ -Proben-Lösungen + N2a-WT- oder N2a-PrP ^{0/0} -Exosomen.	68

Abbildung 3.12: Zeitaufgelöste ATR-FTIR-Messungen der A β ₁₋₄₂ -Proben-Lösungen + N2a-WT- oder N2a-PrP ^{0/0} -Exosomen.....	69
Abbildung 3.13: Zeitliche Entwicklung der zwei Hauptkomponenten in der A β ₁₋₄₂ -Proben-Lösung.....	70
Abbildung 3.14: Analyse der Fraktionen des OptiPrep TM -Dichtegradient nach Ultrazentrifugation der R87 und PKH26 behandelten Exosomen.....	73
Abbildung 3.15: Exosome- <i>uptake</i> -Assay der mit den Membranfarbstoffen R87 bzw. PKH26 behandelten Exosomen auf N2a-WT-GFP-Zellen.....	74
Abbildung 3.16: Exosome- <i>uptake</i> -Assay der mit den Membranfarbstoffen R87 bzw. PKH26 behandelten Exosomen auf N2a-WT-GFP-Zellen nach UV-A-Bestrahlung.	76
Abbildung 3.17: Exosome- <i>uptake</i> -Assay der mit R87 behandelten Exosomen auf N2a-WT-Zellen nach UV-A- und UV-C-Bestrahlung in unterschiedlicher Dauer.	77
Abbildung 3.18: MALDI-TOF Analyse von Iodixanol (A) und Iodixanolderivaten (B) ¹⁸¹	78
Abbildung 3.19: Exosome- <i>uptake</i> -Assay von R87-Exosomen nach UV-C-Bestrahlung auf N2a-WT-Zellen.	81
Abbildung 3.20: Schematische Darstellung des Protokolls zur longitudinal stabilen Funktionalisierung von Exosomen mit dem R87-Membranfarbstoff.	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: verwendete Geräte	25
Tabelle 2.2: verwendete Glas- und Kunststoffverbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 2.3: verwendete Primär- und Sekundärantikörper	28
Tabelle 2.4: verwendete Farbstoffe	30
Tabelle 2.5: verwendete Kits	30
Tabelle 2.6: verwendete Agentien	30
Tabelle 2.7: murine Zelllinien.....	31
Tabelle 2.8: Zusammensetzung der 1D-Gele	39
Tabelle 2.9: MES/SDS-Laufpuffer	40
Tabelle 2.10: Verwendete Probenansätze <i>in vivo</i>	46
Tabelle 3.1: Vergleich der Färbeprotokolle (nicht optimiert vs. optimiert).	79

Danksagung

Hiermit möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Doktorarbeit im Institut für Neuropathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchführen durfte. Ich danke **Prof. M. Glatzel** in seiner Funktion als Doktorvater und Institutsleiter, sowie **Dr. S. Krasemann** für die Betreuung der praktischen Arbeiten im Labor. Dem gesamten Team der Neuropathologie danke ich des Weiteren für die Unterstützung im Laboralltag.

*Ein gesonderter Dank richtet sich an **Beata Anderson**, welche mir immer helfend zur Seite stand und leider viel zu früh von uns gehen musste. Deine Art und allgegenwärtige Gute Laune wird mir ewig in Erinnerung bleiben.*

Auch meiner Familie und engen Freunden möchte ich dafür danken, dass sie mich seit dem Studium unterstützt und damit die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Mein Besonderer Dank richtet sich an meine Frau **Dr. Christiane Hartmann**, welche mich immer unterstützt und auch durch die schwierigsten Zeiten gelotst hat.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe und das alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind. Mir ist bekannt, dass die Prüfung wegen einer Pflichtwidrigkeit für nicht bestanden erklärt werden kann.

Hamburg, 13.12.2019

Alexander Hartmann