

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Neuropathologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Markus Glatzel

## **Zelluläres Prion Protein auf Exosomen in Amyloid $\beta$ Aggregation und Transport**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Inga Juliane Gütt  
aus Leinefelde

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 31.03.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Braulke**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Markus Glatzel**

**3. Gutachten: Prof. Dr. Aymelt Itzen**

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	5
1.1. Morbus Alzheimer .....	5
1.1.1. Klinische Kennzeichen und Therapie.....	6
1.1.2. APP und dessen Proteolytische Prozessierung.....	9
1.1.3. Amyloid $\beta$ (A $\beta$ ) .....	12
1.1.4. A $\beta$ , Tau und Neurodegeneration .....	14
1.2. Zelluläres Prion-Protein (PrP <sup>C</sup> ) .....	15
1.2.1. Physiologische Funktion des Prion-Proteins.....	16
1.2.2. Pathologie des Prion-Proteins .....	16
1.2.3. Prion-Protein und Morbus Alzheimer .....	17
1.3. Exosomen .....	19
1.3.1. Genese von Exosomen .....	19
1.3.2. Zusammensetzung von Exosomen .....	21
1.3.3. Physiologische Funktion der Exosomen .....	21
1.3.4. PrP <sup>C</sup> und PrP <sup>Sc</sup> auf Exosomen.....	22
1.3.5. Exosomen und Morbus Alzheimer.....	22
1.4. Hypothese .....	25
2. Material und Methoden .....	26
2.1. Material.....	26
2.1.1. Geräte und Zubehör.....	26
2.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	27
2.1.3. Chemikalien und Puffer .....	28
2.1.4. Enzyme.....	29
2.1.5. Laborkits.....	29
2.1.6. Antikörper .....	30
2.1.7. Software .....	30
2.1.8. Zellkulturmedien und Medienzusätze .....	31
2.1.9. Bakterien und Zelllinien.....	31
2.1.10. Zusammengesetzte Puffer und Lösungen .....	31
2.2. Methoden .....	36
2.2.1. Klonierung.....	36
2.2.1.1. Restriktion und Ligation.....	36
2.2.1.2. Transformation der Bakterien.....	37
2.2.1.3. Colony-PCR.....	37
2.2.1.4. TALEN-Methode.....	39

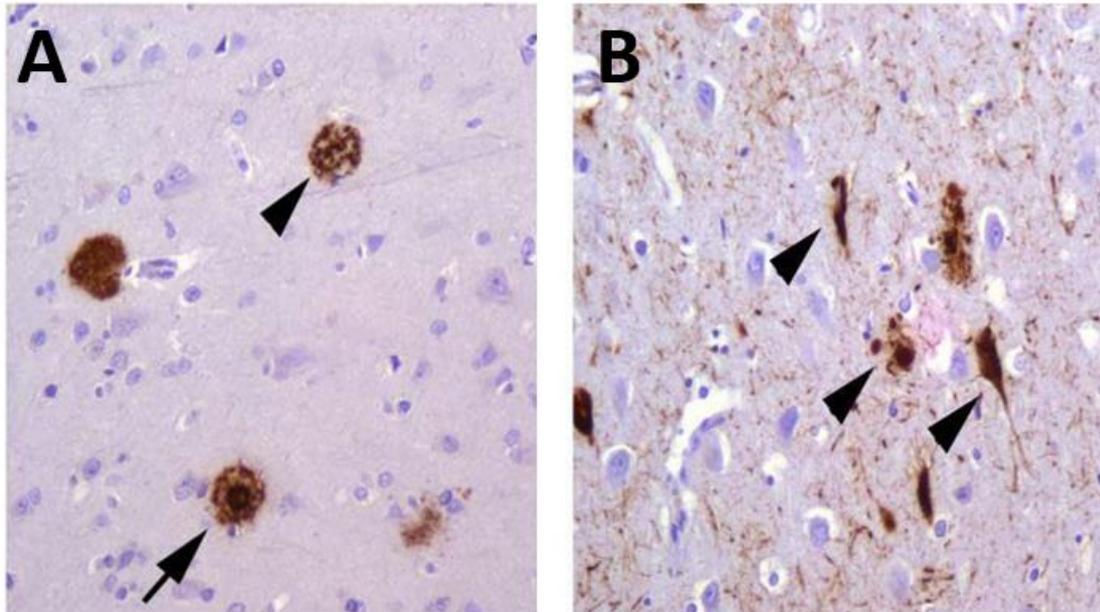
2.2.2.	Zellkultur .....	44
2.2.2.1.	Kultivieren der N2a-Zellen.....	44
2.2.2.2.	Kultivieren der SH-SY5Y-Zellen .....	45
2.2.2.3.	Kryokonservierung .....	45
2.2.2.4.	Lyse von Zellen .....	46
2.2.2.5.	Transfektion von Zellen.....	47
2.2.3.	Bradford-Assay .....	47
2.2.4.	Aufreinigung und Charakterisierung von Exosomen.....	48
2.2.4.1.	Aufreinigen von Exosomen .....	48
2.2.4.2.	Charakterisieren von Exosomen mittels Nanosight-Messung.....	48
2.2.5.	SDS-Page und Western-Blot.....	49
2.2.5.1.	SDS-Page.....	49
2.2.5.2.	Western-Blot.....	51
2.2.6.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	52
2.2.7.	Aggregationsassay (ThioflavinT-Assay).....	53
3.	Ergebnisse .....	54
3.1.	Herstellen einer N2a-PrP <sup>C</sup> -Knock-Out-Zelllinie .....	54
3.1.1.	TALEN-Methode .....	54
3.1.2.	Charakterisierung der N2a-PrP <sup>C</sup> -Knock-Out-Zelllinie .....	57
3.2.	Charakterisierung der SH-SY5Y- und N2a-Exosomen.....	59
3.3.	A $\beta$ bindet an Exosomen via PrP <sup>C</sup> .....	62
3.3.1.	A $\beta$ -Bindung führt zu keiner signifikanten Größenänderung der Exosomen.....	63
3.3.2.	PrP <sup>C</sup> -exprimierende Exosomen binden A $\beta$ .....	64
3.4.	PrP <sup>C</sup> auf Exosomen fördert die A $\beta$ -Aggregation.....	65
4.	Diskussion .....	69
4.1.	Vergleich der Exosomen unterschiedlicher Zelllinien .....	69
4.2.	PrP <sup>C</sup> auf Exosomen in der Pathophysiologie von M. Alzheimer .....	71
5.	Zusammenfassung .....	75
6.	Summary .....	76
7.	Liste der Abbildungen.....	77
8.	Liste der Tabellen.....	78
9.	Abkürzungsverzeichnis .....	79
10.	Literaturverzeichnis.....	82
11.	Danksagung.....	93
12.	Lebenslauf .....	94
13.	Eidesstattliche Versicherung .....	95

# 1. Einleitung

## 1.1. Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer („Alzheimer's disease“, AD) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, welche mit einem fortschreitenden Verlust der kognitiven Fähigkeiten einhergeht. AD ist die häufigste Form der Demenz und weltweit sind über 35 Millionen Menschen davon betroffen<sup>1</sup>. Der wesentliche Risikofaktor für die Manifestation der Erkrankung ist das Altern mit deutlicher Zunahme der Inzidenz in steigenden Lebensjahren<sup>2</sup>. Daher ist angesichts der Bevölkerungsentwicklung in den westlichen Industrienationen mit immer älter werdenden Personengruppen mit einer zunehmenden Prävalenz und damit einhergehender zunehmender ökonomischer Relevanz dieser Erkrankung in den nächsten Jahrzehnten zu rechnen<sup>1</sup>.

Bildung von Neurofibrillen, Ablagerung von senilen Plaques, Verminderung der kortikalen Synapsendichte und zerebrale Atrophie infolge von Neurodegeneration sind zentrale neuropathologische Kennzeichen von Morbus Alzheimer<sup>3,4</sup>. Die pathologischen Neurofibrillen („neurofibrillary tangles“, neurofibrilläre Bündel) bestehen aus aggregiertem hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Das physiologische, nicht-hyperphosphorylierte Tau-Protein spielt eine wichtige Rolle beim Zusammenbau und bei der Stabilität von Mikrotubuli<sup>5-7</sup>. Ein wesentlicher Bestandteil der senilen Plaques hingegen bildet eine aggregierte Form von Amyloid $\beta$  (A $\beta$ )<sup>8-10</sup>.



**Abbildung 1.1: Senile Plaques und Neurofibrilläre Bündel**

Dargestellt sind senile Plaques (A) bestehend aus aggregiertem A $\beta$  und Neurofibrillen (B) bestehend aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein.

(Quelle: Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf)

A $\beta$  wird durch Proteolyse aus einem Transmembranprotein, dem Amyloid-Vorläufer-Protein („Amyloid-Precursor-Protein“, APP) gebildet<sup>11</sup>. Im physiologischen Zustand besteht eine Homöostase zwischen A $\beta$ -Bildung und –Abbau. Gemäß der Amyloid-Hypothese trägt eine Störung dieses Gleichgewichts mit vermehrter Bildung oder vermindertem Abbau und damit einhergehender Anreicherung des Amyloids wesentlich zur Pathogenese von M. Alzheimer bei<sup>12-15</sup>.

### 1.1.1. Klinische Kennzeichen und Therapie

Vor rund hundert Jahren im Jahre 1907 wurde Morbus Alzheimer das erste Mal von Alois Alzheimer in „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ beschrieben. Darin wurde der Fall von Auguste D. beschrieben, welche mit auffälligen Gedächtnisstörungen und Wahnideen in einer Nervenheilanstalt behandelt wurde.<sup>16</sup> Im Jahr 1910 wurde von Emil Kraepelin der Begriff „Alzheimersche Krankheit“ in seinem Lehrbuch für Psychiatrie eingeführt<sup>17</sup>.

Die Erkrankung beginnt zumeist mit diskreten Gedächtnisstörungen, insbesondere das Kurzzeitgedächtnis betreffend. In diesen frühen Stadien von AD spricht man noch von einer milden kognitiven Störung („mild cognitive impairment“, MCI). Dabei kommt es zwar schon zu kognitiven Einbußen, jedoch schränken diese die Alltagskompetenz nicht wesentlich ein.<sup>18</sup>

Daraufhin kommt es über mehrere Jahre in einem langsam progredienten Verlauf zu der Ausbildung weiterer kognitiver Defizite, unter anderem zu Sprachstörungen, Organisations- und Orientierungsstörungen, visuell-räumliche Desorganisation, Apraxie und psychiatrische Symptome. Zu diesen gehören vor allem depressive Verstimmung, Unruhe, Enthemmung, Aggressivität sowie sozialer Rückzug. In Spätstadien können neben den neuropsychologischen, kognitiven Symptomen auch motorische Symptome, wie Pyramidenbahnzeichen, Myoklonien, Tonus- und Haltungsanomalien auftreten. Die Krankheit endet mit dem Verlust der Eigenständigkeit und Kontaktfähigkeit sowie in vollständiger Pflegebedürftigkeit des Patienten.<sup>19-21</sup>

Für Betreuende und Angehörige stellt der Krankheitsverlauf eine enorme emotionale Belastung dar. Die durchschnittliche Lebenserwartung ab Diagnosestellung beträgt 3 bis 10 Jahre<sup>22</sup>. Häufige Todesursachen der Patienten sind Unterernährung, sekundäre Infektionen oder Lungenembolien<sup>21</sup>.

Die ersten pathologischen neurofibrillären Bündel finden sich typischerweise im medialen Temporallappen, vor allem im Bereich des Hippokampus und der Area entorhinalis<sup>23</sup>. Diese Strukturen sind essentiell in der Konsolidierung von Gedächtnisinhalten und durch deren Ausfall kommt es zum klinischen Bild der anterograden Amnesie<sup>24</sup>. Im weiteren Verlauf breiten sich die neuropathologischen Veränderungen über den posterioren Temporal- und den Frontallappen schließlich über den gesamten Isokortex aus. Das Ausbreitungsmuster der Neurofibrillen wurde nach Braak und Braak in sechs Stadien eingeteilt<sup>23</sup>. Auch wenn dies eine Korrelation zwischen der Anatomie der Neuropathologie und dem klinischen Bild der Erkrankung verdeutlicht<sup>25</sup>, treten dennoch erste Veränderungen schon Jahre vor der klinischen Krankheitsmanifestation auf<sup>26,27</sup> und erste „biologische Marker“ können schon lange vor Entwicklung der klinisch manifesten Demenz nachgewiesen werden<sup>28</sup>.

Die weitaus meisten Krankheitsfälle treten sporadisch, meist nach dem 65. Lebensjahr auf („late-onset AD“, LOAD, senile Form). Bis heute weiß man jedoch sehr wenig über die multifaktorielle Genese. In großen Studien konnten mögliche Risikofaktoren identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem das Alter, das weibliche Geschlecht, geringe Schulbildung, geringe körperliche und geistige Aktivität, Hypercholesterinämie im mittleren Lebensalter, Diabetes<sup>29,30</sup> sowie eine Genvariante vom Apolipoprotein-E (Genallel: Apoε-4)<sup>31,32</sup>. Das Apoε-4-Allel scheint dabei einen Einfluss auf die Aβ-Aggregation und den –Abbau zu haben<sup>33,34</sup>. Für die Manifestation der Erkrankung ist die alleinige Trägerschaft dieses Genallels jedoch nicht ausreichend (bei circa 20 % der Normalbevölkerung nachweisbar)<sup>35-37</sup>. Daneben konnten inzwischen noch weitere Risikogene identifiziert werden. Zu denen gehören im Wesentlichen Gene, die für Proteine im Fettstoffwechsel, in der Endozytose und im Rahmen der Entzündungsreaktion kodieren<sup>38</sup>.

Nur 1-6 % der Krankheitsfälle treten vor dem 65. Lebensjahr auf und werden als „early-onset AD“ (EOAD, präsenile Form) klassifiziert. Circa 10 % der EOAD werden autosomal-dominant vererbt (FAD, familiäre Form) und sind daher mit weniger als 1 % der Krankheitsfälle sehr selten.<sup>39</sup> Inzwischen wurden verschiedene Mutationen in drei Genen auf drei Chromosomen als Auslöser identifiziert. Dabei handelt es sich um Mutationen im Präsenilin-Gen 1 (PSEN 1) auf Chromosom 14<sup>40,41</sup>, im Präsenilin-Gen 2 (PSEN 2) auf Chromosom 1<sup>42,43</sup> sowie um Mutationen im APP-Gen auf Chromosom 21<sup>44,45</sup>.

Die Produkte dieser Gene sind alle im Aβ-Metabolismus involviert: APP als transmembranes Protein, aus dem Aβ durch die γ-Sekretase-Aktivität, an der unter anderem Präsenilin 1 oder Präsenilin 2 beteiligt sind<sup>46,47</sup>, freigesetzt wird.<sup>11,48,49</sup> Die Mutationen führen entweder zu einer erhöhten Produktion von Aβ oder steigern dessen Aggregationsneigung durch unterschiedliche Mechanismen, wie beispielsweise durch einen erhöhten Aβ<sub>42</sub>/Aβ<sub>40</sub>-Quotienten. Klinisch sind die familiären Alzheimer-Fälle, abgesehen vom frühen Krankheitsbeginn, nur schwer bis gar nicht von den sporadischen Fällen zu unterscheiden. Das legt die Vermutung nahe, dass beiden Formen gemeinsame pathologische Stoffwechseleränderungen zugrunde liegen, die schließlich zum Vollbild des Morbus Alzheimer führen. Nichtsdestotrotz sind die bisher bekannten Mutationen nur für einen äußerst geringen Teil der

Krankheitsfälle verantwortlich, sodass es letztlich weiterer Grundlagenforschung zum Verständnis der molekularen Mechanismen des A $\beta$ -Metabolismus und dessen Auswirkungen auf das neuronale Netzwerk im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieoptionen bedarf.

So ist bis heute die Therapie neben Allgemeinmaßnahmen, wie Unterbringung in geronto-psychiatrischen Tageskliniken, gezielte Förderung vorhandener Fähigkeiten und supportive Therapiemaßnahmen (wie zum Beispiel Ergo- und Physiotherapie) im Wesentlichen auf zwei Substanzklassen beschränkt: Acetylcholinesterase-Inhibitoren und NMDA-Antagonisten (N-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten)<sup>50</sup>. Die Therapie mit Acetylcholinesterasehemmern basiert auf der Annahme, dass es durch kortikale Synapsenverarmung zu einem relativen cholinergen Neurotransmitterdefizit kommt<sup>51</sup>. Der eingesetzte NMDA-Antagonist Memantin schützt neuronale Zellen vor einer Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität<sup>52</sup>. Die Exzitotoxizität beschreibt eine Überstimulation von Glutamat-Rezeptoren (insbesondere AMPA- und NMDA-Rezeptoren), bei der es infolge eines massiven Calcium-Einstroms zur Apoptose der Zelle kommt<sup>53</sup>.

Allerdings unterbindet keine der heute zugelassenen Therapieoptionen das chronische Fortschreiten der Erkrankung oder führt gar zu einer Heilung. Weitere Therapieansätze, unter anderem basierend auf der Amyloid-Hypothese, werden inzwischen verfolgt und getestet<sup>50,54,55</sup>.

### **1.1.2. APP und dessen Proteolytische Prozessierung**

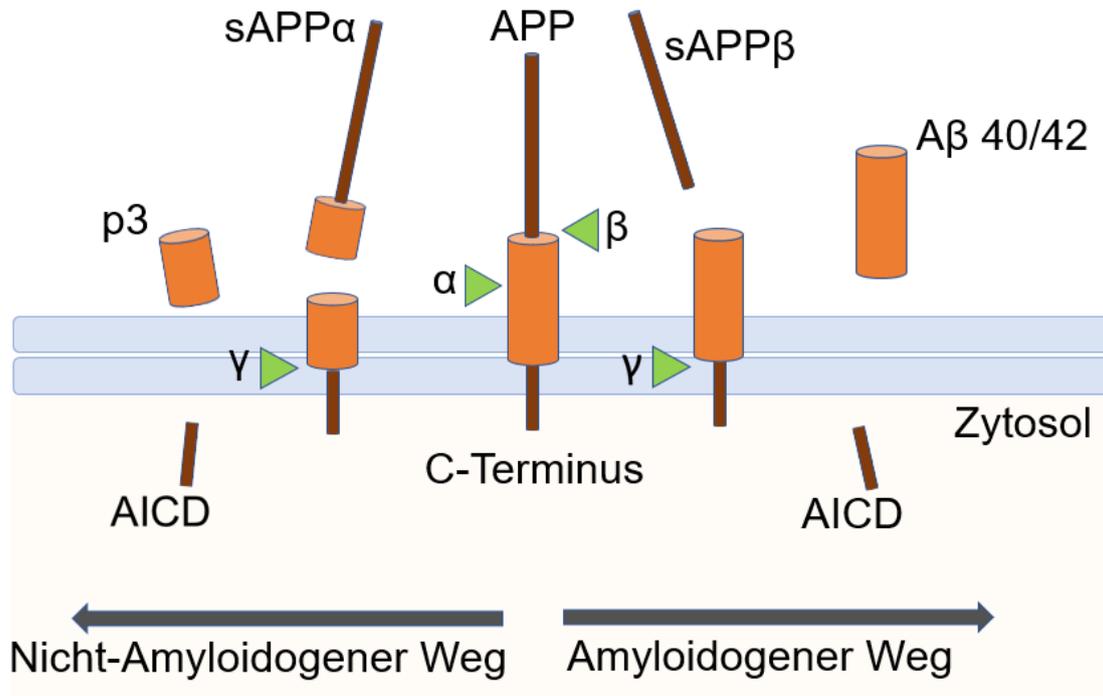
Vor rund 30 Jahren wurde zum ersten Mal A $\beta$  als wesentlicher Bestandteil der Amyloid-Plaques in den Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer entdeckt<sup>8</sup>. Kurze Zeit später konnte das Amyloid-Precursor-Protein als eben jenes Transmembranprotein identifiziert werden, aus dem A $\beta$  durch proteolytische Prozessierung hervorgeht<sup>11,48,49,56</sup>. Wiederum kurze Zeit später konnten erste autosomal-dominant vererbte Mutationen im APP-Gen auf Chromosom 21 identifiziert werden, die für eine familiäre Variante der Alzheimer-Erkrankung verantwortlich sind<sup>44,45</sup>. Ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle von APP in der Pathogenese von Morbus Alzheimer ist die Tatsache, dass es bei Trisomie 21 mit letztlich drei Genallelen

des APP-Gens schon frühzeitig zur Ablagerung von Amyloid-Plaques und zur Entwicklung einer Demenz kommt.

APP ist ein evolutionär konserviertes<sup>57</sup> und ubiquitär exprimiertes Protein<sup>58</sup>, dessen Funktionen bis heute trotz ausgiebiger Forschung nicht vollständig geklärt sind. Diskutiert werden unter anderem Funktionen in der Entwicklung des Gehirns, in Reparaturmechanismen nach Schäden und im Rahmen der neuronalen Plastizität.<sup>59-61</sup> Durch alternatives mRNA-Spleißen entstehen verschiedene APP-Isoformen, von denen insbesondere APP695 im neuronalen Gewebe exprimiert wird<sup>62</sup>. Des Weiteren sind zwei homologe Proteine („APP-like Proteins“, APLPs) bekannt<sup>63-65</sup>, die jedoch nicht die A $\beta$ -Sequenz enthalten<sup>66</sup>.

Bei der proteolytischen Prozessierung von APP unterscheidet man einen amyloidogenen von einem nicht-amyloidogenen Weg, welche beide auch in gesunden Individuen vorkommen<sup>67</sup>. Beim nicht-amyloidogenen Prozess wird APP zunächst durch die  $\alpha$ -Sekretase innerhalb der A $\beta$ -Sequenz geschnitten, wodurch eine große Ektodomäne namens sAPP $\alpha$  in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Übrig bleibt ein 83 Aminosäuren langes membrangebundenes C-terminales Fragment C83, welches wiederum durch Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase in AICD („Amyloid intracellular domain“) und p3 gespalten wird<sup>68</sup>.

Beim amyloidogenen Weg wird APP zunächst durch Proteolyse der  $\beta$ -Sekretase („beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1“, BACE-1) in die Ektodomäne sAPP $\beta$  und ein 99 Aminosäuren langes transmembranes Fragment C99 gespalten<sup>69-71</sup>. C99 fungiert ebenso als Substrat der  $\gamma$ -Sekretase und wird durch diese in A $\beta$  und AICD gespalten. Der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen: Präsenilin, Nicastrin; APH-1 („anterior pharynx-defective 1“) und PEN-2 („presenilin enhancer 2“).<sup>72,73</sup> Die Proteolyse der  $\gamma$ -Sekretase erfolgt innerhalb der Membran<sup>74</sup> und ist nicht vollständig exakt, sodass ein Spektrum an A $\beta$ -Peptiden, die sich in der Länge am C-Terminus um einige Aminosäuren unterscheiden, produziert wird<sup>75,76</sup>. AICD wird ins Zytosol freigesetzt und spielt eventuell eine Rolle in der Regulation der Gentranskription<sup>77,78</sup>.



**Abbildung 1.2: Proteolytische Prozessierung von APP**

Dargestellt sind der amyloidogene und nicht-amyloidogene Weg der proteolytischen Prozessierung von APP. Die grünen Pfeile markieren die Schnittpunkte der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase.

(Modifiziert nach Thinakaran, G. and E. H. Koo (2008). "Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function." J Biol Chem 283(44): 29615-29619.)

Dementsprechend konkurrieren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase-Aktivität um die Bildung von A $\beta$ , sodass eine erhöhte  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität die Bildung von A $\beta$  reduziert<sup>79,80</sup>.

Mitunter scheint die Lokalisation der Substrate in unterschiedlichen Zelldomänen die konkurrierende Aktivität zu beeinflussen. So ist die Proteolyse mittels  $\beta$ -Sekretase abhängig von Lipid-Rafts, wohingegen die  $\alpha$ -Sekretase außerhalb von Lipid-Rafts arbeitet<sup>81,82</sup>. Zudem reduziert die Inhibition der Endozytose die Proteolyse mittels  $\beta$ -Sekretase<sup>83</sup>. So konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -Proteolyse in frühen Endosomen stattfindet und A $\beta$  in Assoziation mit Exosomen (kleinen extrazellulären Vesikeln endosomalen Ursprungs) freigesetzt wird<sup>84</sup>.

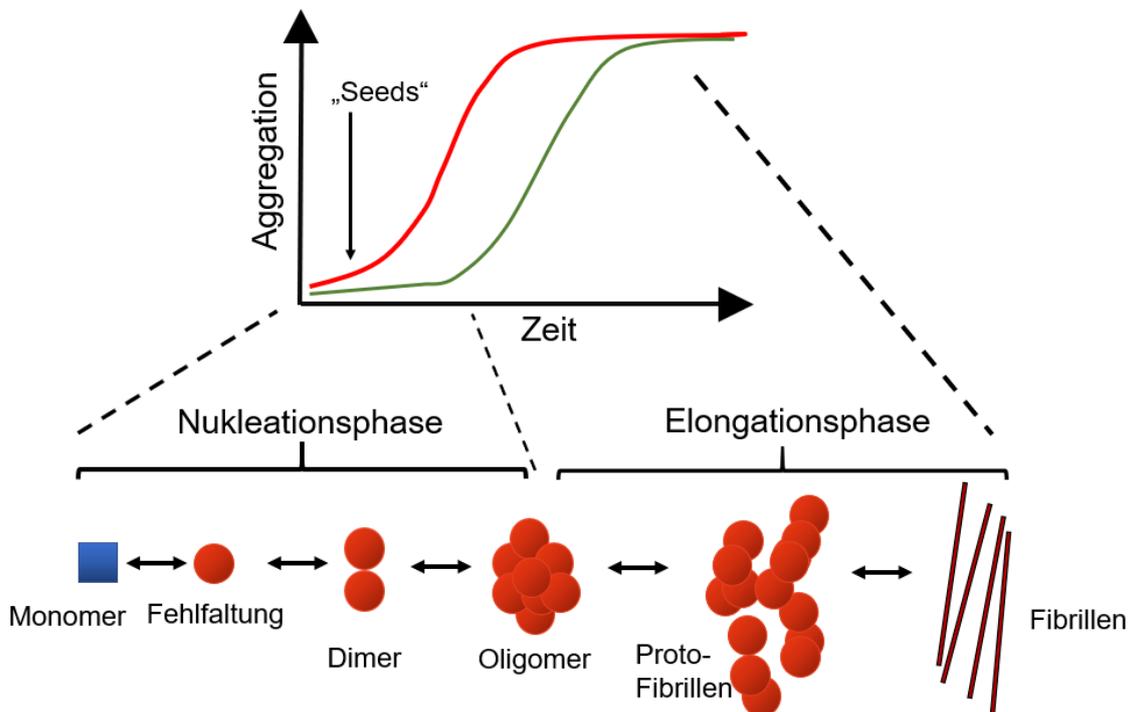
Anscheinend wird die Proteolyse von APP und damit die Freisetzung von A $\beta$  direkt durch neuronale Aktivität getriggert, eventuell mit der Aufgabe neuronale Überstimulation zu unterbinden<sup>85</sup>. Allerdings bleibt die physiologische Funktion der Proteolyse und deren Produkte bis heute weitestgehend ungeklärt.

### 1.1.3. Amyloid $\beta$ (A $\beta$ )

Das 38-43 Aminosäuren lange A $\beta$  wurde ursprünglich in meningealen Arteriolen und Venolen von Patienten mit Morbus Alzheimer und Patienten mit Trisomie 21 entdeckt<sup>86,87</sup>. Erst später konnte das Amyloid als wesentlicher Bestandteil von senilen Plaques identifiziert werden<sup>8</sup>.

Lange wurde angenommen, dass die Sekretion von A $\beta$  nur unter pathologischen Bedingungen erfolgt, bis schließlich nachgewiesen werden konnte, dass A $\beta$  sowohl von neuronalen als auch von nicht-neuronalen Zellen unter physiologischen Bedingungen sezerniert wird<sup>88-91</sup>. Diese Tatsache impliziert eine physiologische Funktion von A $\beta$ . Unter anderem wurde A $\beta$  inzwischen eine Rolle im Cholesterinstoffwechsel<sup>92</sup>, in der Regulation der Transkription<sup>93</sup> sowie im Rahmen von Lernen und Gedächtnis<sup>94</sup> zugeschrieben. In gesundem neuronalem Gewebe wird A $\beta$  durch verschiedene Enzyme, wie Nephilysin, Endothelin-konvertierendes Enzym und Insulysin abgebaut<sup>95</sup>.

Dabei sind Monomere der 40 Aminosäuren langen Variante A $\beta_{40}$  deutlich häufiger vorhanden als das viel mehr zur Aggregation neigende und neurotoxisch wirkende A $\beta_{42}$ <sup>96,97</sup>. Der Aggregationsprozess von A $\beta$ -Monomeren und –Dimeren über Oligomere zu Proto-Fibrillen und Fibrillen stellt einen komplizierten molekularen Prozess dar, der unter anderem auch mit einem Prion-ähnlichen Mechanismus der Proteinfehlfaltung einhergeht. Wohingegen A $\beta$ -Monomere vor allem eine  $\alpha$ -helikale beziehungsweise ungeordnete Struktur aufweisen, finden sich in den Proteinaggregaten vorzugsweise  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Dabei scheint der Polymerisationsprozess abhängig von einer Art Keimbildung im Rahmen der Proteinfehlfaltung zu sein. Nach dieser These unterscheidet man thermodynamisch zwei Phasen der Polymerisation: eine Nukleationsphase (Keimbildungsphase) und eine Elongationsphase (siehe Abbildung 1.3).<sup>98,99</sup>



### Abbildung 1.3: Aggregation von Amyloid $\beta$

In der langsamen Nukleationsphase lagern sich Monomere und Dimere im Rahmen einer Proteinefehlfaltung zu Oligomeren zusammen, die reich an  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind. Wenn ein kritischer Punkt erreicht wurde, lagern sich in der schnelleren und thermodynamisch günstigeren Elongationsphase viele Monomere an die präformierten Strukturen und bilden Proto-Fibrillen und Fibrillen bis zu einem bestimmten Sättigungspunkt. Durch Zugabe präformierter Aggregationskeime (engl. „Seeds“) verkürzt sich die initiale Nukleationsphase (rote Linie). (Modifiziert nach: Kumar, S. and J. Walter (2011). "Phosphorylation of amyloid beta (A $\beta$ ) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease." Aging (Albany NY) 3(8): 803-812.)

Dabei stehen vor allem lösliche Oligomere als neurotoxische Entität zur Diskussion<sup>100-102</sup>. Neben dem Verlust der Synapsen<sup>103</sup> korreliert die Schwere der Kognitionseinschränkung mit der Menge an löslichen Oligomeren, jedoch nicht mit der absoluten Menge von A $\beta$ <sup>104-108</sup>. Und auch wenn die Schwere der Demenz nicht mit der Menge der Amyloid-Plaques korreliert, so könnten diese dennoch als Reservoir dienen, aus denen sich bei einem Verschieben des molekularen Gleichgewichts wieder lösliche A $\beta$ -Strukturen lösen. So konnte nachgewiesen werden, dass diese Oligomere im Hippokampus die Langzeit-Potenzierung („long-term potentiation“, LTP) inhibieren<sup>101</sup> und die Langzeit-Depression („long-term depression“, LTD) fördern<sup>109</sup>. Die LTP beschreibt eine langandauernde Verstärkung der synaptischen Aktivität zwischen Neuronen und stellt eine wichtige molekulare Grundlage der neuronalen Plastizität und des Lernens dar. Hingegen beschreibt die LTD die langandauernde

Abschwächung der Signalübertragung<sup>110</sup>. Unterstützend konnten inzwischen APP-Mutationen identifiziert werden, welche zwar die absolute Menge an A $\beta$  nicht erhöhten, aber die Oligomer-Bildung favorisieren und klinisch zur Alzheimer-Demenz führen<sup>111,112</sup>.

Für die Entwicklung kurativer Therapieansätze ist es essenziell die physiologischen und pathologischen Mechanismen zu erforschen, welche die Produktion, die Aggregation und den Abbau von A $\beta$  regulieren.

#### **1.1.4. A $\beta$ , Tau und Neurodegeneration**

Die Amyloid-Hypothese besagt, dass die Ursache der Alzheimer-Erkrankung die pathologische Anreicherung von A $\beta$ , insbesondere A $\beta$ <sub>42</sub> ist<sup>12</sup>. Durch diese Anreicherung kommt es letztlich zu einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins mit der Bildung von Neurofibrillen, zur synaptischen Dysfunktion und zur Entstehung der Demenz<sup>12</sup>.

Mutationen im Tau-Protein führen zwar neuropathologisch zur Bildung von Neurofibrillen, aber klinisch zur Entwicklung einer Frontotemporalen Demenz mit Parkinson-Symptomatik assoziiert zu Chromosom 17 (FTD-P 17). Diese unterscheiden sich klinisch deutlich von Morbus Alzheimer.<sup>113</sup> Zwar korreliert die Tau-Pathologie eher mit den kognitiven Einschränkungen als die Menge an Amyloid-Plaques<sup>12,114</sup>, aber letztlich ist anzunehmen, dass die Menge an hyperphosphoryliertem Tau-Protein wichtig, aber nicht entscheidend für die Entstehung der Alzheimer-Demenz ist.

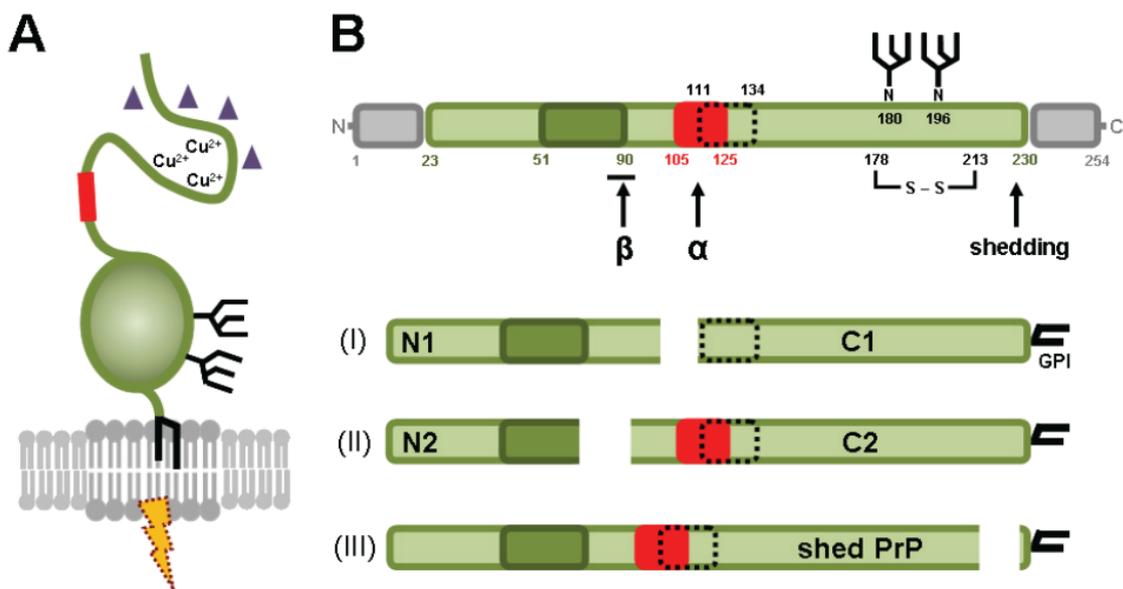
Zusammenfassend kann man behaupten, dass A $\beta$ -Oligomere die primäre pathologische Entität in AD bilden. Die Frage welche molekularen Signalwege zu einer Hyperphosphorylierung von Tau, zur synaptischen Dysfunktion und zur Inhibition der LTP führen, ist Gegenstand aktueller Forschung.

In diesem Zusammenhang konnte PrP<sup>C</sup> als hochaffiner Rezeptor für A $\beta$ -Oligomere, nicht Fibrillen und nicht Monomere, identifiziert werden<sup>115</sup>. Und diese Interaktion wird mitunter als ursächlich für die Ausbildung der Krankheitspathologie diskutiert<sup>116</sup>.

## 1.2. Zelluläres Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>)

Das zelluläre Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>) wird in vielen Zelltypen des Organismus exprimiert<sup>117,118</sup>. Ein besonders hohes Maß an Expression findet sich im neuronalen Gewebe<sup>119</sup>.

Das circa 35 kDa große Protein wird durch das PRNP-Gen kodiert und nach dessen Transkription mit Hilfe eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) an der äußeren Zellmembranseite in Lipid Rafts verankert<sup>120,121</sup>. Das Protein setzt sich aus einem flexiblen, unstrukturierten N-Terminus und einer globulären C-terminalen Domäne, in welcher sich vorwiegend  $\alpha$ -helikale Strukturen finden, zusammen<sup>122</sup>. Ähnlich wie APP wird auch das membrangebundene PrP<sup>C</sup> proteolytisch prozessiert<sup>123</sup> (s. Abb. 1.4).



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von murinem PrP<sup>C</sup> und dessen proteolytische Prozessierung**

A: Das zelluläre Prion-Protein wird mittels GPI-Anker an der äußeren Zellmembranseite in Lipid-Rafts verankert. Die flexible N-terminale Domäne kann Kupfer und oligomeres A $\beta$  binden (lila Dreiecke). Die globuläre C-terminale Domäne beinhaltet zwei Seitenketten für die N-Glykosylierung.

B: Posttranslational wird eine N-terminale (AS 1-22, graue Box) und eine C-terminale (AS 231-254, graue Box) Sequenz entfernt. C-terminal wird ein GPI-Anker angehängen. Das reife PrP<sup>C</sup> enthält eine Octa-Repeat-Region (AS 51-90, dunkelgrün), eine neurotoxische Domäne (AS 105-125, rot), einen hydrophoben Kern (AS 111-134, gestrichelt), eine Disulfidbrücke (AS 178 und 213) und zwei Glykosylierungsstellen (AS 180 und 196). Es wurden bisher drei proteolytische Prozessierungen beschrieben:  $\beta$ -Spaltung,  $\alpha$ -Spaltung und Shedding.

(Modifiziert nach: Altmeppen, H. C., et al. (2012). "Proteolytic processing of the prion protein in health and disease." *Am J Neurodegener Dis* 1(1): 15-31.)

### 1.2.1. Physiologische Funktion des Prion-Proteins

Die Tatsache, dass die PRNP-Gensequenz evolutionär hochkonserviert ist, deutet auf eine wichtige physiologische Funktion des Prion-Proteins hin. Diese konnte allerdings bis heute nicht vollständig geklärt werden.<sup>124,125</sup>

Interessanterweise weisen PRNP-Knock-Out-Mäuse keine wesentlichen anatomischen oder physiologischen Störungen auf<sup>126</sup>. Nur leichte Veränderungen unter anderem im Lernmechanismus und im Schlaf-Wach-Rhythmus werden diskutiert<sup>127</sup>. Zudem wird dem PrP<sup>C</sup> eine wichtige Rolle im Immunsystem<sup>128</sup>, in der Zelladhäsion<sup>129</sup>, in der Signaltransduktion<sup>130</sup> sowie im Kupfer- und Zink-Stoffwechsel<sup>131,132</sup> zugeschrieben. Ergänzend scheint PrP<sup>C</sup> neuro- und zytoprotektive Aufgaben zu erfüllen<sup>133,134</sup>. Zu den neuroprotektiven Eigenschaften gehört unter anderem auch die Unterdrückung von Exzitotoxizität durch Hemmung des NMDA-Rezeptors<sup>135</sup>.

### 1.2.2. Pathologie des Prion-Proteins

Das Wort Prion wurde ursprünglich von „proteinaceous infectious particle“ abgeleitet und nimmt damit Bezug auf die Entdeckung, dass Prionenerkrankungen nur durch ein fehlgefaltetes Protein, dem PrP<sup>Sc</sup> („Prion-Protein Scrapie“) hervorgerufen werden<sup>136,137</sup>. Dem zugrunde liegt eine Konformationsänderung des physiologischen PrP<sup>C</sup> in ein  $\beta$ -faltblattreiches PrP<sup>Sc</sup>, welches in der Lage ist seine pathologische Konformation auf weitere physiologische Prion-Proteine zu übertragen und sich so im Organismus auszubreiten. Zudem können Prionen auch zwischen verschiedenen Organismen übertragen werden. Was Prionen von anderen Infektionserregern abgrenzt, ist die Tatsache, dass sie keinen genetischen Informationsträger für ihre Infektiosität benötigen. Zu den Spongiformen Enzephalopathien („Transmissible spongiform encephalopathies“, TSE's) gehören unter anderem die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung („Creutzfeldt-Jakob-Disease“, CJD), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)<sup>138,139</sup>, die Letale Familiäre Insomnie („Fatal Familial Insomnia“, FFI)<sup>140</sup> und Kuru<sup>141</sup> beim Menschen sowie Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern<sup>142</sup> und Scrapie bei Schafen.<sup>143</sup>

PrP<sup>Sc</sup> hat im Vergleich zu PrP<sup>C</sup> mehr  $\beta$ -Faltblattstrukturen und ist resistenter gegenüber dem Verdau durch die Proteinase K<sup>144</sup>. Für die Neurotoxizität und die Ausbreitung der Pathologie bedarf es dem Vorhandensein von membrangebundenen PrP<sup>C</sup><sup>145,146</sup>. Die Ausbreitung der Erkrankung folgt demnach einem Modell, in dem sich PrP<sup>Sc</sup> von Zelle zu Zelle überträgt, seine pathologische Konformation auf PrP<sup>C</sup> überträgt und sich das Pathogen so im Organismus und innerhalb neuronaler Netzwerke ausbreitet.

Die infektiöse Übertragung zwischen Organismen erfolgt vorwiegend nach oraler Aufnahme von PrP<sup>Sc</sup>. Die Resistenz gegenüber Proteinase K könnte eine Erklärung dafür bieten, warum PrP<sup>Sc</sup> im Verdauungstrakt nicht vollständig abgebaut wird.<sup>147</sup>

Nach Aufnahme kommt es zur Ausbreitung des Pathogens im Lymphsystem<sup>148</sup> und im peripheren Nervensystem<sup>149</sup>. Dabei sind verschiedene Zellen, u.a. auch Immunzellen beteiligt<sup>150,151</sup>. Letztlich kommt es zur Infektion des ZNS, wobei der grundlegende molekulare Mechanismus der Ausbreitung weiterhin ungeklärt bleibt und weiterer Studien bedarf<sup>152</sup>. Möglicherweise wird hierfür ein enger Zell-zu-Zell-Kontakt benötigt<sup>153</sup>, aber es gibt auch Hinweise für die Übertragung mit zellfreien Medien<sup>154,155</sup>, sodass mindestens ein weiterer Übertragungsweg diskutiert werden muss.

So konnte gezeigt werden, dass sowohl PrP<sup>C</sup> als auch PrP<sup>Sc</sup> in Assoziation mit Exosomen in den extrazellulären Raum freigesetzt werden<sup>156</sup>. Diese Assoziation könnte eine Erklärungsgrundlage für die Ausbreitung des Pathogens liefern.

### **1.2.3. Prion-Protein und Morbus Alzheimer**

Abgesehen von seiner Rolle in Spongiformen Enzephalopathien scheint PrP<sup>C</sup> auch in Morbus Alzheimer von Bedeutung zu sein. So konnte nachgewiesen werden, dass membrangebundene Prion-Proteine als hochaffine Rezeptoren für lösliche A $\beta$ -Oligomere dienen. Monomere und Fibrillen wurden hingegen nicht gebunden. Für die Interaktion ist der N-Terminus entscheidend und es konnten zwei protein-bindende Regionen identifiziert werden: an den Aminosäuren 23-27 sowie 95-110 (s. Abbildung 1.4). Aktuell wird diskutiert, ob diese Bindung entscheidend für die Vermittlung der neurotoxischen Effekte von löslichen A $\beta$ -Oligomeren ist.<sup>115,157,158</sup>

Denn durch die hochaffine Bindung, wobei scheinbar LPR1<sup>159</sup> und mGLUR5<sup>160</sup> als Co-Rezeptoren dienen, kommt es zur Aktivierung der Fyn-Kinase<sup>161</sup>. Diese wiederum ist verantwortlich für die Phosphorylierung der GluN2B-Untereinheit von NMDA-Rezeptoren, welches letztlich zur synaptischen Dysfunktion führen soll<sup>162</sup>. Zudem führt die Fyn-Kinase-Aktivierung zur Phosphorylierung von Tau-Protein<sup>163</sup>. Voraussetzung für diesen Signalweg ist die Integrität der Lipid Rafts<sup>159</sup>.

In einem AD-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Expression von PrP<sup>C</sup> notwendig für die kognitiven Einschränkungen und für die Ausbildung typischer neuropathologischer Kennzeichen ist, wobei die Expression von APP durch die Anwesenheit von PrP<sup>C</sup> nicht verändert wurde<sup>157</sup>. Weiterhin wurde beschrieben, dass PrP<sup>C</sup> die Aggregation von A $\beta$  fördert<sup>164</sup> und sich in Amyloid-Plaques findet<sup>165</sup>. Letztlich konnte ein Met/Val 129 Polymorphismus des PRNP-Gens als Risikofaktor für EOAD identifiziert werden<sup>166-169</sup>.

Auf der anderen Seite nimmt durch Überexpression von PrP<sup>C</sup> die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase und damit einhergehend die Produktion von A $\beta$  ab<sup>170</sup>. Zudem bindet N1 (ein proteolytisches Produkt von PrP<sup>C</sup>) A $\beta$ -Oligomere und hemmt deren neurotoxischen Effekte<sup>171</sup>. Dies wiederum weist auf eine protektive Funktion des zellulären Prion-Proteins im Rahmen der Amyloid-Kaskade und der Pathogenese von AD hin.

So bleibt die Rolle von PrP<sup>C</sup> in Morbus Alzheimer weiterhin Gegenstand aktueller Forschung mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen<sup>172</sup>. Zwar bestätigen einige Forschungsgruppen die spezifische Bindung von A $\beta$ -Oligomeren an PrP<sup>C</sup>, jedoch war die Expression von PrP<sup>C</sup> nicht immer Voraussetzung für die Vermittlung neurotoxischer Effekte<sup>173-175</sup>. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte durch die unterschiedliche Präparation der Oligomere erklärt werden.

### 1.3. Exosomen

Exosomen sind kleine extrazelluläre Vesikel (50-150 nm) endosomalen Ursprungs, welche eine Lipid-Doppelmembran besitzen und vorwiegend der interzellulären Kommunikation dienen.

Sie finden sich in verschiedenen Körperflüssigkeiten; wie Urin<sup>176</sup>, Speichel<sup>177</sup>, Liquor<sup>178</sup> und Blut<sup>179</sup> und können von vielen Zellen, wie Neuronen<sup>180,181</sup>, Tumorzellen, Immunzellen, Retikulozyten<sup>182</sup> und anderen hämatopoetischen Zellen sezerniert werden.<sup>183</sup>

Die Differenzierung zu anderen extrazellulären Vesikeln (EV's), wie zum Beispiel Mikrovesikel, gelingt durch die Definition der Größe (50-150 nm), die Analyse der Proteinzusammensetzung und durch die Bestimmung des Saccharose-Gradienten. Definitionsgemäß entstehen Exosomen durch Einstülpung der Membran später Endosomen, wohingegen Mikrovesikel durch Ausstülpen der Zellmembran entstehen.<sup>183-185</sup>

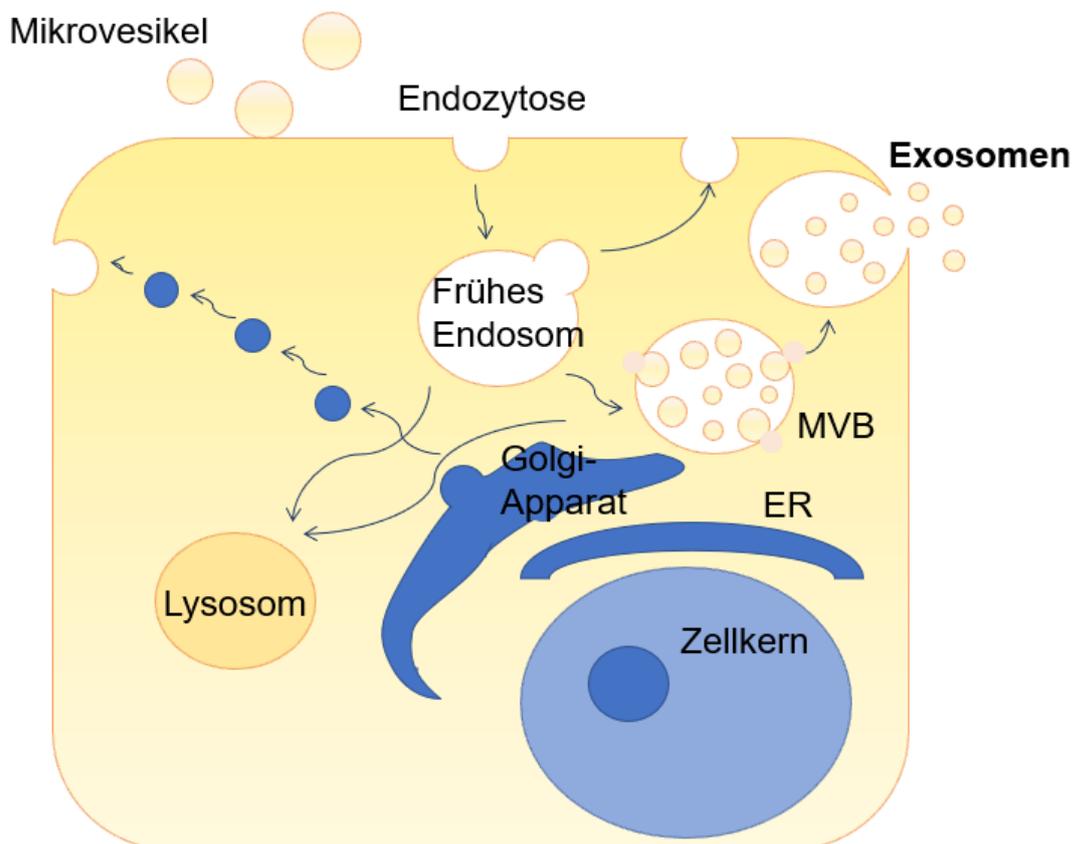
Zur Aufreinigung hat sich ein Prozedere aus einem 0,22 µm-Filtrationsschritt mit einer Reihe von Zentrifugationsschritten zur Beseitigung von toten Zellen, größeren Zellbestandteilen sowie größerer extrazellulärer Vesikel kombiniert mit einer finalen Ultrazentrifugation zur Pelletierung der Exosomen etabliert. Zwar finden sich in diesen Präparationen angereichert Exosomen, eine Kontamination mit anderen extrazellulären Vesikeln kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.<sup>186</sup>

#### 1.3.1. Genese von Exosomen

Exosomen werden durch Fusion von Multivesikulären Körperchen („multivesicular bodies“, MVB's) mit der Zellmembran freigesetzt<sup>182</sup>. MVB's entstehen aus späten Endosomen, in dessen Lumen sich durch Einstülpen und Abtrennen zunehmend sogenannte intraluminale Vesikel (ILV) formieren. Dabei werden zytosolische Proteine in das Innere der ILV eingeschleust und Transmembranproteine, mit der extrazellulären Domäne nach außen gerichtet in die Membran der späteren Exosomen einsortiert. Nach Fusion der MVB's mit der Zellmembran werden die ILV freigesetzt und anschließend als Exosomen bezeichnet. Der genaue Bildungsvorgang der MVB's,

die Sortierung der Proteine und die Fusion mit der Zellmembran sind bis heute nicht vollständig geklärt.<sup>183-185</sup>

Unter anderem scheint die Ubiquitinierung bei der Sortierung der Proteine eine Rolle zu spielen<sup>187,188</sup>. Daran ist auch der aus mehreren Proteinen zusammengesetzte ESCRT („endosomal sorting complex required for transport“) beteiligt. Daneben scheinen auch andere Prozesse involviert zu sein<sup>189,190</sup>. Ungeklärt bleibt, warum aus diesen späten Endosomen MVB's und keine Endolysosomen (für den späteren lysosomalen Abbau nicht mehr benötigter Proteine) werden. Hierbei scheint insbesondere die Lipid-Zusammensetzung entscheidend zu sein<sup>191</sup>. Die Sekretion von Exosomen wird mittels Membran-Depolarisation reguliert<sup>180,192</sup>.



#### **Abbildung 1.5: Genese von Exosomen**

Exosomen werden nach Fusion von Multivesikulären Körperchen (MVB) mit der Zellmembran freigesetzt. Im Gegensatz dazu entstehen Mikrovesikel durch Ausstülpen der Zellmembran.

(Modifiziert nach: Thery, C., et al. (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." *Nat Rev Immunol* 9(8): 581-593.)

### 1.3.2. Zusammensetzung von Exosomen

Die Proteinzusammensetzung von Exosomen variiert abhängig vom sezernierenden Zelltyp. So finden sich in Exosomen zelltypspezifische Proteine wie MHC-Klasse-II-Proteine oder T-Zellrezeptoren. Zu den zelltypunabhängigen Proteinen gehören unter anderem Tubulin, Aktin, Hitzeschockproteine („heat shock proteins“, HSP), MHC-Klasse-I-Proteine und Tetraspanine.<sup>193</sup> Wahrscheinlich gelangen sie im Rahmen der Biogenese in die Exosomen oder sind Ausdruck einer generellen Funktion.

Weitere Proteine, die in der Entstehung der MVB's beteiligt sind, sind Alix und Tsg101<sup>194</sup>. Antikörper gegen diese Strukturen werden für den Nachweis von Exosomen verwendet. Daneben finden sich gehäuft Proteine, welche normalerweise mit Lipid Rafts assoziiert sind<sup>184,195</sup>. Außerdem konnte auch mRNA in Exosomen nachgewiesen werden. Diese konnte in andere Zellen übertragen und dort translatiert werden. Hierfür wurde die Bezeichnung esRNA („exosomal shuttle RNA“) geprägt.<sup>196</sup>

### 1.3.3. Physiologische Funktion der Exosomen

Bis heute ist die Funktion der Exosomen nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich dienen sie der interzellulären Kommunikation<sup>197</sup>, der Eradikation nicht mehr benötigter Metabolite und Proteine als Alternative zum lysosomalen Abbau<sup>198</sup> sowie dem Transport von zytosolischen Proteinen, Transmembranproteinen, Membranbestandteilen und sogar von RNA.<sup>185,196</sup> Exosomen können dabei von der Ziel-Zelle durch Endozytose aufgenommen werden, direkt mit der Zellmembran fusionieren oder mit extrazellulären Rezeptoren interagieren<sup>199</sup>. Damit dienen sie der Regulation und Organisation verschiedener Prozesse im multizellulären Organismus, unter anderem auch in der Immunmodulation, der Angiogenese, der Apoptose sowie der Zell-Proliferation und -Differenzierung<sup>183</sup>.

Im Nervensystem werden EV's von Neuronen<sup>180,181</sup>, Oligodendrozyten<sup>200</sup>, Astrozyten<sup>201</sup> und Mikrogliazellen<sup>202</sup> sezerniert und erfüllen wahrscheinlich eine wichtige Funktion im Rahmen der Myelinisierung<sup>203</sup> und im neuronalen Überleben<sup>204</sup>.

### **1.3.4. PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> auf Exosomen**

Neben den möglichen physiologischen Funktionen von Exosomen erwecken sie immer mehr Interesse in der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen. So wird beispielsweise vermutet, dass Exosomen für die Ausbreitung und den Transport von Prionen relevant sind.

PrP<sup>C</sup> findet sich stark angereichert auf Exosomen<sup>205</sup> und exosomales PrP<sup>C</sup> konnte von Zellkulturen kortikaler Neuronen<sup>180</sup> und aus Liquor cerebrospinalis von Schafen<sup>205</sup> nachgewiesen werden.

Sowohl PrP<sup>C</sup> als auch PrP<sup>Sc</sup> werden in Assoziation mit Exosomen von Zellen sezerniert<sup>156</sup>. In einer neueren Studie konnte nachgewiesen werden, dass der Großteil des extrazellulären PrP<sup>Sc</sup> einer infizierten Zellkultur exosomal Ursprungs ist<sup>206</sup>. Tatsächlich waren Exosomen von Prionen-infizierten neuronalen Zellkulturen nicht nur in der Lage Prionen auf nicht-infizierte Zellkulturen zu übertragen, sondern auch nach Injektion Prionen-Erkrankungen in Mäusen hervorzurufen<sup>178</sup>. Mit Inhibition des ESCRT konnte die Sekretion von PrP<sup>Sc</sup> und die Infektiosität reduziert werden<sup>207</sup>.

Eine Ausbreitung von PrP<sup>Sc</sup> via Exosomen (und damit unabhängig von Zell-zu-Zell-Kontakt) könnte die bisher noch unzureichend geklärte Transmission von PrP<sup>Sc</sup> vom Gastrointestinaltrakt in das ZNS erklären und ein zusätzliches Erklärungsmodell für die Ausbreitung innerhalb des ZNS bieten. Außerdem wird der Exosomen-Transport als relevanter Faktor für die Konformationsänderung von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> diskutiert<sup>208</sup>.

Neben Prionen-Erkrankungen scheinen Exosomen auch in weiteren neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington<sup>209</sup>, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)<sup>210</sup> und Morbus Alzheimer<sup>84</sup> eine Rolle zu spielen.

### **1.3.5. Exosomen und Morbus Alzheimer**

In 2006 konnte nachgewiesen werden, dass die proteolytische Prozessierung von APP mit konsequenter Bildung von A $\beta$  in N2a-Zellen in frühen Endosomen stattfindet und im Folgenden das  $\beta$ -Amyloid via MVB's in Assoziation mit Exosomen freigesetzt wird<sup>84</sup>. Weitere Studien konnten eine Assoziation von APP und Exosomen

untermauern<sup>211,212</sup>. Auch wenn über diesen Mechanismus nur kleine Mengen des insgesamt vorhandenen A $\beta$  sezerniert werden, könnte dies dennoch die Grundlage einer prionen-ähnlichen Transmission von toxischen A $\beta$  im ZNS bilden<sup>213,214</sup>. Jedoch wird dies weiterhin kontrovers diskutiert. So gibt es auf der anderen Seite Hinweise dafür, dass Exosomen die Aggregation von A $\beta$  in nicht-toxische Aggregate sowie deren Abbau fördern. Dadurch wird u.a. die neurotoxische Wirkung von A $\beta$  inhibiert.<sup>215-218</sup>

Eine Forschungsgruppe um Yuyama et al. konnte zeigen, dass lösliches A $\beta_{42}$  in Abhängigkeit von Exosomen aggregiert und im Folgenden von Mikrogliazellen aufgenommen und abgebaut werden kann<sup>217</sup>. Dementsprechend könnte die Bindung des Amyloids an Exosomen dem Abbau von übermäßigem extrazellulären A $\beta$  dienen. Tatsächlich konnte die gleiche Forschungsgruppe im Verlauf zeigen, dass die intracerebrale Applikation von Exosomen in einem AD-Maus-Modell die absolute Menge von A $\beta$  sowie die A $\beta$ -vermittelte Synaptotoxizität reduzieren<sup>216</sup>.

Eine weitere Forschungsgruppe konnte durch die intraventrikuläre Injektion von Exosomen in Ratten die A $\beta$ -vermittelte Synaptotoxizität antagonisieren. Voraussetzung für diesen Effekt war die Anwesenheit von exosomalen PrP<sup>C</sup>.<sup>215</sup>

Andererseits gibt es immer mehr Hinweise dafür, dass Exosomen für Ausbreitung von A $\beta$  innerhalb des ZNS essenziell sind. Exosomale Proteine wie Alix und Flotillin akkumulieren in Plaques von AD-Patienten<sup>84</sup>. Zudem fanden sich in neuronalen Exosomen aus dem Blut von Alzheimer-Patienten erhöhte Werte von A $\beta_{42}$  und pTau im Vergleich zur alterskorrigierten Kontrollgruppe und nach Injektion dieser Exosomen bildeten sich typische neuropathologische Veränderungen in vorher gesunden Maus-Gehirnen aus<sup>219</sup>. Schon Jahre vor klinischem Krankheitsbeginn fanden sich erhöhte Werte für A $\beta_{42}$  in menschlichen neuronalen Exosomen<sup>220</sup>. Darüber hinaus konnten nicht nur A $\beta$ -Monomere in Exosomen aus Blut<sup>220</sup>, Nervenwasser<sup>221</sup> und Zellkulturmedien<sup>84</sup> nachgewiesen werden, sondern auch A $\beta$ -Oligomere, welche mittels ebenjener extrazellulären Vesikel von Zelle zu Zelle transportiert werden konnten<sup>222</sup>. Und für Mikrovesikel von Mikrogliazellen wurde beschrieben, dass sie die Bildung von toxischen A $\beta$ -Oligomeren aus unlöslichen extrazellulären Plaques fördern<sup>223</sup>.

Zusammenfassend enthalten neuronale Exosomen  $A\beta^{84}$  und interagieren mit extrazellulären  $A\beta$  über bestimmte Lipide<sup>216</sup> und Oberflächenproteine, wie PrP<sup>C215</sup>. Jedoch bleibt die Rolle von Exosomen in Morbus Alzheimer weiterhin unklar mit zum Teil widersprüchlichen Forschungsergebnissen. Auch im Hinblick auf potenzielle therapeutische Interventionspunkte bedarf es daher zusätzlicher Studien.

## 1.4. Hypothese

Morbus Alzheimer ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, welche mit zunehmendem Verlust der kognitiven Fähigkeiten einhergeht. Nach der Amyloid-Hypothese ist die Bildung von toxischen A $\beta$  ursächlich für die Entstehung der Erkrankung.<sup>12</sup>

Inzwischen gibt es immer mehr Hinweise für vergleichbare molekulare Grundlagen zwischen Prionenerkrankungen und Morbus Alzheimer<sup>224</sup>. So wird angenommen, dass der Aggregation von A $\beta$  eine Proteinefehlfaltung mit vermehrter  $\beta$ -Faltblattstruktur vorausgeht<sup>98,99</sup>. Die Aggregation kann durch präformierte Aggregationskeime beschleunigt werden<sup>98</sup>. Die Forschung ist sich inzwischen einig, dass insbesondere A $\beta$ -Oligomere neurotoxisch wirken<sup>100</sup>. Das klinische Fortschreiten der Erkrankung geht typischerweise mit einem bestimmten Ausbreitungsmuster der neuropathologischen Veränderungen innerhalb des ZNS einher<sup>23</sup>. Die molekulare Grundlage der Transmission zwischen Zellen ist allerdings weiterhin weitestgehend ungeklärt und Gegenstand aktueller Forschung.

Hierbei scheinen Exosomen, kleine extrazelluläre Vesikel endosomalen Ursprungs, in der Biogenese und dem Transport von A $\beta$  eine wesentliche Rolle zu spielen. So konnte nachgewiesen werden, dass intrazelluläres A $\beta$  mit Exosomen sezerniert wird und sich exosomale Marker in Amyloid-Plaques finden<sup>84</sup>. In weiteren Studien konnte die Bindung von A $\beta$  an Exosomen verifiziert und eine bedeutende Rolle dieser kleinen extrazellulären Vesikel in der Pathologie von Morbus Alzheimer untermauert werden<sup>215-217</sup>. Allerdings finden sich zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, welche Effekte diese Interaktionen haben. Auf Grundlage des Wissens, dass sich PrP<sup>C</sup> angereichert auf neuronalen Exosomen findet<sup>205</sup>, ist das Ziel dieser Doktorarbeit herauszufinden, welchen Einfluss exosomales PrP<sup>C</sup> auf die Aggregation und den Transport von A $\beta$  hat. Hierfür sollte mit Hilfe der TALEN-Methode eine N2a-PrP<sup>C</sup>-KnockOut-Zelllinie generiert werden. Anhand der von dieser Zelllinie gewonnenen Exosomen sollte anschließend untersucht werden, ob die Bindung von A $\beta$  an Exosomen von PrP<sup>C</sup> abhängig ist, exosomales PrP<sup>C</sup> Einfluss auf die Aggregation von A $\beta$  und damit auf die neurotoxische Wirkung dieses Amyloids hat. Die Daten dieser Doktorarbeit ermöglichen ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen von Morbus Alzheimer und könnten für die Entwicklung zukünftiger therapeutischer Interventionen von Bedeutung sein.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte und Zubehör

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
1-Kanal-Pipetten 0,1-2,5µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf, Deutschland
8-Kanal-Pipette 10-100µl	Eppendorf, Deutschland
Analysenwaage MC1 Research RC210P	Sartorius, Deutschland
Chemidoc Gel Darstellungssystem	Bio-Rad, USA
Chemidoc MP Detektionssystem	Bio-Rad, USA
Feinwaage (CP3202S)	Sartorius, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C): UF80-450S	Colora Messtechnik GmbH, Deutschland
Heizrührer Ikamag RCT	IKA, Deutschland
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Sartorius, Deutschland
Inkubator Heraeus	Thermo Scientific, USA
Konfokales Mikroskop (TCS SP5)	Leica, Deutschland
Kühl-/Gefrierkombination	Liebherr, Schweiz
Lichtmikroskop DMD 108	Carl Zeiss AG, Deutschland
Lichtmikroskop Eclipse TS100	Nikon, Japan
Magnetrührer Variomag mono	ThermoElectronCorporation, USA
Mikrowelle R334-W	Sharp, Japan
Mini Trans-Blot	Bio-Rad, USA
Mini-PROTEAN Elektrophorese-System	Bio-Rad, USA
Mini-Sub Cell GT Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, USA
Monochromer A6-Drucker P93D	Mitsubishi, Japan
Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific, USA
Nanosight LM10	Nanosight, Großbritannien
pH-Meter CG 840	Schott, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences, Schweiz
Plattform-Wippe STR6	Stuart Scientific, Großbritannien
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, USA
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph, Deutschland
Reaktionsgefäß-Rotator Stuart SB3	Bibby Scientific, Großbritannien
Reax 2000 Schüttler	Heidolph GmbH, Deutschland
Safire2 Mikroplatten-Reader	Tecan, Schweiz
Sterilbank	ThermoElectronCorporation, USA

Thermocycler MyCycler PCR  
 Thermomixer compact  
 Ultrazentrifuge Optima L-100 XP  
 (Rotor: SW40Ti)  
 Vortex MS Minishaker  
 Wasserbad  
 Wasserpurifikationssystem Milli-RX20  
 Zellinkubator MCO-19AIC(UV)  
 Zentrifuge 5417 R  
 Zentrifuge 5430 R  
 µQuant-Spektrometer

Bio-Rad, USA  
 Eppendorf, Deutschland  
 Beckman Coulter, USA  
  
 IKA, Deutschland  
 P-D Industrie, Deutschland  
 Merck Millipore, USA  
 Sanyo, Japan  
 Eppendorf, Deutschland  
 Eppendorf, Deutschland  
 BioTek, USA

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Amicon Ultra 100kDa cut-off Filter	Merck Millipore, Deutschland
Aurelia Perform Untersuchungshandschuhe	Supermax, Malaysia
Blotpapier (Whatman paper)	Bio-Rad, USA
Costar 96-Well-Platte, schwarz, unbehandelt	Corning, USA
Cryovials Cryo Pure GefäÙe (1,6ml)	Sarstedt, Deutschland
Cutfix Einmalskalpelle	B/Braun, Deutschland
Deckgläschen	Menzel, Deutschland
Multischale (6-, 12-, 24- und 96-Well-Platten)	Thermo Scientific, USA
Nitrocellulose Membranen	Bio-Rad, USA
Novex Bis-Tris-Gele (4-12%)	Life Technologies, USA
Objekträger	Roth, Deutschland
Parafilm	SPI Supplies, USA
Pipettenspitzen (0,1-10µl, 2-100µl, 50-1000µl)	Eppendorf, Deutschland
Polyallomer Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, USA
Polypropylenröhrchen, 14ml	BD Biosciences, USA
Protein LoBind ReaktionsgefäÙe (1,5ml)	Eppendorf, Deutschland
ReaktionsgefäÙe (1,5ml, 2,0ml)	Eppendorf, Deutschland
Reaktionsröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Österreich
Rotilabo-Spritzenfilter (0,22µm)	Roth, Deutschland
Serologische Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	BD Biosciences, USA
Spritzen (10ml)	TERUMO, USA
Spritzen (1ml, 30ml)	B/Braun, Deutschland
Spritzen (50ml)	BD Bioscience, USA
T25 und T75 Zellkulturflaschen	Sarstedt, Deutschland
Zellkulturschalen	Nunc, Schweiz

### 2.1.3. Chemikalien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
0,05% Trypsin-EDTA	Gibco, USA
1kb DNA plus Ladder	Life Technologies, USA
10x Dream Taq-Puffer	Thermo Scientific, USA
10x Fast Digest Green Buffer	Fermentas, USA
10x T4 DNA Ligase Buffer	Thermo Scientific, USA
Acrylamidlösung (Rotiphorese 30%)	Roth, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	Life Technologies, USA
Agarose	Invitrogen, USA
Alkalische Phosphatase Puffer	Fermentas, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, USA
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich, USA
Bovin Serum Albumin (BSA)	Roth, Deutschland
Bromphenol Blau	Merck, Deutschland
DAPI Fluoromount G	SouthernBiotech, USA
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) Mixtur	Sigma-Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's PBS	Gibco, USA
EDTA-freie Proteinase Inhibitor Mixtur	Roche, Schweiz
Essigsäure	Roth, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
G418 (Geneticin)	PAA, Österreich
Glycerol	GE Healthcare, Großbritannien
HPLC H <sub>2</sub> O	Roth, Deutschland
Humanes A $\beta$ <sub>40</sub>	Genic Bio, Großbritannien
Humanes A $\beta$ <sub>42</sub>	Genic Bio, Großbritannien
Immersionsöl	SouthernBiotech, USA
Instant Milchpulver	GranoVita, Deutschland
Isopropanol	Roth, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Deutschland
LB-Medium-Konzentrat	Roth, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, USA
Natriumazid	Sigma-Aldrich, USA
Natriumchlorid	Roth, Deutschland
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich, USA
NP-40	Sigma-Aldrich, USA
Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-170kDa	Fermentas, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Deutschland

Pierce Blocking Buffer	Thermo Scientific, USA
Pierce ECL Western Blot Substrat	Thermo Scientific, USA
Quick Start Bradford Protein Standard Solution	Bio-Rad, USA
Salzsäure	Merck, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Deutschland
Spectinomycin (Spec)	AppliChem GmbH, Deutschland
Super Signal West Femto Substrat	Thermo Scientific, USA
Super Signal West Pico Substrat	Thermo Scientific, USA
T4-DNA-Ligase-Puffer	Thermo Scientific, USA
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth, Deutschland
Thioflavin T (ThT)	Sigma-Aldrich, USA
Tris Base	Sigma-Aldrich, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, USA
Triton X100	AppliChem GmbH, Deutschland
Tween 20	Roth, Deutschland
Western-Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, USA
X-Gal	Fermentas, USA
β-Mercaptoethanol	Thermo Scientific, USA

#### 2.1.4. Enzyme

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Alkalische Phosphatase	Fermentas, USA
DNA-Polymerase	Fermentas, USA
Dream Taq DNA-Polymerase	Thermo Scientific, USA
Fast Digest Restriktionsenzyme (AflII, ApaI, BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, NheI, NotI)	Fermentas, USA
Restriktionsenzym Esp3I	Fermentas, USA
Restriktionsenzyme AflII, XbaI, BsaI	New England Biolabs, USA
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, USA

#### 2.1.5. Laborkits

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
GeneJet PCR purification Kit	Thermo Scientific, USA
GenJet Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, USA
Golden Gate TALEN und TAL Effektor Kit 1.0 + 2.0	Addgene, USA

High Pure PCR Template Preparation Kit  
 NucleoBond Xtra Midi / Maxi  
 QIAprep Spin Miniprep Kit

Roche, Schweiz  
 Macherey-Nagel, Deutschland  
 Qiagen, Niederlande

### 2.1.6. Antikörper

Antikörper	Zielstruktur	Quelle
<b>Primär:</b>		
6E10	Amyloid $\beta$ (AS 1-16)	DBS Emergo, USA
A11	Protein-Oligomere	Thermo Scientific, USA
Actin	B-Aktin	Sigma-Aldrich, USA
AIP-1	AIP-1	
Alix	Alix	
Flotillin-1	Flotillin	BD Biosciences, USA
GM130	GM130	BD Biosciences, USA
POM-1	PrPC	A. Aguzzi, Schweiz
POM-2	PrPC	A. Aguzzi, Schweiz
Tsg101	Tsg101	
<b>Sekundär:</b>		
Alexa555 red anti mouse		Life Technologies, USA
Horseradish peroxidase-labeled Anti-Mouse		Promega, USA
Horseradish peroxidase-labeled Anti-Rabbit		Promega, USA

### 2.1.7. Software

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Photoshop CS3	Adobe, USA
EndNote X7	Thomson Reuters, USA
Office 2010	Microsoft, USA
Prism5	GraphPad, USA
Quantity One	Bio-Rad, USA
NanoSight NTA 2.3	Malvern Instruments, Großbritannien
Image J	National Institute of Health, USA

### 2.1.8. Zellkulturmedien und Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose (4,5g/l) (DMEM)	Gibco Life Technologies, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM-F12)	Gibco Life Technologies, USA
Exosomen-freies FBS	Atlas Biologicals, USA
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAA, Österreich
Opti-MEM	Gibco Life Technologies, USA

### 2.1.9. Bakterien und Zelllinien

Bezeichnung Bakterienstamm	Herkunft
E.coli SURE 2 Superkompetente Zellen	Stratagene, USA
E.coli XL10-Gold Ultrakompetente Zellen	Stratagene, USA

Bezeichnung Zelllinie	Herkunft
N2a	ATTC, USA
SH-SY5Y-Ires	Nigel Hooper, University of Leeds
SH-SY5Y-PrP	Nigel Hooper, University of Leeds

### 2.1.10. Zusammengesetzte Puffer und Lösungen

6x Lade-Puffer für Agarosegel:

10mM Tris-HCl

0,03% Bromphenolblau

60% Glycerol

60mM EDTA

Anm.: Der Puffer wurde bei -20°C aufbewahrt.

10x CVL: zu 20ml dest. Wasser  
2g SDS  
5ml 1M Tris-HCl  
5ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
3g Sucrose  
Messerspitze Bromphenolblau  
pH: 6,8

Ethidiumbromidbad:  
100 $\mu$ l Ethidiumbromid  
99,9ml TAE-Puffer

LB-Medium: zu 1l H<sub>2</sub>O  
10g Pepton  
5g Hefeextrakt  
5g Natriumchlorid (NaCl)  
pH 7,0

LB Agar: zu 1l H<sub>2</sub>O  
10g Pepton  
5g Hefeextrakt  
5g Natriumchlorid (NaCl)  
12,5g Agar

NZY<sup>+</sup>-Medium: in 50ml LB-Medium:

625 $\mu$ l 1M Magnesiumchlorid

625 $\mu$ l 1M Magnesiumsulfat

1000 $\mu$ l 20% Glukose

Anm.: Das NZY<sup>+</sup>-Medium wurde steril filtriert, dann aliquotiert und bei 4°C gelagert.

#### PBS-Puffer:

1,37M Natriumchlorid

27mM Kaliumchlorid

43mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

14mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH: 7,4

Anm.: Mit Zugabe von 0,1% Tween 20 wurde aus dem PBS der PBST-Puffer.

#### PFA-Lösung (4%) in 0,1M PBS:

+ 4% PFA

Anm.: Während des Einrührens wurde die Lösung auf 60°C erhitzt und einige Tropfen Natronlauge wurden hinzugegeben, bis sich die Lösung entfärbt hat. Daraufhin wurde die Lösung abgekühlt, filtriert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

#### RIPA-Puffer:

50mM Tris Base

150mM Natriumchlorid

1% NP40

0,5% Natrium-Deoxycholat

0,1% SDS

pH: 8,0

Anm.: Kurz vor Gebrauch wurden auf je 10ml RIPA-Puffer eine Tablette Protease-Inhibitor gegeben. Der Puffer wurde nur gekühlt verwendet.

#### Running-Buffer 10x:

0,25M Tris Base

1,92M Glycin

1% SDS

pH: 8,3 – 8,8

Anm.: Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Sammelgel 4%:

6,1ml destilliertes Wasser  
1,3ml Acrylamid  
2,5ml Sammelgelpuffer  
100µl APS  
10µl TEMED

Sammelgelpuffer:

0,5M Tris-HCl  
pH: 6,8

Sandwich-Puffer 10x:

250mM Tris Base  
1,92M Glycin  
pH: 8,3 – 8,8

Anm.: Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.  
Zu dem verdünnten Puffer wurden entweder 10% Methanol für Proteine über 30kDa oder 20% Methanol für Proteine unter 30kDa hinzugefügt.

TAE-Puffer 50x:

2M Tris Base  
1M Essigsäure  
0,05M EDTA  
pH: 8,0

TBST-Puffer 10x:

200mM Tris Base  
1,5M NaCl  
0,5% Tween 20  
pH: 7,6

Anm.: Vor Zugabe des Tween 20 wurde der pH eingestellt. Der Puffer wurde vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Trenngel 10%:

4,02ml destilliertes Wasser

3,33ml Acrylamid

2,5ml Trenngel-Puffer

100µl SDS

100µl APS

10µl TEMED

Trenngelpuffer:

1,5M Tris-HCl

pH: 8,8

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Klonierung**

Als Klonierung wird im Folgenden der Prozess der Herstellung und Vervielfältigung rekombinanter DNA bezeichnet. Als DNA-Basis wurden kommerziell erhältliche Plasmide verwendet. Plasmide sind runde, doppelsträngige DNA-Fragmente, welche vorwiegend in Bakterien vorkommen und meist der Vermittlung von Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika dienen. In der Molekularbiologie können Plasmide, als Vektoren eingesetzt, dem Transport rekombinanter DNA in Bakterien oder in eukaryote Zellen im Rahmen der Transfektion dienen.

Die Plasmide wurden mit speziellen Restriktionsenzymen geschnitten und in der folgenden Ligation mit weiteren DNA-Konstrukten wieder kovalent verbunden. Diese neu entstandene rekombinante Plasmid-DNA konnte in Bakterien transformiert und mit Hilfe dieser auch vervielfältigt werden. Im Folgenden werden die einzelnen Teilschritte der Klonierung näher erläutert.

#### **2.2.1.1. Restriktion und Ligation**

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an speziellen Erkennungssequenzen („recognition sites“) geschnitten.

Der Ansatz für den Restriktionsverdau hat neben der gewünschten Menge an Plasmid-DNA auch Fast Digest Restriktionsenzyme (1 Unit spaltet 1 µg DNA, 1 U = 1 µl) und 10fach Fast Digest Puffer enthalten. Für 1 µg DNA wurde der Ansatz auf 10 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Verdau hat innerhalb von 5 Minuten bei 37°C stattgefunden. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe von 1%igem Agarosegel bei 90-110 V innerhalb von einer Stunde elektrophoretisch getrennt. Die DNA-Fragmente konnten nach einer zwanzigminütigen Inkubation mit der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid dargestellt werden und das gewünschte Fragment wurde mit Hilfe von GeneJET Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aus dem Gel aufgereinigt. Anschließend konnte die Reinheit und Konzentration der DNA-Fragmente mit Hilfe des UV-Vis Spektrophotometers NanoDrop 1000 bestimmt werden.

Die Ligationsreaktion wurde in einem Verhältnis von 1:3 für Vektor zu Insert mit entsprechenden Mengen T4-Puffer und T4-Ligase angesetzt. Die Reaktion lief mindestens 20 min bei Raumtemperatur oder mindestens 4 Stunden bei 4°C.

#### **2.2.1.2. Transformation der Bakterien**

Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA wurde diese in kompetente Bakterien transformiert. Als kompetente Bakterien wurden vorwiegend XL10-GOLD Ultrakompetente Zellen verwendet. In späteren Stadien der Klonierung wurde auf SURE-Zellen umgestiegen.

Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert und für die Transformation zusammen mit  $\beta$ -Mercaptoethanol langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol zu je 50  $\mu$ l kompetente Zellen gegeben. Diese Mischung wurde weiterhin auf Eis gelagert und für 10 Minuten alle 2 Minuten mit Hilfe des Vortex-Geräts stark geschüttelt. Daraufhin wurden 2  $\mu$ l DNA hinzugegeben und die resultierende Lösung wurde wiederum 30 Minuten auf Eis gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit bekamen die kompetenten Zellen einen Hitzeschock in einem auf 42°C aufgewärmten Wasserbad für 30 Sekunden. Daraufhin wurden sie wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt und bekamen letztlich 450  $\mu$ l auf 42°C vorgewärmtes NZY-Medium. Diese Mischung wurde für 1 Stunde bei 37°C und 550 rpm im Schüttler geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde je nach Größe des Plasmids eine variable Menge der Lösung auf Agaroseplatten ausplattiert, welche mit entsprechenden Antibiotika versetzt waren. Die geimpften Agaroseplatten wurden bei 37°C für 16 h inkubiert.

#### **2.2.1.3. Colony-PCR**

Am folgenden Tag wurden mindestens drei der über Nacht gewachsenen Kolonien gepickt und in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O resuspendiert. Um eine erfolgreiche Ligation zu verifizieren, wurde eine PCR mit Insert-relevanten Primern und in Tab. 2.10 aufgeführter Zusammensetzung gestartet.

**Tabelle 2.10: Zusammensetzung Lösung der Colony-PCR**

Volumen	Lösung
5 µl	Bakterien-Suspension
0,5 µl	Forward-Primer (10 µM)
0,5 µl	Reverse-Primer (10 µM)
0,5 µl	dNTP`s
2,5 µl	Dream Taq Puffer (10x)
0,1 µl	Dream Taq (5 U/µl)
15,9 µl	H <sub>2</sub> O

Mit Hilfe des Thermo-Cyclers wurde das in Tab. 2.11 dargestellte Programm für die PCR verwendet.

**Tabelle 2.11: PCR-Zyklus für Colony-PCR**

PCR Programm	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5´	
Denaturierung	95	45´´	30
Primer-Hybridisierung	*	45´´	
Elongation	72	*	
Finale Elongation	72	5´	
Ende	4	∞	

\*Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung, sowie die Elongationszeit sind abhängig von der Primerzusammensetzung und der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Konstrukts.

Die Fragmente konnten überprüft werden, indem 10 µl des PCR-Produkts mit 2 µl 6fach-Lade-Puffer gemischt in einem einprozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und dargestellt wurden.

Positive Klone wurden in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum suspendiert und über Nacht bei 37°C oder über 2 Tage bei Raumtemperatur kultiviert. Nach der Inkubation konnten die Plasmide mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kit aufgereinigt und in weiteren Klonierungsschritten oder in einer Transfektion von Zellen verwendet werden. Die so entstandene rekombinante DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsansätzen und wenn nötig PCR kontrolliert. Des Weiteren wurden

Mutationen, Leseraster-Verschiebungen oder ähnliches regelmäßig durch Sequenzierung im SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen) ausgeschlossen.

#### **2.2.1.4. TALEN-Methode**

Für die Herstellung einer PrP<sup>C</sup>-Knock-Out-Zelllinie wurde die TALEN-Methode ausgewählt. TALEN („Transcription Activator-like Effector Nuclease“) sind Proteine, die gezielt bestimmte DNA-Sequenzen binden und über Kopplung an die Nuklease FokI DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen können. Da die FokI nur als Dimer arbeitet, ist es notwendig zwei TALEN zu klonieren, die an gegenüberliegenden DNA-Abschnitten über einen Spacer binden. Dabei bindet ein TALEN vor der zu schneidenden Stelle am 5'- und das andere weiter im Verlauf am 3'-DNA-Strang. Zur Herstellung einer PrP<sup>C</sup>-Knock-Out-Zelllinie sollten diese möglichst im Bereich des PrP-Startcodons binden und einen Doppelstrangbruch erzeugen.

Im Falle der homologen Rekombination zur DNA-Reparatur sollte eine bereits im Vorfeld klonierte Selektionskassette als Genmatrix dienen. Diese enthielt neben den 5'- und 3'-Untranslated-Regions (5'- und 3'-UTR) des Prnp-Gens auch DNA-Sequenzen für ein EGFP-Zeocin-Fusionsprotein flankiert von 2 LoxP-Enden. EGFP („enhanced green fluorescent protein“, verstärkt grün-fluoreszierendes Protein) sowie Zeocin sollten nach erfolgter Transfektion der Zellen die Selektion der KnockOut-Zelllinie erleichtern, indem die Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie grün fluoreszieren und gegenüber Zeocin resistent sein sollten. Die LoxP-Enden sollten, wenn nötig die spätere Entfernung der EGFP-Zeocin-Genmatrix aus den Zellen erleichtern. Es konnte sichergestellt werden, dass das Plasmid pcDNA3.1(-)-Prnp-5'-UTR-LoxP-EGFP-Zeo-LoxP-Prnp-3'-UTR keinen eigenen Promotor mehr besitzt. Im Folgenden wird das Plasmid pcDNA3.1(-)mPrP-KO-Cas genannt.

Für die Herstellung der PrP<sup>C</sup>-KO-Zelllinie wurden drei verschiedene TALEN-Paare mPrP-TALEN01, mPrP-TALEN03 und mPrP-TALEN04 mit Hilfe des Golden Gate TALEN und TAL Effector Kit 1.0 und 2.0 kloniert. In Tabelle 2.12 sind die TALEN-Paare mit ihren RVD's und dem dazugehörigen Prnp-Locus mit roten Startcodon dargestellt.

**Tabelle 2.12: TALEN-RVD's und der dazugehörige Prnp-Locus**

<b>mPrP-TALEN01</b>	5'-TALEN	NN NI NG NI HD HD NG NG NN NG NG HD HD NG HD
	3'-TALEN	NI NN HD HD NI NI NN NN NG NG HD NN HD HD NI NG NN NI
	Prnp-Locus	tGATACCTTGTTCCCTC atttgcagatcagtca TC <b>ATG</b> GCGAACCTTGGCTa
<b>mPrP-TALEN03</b>	5'-TALEN	HD NI NG NG NG NG NN HD NI NH NI NG HD NI NN
	3'-TALEN	HD NI HD NI NI NI NN NI NH NN NH HD HD NI NH HD NI NN HD HD
	Prnp-Locus	tCATTTCGAGATCAGTcatc <b>atg</b> gcgaacctggctact GGCTGCTGGCCCTCT TTGTGa
<b>mPrP-TALEN04</b>	5'-TALEN	NG NG NG NN HD NI NH NI NG HD NI NH NG HD NI NG HD NI NG
	3'-TALEN	HD NI HD NI NI NI NN NI NH NN NH HD HD NI NH HD NI NN HD HD
	Prnp-Locus	tTTTGAGATCAGTCATC <b>ATg</b> gcgaacctggctactGGCTGCTGGCCCTCTT TGTGa

Nach Herstellerangaben konnten die ersten 10 RVD's mittels einer einzigen Klonierungsreaktion zusammengefügt werden (Reaktion 1a). Als Zielvektor der ersten Reaktion wurde pFUS-A verwendet. Die übrigen RVD's der jeweiligen TALEN-Konstrukte wurden in einer zweiten Reaktion zusammengefügt (Reaktion 1b). Der Zielvektor hierbei war pFUS-B, welcher abhängig von der Länge der TALEN unterschiedlich war.

**Tabelle 2.13: Golden Gate Reaktion #1**

Volumen	Lösung
Je 150 ng	Modul-Vektor und pFUS-Vektor
1 µl	Bsal
1 µl	T4 DNA Ligase
2 µl	T4 DNA Ligase Puffer (10x)
2 µl	Bovines Serumalbumin
Auffüllen bis 20 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 2.14: RVD's für Reaktion 1a**

TALEN 01-5'	TALEN 01-3'	TALEN 03-5'	TALEN 03-3'	TALEN 04-5'	TALEN 04-3'
pNN1	pNI1	pHD1	pHD1	pNG1	pHD1
pNI2	pNN2	pNI2	pNI2	pNG2	pNI2
pNG3	pHD3	pNG3	pHD3	pNG3	pHD3
pNI4	pHD4	pNG4	pNI4	pNN4	pNI4
pHD5	pNI5	pNG5	pNI5	pHD5	pNI5
pHD6	pNI6	pNG6	pNI6	pNI6	pNI6
pNG7	pNN7	pNN7	pNN7	pNH7	pNN7
pNG8	pNN8	pHD8	pNI8	pNI8	pNI8
pNN9	pNG9	pNI9	pNH9	pNG9	pNH9
pNG10	pNG10	pNH10	pNN10	pHD10	pNN10
pFUS-A	pFUS-A	pFUS-A	pFUS-A	pFUS-A	pFUS-A

**Tabelle 2.15: RVD's für Reaktion 1b**

TALEN 01-5'	TALEN 01-3'	TALEN 03-5'	TALEN 03-3'	TALEN 04-5'	TALEN 04-3'
pNG1	pHD1	pNI1	pNH1	pNI1	pNH1
pHD2	pNN2	pNG2	pHD2	pNH2	pHD2
pHD3	pHD3	pHD3	pHD3	pNG3	pHD3
pNG4	pHD4	pNI4	pNI4	pHD4	pNI4
pFUS-B4	pNI5	pFUS-B4	pNH5	pNI5	pNH5
	pNG6		pHD6	pNG6	pHD6
	pNN7		pNI7	pHD7	pNI7
	pFUS-B7		pNN8	pNI8	pNN8
			pHD9	pFUS-B8	pHD9
			pFUS-B9		pFUS-B9

Der Reaktionszyklus für Reaktion 1 war: 10x (37°C/5min + 16°C/10min) + 50°C/5min + 80°C/5min.

Die linearen dsDNA-Fragmente wurden bei unvollständiger Ligation mittels Plasmid-Safe Nuklease zerstört. Hierfür wurden 10 µl 10 mM ATP und 1 µl Plasmid-Safe Nuklease der Reaktion hinzugefügt und für 60 min bei 37°C inkubiert.

Die kompetenten Bakterien wurden mit 5 µl der Reaktion transformiert (s. Kapitel 2.2.1.2 Transformation der Bakterien) und über Nacht bei 37°C auf Agaroseplatten mit Spectinomycin, X-Gal und IPTG inkubiert. X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) dienen der Blau-Weiß-Selektion, sodass am Folgetag die weißen Kolonien gepickt werden konnten und mittels Colony-PCR mit den Primern pCR8\_F1 und pCR8\_R1 analysiert werden konnten.

**Tabelle 2.16: Colony-PCR-Programm für pFUS-Vektoren**

PCR-Programm	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5'	1
Denaturierung	95	30"	35
Primer-Hybridisierung	55	30"	
Elongation	72	1'45"	
Finale Elongation	72	5'	1
Ende	4	∞	

Positive Klone wurden über Nacht inkubiert und die Plasmide mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kit aufgereinigt.

In der zweiten Klonierungsreaktion (Golden Gate Reaktion #2) wurden die pFUS-A- und pFUS-B-Vektoren mit einem von fünf pLR-Vektoren (abhängig vom letzten RVD) sowie dem Destinationsvektor pTAL3 ligiert.

**Tabelle 2.17: Golden Gate Reaktion #2**

Volumen	Lösung
150 ng	Von jedem pFUS Vektor
150 ng	Vom jeweiligen pLR Vektor
75 ng	Destinationsvektor pTAL3
1 µl	Esp3I Restriktionsenzym
1 µl	T4 Ligase
2 µl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
Auffüllen bis 20 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 2.18: pLR-Vektoren der TALEN**

TALEN	pLR-Vektor
mPrP-TALEN01-5'	pLR-HD
mPrP-TALEN01-3'	pLR-NI
mPrP-TALEN03-5'	pLR-NN
mPrP-TALEN03-3'	pLR-HD
mPrP-TALEN04-5'	pLR-NG
mPrP-TALEN04-3'	pLR-HD

Der Reaktionszyklus für Reaktion 2 war: 37°C/10min + 16°C/15min + 37°C/15min + 80°C/5min. Nach der zweiten Reaktion war keine Inkubation mit der Plasmid-Safe Nuklease notwendig.

Die kompetenten Bakterien wurden mit 5 µl der Reaktion transformiert und über Nacht bei 37°C auf Agaroseplatten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG inkubiert. Am Folgetag wurden die weißen Kolonien gepickt und mittels Colony-PCR mit den Primern TAL\_F1 und TAL\_R2 analysiert. Die PCR lief bei einer Temperatur zur Primer-Hybridisierung von 55°C und einer Elongationszeit von 3 Minuten mit 35 Zyklen. Positive Klone wurden über Nacht inkubiert und die Plasmide mit Hilfe des QIAprep Miniprep Kit aufgereinigt.

Zum Nachweis der korrekten Klonierung wurden die Plasmide mit den Primern TAL-Seq\_5-1 und TAL\_R2 sequenziert.

Mittels den Restriktionsenzymen AflII und XhoI konnten die TALEN in den Vektor pcDNA3.1(-) kloniert werden. Ursprüngliches Ziel war die Klonierung der mPrP-KO-

Kassette (s.o.) zusammen mit den jeweiligen TALEN-Paaren in einem Vektor. Dies war jedoch, wahrscheinlich aufgrund der Größe des rekombinanten Plasmids, nicht erfolgreich. Letztlich war es noch möglich die mPrP-KO-Kassette mittels BglIII in einen pIRES-Vektor zu klonieren und im Folgenden mit XhoI und MluI das mPrP-Talen03-5' rekombinant zu ergänzen, sodass der Vektor pIRES-mPrP-TALEN03-5'-mPrP-KO-Cas entstand.

Für die Transfektion der Zellen standen letztlich folgende Plasmide zur Verfügung: pcDNA3.1(-)mPrP-KO-Cas, pcDNA3.1-mPrP-TALEN01-5', pcDNA3.1-mPrP-TALEN01-3', pcDNA3.1-mPrP-TALEN03-5', pcDNA3.1-mPrP-TALEN03-3', pcDNA3.1-mPrP-TALEN04-5', pcDNA3.1-mPrP-TALEN04-3' sowie pIRES-mPrP-TALEN03-5'-mPrP-KO-Cas.

## **2.2.2. Zellkultur**

### **2.2.2.1. Kultivieren der N2a-Zellen**

Die N2a-Zellen gehören zu einer adhären- und schnell-wachsenden immortalen Zelllinie, welche ursprünglich aus einem Neuroblastom der Maus stammt.

Die Zellen wurden in unbeschichteten T75-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter möglichst sterilen Bedingungen (Sterilbänke, desinfizierte Arbeitsmaterialien) um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden und mit auf 37°C vorgewärmtem Medium und PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung). Als Medium wurde DMEM („Dulbecco's Modified Eagle Medium“) ergänzt mit 10 % FCS („fetal calf serum“, Fetales Kälberserum) verwendet. Alle zwei bis drei Tage wurden sie bei einer Konfluenz von 70-90 % in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gesplittet. Dafür wurde zunächst das Medium vorsichtig abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen um Reste des Mediums sowie nicht-adhären- tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Im Folgenden wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-Lösung für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Trypsin ist eine Pankreasprotease, welche Oberflächenproteine (unter anderem auch Adhärenzproteine) spaltet, so dass sich die Zellen leicht vom Flaschenboden lösen lassen. Mit Hilfe von leichtem Klopfen und Schwenken der Zellkulturflasche wurde die

Ablösung der Zellen beschleunigt. Durch Resuspension der Zellen in mindestens 2 ml Medium wurde die Trypsinierung beendet.

Im Rahmen der Herstellung einer PrP-KO-Zelllinie mit Hilfe der TALEN-Methode ist ein N2a-Zellklon entstanden, der nur teilweise adhärent gewachsen ist. Auch dieser wurde unter ähnlichen Bedingungen wie die N2a-Wildzellen in einer unbeschichteten T75-Zellkulturflasche kultiviert und alle zwei bis drei Tage bei einer Konfluenz von 60-80 % 1:3 gesplittet. Leichtes Klopfen der Zellkulturflasche ermöglichte bereits das Lösen der nur teilweise adhären Zellen. Das ersparte den Vorgang der Trypsinierung und war nur deshalb möglich, weil sich im Laufe der Kultivierung wenig tote Zellen und Zelltrümmer gebildet hatten.

#### **2.2.2.2. Kultivieren der SH-SY5Y-Zellen**

Die SH-SY5Y-Zellen, welche aus einem Neuroblastom eines vierjährigen Mädchens stammen und keine detektierbaren Level von PrP<sup>C</sup> exprimieren, wurden entweder mit leerem pIRESneo-Vektor (SH-SY5Y-PrP(-)) oder mit pIRESneo-Vektor mit der Prnp-DNA-Sequenz (SH-SY5Y-PrP(+)) stabil transfiziert. Ähnlich wie die N2a-Zellen wachsen die SH-SY5Y-Zellen adhärent und wurden in unbeschichteten T75-Zellkulturflaschen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> unter möglichst sterilen Bedingungen kultiviert. Als Medium wurde DMEM/F12 („Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12“) ergänzt mit 10% FCS verwendet.

Die SH-SY5Y-PrP(-) waren schnell wachsende Zellen, die ähnlich wie die N2a-Zellen alle zwei bis drei Tage bei einer Konfluenz von etwa 70-90% in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:5 gesplittet wurden.

Das Wachstum der SH-SY5Y-PrP(+) hingegen war eher langsam und daher wurden sie nur etwa einmal in der Woche in einem Verhältnis von 1:2 gesplittet. Dieser Klon wurde bereits bei einer vergleichsweise geringen Konfluenz von etwa 50% gesplittet.

#### **2.2.2.3. Kryokonservierung**

Die Kryokonservierung bezeichnet das Einfrieren und Konservieren von Zellen über mehrere Monate bis Jahre. Hierfür wurden die Zellen wie zuvor beschrieben trypsiniert.

Ein gewünschter Anteil der Medium-Zell-Suspension (zum Beispiel 1/3 einer konfluenten N2a-Zellkulturflasche) wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und bei 200 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl eines speziellen Einfriermediums resuspendiert. Das Einfriermedium setzte sich aus 50 % FCS, 40 % Medium (N2a: DMEM, SH-SY5Y: DMEM/F12) und 10 % DMSO zusammen. Das DMSO diente als Gefrierschutzmittel und verhinderte die Bildung von Eiskristallen. Diese Suspension wurde dann in ein Einfrier Röhrchen überführt und schnell bei -80°C eingefroren.

Zum Wiederauftauen wurden die Zellen schnell auf 37°C aufgewärmt und in einem Falcon-Röhrchen mit mindestens 10 ml Medium suspendiert. Die entstandene Lösung wurde bei 1000 x g für 5 min zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand und damit auch Reste des Einfriermediums wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 4 ml frischem Medium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach wenigen Tagen waren die Zellen wieder soweit angewachsen, dass sie in eine T75-Zellkulturflasche überführt werden konnten.

#### **2.2.2.4. Lyse von Zellen**

Für die Herstellung eines Zelllysats wurden die Zellen wie zuvor beschrieben trypsinisiert und bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde abhängig von dessen Größe in 50-200 µl vorgekühltem RIPA-Puffer (Radioimmunpräzipitationsassay-Puffer) ergänzt mit Proteinase-Inhibitor suspendiert. Alle weiteren Schritte fanden auf Eis oder bei 4°C statt um einen weiteren Metabolismus zu minimieren. Die Lösung wurde alle zwei Minuten für einige Sekunden mit der Vortex-Maschine geschüttelt, wieder auf Eis gestellt und nach insgesamt 10 min für weitere 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Während der letzten Zentrifugation wurden Zelltrümmer, welche in weiteren Experimenten stören würden, pelletiert. Der Überstand mit den Proteinen der Zellen wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und entweder bei -20°C eingefroren oder direkt in weiteren Experimenten weiterverwendet.

### **2.2.2.5. Transfektion von Zellen**

Ein Teil der kultivierten N2a-Zellen wurde auf einer 6-Well-Platte verteilt und über Nacht inkubiert. Die benötigte Menge DNA wurde mit Opti-Mem auf ein finales Volumen von 200 µl gemischt. Außerdem wurden 20-30 µl Lipofectamin mit 180 µl Opti-Mem vermischt. Beide Lösungen wurden 5 min bei Raumtemperatur separat inkubiert, daraufhin miteinander vermengt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 1,5 ml Opti-Mem versorgt. Nach der Inkubation wurde die DNA-Lipofectamin-Mischung hinzugefügt und die Platte leicht geschwenkt. Nach 4-8 h wurde das Medium durch DMEM versetzt mit 10 % FCS ausgetauscht. Am folgenden Tag wurde G418 (Gentamycin) zu der Lösung ergänzt, um erfolgreich transfizierte Zellen zu selektieren.

### **2.2.3. Bradford-Assay**

Der Bradford-Test dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen in Lösung. Er basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie-Brillant-Blau G-250 durch Komplexbildung mit Proteinen. In seiner ungebundenen Form hat der Farbstoff eine rötlich-bräunliche Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 470 nm, welche sich durch Proteinbindung zu einer bläulichen Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm verschiebt. Diese Verschiebung kann photometrisch analysiert werden. In dieser Arbeit wurde die Methode vor allem dazu verwendet, um die Konzentration von Zelllysaten abzuschätzen und um diese in vergleichbaren Mengen in Experimenten einzusetzen zu können.

Als Farbstoffquelle wurde „Quick Start Bradford Protein Standard Solution“ verwendet. In einer 96-Well-Platte wurde eine doppelt ausgeführte BSA-Protein-Standard-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 1,25 µg und 10 µg vorbereitet. Die zu messenden Proben wurden 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und in dreifacher Ausführung vorbereitet. Schließlich wurden zu 10 µl Probe 200 µl Bradford-Reagenz gegeben und die Platte wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Absorption bei 595 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers bestimmt. Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate konnten dann anhand der Standardkurve errechnet werden.

## **2.2.4. Aufreinigung und Charakterisierung von Exosomen**

### **2.2.4.1. Aufreinigen von Exosomen**

Zur Untersuchung der Eigenschaften von Exosomen sollten diese in möglichst hoher Konzentration und mit möglichst geringer Verunreinigung aus Zellmedien aufgereinigt werden.

Hierfür wurden die Zellen zunächst in ihrem Medium (SH-SY5Y: DMEM/F12, N2a: DMEM) ergänzt mit Exosomen-freiem FBS (fetales Kälberserum) kultiviert. Der Einsatz von Exosomen-freiem FBS war notwendig, um eine Kontamination der Präparation mit Exosomen aus unbehandeltem FBS zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit von mindestens zwei Tagen, in denen die Zellen Exosomen in das Medium abgesondert haben, wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und in ein Falconröhrchen überführt. Die folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, um einen weiteren Metabolismus zu unterbinden. Das so gewonnene Medium wurde bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert, um tote Zellen und größere Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Tube überführt und für weitere 15 min bei 7500 x g zentrifugiert, um auch kleinere Zelltrümmer und größere Membranbruchstücke zu pelletieren. Der resultierende Überstand wurde durch ein 0,22 µm-Filter steril filtriert, um größere Vesikel und Partikel zu beseitigen. In einem letzten Ultrazentrifugationsschritt von 100.000 x g für 1 h 10 min wurden die Exosomen pelletiert. Für die finale Exosomen-Lösung wurde das Pellet in PBS ergänzt mit Proteinase-Inhibitor resuspendiert.

### **2.2.4.2. Charakterisieren von Exosomen mittels Nanosight-Messung**

Für die Charakterisierung und Konzentrationsbestimmung von Exosomen wurde die Messung am Nanosight-LM10, ausgestattet mit einem 618nm Laser und einer Marlin F-033B IRF Kamera, als neues Verfahren etabliert. Das Nanosight-LM10 basiert auf einem normalen Lichtmikroskop, ist jedoch aufgrund einer speziellen Laser-Technologie in der Lage Nanopartikel in Lösung zu visualisieren und kann diese direkt in einer Videosequenz aufnehmen.

Die Nanoparticle Tracking Analysis Software (NTA) analysiert das Video Partikel für Partikel und kann mit Hilfe der Brown'schen Molekularbewegung die Größe der einzelnen Partikel berechnen. Da die Software Partikel für Partikel misst, ergibt sich eine hohe Auflösung der Größenvarianz der einzelnen Partikel. Des Weiteren ist es möglich die Konzentration zu bestimmen, da das aufgenommene Volumen bekannt ist.

Zur Messung der mittleren Konzentration und Größe der aufgereinigten Exosomen wurde die Lösung auf  $8 \times 10^8$  bis  $2 \times 10^9$  Partikel/ml verdünnt und es wurden 5 Videos zu je 30s bei einer Kameraintensität von 16 aufgenommen.

## **2.2.5. SDS-Page und Western-Blot**

### **2.2.5.1. SDS-Page**

Die SDS-Page („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient der Auftrennung von Stoffgemischen nach ihrer Molekularmasse in einem elektrischen Feld. In dieser Arbeit wurden vor allem Proteine in einer diskontinuierlichen Matrix auf der Basis von Polyacrylamid aufgetrennt. Das Polyacrylamid bildet nach Polymerisation ein dreidimensionales Netzwerk mit unterschiedlich großen Poren in Abhängigkeit von der Konzentration. Die Porengröße und die Molekularmasse, beziehungsweise die Kettenlänge der Proteine bestimmen deren charakteristische Migration in der Matrix. Das SDS („sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat) dient als anionisches Detergenz. Es bindet die Eigenladung der Proteine, so dass diese im Wesentlichen vernachlässigbar wird. Des Weiteren wurden die Proteine aufgeköcht und denaturiert. Zunächst wurde die Matrix in Form von Gelen gegossen. Diese bestanden aus einem unteren 10%igen Trenngel und einem oberen 4%igen Sammelgel. Im weniger konzentrierten oberen Gel wurden die Proben akkumuliert, um anschließend im höher konzentrierten unteren Gel getrennt zu werden.

Die Gele wurden zwischen zwei sauberen Glasplatten gegossen. Zuerst wurde das Trenngel nach dem untenstehenden Rezept fertig gestellt. Um Luftbläschen zwischen den beiden Gelen zu vermeiden, wurde direkt nach dem Gießen Isopropanol aufgetragen. Sobald das erste Gel nach circa 30min auspolymerisiert war, konnte das

Isopropanol abgegossen und das Sammelgel gefertigt werden. Man musste zügig arbeiten, um eine beginnende Polymerisation noch vor dem Gießen zu vermeiden. APS und TEMED wurden jeweils zum Schluss hinzugefügt, da sie die Polymerisation einleiten. In das frisch gegossene Sammelgel wurde zwischen die beiden Glasplatten ein Plastikkamm gesteckt.

**Tabelle 2.19: Zusammensetzung SDS-Page**

Reagent	4% Sammelgel	10% Trenngel
Dest. Wasser	6,1ml	4,02ml
Acrylamid	1,3ml	3,33ml
1,5M Tris-HCl pH=8,8	-	2,5ml
0,5M Tris-HCl pH=6,8	2,5ml	-
SDS	-	100µl
APS	100µl	100µl
TEMED	10µl	10µl

Die zu untersuchenden Proben aus Zelllysaten oder Exosomen-Präparationen wurden in einem entsprechenden Verhältnis mit 4fach-Lade-Puffer vermischt und 5 min bei 95°C gekocht.

Die auspolymerisierten Gele wurden in eine Gelelektrophoresekammer (BioRad), gefüllt mit Running-Buffer, überführt und nach vorsichtigem Herausziehen des Kammes konnten die Proben in die nun freigelegten Taschen geladen werden. Zusätzlich wurden jeweils 6 µl Marker geladen. Der Marker enthält markierte Proteine von definierter Größe, welche das spätere Größenzuordnen von Proteinbanden ermöglichte. Zum Auftrennen wurde ein konstantes Spannungsfeld von 20 mA/Gel angelegt, dessen Fortschreiten anhand des Markers verfolgt werden konnte.

Für die Analyse von Aβ-Präparaten wurden NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Proteingele in Kombination mit MES/SDS-Puffer verwendet. Diese liefen bei 200 V für 35 min.

### 2.2.5.2. Western-Blot

Der Western-Blot bezeichnet die Übertragung der zuvor in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Dies ermöglicht die spätere Darstellung von spezifischen Proteinbanden mit Hilfe von primären und sekundären Antikörpern (Immunoblot). Dabei bindet der erste Antikörper sein spezifisches Antigen auf dem zu untersuchenden Protein und der zweite HRP-gekoppelte Antikörper („horseradish peroxidase“, Meerrettichperoxidase) bindet dessen speziespezifischen F<sub>C</sub>-Teil. Das HRP dient als Reporterenzym, welches nach Inkubation mit geeignetem Substrat ein detektierbares Chemilumineszenz-Signal abgibt.

Zunächst wurde das Gel aus der SDS-Page vorsichtig aus den Glasplatten herausgelöst und zusammen mit einer Nitrocellulose-Membran, Whatman-Papier und Schwämmen in Sandwich-Puffer gelegt. Der Proteintransfer erfolgte von der Kathode (-) in Richtung Anode (+). Daher sah der Aufbau des Konstrukts wie folgt aus: Kathode – Schwamm – Whatman-Papier – Gel – Nitrocellulosemembran – Whatman-Papier – Schwamm – Anode. Dieses „Sandwich“ wurde daraufhin in eine spezielle Vorrichtung geklemmt und in eine mit Sandwich-Puffer gefüllte Transferkammer überführt. Für den 1x Sandwich-Puffer wurde der 10x Sandwich-Puffer 1:10 mit destilliertem Wasser und 10% Methanol verdünnt. Ergänzt wurden ein Kühlelement und ein Rührfisch. Die komplette Transferkammer wurde auf einen Magnetrührer gestellt und der Proteintransfer erfolgte in einem elektrischen Feld von konstanten 400 mA für 60 min. Nach dem Transfer wurde die Membran vorsichtig aus der Vorrichtung gelöst und für eine Stunde in 5%-Milch (5 g Milchpulver auf 100 ml TBST) geblockt. Die Milch verhindert das Binden der Antikörper an unspezifischen Bindungsstellen. Nach Ablauf der Zeit wurde die Membran entweder über Nacht bei 4°C oder 4h bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper mit entsprechender Konzentration in Milch verdünnt inkubiert. Daraufhin wurde die Membran dreimal 10 Minuten mit TBST gewaschen, eine Stunde mit dem zweiten Antikörper mit entsprechender Verdünnung in Milch inkubiert und erneut dreimal 10 Minuten mit TBST gewaschen. Der erste Antikörper konnte nach Zugabe von 10%iger Natriumazidlösung im Verhältnis 1:100 konserviert und wiederverwendet werden. Der zweite Antikörper wurde verworfen. Die Waschschriffe mit TBST entfernten schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper.

Nun konnte die Membran mit geeignetem HRP-Substrat (ECL, Pico, Femto) inkubiert und die gesuchten Proteinbanden mit Hilfe des Chemilumineszenz-Detektors und der Quantity One Software analysiert werden.

### **2.2.6. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung können membrangebundene und intrazelluläre Proteine der Zelle unter einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen, visualisiert und lokalisiert werden. Der Nachweis beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. In der indirekten Immunfluoreszenz werden dafür primäre und sekundäre Antikörper verwendet. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an ein Antigen auf dem darzustellenden Protein. An dessen Fc-Teil bindet ein mit einem Fluorochrom (fluoreszierender Farbstoff) gekoppelter sekundärer Antikörper. Wird das Fluorophor mit Licht der richtigen Wellenlänge („excitation wavelength“, Anregungslicht) angeregt, absorbiert es dieses Licht, wird erregt und emittiert daraufhin Licht einer längeren Wellenlänge („emission wavelength“, Emissionslicht). Dieses Emissionslicht kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt und gemessen werden.

Für dieses Ziel mussten die Zellen zunächst auf einer geeigneten Fläche fixiert werden. Dafür wurden in 6-Well-Platten einzelne Deckgläschen verteilt. In die so präparierten Platten konnte die gewünschte Zell-Medium-Suspension (beschrieben in Zellkultur) pipettiert werden und die Zellen wurden dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde zu 1 ml Medium 2 ml 37°C warmes Paraformaldehyd (PFA; 4% aufgelöst in PBS) in die 6-Well-Platte gegeben und diese 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die instabile PFA-Lösung wurde entweder frisch angesetzt oder zuvor angesetzte PFA-Lösung frisch von -80°C auf 37°C aufgewärmt. Nach Ablauf der Zeit wurde die PFA-Medium-Lösung abgenommen und die Zellen wurden für weitere 10 Minuten mit reiner PFA-Lösung inkubiert. Daraufhin wurden sie dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen.

Die nun fixierten Zellen wurden eine Stunde mit Pierce Blocking Buffer geblockt. Dieser verhinderte das Binden der Antikörper an unspezifische Bindungsstellen. Daraufhin wurden sie mit dem ersten Antikörper (POM1 für PrP<sup>C</sup>, 1:100 in Pierce Blocking Buffer) entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und daraufhin eine Stunde mit dem zweiten Antikörper (Alexa 555

red, 1:300 in Pierce Blocking Buffer) inkubiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Deckgläschen vorsichtig abgetropft und mit einem Tropfen DAPI Fluoromount G auf einem Objektträger fixiert. DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) dient als Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA der Zellen blau anfärbt. Nach dem Trocknen konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica TCS SP5) analysiert werden. Um ein Ausbleichen des Fluorophors zu vermeiden, wurden der Objektträger, der sekundäre Antikörper und DAPI Fluoromount G immer lichtgeschützt gelagert.

### **2.2.7. Aggregationsassay (ThioflavinT-Assay)**

Um die A $\beta$ -Aggregation zu messen und unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen, wurde das Aggregationsassay bzw. ThioflavinT-Assay neu etabliert. ThioflavinT (ThT) bindet Amyloid-Fibrillen und gibt daraufhin ein starkes Fluoreszenzsignal ab. Das Fluoreszenzsignal kann in einem kinetischen Assay über die Zeit gemessen werden und ermöglicht so Rückschlüsse auf die A $\beta$ -Aggregation. A $\beta$  wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und 2 mM Ausgangslösung entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C eingefroren.

Die Exosomenpräparationen wurden mit 2  $\mu$ M A $\beta$  und 20  $\mu$ M Thioflavin T (ThT) in einem finalen Volumen von 170  $\mu$ l bei 37°C im Tecan Safire Microplate Reader unter leichtem Schütteln inkubiert. ThT wurde mit Licht von 450 $\pm$ 5 nm Wellenlänge angeregt („excitation wavelength“) und die Emission wurde bei 482 $\pm$ 10 nm alle 10 min gemessen („emission wavelength“).

### 3. Ergebnisse

Nach der Amyloid-Hypothese kommt es zur pathologischen Anreicherung und interneuronalen Ausbreitung von A $\beta$  bei Patienten mit Morbus Alzheimer<sup>12</sup>. Zudem gibt es Hinweise dafür, dass Exosomen in der Pathogenese von Morbus Alzheimer eine entscheidende Rolle spielen. Ziel dieser Doktorarbeit war es zu untersuchen, ob A $\beta$  an Exosomen via PrP<sup>C</sup> bindet und ob diese Interaktion Einfluss auf das Aggregationsverhalten und die neuronale Toxizität von A $\beta$  hat.

#### 3.1. Herstellen einer N2a-PrP<sup>C</sup>-Knock-Out-Zelllinie

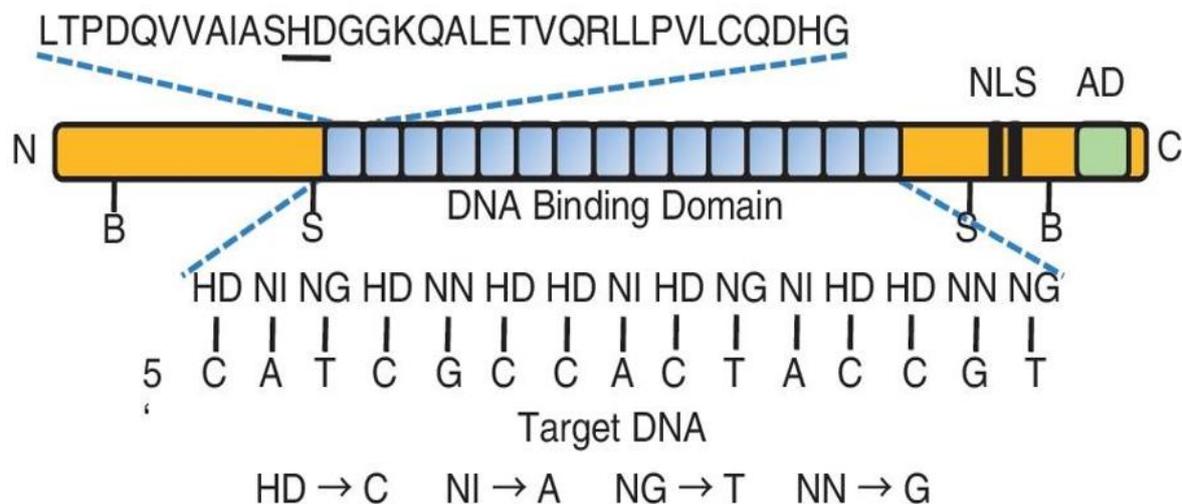
Um den Nachweis zu erbringen, dass A $\beta$  an Exosomen via PrP<sup>C</sup> bindet, wurde eine neuronale PrP<sup>C</sup>-Knock-Out-Zelllinie benötigt, welche mit einer korrespondierenden PrP<sup>C</sup> exprimierenden Zelllinie in ausreichender Anzahl in Zellkulturen kultiviert werden konnte und zudem ausreichende Mengen an Exosomen für die weiteren Experimente produzierte. Zu Beginn der Forschungsarbeit stand keine den Anforderungen entsprechende Zelllinie zur Verfügung, sodass wir uns für den genetischen PrP<sup>C</sup>-Knock-Out der N2a-Zellen mittels TALEN-Methode entschieden.

##### 3.1.1. TALEN-Methode

TALEN („Transcription Activator-like Effector Nuclease“) sind Proteine, die spezifische DNA-Sequenzen binden können und über Kopplung an die Nuklease FokI DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen können.

Ursprünglich wurden die „Transcription Activator-like“ Proteine (TAL) im phytopathogenen Bakterienstamm Xanthomonas entdeckt, welche sie dazu nutzen die Genexpression ihrer Wirtszellen über Bindung an Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen. Als zentrale Domäne besitzen sie eine Reihe von Sequenzwiederholungen, welche jeweils ca. 33-35 Aminosäuren lang sind. Die natürlich vorkommenden Proteine besitzen zwischen 12 und 27 solcher Wiederholungen. Jede Sequenzkopie variiert nur in einem Aminosäurepaar an Position 12 und 13, das sogenannte „repeat variable di-residue“ (RVD). Die

Zusammensetzung eines RVD's entscheidet über die spezifische Bindung an jeweils eines der vier DNA-Nukleotide (s. Abbildung 3.1).<sup>225</sup>

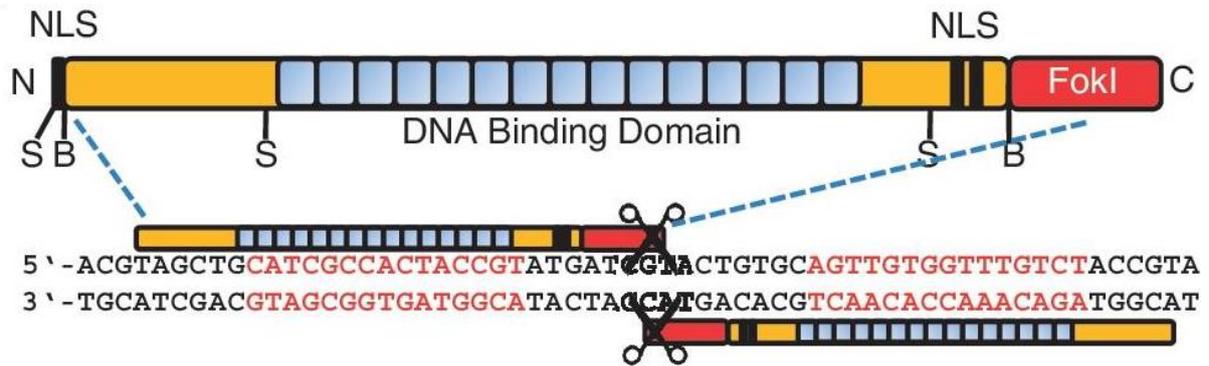


### Abbildung 3.1: Repräsentativer Aufbau eines TALEN-Proteins

Ein TALEN-Protein setzt sich neben einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne aus einem zentralen Bereich: der DNA-Bindungs-Domäne zusammen. Diese Domäne baut sich aus einer Reihe von Sequenzwiederholungen auf, die untereinander nur an Position 12 und 13 variieren. Die Zusammensetzung dieser beiden variierenden Aminosäuren (RVD, „repeat variable di-residue“) bestimmt die spezifische Bindung an ein Nukleotid der DNA. Für jedes Nukleotid gibt es mindestens eine Aminosäurekombination (HD → C, NI → A, NG → T, NN → G). Folglich bestimmt die Sequenz der RVD's den DNA-Locus, der von dem jeweiligen TALEN gebunden werden kann.

(Modifiziert nach: Cermak, T., et al. (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.)

Wenn man nun das Konstrukt mit der Nuklease FokI verbindet, ist es möglich innerhalb einer bestimmten DNA-Sequenz einen Doppelstrangbruch zu erzeugen. Da die FokI-Nuklease nur als Dimer aktiv wird, ist es notwendig zwei TALEN zu klonieren, welche an gegenüberliegenden DNA-Abschnitten über einen Spacer binden. Dabei bindet ein TALEN vor der zu schneidenden Stelle am 5'- und das andere weiter im Verlauf am 3'-DNA-Strang (s. Abb. 3.2).<sup>225</sup>



**Abbildung 3.2: Erzeugen eines Doppelstrangbruchs mit Hilfe der TALEN-Methode**

Mit der Fähigkeit DNA-Sequenzen mit Hilfe der TALEN spezifisch anvisieren zu können, ergeben sich für die Molekularbiologie viele Möglichkeiten. So kann mit Hilfe eines TALEN-Paars, welches mit der Nuklease FokI verbunden ist, ein gezielter DNA-Doppelstrangbruch erzeugt werden.

(Modifiziert nach: Cermak, T., et al. (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." *Nucleic Acids Res* 39(12): e82.)

Zur Herstellung einer Prion-Knock-Out-Zelllinie wurden drei verschiedene TALEN-Paare mit Hilfe des Golden Gate TALEN und TAL Effector Kit 1.0 und 2.0 kloniert, welche alle im Bereich des Prion-Startcodons schneiden sollten (s. Tab. 3.1, Startcodon rot markiert).

**Tabelle 3.1: TALEN-RVD's und der dazugehörige Prnp-Locus**

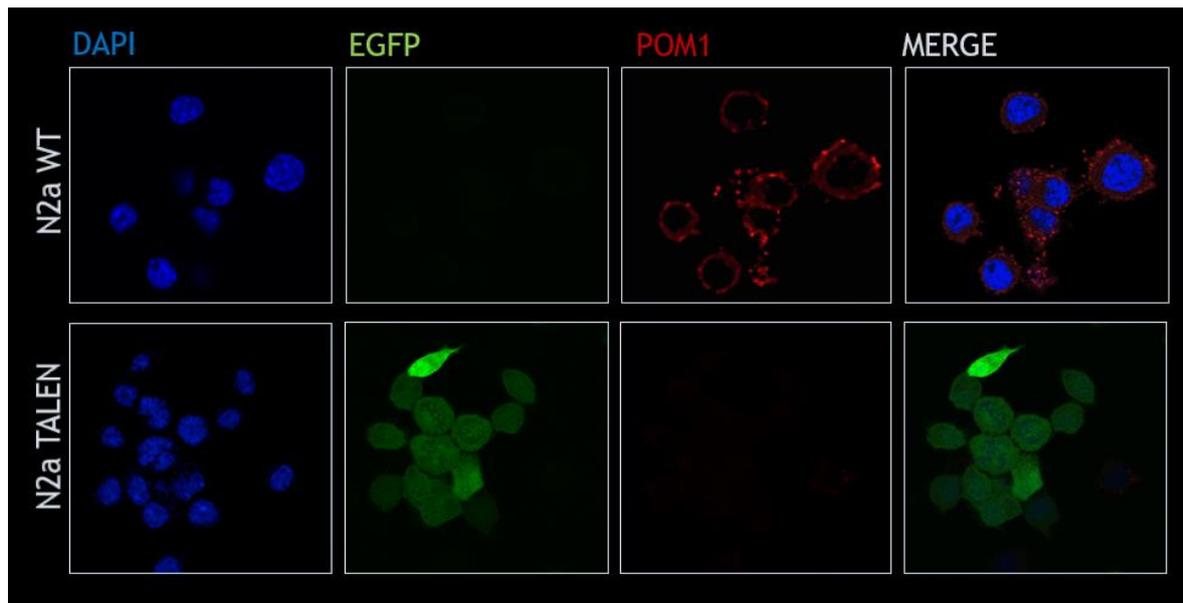
mPrP-TALEN01	5'-TALEN	NN NI NG NI HD HD NG NG NN NG NG HD HD NG HD
	3'-TALEN	NI NN HD HD NI NI NN NN NG NG HD NN HD HD NI NG NN NI
	Prnp-Locus	tGATACCTTGTTCTC atttgcagatcagca TC <b>ATG</b> GCGAACCTTGGCTa
mPrP-TALEN03	5'-TALEN	HD NI NG NG NG NG NN HD NI NH NI NG HD NI NN
	3'-TALEN	HD NI HD NI NI NI NN NI NH NN NH HD HD NI NH HD NI NN HD HD
	Prnp-Locus	tCATTTCAGATCAGTcatc <b>atg</b> gcgaaccttggtact GGCTGCTGGCCCTCT TTGTGa
mPrP-TALEN04	5'-TALEN	NG NG NG NN HD NI NH NI NG HD NI NH NG HD NI NG HD NI NG
	3'-TALEN	HD NI HD NI NI NI NN NI NH NN NH HD HD NI NH HD NI NN HD HD
	Prnp-Locus	tTTTGCAGATCAGTCATC <b>ATg</b> gcgaaccttggtactGGCTGCTGGCCCTCTT TGTGa

Entsteht ein Doppelstrangbruch, kann dieser über zwei wesentliche Reparaturmechanismen der Zelle repariert werden. Zum einen über homologe Rekombination, wobei mit Hilfe einer Genmatrix (normalerweise das homologe Chromosom) die geschädigte Sequenz wiederhergestellt wird und zum anderen über Non-homologous end-joining (NHEJ). Dabei werden die DNA-Enden nach Entfernung der geschädigten Nukleotide wieder verknüpft. Dies führt häufig zu Genunterbrechungen oder zu Lese-Raster-Verschiebungen.<sup>226</sup>

Im Falle der homologen Rekombination sollte eine bereits im Vorfeld klonierte Selektionskassette als Genmatrix dienen. Diese enthielt neben den 5'- und 3'-Untranslated-Regions (5'- und 3'-UTR) des Prnp-Gens auch DNA-Sequenzen für ein EGFP-Zeocin-Fusionsprotein flankiert von 2 LoxP-Enden. EGFP („enhanced green fluorescent protein“, verstärkt grün-fluoreszierendes Protein) sowie Zeocin sollten nach erfolgter Transfektion der Zellen die Selektion der KnockOut-Zelllinie erleichtern, indem die Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie grün fluoreszieren und gegenüber Zeocin resistent sein sollten. Die LoxP-Enden sollten, wenn nötig, die spätere Entfernung der EGFP-Zeocin-Genmatrix aus den Zellen erleichtern.

### **3.1.2. Charakterisierung der N2a-PrP<sup>C</sup>-Knock-Out-Zelllinie**

Nach multiplen Zelltransfektionen mit verschiedenen Reaktionsansätzen mit unterschiedlichen Mengen DNA (1-3 µg) und Lipofectamin (20-30 µl) konnte ein EGFP-positiver Zellklon nach Transfektion mit jeweils 1,5 µg pcDNA3.1-mPrP-TALEN01-3' und -mPrP-TALEN01-5' sowie 3 µg pcDNA3.1-mPrP-KO-Cas unter 30 µl Lipofectamin selektiert werden.



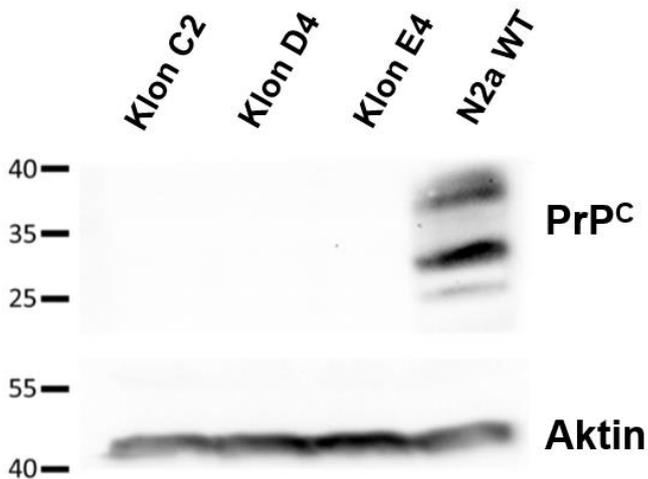
**Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzfärbung nach Transfektion mit den TALEN-Konstrukten und Selektion eines EGFP-positiven Klons**

Nach Selektion konnten grün fluoreszierende Zellen ohne PrP<sup>C</sup>-Signal (POM 1) nachgewiesen werden (N2a TALEN). Die N2a-Wildtyp-Zellen (N2a WT) weisen hingegen keine grüne Fluoreszenzfärbung auf und mittels POM1 konnte membrangebundenes zelluläres Prion-Protein dargestellt werden. DAPI: Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA blau färbt. Merge: Summiertes Fluoreszenzsignal.

Für eine erfolgreiche Transfektion der Zellen war eine ungewöhnlich hohe Menge an DNA und Lipofectamin notwendig.

Der Zellklon wurde im Folgenden weiter aufgesplittet und weiter selektiert. Es zeigte sich, dass die Zellen nicht resistent gegenüber Zeocin waren. Erstaunlich war zudem, dass die EGFP-positiven Zellen in unterschiedlichem Maße weniger adhären wuchsen.

Die folgenden Western-Blot-Analysen zeigten keine detektierbaren Level von PrP<sup>C</sup> in den Klonen C2, D4 und E4.



**Abbildung 3.4: Western-Blot-Analyse der EGFP-positiven Klone**

Es findet sich kein detektierbares PrP<sup>C</sup>-Signal in den weiter selektierten EGFP-positiven Klonen C2, D4 und E4.

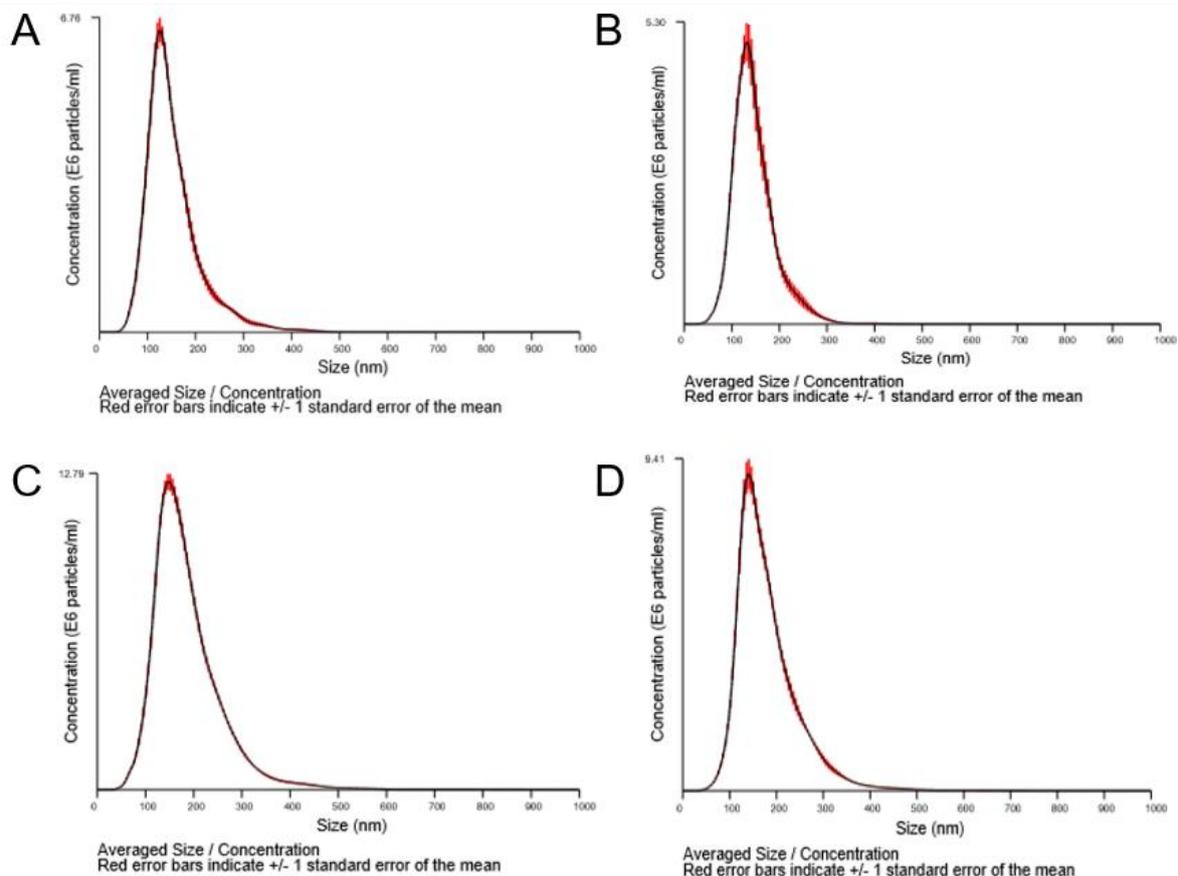
Der Klon D4 wurde für die weiteren Experimente ausgewählt und wird im Folgenden als N2a-PrP(-) bezeichnet. Die parentale PrP<sup>C</sup>-exprimierende Zelllinie wird im Folgenden als N2a-PrP-WT bezeichnet.

Durch weitere qPCR und genomische Analysen durch einen Forschungskollegen konnte der definitive genomische PrP<sup>C</sup>-Knock-Out bestätigt werden.

### 3.2. Charakterisierung der SH-SY5Y- und N2a-Exosomen

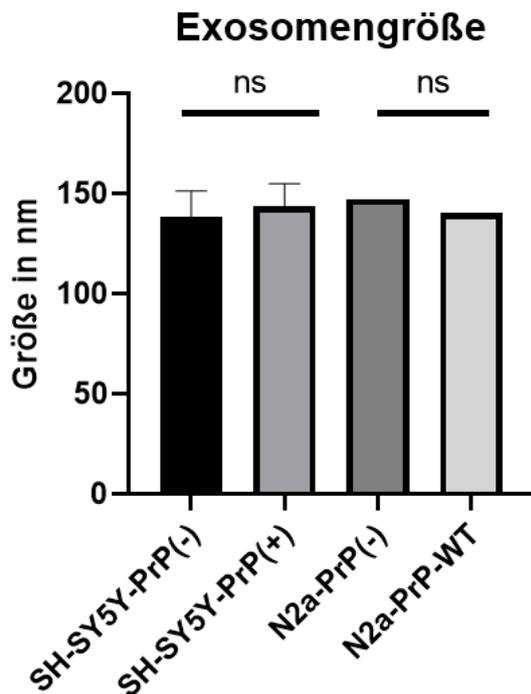
Mit Hilfe der neu generierten PrP<sup>C</sup>-Knock-Out-Zelllinie konnten die PrP<sup>C</sup>-abhängigen Effekte auf Exosomen untersucht werden. Vergleichend wurden N2a-WT-Zellen analysiert. Ergänzend wurden SH-SY5Y-Zellen, welche keine detektierbaren Level von PrP<sup>C</sup> exprimieren, aber keinen genetischen Knock-Out haben, untersucht. Verwendet wurden SH-SY5Y-Zellen, welche entweder mit leerem pIRESneo-Vektor (SH-SY5Y-PrP(-)) oder mit pIRESneo-Vektor mit der PRNP-DNA-Sequenz (SH-SY5Y-PrP(+)) stabil transfiziert wurden. Mit dem vergleichenden Einsatz von humanen (SH-SY5Y-Zellen) und murinen Zelllinien (N2a-Zellen) konnten spezie-spezifische Unterschiede ausgeschlossen werden.

Für Experimente an Exosomen, sollten diese in möglichst hoher Konzentration und mit möglichst geringer Verunreinigung aus den Zellmedien aufgereinigt werden. Hierfür wurden die Zellen für mindestens 48 h in exosomen-freiem Medium kultiviert. In dieser Zeit konnten die Zellen ausreichend Exosomen für die weiteren Experimente in das Medium sezernieren. Anschließend wurden die Exosomen in einer Reihe von Zentrifugationsschritten mit einem finalen Ultrazentrifugationsschritt zur Pelletierung der Exosomen aus dem Medium aufgereinigt. Letztlich konnte die Konzentration und Größenverteilung der aufgereinigten Exosomen mittels Nanosight-Messung bestimmt werden. Es wurde jeweils mit dem Mittel aus fünf Messungen gearbeitet. Somit wurde sichergestellt, dass für die weiteren Experimente gleiche Mengen an Exosomen eingesetzt wurden.



**Abbildung 3.5: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer Messung mit Nanoparticle Tracking Analyse (NTA)**

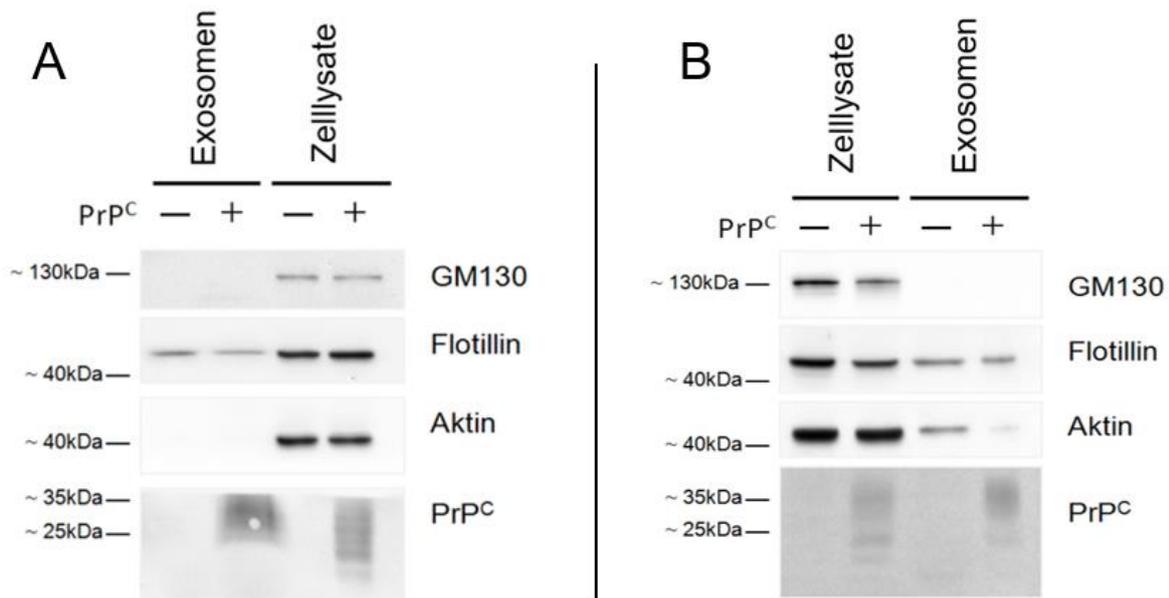
Dargestellt ist jeweils die Durchschnittsgröße von insgesamt 5 Messungen mit rot-markierter Standardabweichung. A: SH-SY5Y-PrP(-), B: SH-SY5Y-PrP(+), C: N2a-PrP(-), D: N2a-PrP-WT



**Abbildung 3.6: Größenverteilung der Exosomen**

Die Exosomen der SH-SY5Y-PrP(-), SH-SY5Y-PrP(+), N2a-PrP(-) und N2a-PrP-WT-Zellen unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Größe.

Aus dem Medium der N2a-Zellen konnten nach den 48 h deutlich mehr Exosomen aufgereinigt werden als aus dem Medium der SH-SY5Y-Zellen. Für die Western-Blot-Untersuchungen wurden  $6,6 \times 10^9$  Exosomen von den N2a-Zellen und  $1,9 \times 10^9$  Exosomen von den SH-SY5Y-Zellen verwendet.



**Abbildung 3.7: PrP<sup>C</sup> auf Exosomen von A: SH-SY5Y-PrP(+)- und B: N2a-PrP-WT-Zellen**

Mittels Western-Blot-Analyse konnte die Reinheit der Exosomen-Präparationen nachgewiesen werden. PrP<sup>C</sup> findet sich angereichert auf Exosomen der A: SH-SY5Y-PrP(+)- und B: N2a-PrP-WT-Zellen.

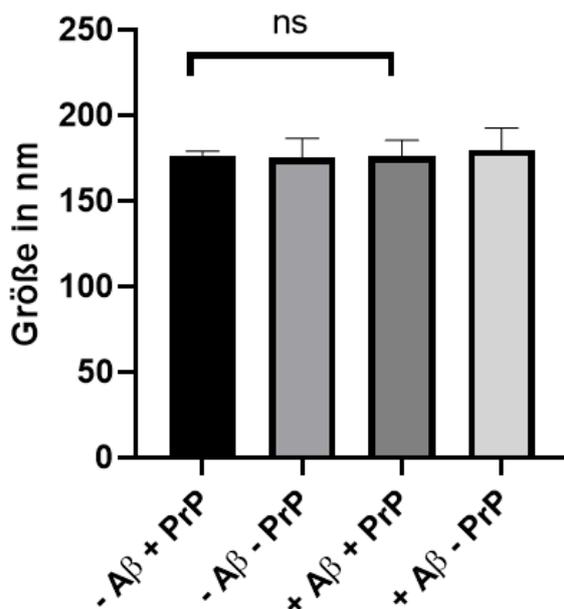
Die Reinheit der Exosomen-Präparationen zeichnete sich durch die Abwesenheit vom Golgi-Marker GM130 und durch den Nachweis vom ubiquitär exprimierten und membran-assoziierten Protein Flotillin 1 aus. PrP<sup>C</sup> findet sich angereichert auf Exosomen von PrP<sup>C</sup> exprimierenden Zellen. Hingegen konnte kein PrP<sup>C</sup>-Signal auf den Exosomen der N2a-PrP(-)- und SH-SY5Y-PrP(-)-Zellen nachgewiesen werden.

### 3.3. A $\beta$ bindet an Exosomen via PrP<sup>C</sup>

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war der Nachweis der Bindung von A $\beta$  an Exosomen via PrP<sup>C</sup>. Hierfür wurden die Exosomen über Nacht mit A $\beta$  inkubiert und mittels Ultrazentrifugation erneut pelletiert. Die resultierenden Exosomen wurden mittels Nanoparticle Tracking Analyse und Western Blot analysiert.

### 3.3.1. A $\beta$ -Bindung führt zu keiner signifikanten Größenänderung der Exosomen

Die Nanoparticle Tracking Analysis Software (NTA) analysiert die zuvor mittels des Nanosight-LM1 visualisierten Partikel einzeln und kann mit Hilfe der Brown'schen Molekularbewegung die Größe der einzelnen Partikel berechnen. Da die Software Partikel für Partikel misst, ergibt sich eine hohe Auflösung der Größenvarianz der einzelnen Exosomen. Daher folgte die Überlegung, ob die Bindung von A $\beta$  Einfluss auf die Größe der Exosomen haben könnte. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den PrP<sup>C</sup>-exprimierenden Exosomen nach Inkubation mit A $\beta$  oder ohne A $\beta$  nachgewiesen werden.

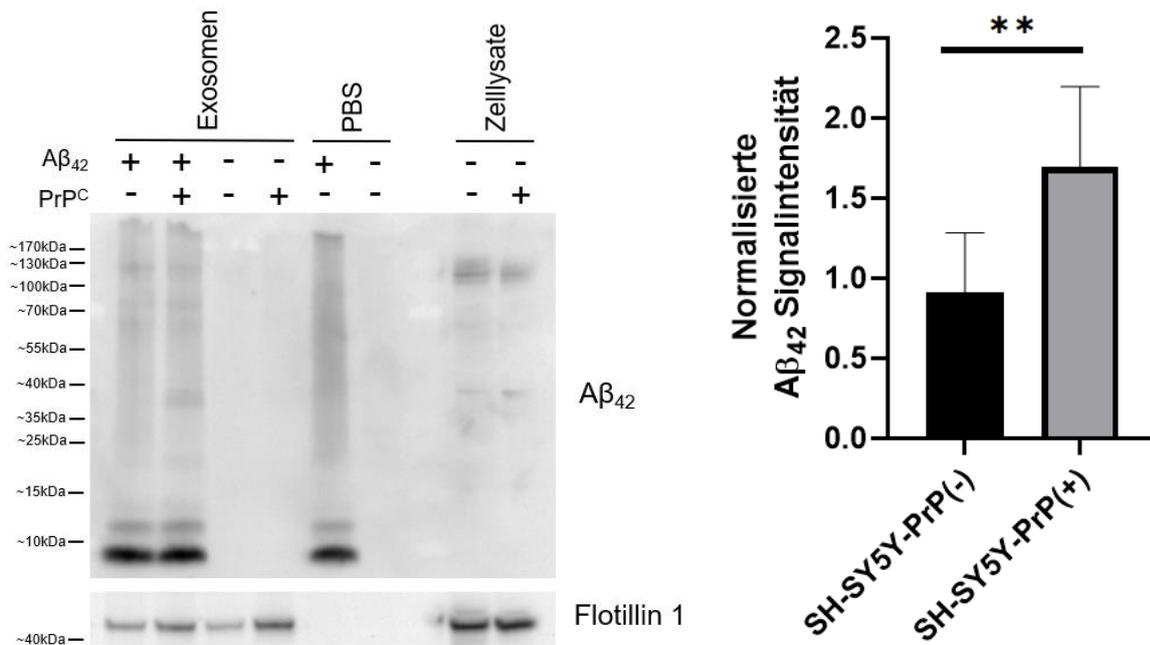


**Abbildung 3.8: Größenvergleich der Exosomen von SH-SY5Y-PrP(+) und SH-SY5Y-PrP(-) nach Inkubation mit A $\beta$**

Im Durchschnitt zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Größe der Exosomen nach Inkubation mit A $\beta$  ( $p > 0,9999$ ,  $n = 5$ ).

### 3.3.2. PrP<sup>C</sup>-exprimierende Exosomen binden A $\beta$

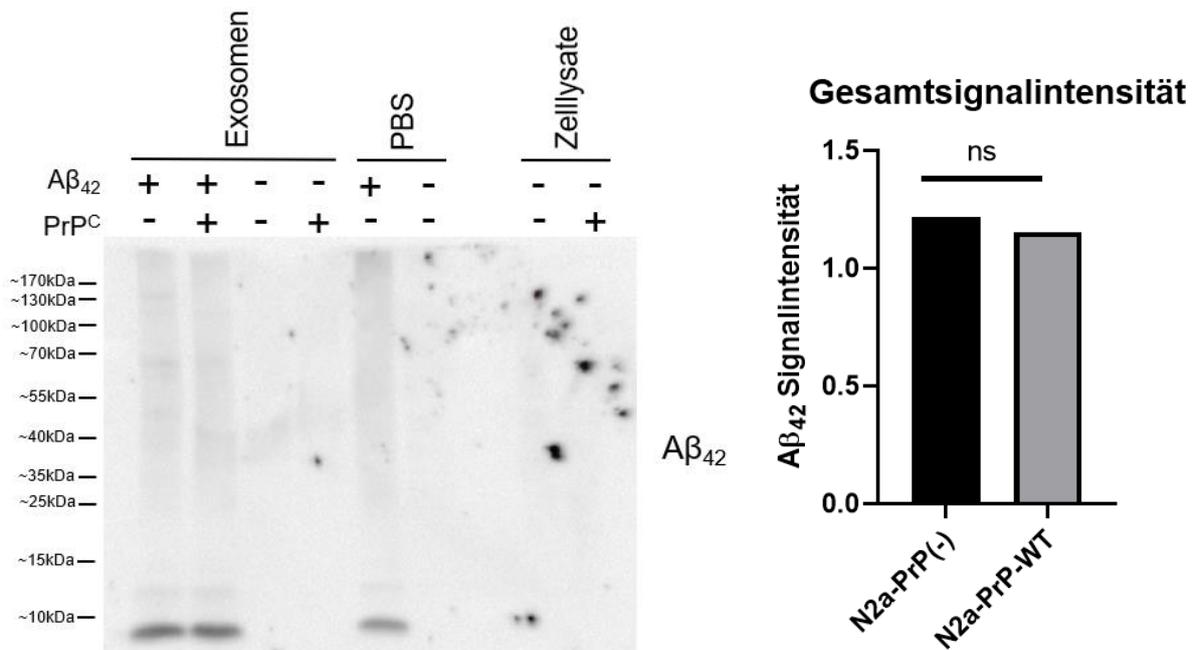
Unter der These, dass A $\beta$  fest an PrP<sup>C</sup> bindet, sollte nach Ultrazentrifugation mehr A $\beta$  in den Pellets mit PrP<sup>C</sup>-exprimierenden Exosomen nachzuweisen sein als in den Lösungen mit Exosomen ohne PrP<sup>C</sup>.



#### Abbildung 3.9: Exosomen der SH-SY5Y-PrP(+)-Zellen binden A $\beta_{42}$

Dargestellt ist die Signalintensität von A $\beta_{42}$  nach Inkubation mit Exosomen von SH-SY5Y-PrP(+)- und -PrP(-)-Zellen. Die Signalintensität war bei PrP<sup>C</sup>-exprimierenden Exosomen signifikant erhöht (\*\*p=0,0044, n=3).

Die Quantifizierung erbrachte einen signifikanten Unterschied im Amyloid-Gehalt zwischen den verschiedenen Exosomen der SH-SY5Y-Zellen.



**Abbildung 3.10: Exosomen der N2a-PrP-WT-Zellen binden A $\beta_{42}$**

Dargestellt ist die Signalintensität von A $\beta_{42}$  nach Inkubation mit Exosomen von N2a-WT- und -PrP(-)-Zellen (n=1). Im weiteren Verlauf konnte ein signifikanter Unterschied für die N2a-Zellen bestätigt werden.

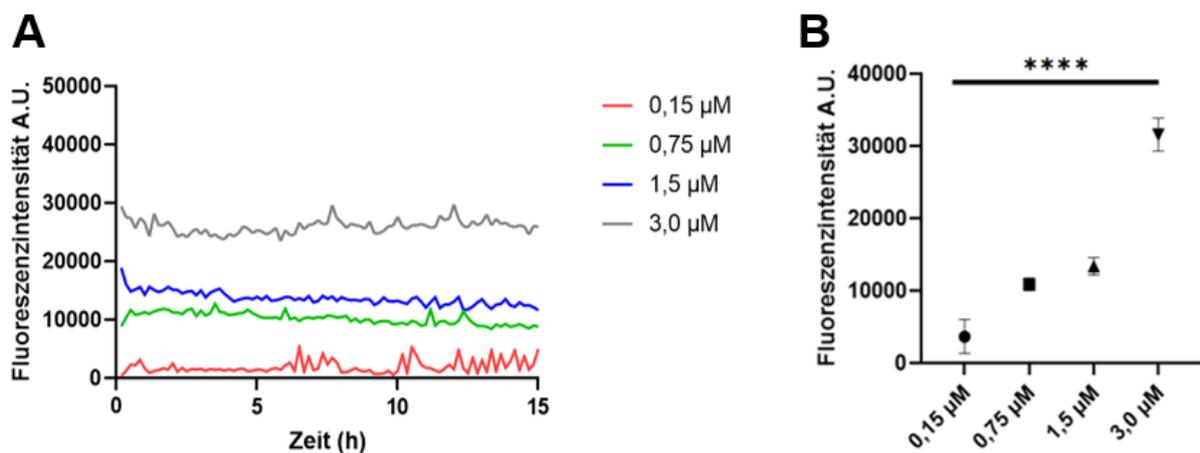
Für die Exosomen der N2a-Zellen konnte zunächst aufgrund der geringen Probenzahl kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Erst im Verlauf konnte nach entsprechenden Wiederholungen des Experiments auch hier ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden<sup>227</sup>.

**3.4. PrP<sup>C</sup> auf Exosomen fördert die A $\beta$ -Aggregation**

Für den Nachweis, dass exosomales PrP<sup>C</sup> Einfluss auf die Aggregationsneigung von A $\beta_{42}$  hat, wurde ein Thioflavin T-Assay etabliert. Thioflavin T ist ein fluoreszierender Farbstoff, der nach Bindung mit  $\beta$ -faltblattreichen Strukturen wie Amyloidfibrillen seine Fluoreszenzeigenschaften ändert. So kommt es nach Bindung zur Verschiebung des Anregungsspektrums auf 450 nm und der Emission auf 482 nm im Vergleich zu 385 nm („excitation wavelength“) und 445 nm („emission wavelength“).<sup>228</sup> Somit war die Hypothese, dass die Fluoreszenzintensität von Thioflavin T direkt mit dem Aggregationsstatus von A $\beta$  korreliert werden kann.

Da es sich um ein bisher in der Forschungsgruppe nicht etabliertes Testverfahren gehandelt hat, waren zunächst einige Experimente zur Evaluation der unterschiedlichen Konzentrationen und Reproduzierbarkeit notwendig. Verschiedene A $\beta$ -Präparationen von A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$ , sowie von unterschiedlichen Herstellern und nach unterschiedlichen Lösungsvarianten des kommerziell erhältlichen Amyloidpulvers zeigten teilweise unterschiedliche Aggregationstendenzen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Fluoreszenzintensität in direkter Abhängigkeit zur Konzentration von zuvor aggregiertem A $\beta_{40}$  steht.

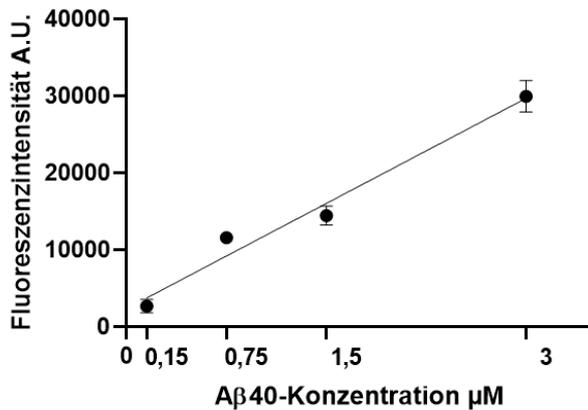


### Abbildung 3.11: ThT-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit zur A $\beta$ -Konzentration

A: Die Fluoreszenzintensität von Thioflavin T ist abhängig von der Konzentration des aggregiertem A $\beta_{40}$  und zeigt über eine Zeitspanne von insgesamt 15 Stunden nur geringe Schwankungen.

B: Die Fluoreszenzintensitäten stellen sich bereits bei geringen Konzentrationsunterschieden von aggregiertem A $\beta_{40}$  signifikant unterschiedlich dar. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die graphische Darstellung vereinfacht. So fanden sich signifikante Unterschiede zwischen allen Konzentrationen (0,15  $\mu\text{M}$  vs. 0,75  $\mu\text{M}$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=90$ ; 0,15  $\mu\text{M}$  vs. 1,5  $\mu\text{M}$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=90$ ; 0,15  $\mu\text{M}$  vs. 3,0  $\mu\text{M}$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=90$ ; 0,75  $\mu\text{M}$  vs. 1,5  $\mu\text{M}$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=90$ ; 0,75  $\mu\text{M}$  vs. 3,0  $\mu\text{M}$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=90$ ; 1,5  $\mu\text{M}$  vs. 3,0  $\mu\text{M}$  \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=90$ ).

Die lineare Regression konnte eine Korrelation von 95,9 % zwischen Amyloid-Konzentration und Fluoreszenzintensität nachweisen.

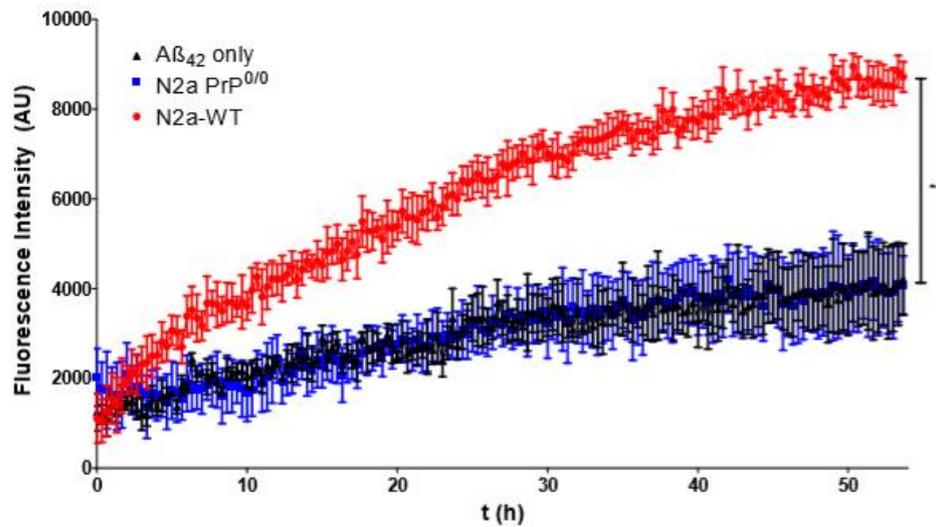


**Abbildung 3.12: Die ThT-Fluoreszenzintensität korreliert mit der Aβ-Konzentration**

Die lineare Regression erbrachte einen  $r^2$ -Wert von 0,9587. Entsprechend zeigt sich eine gute Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Aβ-Konzentration.

Ähnliche Ergebnisse konnten im Verlauf für Aβ<sub>42</sub> nachgewiesen werden. Da sich initial keine reproduzierbaren Ergebnisse mit Aβ<sub>40</sub> und Aβ<sub>42</sub> als Reaktionskatalysator zeigten, wurde im Verlauf auf Aβ<sub>42</sub> als Ausgangsamyloid gewechselt. Die Exosomenpräparationen wurden mit 2 μM Aβ<sub>42</sub> und 20 μM Thioflavin T (ThT) in einem finalen Volumen von 170 μl bei 37°C im Tecan Safire Microplate Reader für 54 h inkubiert.

Nach Etablierung des Aggregationsassays konnte durch einen Forschungskollegen gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Beschleunigung und Zunahme der Aβ-Aggregation kommt, wenn Aβ<sub>42</sub> mit PrP<sup>C</sup>-enthaltenden Exosomen inkubiert wird. Exprimierten die Exosomen jedoch kein PrP<sup>C</sup>, ergab sich kein Unterschied in der Aggregationskinetik im Vergleich zu isoliertem Aβ<sub>42</sub>. Diese Ergebnisse sind Teil einer gemeinsamen Publikation („Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity“) und bestätigen einen entscheidenden Einfluss von exosomalen PrP<sup>C</sup> im Aβ-Metabolismus.<sup>227</sup>



**Abbildung 3.13: PrP<sup>C</sup>-exprimierende Exosomen fördern die Aggregation von Aβ<sub>42</sub>**

Über einen Zeitraum von 54h führen PrP<sup>C</sup>-exprimierende Exosomen der N2a-WT-Zellen zu signifikant höheren Fluoreszenzintensitäten im Aggregationsassay im Vergleich zu Exosomen ohne nachweisbares PrP<sup>C</sup> (N2a-PrP(-) vs. Aβ<sub>42</sub>, p=0,8248, n=3; N2a-PrP-WT vs. Aβ<sub>42</sub>, \*\*p=0,0076, n=3).

(Modifiziert nach: Falker, C., et al. (2016). "Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity." J Neurochem 137(1): 88-100.)

## 4. Diskussion

In dieser Doktorarbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass das zelluläre Prion-Protein an der Bindung von A $\beta$  an neuronale Exosomen beteiligt ist und somit Einfluss auf den A $\beta$ -Metabolismus in Morbus Alzheimer nehmen kann. Vorgegangen war die Erkenntnis, dass PrP<sup>C</sup> als hochaffiner Rezeptor für A $\beta$ -Oligomere dienen kann<sup>115</sup> und sich angereichert auf neuronalen Exosomen findet<sup>205</sup>.

Darüber hinaus konnten immer mehr Forschungsgruppen einen entscheidenden Einfluss von Exosomen in AD belegen, wobei die molekulare Grundlage dessen weitestgehend ungeklärt bleibt. So resultierte die Reduktion der Exosomen-Produktion in einem AD-Mausmodell in signifikant geringeren Plaque-Mengen<sup>229</sup>. Zwar konnte auch nachgewiesen werden, dass ein Teil des sezernierten A $\beta$  in Assoziation mit Exosomen freigesetzt wird<sup>84</sup>, aber es finden sich auch Hinweise dafür, dass neuronale Exosomen die Aggregation von A $\beta$  und im Folgenden die Aufnahme durch Mikrogliazellen fördern und somit dem Abbau dienen<sup>217</sup>. Die intracerebrale Injektion neuronaler Exosomen in einem AD-Mausmodell führte zu reduzierter A $\beta$ -Menge, Amyloid-Ablagerungen und reduzierter A $\beta$ -vermittelter Synaptotoxizität<sup>216</sup>.

### 4.1. Vergleich der Exosomen unterschiedlicher Zelllinien

Um PrP<sup>C</sup>-abhängige Effekte im A $\beta$ -Metabolismus zu analysieren, war es notwendig eine zuverlässige und stabile PrP<sup>C</sup>-Knock-Out-Zelllinie zu generieren, welche zudem ausreichend Exosomen für die weiteren Experimente produzierte. Als Ursprungszelllinie wurden N2a-Zellen ausgewählt. Diese sind kommerziell erhältliche, immortale, sowie adhären und schnell-wachsende Zellen, welche ursprünglich aus einem Neuroblastom der Maus stammen. Mittels TALEN-Methode sollte ein PrP-Knock-Out generiert werden.

Für die erfolgreiche Transfektion waren erstaunlich große Mengen Plasmid-DNA und Lipofectamin abweichend vom Protokoll notwendig. Alle daraufhin selektierten EGFP-positiven Klone wuchsen weniger adhären im Vergleich zu den N2a-WT-Zellen. Dies könnte entweder ein Resultat der EGFP-Expression oder der fehlenden Expression

von PrP<sup>C</sup> sein. So wurde bereits zuvor dem Prion-Protein u.a. eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion von N2a-Zellen zugeschrieben<sup>129</sup>. Für die weiteren Experimente wurde aus Gründen der Praktikabilität der am meisten adhärent wachsende Klon ausgewählt. Durch Western Blot, Immunfluoreszenz, qPCR und genomische Analysen konnte letztlich der sichere Knock-Out festgestellt werden.

Vergleichend wurden SH-SY5Y-Zellen eingesetzt, welche aus einem menschlichen Neuroblastom stammen. Diese exprimieren keine detektierbaren Level von PrP<sup>C</sup>, sind aber keine sicheren Knock-Out-Zellen. Bereits zuvor wurden die Zellen entweder stabil mit murinen PrP<sup>C</sup>-enthaltendem oder leerem pIRESneo-Vektor transfiziert und in verschiedenen Experimenten von PrP<sup>C</sup>-abhängigen Effekten untersucht<sup>159,230</sup>. Sowohl die N2a- als auch die SH-SY5Y-Zellen stammen aus einem Neuroblastom. Durch den vergleichenden Einsatz beider Zelllinien konnten spezie-spezifische Unterschiede unabhängig vom PrP<sup>C</sup> weitestgehend ausgeschlossen werden.

Nach Aufreinigung der Exosomen wurden die Größenzusammensetzung und Konzentration direkt mittels Nanopartikel Tracking Analyse bestimmt. Die Software kann anhand der Brown'sche Molekularbewegung die Größe der einzelnen Partikel errechnen. Dadurch ergibt sich eine hohe Auflösungskraft der Größenvarianz. Die durchschnittliche Größe der Exosomen lag meist etwas > 150 nm („Mean“). Jedoch lag die am meisten vertretene Größe immer zwischen 100 und 150 nm („Mode“). Eine entsprechende Verunreinigung der Präparationen mit größeren extrazellulären Vesikeln, Zellpartikeln oder apoptotischen Körperchen erscheint daher möglich. Die weitere Analyse mittels Western-Blot konnte jedoch durch die Abwesenheit des Golgi-Markers GM130 und durch den Nachweis des Exosomen-Markers Flotillin die Reinheit der Präparationen nachweisen. GM130 lässt sich nur bei Kontamination mit intrazellulären Zellbestandteilen nachweisen.<sup>231</sup> Auch wenn eine gewisse Verunreinigung mit größeren extrazellulären Vesikeln, Zellbestandteilen und apoptotischen Körperchen niemals vollständig auszuschließen ist, galt dies jedoch für die korrespondierenden Zelllinien gleichermaßen und ist daher in vergleichenden Experimenten zu vernachlässigen. Die weiteren Analysen konnten zudem eine ausreichende Reinheit der Präparationen nachweisen.

Die PrP<sup>C</sup>-Expression hatte keinen Einfluss auf die Exosomengröße und es fanden sich keine Unterschiede in der Protein-Zusammensetzung, soweit diese analysiert wurde. Daher ist anzunehmen, dass die Expression von PrP<sup>C</sup> keinen wesentlichen Einfluss auf die Produktion oder Freisetzung von Exosomen hat.

## 4.2. PrP<sup>C</sup> auf Exosomen in der Pathophysiologie von M. Alzheimer

Für den Nachweis einer PrP<sup>C</sup>-abhängigen Bindung von A $\beta$  an Exosomen wurde ein spezielles Bindungsassay etabliert. Hierfür wurden die Exosomen über Nacht mit A $\beta$  inkubiert und nach erneuter Pelletierung konnte der an PrP<sup>C</sup> gebundene A $\beta$ -Gehalt der Proben normalisiert zu Flotillin quantifiziert werden. Die Gesamtsignalintensität von A $\beta$  war bei den SH-SY5Y-PrP(+)-Zellen signifikant höher im Vergleich zu den SH-SY5Y-PrP(-)-Zellen (\*\*p=0,0044, n=3). Für die N2a-Zellen konnte dies nicht bestätigt werden. Dies ist allerdings wahrscheinlich auf die geringe Fallzahl zurückzuführen, denn nach Wiederholung fanden sich ähnliche Ergebnisse wie bei den SH-SY5Y-Zellen<sup>227</sup>.

Im gleichen Forschungsjahr konnte eine Gruppe um *An et al.* nachweisen, dass Exosomen von PrP<sup>C</sup>-exprimierenden Zellen signifikant mehr A $\beta$ -Oligomere binden als Exosomen einer PrP<sup>C</sup>-KO-Zelllinie. Diese Exosomen konnten *in vivo* die A $\beta$ -vermittelte LTP-Inhibition signifikant reduzieren. Allerdings wurden hierfür immortalisierte Zelllinien unterschiedlichen Ursprungs vergleichend eingesetzt, nämlich HW8-1- und Hpl3-4-Zellen. Da aber Exosomen unterschiedlicher Zelllinien in ihrer Proteinzusammensetzung variieren<sup>232</sup>, ist zum einen die Quantifizierung mittels eines kommerziell erhältlichen Protein-Konzentrationsbestimmungs-Assays nicht verlässlich und zum anderen eine PrP<sup>C</sup>-unabhängige zelltypspezifische Interaktion mit A $\beta$  nicht ausgeschlossen.<sup>215</sup> Im Gegensatz dazu wurden während dieser Forschungsreihe Exosomen korrespondierender Zelllinien untersucht und deren absolute Menge konnte mittels NTA bestimmt werden. Durch den zusätzlichen Einsatz von murinen und humanen Zellen konnten dadurch nicht nur proteinabhängige Unterschiede verschiedener Zelllinien, sondern auch spezie-spezifische Unterschiede und Beeinflussungsfaktoren ausgeschlossen werden.

Unabhängig davon hat die gleiche Forschungsgruppe auch den Effekt von trypsinisierten Exosomen der N2a-Zellen auf die A $\beta$  vermittelte LTP-Inhibition untersucht. Die Behandlung mit Trypsin sollte Oberflächenproteine, wie auch PrP<sup>C</sup> von den Exosomen entfernen und so den Nachweis erbringen, dass der Effekt auf die LTP-Inhibition von einer Proteininteraktion auf den Oberflächen der Exosomen abhängig ist. Dies geschah leider nicht im Vergleich zu der Exposition von A $\beta$  allein, sondern nur im Vergleich zu nicht-trypsinisierten Exosomen. So kommt es bei den Letzteren zu einer signifikant geringeren Inhibition der LTP durch A $\beta$  als bei trypsinisierten Exosomen. Aber interessanterweise konnten auch die Exosomen der PrP<sup>C</sup>-KO-Zelllinie die A $\beta$ -vermittelte Inhibition der LTP teilweise blockieren, was weitere und bisher ungeklärte Mechanismen einer Exosomen-A $\beta$ -Interaktion unabhängig von PrP<sup>C</sup> nahelegt.<sup>215</sup>

So wurde beschrieben, dass Glycosphingolipide (GSL) an der Assoziation von A $\beta$  an Exosomen mit folgender Aufnahme und Degradierung in Mikrogliazellen beteiligt sind<sup>216</sup>. GSL sind membranassoziierte Lipide mit einem glykosidisch gebundenen Kohlenhydrat-Anteil. A $\beta$  bindet an Glycosphingolipide, insbesondere an GM1 und infolge der Proteininteraktion wurde eine Veränderung der sekundären Proteinstruktur mit erhöhter Aggregationsneigung in Zusammenhang mit Lipid-Rafts beschrieben.<sup>233-235</sup> So konnte bereits zuvor eine Exosomen-abhängige Beschleunigung der A $\beta$ -Aggregation nachgewiesen werden<sup>217</sup>. Dies konnte hier bestätigt werden und PrP<sup>C</sup> scheint hierbei eine entscheidende Rolle einzunehmen (s. Abb. 3.13).

Interessanterweise wurde ebenfalls eine Assoziation des zellulären Prion-Proteins mit GM1 und Lipid-Rafts beschrieben<sup>236</sup>. Denkbar wäre daher, dass lipid-raft-assoziiertes PrP<sup>C</sup> in Zusammenhang mit GSL als Katalysator der Amyloid-Aggregation dient. Da insbesondere Oligomere als toxische Entität in der Alzheimer-Pathologie gelten<sup>100</sup>, ist daher davon auszugehen, dass exosomales Prion-Protein eine neuroprotektive Rolle erfüllt. Durch diese Interaktion kommt es über eine Bildung höherer Aggregatzustände von A $\beta$  zur Reduktion löslicher A $\beta$ -Oligomere. Dies erklärt ebenfalls die Assoziation von Exosomen mit vermehrter Plaque-Bildung<sup>84</sup>.

Wohlgermerkt wird die A $\beta$ -Aggregation jedoch durch lösliches PrP<sup>C</sup> ohne GPI-Anker inhibiert<sup>237</sup>. Zudem ist membrangebundenes neuronales PrP<sup>C</sup> nach Bindung von löslichen A $\beta$ -Oligomeren assoziiert mit Synaptotoxizität und Neurodegeneration<sup>157,160,161,163,238,239</sup>. Dies impliziert eine duale Rolle des zellulären

Prion Proteins in Zusammenhang mit den molekularen Grundlagen des A $\beta$ -Metabolismus.

Im Gegensatz zu den neuronalen Exosomen inhibieren Mikrovesikel von Mikrogliazellen die A $\beta$ -Aggregation und führen zur Bildung von neurotoxischem A $\beta$ <sup>223</sup>. Tatsächlich ist die Produktion von Mikrovesikeln in Alzheimer-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöht<sup>223</sup> und korreliert mit Neurodegeneration und hippokampaler Atrophie<sup>240</sup>.

Unabhängig von diesen Mikrovesikeln wurden in weiteren Forschungsarbeiten auch Exosomen krankheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. So fand eine Forschungsgruppe 2018, dass Exosomen von Alzheimer-Patienten ohne spezifische Zellzuordnung angereichert A $\beta$ -Oligomere enthalten und diese in weiteren *in vitro* Studien auf neuronale Zellen übertragen konnten. Postuliert wurde daher, dass Exosomen dem interneuronalen Transport von neurotoxischen A $\beta$ -Oligomeren im Gehirn dienen und eine Suppression der Exosomenproduktion potenziell krankheitsmodulierende Effekte haben könnte.<sup>241</sup> Allerdings konzentrierte sich jene Forschungsgruppe auf A $\beta$ -Oligomere innerhalb von Exosomen, wohingegen in dieser Forschungsarbeit Oberflächeninteraktionen untersucht wurden.

Darüber hinaus führt die genetische Unterdrückung der nSMase 2, einem Schlüsselenzym der Biogenese von Exosomen, zur Verbesserung der kognitiven Defizite in einem Alzheimer-Maus-Modell, den 5xFAD-Mäusen. Jedoch konnte in diesen Mäusen ein höherer Anteil an löslichem A $\beta$ <sub>42</sub> nachgewiesen werden.<sup>242</sup> Unter der Annahme, dass zu diesen auch vermehrt lösliche A $\beta$ -Oligomere gehören, sind weitere von Exosomen unabhängige und kognitionsfördernde Faktoren der genetischen Modifikation nicht ausgeschlossen und sollten weiter untersucht werden.

Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass der Einfluss auf die Aggregation von A $\beta$  vom Zelltyp und Typ der extrazellulären Vesikel abhängig ist. So scheinen EV's Einfluss auf die Bildung, den Transport und den Abbau verschiedener A $\beta$ -Aggregatzustände zu nehmen. Ob dies eine physiologische Funktion erfüllt, im Gesunden ein Gleichgewicht zwischen A $\beta$ -Bildung und -Abbau existiert und inwieweit das im AD-Metabolismus gestört ist, wird bisher kontrovers diskutiert und bedarf

weiterer Forschung. Erschwert wird dies allerdings durch die technischen Grenzen einer exakten Aufreinigung und Trennung von Exosomen, Mikrovesikeln und apoptotischen Körperchen. So können Verunreinigungen der verschiedenen Präparationen schnell zu widersprüchlichen Ergebnissen führen.

Die Daten dieser Forschungsarbeit implizieren in der Zusammenschau eine neuroprotektive Rolle von PrP<sup>C</sup> auf neuronalen Exosomen. Einerseits ist anzunehmen, dass durch die Bindung mit konsekutiver vermehrter Aggregation des Amyloids zu Amyloidfibrillen und letztlich Plaques die Menge von löslichen A $\beta$ -Oligomeren reduziert wird und andererseits könnte ein weiterer Mechanismus die Menge an toxischen A $\beta$  zusätzlich reduzieren. So wird exosomal gebundenes A $\beta$  durch Mikrogliazellen aufgenommen und lysosomal abgebaut. *In vitro* kam es durch diesen Mechanismus zu einer signifikanten Reduktion des extrazellulären Amyloids.<sup>217</sup> Obwohl Mikrogliazellen auch freies A $\beta$  aufnehmen und abbauen, könnte die vorhergehende Bindung an Exosomen einen effektiveren Mechanismus darstellen<sup>243</sup>. Die zunehmende Erkenntnis über Bildung, Interaktionen und den Abbau von A $\beta$  liefert weitere Ansatzpunkte zur Entwicklung einer effektiven und nebenwirkungsarmen Therapie von Morbus Alzheimer.

## 5. Zusammenfassung

Morbus Alzheimer (AD) ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Form der Demenz<sup>1</sup>. Gemäß der Amyloid-Hypothese trägt eine Störung des Gleichgewichts von A $\beta$ -Bildung und -Abbau wesentlich zur Pathogenese der Erkrankung bei<sup>12</sup>. Dabei wirken insbesondere lösliche A $\beta$ -Oligomere neurotoxisch<sup>100</sup> und deren Menge korreliert mit der Schwere der Kognitionseinschränkung<sup>105</sup>. Zelluläres Prion-Protein (PrP<sup>C</sup>) konnte als hochaffiner Rezeptor für A $\beta$ -Oligomere identifiziert werden<sup>115</sup>. Wahrscheinlich kommt es über eine pathologische Signalkaskade über die Fyn-Kinase zu A $\beta$ -vermittelter Synaptotoxizität und Inhibierung der Langzeit-Potenzierung<sup>161</sup>. Neuere Forschungsergebnisse weisen zudem auf eine wichtige Funktion von Exosomen in der Pathogenese von AD hin. Exosomen sind kleine extrazelluläre Vesikel endosomalen Ursprungs und scheinen eine wichtige Funktion im interzellulären Transport von Molekülen zu erfüllen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Exosomen die Aggregation und anschließend die Aufnahme und den Abbau von A $\beta$  durch Mikrogliazellen fördern<sup>217</sup>. Der Einfluss von Exosomen auf den AD-Metabolismus wird allerdings kontrovers diskutiert.

Da sich PrP<sup>C</sup> angereichert auf Exosomen findet, war Ziel dieser Doktorarbeit der Nachweis einer PrP<sup>C</sup>-abhängigen Bindung von A $\beta$  an Exosomen. Hierfür wurde zunächst eine murine PrP<sup>C</sup>-Knock-Out-Zelllinie mittels Transcription-Activator-like Effector Nukleasen (TALEN) generiert. Unter Verwendung dieser mit ihrer parental Wildtyp-Zelllinie, sowie SH-SY5Y-Zellen, welche keine detektierbaren Level von PrP<sup>C</sup> exprimieren mit SH-SY5Y-Zellen, welche stabil mit PrP<sup>C</sup> transfiziert wurden, konnte eine PrP<sup>C</sup>-abhängige Bindung von A $\beta$  an Exosomen nachgewiesen werden. Die Exosomen der verschiedenen Zelllinien unterschieden sich weder in Größe noch in analysierter Proteinzusammensetzung. In einem neu etablierten Aggregationsassay konnte zudem bewiesen werden, dass PrP<sup>C</sup>-exprimierende neuronale Exosomen die Aggregation von A $\beta$  katalysieren. Postuliert wird korrespondierend zu aktuellen Forschungsergebnissen eine neuroprotektive Funktion von exosomal PrP<sup>C</sup> über Förderung der Aggregation mit Bildung nicht-toxischer Amyloid-Fibrillen. Die Ergebnisse tragen wesentlich zum Verständnis des A $\beta$ -Metabolismus in AD bei. Zur Klärung einer therapeutischen Konsequenz bedarf es jedoch weiterer *in vivo* Studien.

## 6. Summary

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease and the most common form of dementia<sup>1</sup>. According to the Amyloid Hypothesis A $\beta$  generation and deposition are the main reasons for developing AD<sup>12</sup>. Especially A $\beta$  oligomers seem to have the most neurotoxic effects<sup>100</sup> and the overall amount of soluble A $\beta$  highly correlates with disease severity<sup>105</sup>. The cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) was identified as a high-affinity receptor for A $\beta$  oligomers<sup>115</sup> and this interaction seems to mediate the synaptotoxicity and the suppression of long term potentiation via an activation of Fyn-Kinase<sup>161</sup>. Furthermore, recent findings highlight the importance of exosomes, small extracellular vesicles of endosomal origin, in pathogenesis of AD. It was shown that exosomes drive the fibrillization of A $\beta$  and promote the uptake of A $\beta$  aggregates by microglial cells for degradation<sup>217</sup>. Nevertheless, the role of exosomes in AD is still subject of a controversial debate.

Since cellular prion protein is found highly enriched on exosomes, subject of this thesis was the proof of PrP<sup>C</sup>-dependent binding of A $\beta$  to exosomes. For this reason, a murine N2a-PrP<sup>C</sup>-KnockOut-Cellline was generated using transcription activator-like effector nucleases (TALEN). Using this cell line and their parental wildtype cell line, as well as human SH-SY5Y-Cells, which do not express detectable amounts of PrP<sup>C</sup> in correlation to SH-SY5Y-Cells, stably transfected with PrP<sup>C</sup>; it was possible to proof a PrP<sup>C</sup>-dependent binding of A $\beta$  to exosomes. The exosomes of the different cell lines did not differ in size or analysed protein composition. In a newly established aggregation assay it was shown that PrP<sup>C</sup>-expressing neuronal exosomes catalyse the aggregation of toxic soluble A $\beta$  into non-toxic A $\beta$  aggregates and therefore possibly have a neuroprotective function in AD. To investigate possible therapeutic applications of these results more studies on exosomal PrP<sup>C</sup> and its impact on A $\beta$  metabolism *in vivo* are required.

## 7. Liste der Abbildungen

- Abb. 1.1 Senile Plaques und Neurofibrilläre Bündel
- Abb. 1.2 Proteolytische Prozessierung von APP
- Abb. 1.3 Aggregation von Amyloid $\beta$
- Abb. 1.4 Schematische Darstellung von murinen PrP<sup>C</sup> und dessen proteolytische Prozessierung
- Abb. 1.5 Genese von Exosomen
- Abb. 3.1 Repräsentativer Aufbau eines TALEN-Proteins
- Abb. 3.2 Erzeugen eines Doppelstrangbruchs mit Hilfe der TALEN-Methode
- Abb. 3.3 Immunfluoreszenzfärbung nach Transfektion mit den TALEN-Konstrukten und Selektion eines EGFP-positiven Klons
- Abb. 3.4 Western-Blot-Analyse der EGFP-positiven Klone
- Abb. 3.5 Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer Messung mit Nanoparticle Tracking Analyse (NTA)
- Abb. 3.6 Größenverteilung der Exosomen
- Abb. 3.7 PrP<sup>C</sup> auf Exosomen von A: SH-SY5Y-PrP(+)- und B: N2a-PrP-WT-Zellen
- Abb. 3.8 Größenvergleich von SH-SY5Y-PrP(+) und SH-SY5Y-PrP(-) nach Inkubation mit A $\beta$
- Abb. 3.9 Exosomen der SH-SY5Y-PrP(+)-Zellen binden A $\beta$ <sub>42</sub>
- Abb. 3.10 Exosomen der N2a-WT-Zellen binden A $\beta$ <sub>42</sub>
- Abb. 3.11 ThT-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit zur A $\beta$ -Konzentration
- Abb. 3.12 Die ThT-Fluoreszenzintensität korreliert mit der A $\beta$ -Konzentration
- Abb. 3.13 PrP<sup>C</sup>-exprimierende Exosomen fördern die Aggregation von A $\beta$ <sub>42</sub>

## 8. Liste der Tabellen

Tab. 2.1	Geräte und Zubehör
Tab. 2.2	Verbrauchsmaterialien
Tab. 2.3	Chemikalien und Puffer
Tab. 2.4	Enzyme
Tab. 2.5	Laborkits
Tab. 2.6	Antikörper
Tab. 2.7	Software
Tab. 2.8	Zellkulturmedien und Medienzusätze
Tab. 2.9	Bakterien und Zelllinien
Tab. 2.10	Zusammensetzung Lösung der Colony-PCR
Tab. 2.11	PCR-Zyklus für Colony-PCR
Tab. 2.12	TALEN-RVD's und der dazugehörige Prnp-Locus
Tab. 2.13	Golden Gate Reaktion #1
Tab. 2.14	RVD's für Reaktion 1a
Tab. 2.15	RVD's für Reaktion 1b
Tab. 2.16	Colony-PCR-Programm für pFUS-Vektoren
Tab. 2.17	Golden Gate Reaktion #2
Tab. 2.18	pLR-Vektoren der TALEN
Tab. 2.19	Zusammensetzung SDS-Page
Tab. 3.1	TALEN-RVD's und der dazugehörige Prnp-Locus

## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	„Alzheimer’s Disease“, Morbus Alzheimer
AICD	„Amyloid intracellular domain“
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMPA-Rez.	„ $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor“
Anm.	Anmerkung
AP	Alkalische Phosphatase
APH-1	„anterior pharynx-defective 1“
APLP	„APP like Protein“
Apo $\epsilon$ -4	Apolipoprotein-E4-Genallel
APP	„Amyloid-Precursor-Protein“, Amyloid-Vorläufer-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure/n
ATP	Adenosintriphosphat
A $\beta$	Amyloid $\beta$
BACE-1	„Beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1“, $\beta$ -Sekretase
BSA	„Bovine Serum Albumin“, Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
Bzw.	Beziehungsweise
CJD	„Creutzfeldt-Jakob-Disease“, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“, Zellmedium
DMEM-F12	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“: Nutrient Mixture F-12, Zellmedium mit speziellen Nährstoffzusätzen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA / DNS	„Desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP’s	Desoxynukleosidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbruch
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“, verstärkt grün-fluoreszierendes Protein
EOAD	„Early-onset Alzheimer-Disease“, präsenile Form von AD
ESCRT	„endosomal sorting complex required for transport“
esRNA	„exosomal shuttle RNA“, RNA welche mittels Exosomen zwischen Zellen transportiert und in der Empfängerzelle translatiert wird
EV	Extrazelluläre Vesikel
FAD	„Familiar Alzheimer Disease“, familiäre Alzheimer-Erkrankung
FBS	„Fetal bovine serum“, Fetales Kälberserum
FCS	„Fetal calf serum“, Fetales Kälberserum

FFI	„Fatal Familial Insomnia“, Letale Familiäre Insomnie
FTD-P 17	Frontotemporale Demenz mit Parkinson-Symptomatik assoziiert mit Chromosom 17
G418	Geneticin
GM130	Golgi Markerprotein 130
GPI	Glukosyl-Phosphatidyl-Inositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
HRP	„Horseradish peroxidase“, Meerrettichperoxidase
HSP	„Heat shock proteins“, Hitzeschockproteine
IgG	Immunglobulin G
ILV	Intraluminale Vesikel
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRES	„Internal ribosomal entry site“, Interne ribosomale Eintrittsstelle
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Lysogeny broth
LOAD	„Late-onset Alzheimer-Disease“, senile Form von AD
LTD	„Long-term depression“ Langzeit-Depression
LTP	„Long-term potentiation“ Langzeitpotenzierung
MCI	„Mild cognitive impairment“, milde kognitive Störung
MHC	„Major Histocompatibility Complex“, Haupthistokompatibilitätskomplex
MV	Mikrovesikel
MVB	„Multivesicular body“, multivesikuläre Körperchen
N2a	Neuro2a, Neuroblastom-Zelllinie der Maus
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NHEJ	Non-homologous end-joining
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP-40	Polyethylenglycol(40)-nonylphenolether
NTA	„Nanoparticle Tracking Analysis Software“, Software des Nanosight-LM10
N-Terminus	Amino-Terminus
PBS	„Phosphat buffered saline“, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
PCR	„Polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PEN-2	„Presenilin enhancer 2“
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Proteaseinhibitor)
PRNP	PrP <sup>C</sup> kodierender Genlocus
PrP <sup>C</sup>	Zelluläres Prion-Protein
PrP <sup>Sc</sup>	Prion-Protein Scrapie
PSEN 1/2	Präsenilin-Gen 1/2
RIPA	„Radioimmunoprecipitation assay“

RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
rpm	„Rounds per minute“, Umdrehungen die Minute
RT	Raumtemperatur
RVD	„Repeat variable di-residue“
s. Abb.	Siehe Abbildung
s.Tab.	Siehe Tabelle
sAPP $\alpha$ /sAPP $\beta$	Sekretorische APP-Fragmente nach $\alpha$ - bzw. $\beta$ -Sekretase-Spaltung
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	„Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH-SY5Y	Neuroblastom-Zelllinie des Menschen
Spec	Spectinomycin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	„Transcription Activator-like“
TALEN	„Transcription Activator-like Effector Nuclease“
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
ThT	Thioflavin T
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSE	„Transmissible spongiform Encephalopathy“
Tsg101	„Tumor susceptibility 101“
UTR	„untranslated region“
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 10. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization & Alzheimer's Disease International. Dementia: a public health priority. 112 (2012).
2. Hirtz, D. et al. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* **68**, 326-37 (2007).
3. Blessed, G., Tomlinson, B.E. & Roth, M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* **114**, 797-811 (1968).
4. Querfurth, H.W. & LaFerla, F.M. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **362**, 329-44 (2010).
5. Grundke-Iqbal, I. et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-7 (1986).
6. Kosik, K.S., Joachim, C.L. & Selkoe, D.J. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4044-8 (1986).
7. Wood, J.G., Mirra, S.S., Pollock, N.J. & Binder, L.I. Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4040-3 (1986).
8. Masters, C.L. et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4245-9 (1985).
9. Gorevic, P.D. et al. Isolation and partial characterization of neurofibrillary tangles and amyloid plaque core in Alzheimer's disease: immunohistological studies. *J Neuropathol Exp Neurol* **45**, 647-64 (1986).
10. Selkoe, D.J., Abraham, C.R., Podlisny, M.B. & Duffy, L.K. Isolation of low-molecular-weight proteins from amyloid plaque fibers in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **46**, 1820-34 (1986).
11. Kang, J. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733-6 (1987).
12. Hardy, J. & Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-6 (2002).
13. Tanzi, R.E. & Bertram, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-55 (2005).
14. Hardy, J.A. & Higgins, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-5 (1992).
15. Hardy, J. & Allsop, D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 383-8 (1991).
16. Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* **64**, 146 - 8 (1907).
17. Kraepelin, E. Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte. *Barth Verlag* (1910).
18. 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. *Alzheimers Dement* **7**, 270-9 (2011).
19. Grehl, H. & Reinhardt, F. *Checkliste Neurologie*, (2016).
20. Sclan, S.G. & Kanowski, S. Alzheimer's disease: stage-related interventions. *Lippincotts Case Manag* **6**, 48-60; quiz 61-3 (2001).
21. Kumar, A. & Tsao, J.W. Alzheimer Disease. in *StatPearls* (StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL), 2019).
22. Wattmo, C., Londos, E. & Minthon, L. Risk factors that affect life expectancy in Alzheimer's disease: a 15-year follow-up. *Dement Geriatr Cogn Disord* **38**, 286-99 (2014).

23. Braak, H. & Braak, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-59 (1991).
24. Weintraub, S., Wicklund, A.H. & Salmon, D.P. The Neuropsychological Profile of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(2012).
25. Weintraub, S. & Mesulam, M. With or without FUS, it is the anatomy that dictates the dementia phenotype. *Brain* **132**, 2906-8 (2009).
26. Morris, J.C. et al. Cerebral amyloid deposition and diffuse plaques in "normal" aging: Evidence for presymptomatic and very mild Alzheimer's disease. *Neurology* **46**, 707-19 (1996).
27. Sperling, R.A. et al. Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron* **63**, 178-88 (2009).
28. Perrin, R.J., Fagan, A.M. & Holtzman, D.M. Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* **461**, 916-22 (2009).
29. Wanleenuwat, P., Iwanowski, P. & Kozubski, W. Alzheimer's dementia: pathogenesis and impact of cardiovascular risk factors on cognitive decline. *Postgrad Med* **131**, 415-422 (2019).
30. Silva, M.V.F. et al. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci* **26**, 33 (2019).
31. Strittmatter, W.J. et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1977-81 (1993).
32. 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* **261**, 921-3 (1993).
33. Castellano, J.M. et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance. *Sci Transl Med* **3**, 89ra57 (2011).
34. Cerf, E., Gustot, A., Goormaghtigh, E., Ruysschaert, J.M. & Raussens, V. High ability of apolipoprotein E4 to stabilize amyloid-beta peptide oligomers, the pathological entities responsible for Alzheimer's disease. *Faseb j* **25**, 1585-95 (2011).
35. Zannis, V.I., Just, P.W. & Breslow, J.L. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* **33**, 11-24 (1981).
36. Daw, E.W. et al. The Number of Trait Loci in Late-Onset Alzheimer Disease. *Am J Hum Genet* **66**, 196-204 (2000).
37. Hyman, B.T. et al. Apolipoprotein E epsilon4/4 in a neuropathologically normal very elderly individual. *Arch Neurol* **53**, 215 (1996).
38. Giri, M., Zhang, M. & Lu, Y. Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging* **11**, 665-81 (2016).
39. Zekanowski, C., Religa, D., Graff, C., Filipek, S. & Kuznicki, J. Genetic aspects of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Exp (Wars)* **64**, 19-31 (2004).
40. Sherrington, R. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**, 754-60 (1995).
41. Schellenberg, G.D. et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* **258**, 668-71 (1992).
42. Levy-Lahad, E. et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* **269**, 973-7 (1995).
43. Rogaev, E.I. et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* **376**, 775-8 (1995).
44. Mullan, M. et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* **1**, 345-7 (1992).
45. Goate, A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-6 (1991).
46. De Strooper, B. et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391**, 387-90 (1998).

47. Wolfe, M.S., De Los Angeles, J., Miller, D.D., Xia, W. & Selkoe, D.J. Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **38**, 11223-30 (1999).
48. Tanzi, R.E. et al. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* **235**, 880-4 (1987).
49. Robakis, N.K., Ramakrishna, N., Wolfe, G. & Wisniewski, H.M. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4190-4 (1987).
50. Godyn, J., Jonczyk, J., Panek, D. & Malawska, B. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Rep* **68**, 127-38 (2016).
51. Davies, P. & Maloney, A.J. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 1403 (1976).
52. McKeage, K. Memantine: a review of its use in moderate to severe Alzheimer's disease. *CNS Drugs* **23**, 881-97 (2009).
53. Puyal, J., Ginet, V. & Clarke, P.G. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol* **105**, 24-48 (2013).
54. Cacabelos, R. et al. Novel Therapeutic Strategies for Dementia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **15**, 141-241 (2016).
55. Cummings, J.L., Morstorf, T. & Zhong, K. Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res Ther* **6**, 37 (2014).
56. Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J. & Younkin, S.G. Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* **255**, 728-30 (1992).
57. Coulson, E.J., Paliga, K., Beyreuther, K. & Masters, C.L. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int* **36**, 175-84 (2000).
58. Puig, K.L. & Combs, C.K. Expression and function of APP and its metabolites outside the central nervous system. *Exp Gerontol* **48**, 608-11 (2013).
59. van der Kant, R. & Goldstein, L.S. Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev Cell* **32**, 502-15 (2015).
60. Dawkins, E. & Small, D.H. Insights into the physiological function of the beta-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem* **129**, 756-69 (2014).
61. Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P. & Abraham, W.C. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* **70**, 1-32 (2003).
62. Zheng, H. & Koo, E.H. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* **6**, 27 (2011).
63. Anliker, B. & Muller, U. The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* **3**, 239-46 (2006).
64. Wasco, W. et al. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10758-62 (1992).
65. Wasco, W. et al. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* **5**, 95-100 (1993).
66. Walsh, D.M. et al. The APP family of proteins: similarities and differences. *Biochem Soc Trans* **35**, 416-20 (2007).
67. Haass, C. et al. Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci* **695**, 109-16 (1993).
68. Haass, C., Hung, A.Y., Schlossmacher, M.G., Teplow, D.B. & Selkoe, D.J. beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* **268**, 3021-4 (1993).

69. Vassar, R. BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* **23**, 105-14 (2004).
70. Sinha, S. et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* **402**, 537-40 (1999).
71. Vassar, R. et al. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735-41 (1999).
72. Edbauer, D. et al. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* **5**, 486-8 (2003).
73. De Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* **38**, 9-12 (2003).
74. Steiner, H., Fluhrer, R. & Haass, C. Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem* **283**, 29627-31 (2008).
75. Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y.W. & Xu, H. Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* **120 Suppl 1**, 9-21 (2012).
76. Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G. & Sisodia, S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006270 (2012).
77. Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W. & De Strooper, B. The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem* **78**, 1168-78 (2001).
78. Gao, Y. & Pimplikar, S.W. The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14979-84 (2001).
79. Hung, A.Y. et al. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem* **268**, 22959-62 (1993).
80. Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W. & Lee, V.M. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem* **275**, 2568-75 (2000).
81. Cordy, J.M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N.M. & Turner, A.J. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11735-40 (2003).
82. Harris, B., Pereira, I. & Parkin, E. Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain Res* **1296**, 203-15 (2009).
83. Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. & Simons, K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* **160**, 113-23 (2003).
84. Rajendran, L. et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11172-7 (2006).
85. Kamenetz, F. et al. APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**, 925-37 (2003).
86. Glenner, G.G. & Wong, C.W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* **120**, 885-90 (1984).
87. Glenner, G.G. & Wong, C.W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1131-5 (1984).
88. Haass, C. et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* **359**, 322-5 (1992).
89. 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 U S A* **90**, 2092-6 (1993).
90. Seubert, P. et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* **359**, 325-7 (1992).

91. Shoji, M. et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-9 (1992).
92. Yao, Z.X. & Papadopoulos, V. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *Faseb j* **16**, 1677-9 (2002).
93. Bailey, J.A., Maloney, B., Ge, Y.W. & Lahiri, D.K. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid beta-peptide interacting domain (AbetaID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene* **488**, 13-22 (2011).
94. Morley, J.E. et al. A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis* **19**, 441-9 (2010).
95. Carson, J.A. & Turner, A.J. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J Neurochem* **81**, 1-8 (2002).
96. Jarrett, J.T., Berger, E.P. & Lansbury, P.T., Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-7 (1993).
97. Klein, A.M., Kowall, N.W. & Ferrante, R.J. Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex. *Ann N Y Acad Sci* **893**, 314-20 (1999).
98. Kumar, S. & Walter, J. Phosphorylation of amyloid beta (Abeta) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* **3**, 803-12 (2011).
99. Ni, C.L., Shi, H.P., Yu, H.M., Chang, Y.C. & Chen, Y.R. Folding stability of amyloid-beta 40 monomer is an important determinant of the nucleation kinetics in fibrillization. *Faseb j* **25**, 1390-401 (2011).
100. Walsh, D.M. & Selkoe, D.J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* **101**, 1172-84 (2007).
101. Walsh, D.M. et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**, 535-9 (2002).
102. Lesne, S. et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352-7 (2006).
103. Terry, R.D. et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572-80 (1991).
104. Lue, L.F. et al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **155**, 853-62 (1999).
105. McLean, C.A. et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **46**, 860-6 (1999).
106. Lambert, M.P. et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6448-53 (1998).
107. Haass, C. & Selkoe, D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-12 (2007).
108. Lacor, P.N. et al. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **27**, 796-807 (2007).
109. Li, S. et al. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* **62**, 788-801 (2009).
110. Lynch, M.A. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* **84**, 87-136 (2004).
111. Tomiyama, T. et al. A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* **63**, 377-87 (2008).
112. Nilsberth, C. et al. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* **4**, 887-93 (2001).
113. Hutton, M. et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* **393**, 702-5 (1998).
114. Spires-Jones, T.L. & Hyman, B.T. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* **82**, 756-71 (2014).

115. Lauren, J., Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Gilbert, J.W. & Strittmatter, S.M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**, 1128-32 (2009).
116. Onodera, T. Dual role of cellular prion protein in normal host and Alzheimer's disease. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **93**, 155-173 (2017).
117. Brown, H.R. et al. The mRNA encoding the scrapie agent protein is present in a variety of non-neuronal cells. *Acta Neuropathol* **80**, 1-6 (1990).
118. Caughey, B., Race, R.E. & Chesebro, B. Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines. *J Gen Virol* **69** ( Pt 3), 711-6 (1988).
119. Kretzschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E. & DeArmond, S.J. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* **122**, 1-5 (1986).
120. Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K. & Prusiner, S.B. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229-40 (1987).
121. Taylor, D.R. & Hooper, N.M. The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol* **23**, 89-99 (2006).
122. Zahn, R. et al. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 145-50 (2000).
123. Altmeyden, H.C. et al. Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *Am J Neurodegener Dis* **1**, 15-31 (2012).
124. Aguzzi, A., Baumann, F. & Bremer, J. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* **31**, 439-77 (2008).
125. Linden, R. et al. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* **88**, 673-728 (2008).
126. Bueler, H. et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-82 (1992).
127. Steele, A.D., Lindquist, S. & Aguzzi, A. The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion* **1**, 83-93 (2007).
128. Isaacs, J.D., Jackson, G.S. & Altmann, D.M. The role of the cellular prion protein in the immune system. *Clin Exp Immunol* **146**, 1-8 (2006).
129. Mange, A., Milhavel, O., Umlauf, D., Harris, D. & Lehmann, S. PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells. *FEBS Lett* **514**, 159-62 (2002).
130. Mouillet-Richard, S. et al. Signal transduction through prion protein. *Science* **289**, 1925-8 (2000).
131. Watt, N.T. & Hooper, N.M. The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends Biochem Sci* **28**, 406-10 (2003).
132. Brown, D.R. Prion protein expression modulates neuronal copper content. *J Neurochem* **87**, 377-85 (2003).
133. Roucou, X. & LeBlanc, A.C. Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion diseases. *J Mol Med (Berl)* **83**, 3-11 (2005).
134. Guillot-Sestier, M.V., Sunyach, C., Druon, C., Scarzello, S. & Checler, F. The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **284**, 35973-86 (2009).
135. Khosravani, H. et al. Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol* **181**, 551-65 (2008).
136. Prusiner, S.B. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13363-83 (1998).
137. Prusiner, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-44 (1982).
138. Gerstmann, J. Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphanomen bei einer Erkrankung des zerebellaren Systems. *Medizin Wochenschr* **78**, 906-8 (1928).
139. Gerstmann, J., Sträussler, E. & Scheinker, I. Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für Neurologie* **154**, 736-62 (1936).
140. Lugaresi, E. et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* **315**, 997-1003 (1986).

141. Gajdusek, D.C. & Zigas, V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* **257**, 974-8 (1957).
142. Wells, G.A. et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* **121**, 419-20 (1987).
143. Prusiner, S.B. The prion diseases. *Brain Pathol* **8**, 499-513 (1998).
144. McKinley, M.P., Bolton, D.C. & Prusiner, S.B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**, 57-62 (1983).
145. Brandner, S. et al. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**, 339-43 (1996).
146. Brandner, S. et al. Normal host prion protein (PrP<sup>C</sup>) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13148-51 (1996).
147. Maignien, T., Lasmezas, C.I., Beringue, V., Dormont, D. & Deslys, J.P. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol* **80** (Pt 11), 3035-42 (1999).
148. Prinz, M. et al. Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 919-24 (2002).
149. Beekes, M. & McBride, P.A. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* **278**, 181-4 (2000).
150. Weissmann, C., Enari, M., Klohn, P.C., Rossi, D. & Flechsig, E. Transmission of prions. *J Infect Dis* **186** Suppl 2, S157-65 (2002).
151. Glatzel, M. & Aguzzi, A. Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes Infect* **2**, 613-9 (2000).
152. Harris, D.A. Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* **12**, 429-44 (1999).
153. Kanu, N. et al. Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr Biol* **12**, 523-30 (2002).
154. Baron, G.S., Wehrly, K., Dorward, D.W., Chesebro, B. & Caughey, B. Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP<sup>res</sup> (PrP<sup>Sc</sup>) into contiguous membranes. *Embo j* **21**, 1031-40 (2002).
155. Schatzl, H.M. et al. A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J Virol* **71**, 8821-31 (1997).
156. Fevrier, B. et al. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9683-8 (2004).
157. Gimbel, D.A. et al. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* **30**, 6367-74 (2010).
158. Dohler, F. et al. High molecular mass assemblies of amyloid-beta oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease. *Brain* **137**, 873-86 (2014).
159. Rushworth, J.V., Griffiths, H.H., Watt, N.T. & Hooper, N.M. Prion protein-mediated toxicity of amyloid-beta oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1. *J Biol Chem* **288**, 8935-51 (2013).
160. Um, J.W. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* **79**, 887-902 (2013).
161. Um, J.W. et al. Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci* **15**, 1227-35 (2012).
162. Um, J.W. & Strittmatter, S.M. Amyloid-beta induced signaling by cellular prion protein and Fyn kinase in Alzheimer disease. *Prion* **7**, 37-41 (2013).
163. Larson, M. et al. The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric Abeta with pathological tau changes in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **32**, 16857-71a (2012).
164. Schwarze-Eicker, K. et al. Prion protein (PrP<sup>C</sup>) promotes beta-amyloid plaque formation. *Neurobiol Aging* **26**, 1177-82 (2005).
165. Ferrer, I. et al. Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **101**, 49-56 (2001).
166. Berr, C. et al. Polymorphism of the codon 129 of the prion protein (PrP) gene and neuropathology of cerebral ageing. *Acta Neuropathol* **106**, 71-4 (2003).

167. 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* **27**, 770.e1-770.e5 (2006).
168. Dermaut, B. et al. PRNP Val129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **53**, 409-12 (2003).
169. Riemenschneider, M. et al. Prion protein codon 129 polymorphism and risk of Alzheimer disease. *Neurology* **63**, 364-6 (2004).
170. Parkin, E.T. et al. Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11062-7 (2007).
171. Fluharty, B.R. et al. An N-terminal fragment of the prion protein binds to amyloid-beta oligomers and inhibits their neurotoxicity in vivo. *J Biol Chem* **288**, 7857-66 (2013).
172. Biasini, E., Turnbaugh, J.A., Unterberger, U. & Harris, D.A. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci* **35**, 92-103 (2012).
173. Kessels, H.W., Nguyen, L.N., Nabavi, S. & Malinow, R. The prion protein as a receptor for amyloid-beta. *Nature* **466**, E3-4; discussion E4-5 (2010).
174. Balducci, C. et al. Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2295-300 (2010).
175. Calella, A.M. et al. Prion protein and Abeta-related synaptic toxicity impairment. *EMBO Mol Med* **2**, 306-14 (2010).
176. Pisitkun, T., Shen, R.F. & Knepper, M.A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13368-73 (2004).
177. Ogawa, Y. et al. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull* **34**, 13-23 (2011).
178. Vella, L.J. et al. Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol* **211**, 582-90 (2007).
179. Caby, M.P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. & Bonnerot, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* **17**, 879-87 (2005).
180. Faure, J. et al. Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* **31**, 642-8 (2006).
181. Lachenal, G. et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci* **46**, 409-18 (2011).
182. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* **97**, 329-39 (1983).
183. Gurunathan, S., Kang, M.H., Jeyaraj, M., Qasim, M. & Kim, J.H. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* **8**(2019).
184. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* **200**, 373-83 (2013).
185. Thery, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2**, 569-79 (2002).
186. 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* **1**(2012).
187. Katzmann, D.J., Babst, M. & Emr, S.D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-55 (2001).
188. Hicke, L. A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* **106**, 527-30 (2001).
189. Reggiori, F. & Pelham, H.R. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Embo j* **20**, 5176-86 (2001).
190. Stuffers, S., Sem Wegner, C., Stenmark, H. & Brech, A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic* **10**, 925-37 (2009).

191. Yanez-Mo, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* **4**, 27066 (2015).
192. Savina, A., Furlan, M., Vidal, M. & Colombo, M.I. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem* **278**, 20083-90 (2003).
193. Escola, J.M. et al. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**, 20121-7 (1998).
194. van Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S. & Raposo, G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* **140**, 13-21 (2006).
195. Wubbolts, R. et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* **278**, 10963-72 (2003).
196. Valadi, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654-9 (2007).
197. Fevrier, B. & Raposo, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 415-21 (2004).
198. Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M. & Johnstone, R.M. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* **101**, 942-8 (1985).
199. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 575-81 (2009).
200. Kramer-Albers, E.M. et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? *Proteomics Clin Appl* **1**, 1446-61 (2007).
201. Guitart, K. et al. Improvement of neuronal cell survival by astrocyte-derived exosomes under hypoxic and ischemic conditions depends on prion protein. *Glia* **64**, 896-910 (2016).
202. Glebov, K. et al. Serotonin stimulates secretion of exosomes from microglia cells. *Glia* **63**, 626-34 (2015).
203. Bakhti, M., Winter, C. & Simons, M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem* **286**, 787-96 (2011).
204. Wang, S. et al. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J Neurosci* **31**, 7275-90 (2011).
205. Vella, L.J., Greenwood, D.L., Cappai, R., Scheerlinck, J.P. & Hill, A.F. Enrichment of prion protein in exosomes derived from ovine cerebral spinal fluid. *Vet Immunol Immunopathol* **124**, 385-93 (2008).
206. Arellano-Anaya, Z.E. et al. Prion strains are differentially released through the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci* **72**, 1185-96 (2015).
207. Vilette, D. et al. Efficient inhibition of infectious prions multiplication and release by targeting the exosomal pathway. *Cell Mol Life Sci* **72**, 4409-27 (2015).
208. Porto-Carreiro, I., Fevrier, B., Paquet, S., Vilette, D. & Raposo, G. Prions and exosomes: from PrP<sup>C</sup> trafficking to PrP<sup>Sc</sup> propagation. *Blood Cells Mol Dis* **35**, 143-8 (2005).
209. Jeon, I. et al. Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. *Acta Neuropathol* **132**, 577-92 (2016).
210. Silverman, J.M. et al. Disease Mechanisms in ALS: Misfolded SOD1 Transferred Through Exosome-Dependent and Exosome-Independent Pathways. *Cell Mol Neurobiol* **36**, 377-81 (2016).
211. Sharples, R.A. et al. Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. *Faseb j* **22**, 1469-78 (2008).
212. Perez-Gonzalez, R., Gauthier, S.A., Kumar, A. & Levy, E. The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *J Biol Chem* **287**, 43108-15 (2012).

213. Vingtdoux, V., Sergeant, N. & Buee, L. Potential contribution of exosomes to the prion-like propagation of lesions in Alzheimer's disease. *Front Physiol* **3**, 229 (2012).
214. 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**, 124 (2012).
215. An, K. et al. Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of Abeta assemblies in vivo. *Mol Brain* **6**, 47 (2013).
216. Yuyama, K. et al. Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J Biol Chem* **289**, 24488-98 (2014).
217. Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S. & Igarashi, Y. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia. *J Biol Chem* **287**, 10977-89 (2012).
218. Yuyama, K. et al. A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid-beta peptide. *FEBS Lett* **589**, 84-8 (2015).
219. Winston, C.N. et al. Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile. *Alzheimers Dement (Amst)* **3**, 63-72 (2016).
220. Fiandaca, M.S. et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers Dement* **11**, 600-7.e1 (2015).
221. Eitan, E. et al. Extracellular Vesicle-Associated Abeta Mediates Trans-Neuronal Bioenergetic and Ca(2+)-Handling Deficits in Alzheimer's Disease Models. *NPJ Aging Mech Dis* **2**(2016).
222. Sardar Sinha, M. et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol* **136**, 41-56 (2018).
223. Joshi, P. et al. Microglia convert aggregated amyloid-beta into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. *Cell Death Differ* **21**, 582-93 (2014).
224. Howitt, J. & Hill, A.F. Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *J Biol Chem* **291**, 26589-26597 (2016).
225. Cermak, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res* **39**, e82 (2011).
226. Takata, M. et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo j* **17**, 5497-508 (1998).
227. 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).
228. Levine III, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* **2**, 404-410 (1993).
229. 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* **35**, 1792-800 (2014).
230. Perera, W.S. & Hooper, N.M. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol* **11**, 519-23 (2001).
231. Théry, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* **7**, 1535750 (2018).
232. Simpson, R.J., Jensen, S.S. & Lim, J.W. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* **8**, 4083-99 (2008).
233. Matsuzaki, K. & Horikiri, C. Interactions of amyloid beta-peptide (1-40) with ganglioside-containing membranes. *Biochemistry* **38**, 4137-42 (1999).

234. Choo-Smith, L.P., Garzon-Rodriguez, W., Glabe, C.G. & Surewicz, W.K. Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of Abeta-(1-40) peptide to ganglioside-containing membrane vesicles. *J Biol Chem* **272**, 22987-90 (1997).
235. Kakio, A., Nishimoto, S., Kozutsumi, Y. & Matsuzaki, K. Formation of a membrane-active form of amyloid beta-protein in raft-like model membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 514-8 (2003).
236. Sanghera, N. et al. Deciphering the molecular details for the binding of the prion protein to main ganglioside GM1 of neuronal membranes. *Chem Biol* **18**, 1422-31 (2011).
237. Nieznanski, K., Choi, J.K., Chen, S., Surewicz, K. & Surewicz, W.K. Soluble prion protein inhibits amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) fibrillization and toxicity. *J Biol Chem* **287**, 33104-8 (2012).
238. Nygaard, H.B. & Strittmatter, S.M. Cellular prion protein mediates the toxicity of beta-amyloid oligomers: implications for Alzheimer disease. *Arch Neurol* **66**, 1325-8 (2009).
239. Barry, A.E. et al. Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *J Neurosci* **31**, 7259-63 (2011).
240. Agosta, F. et al. Myeloid microvesicles in cerebrospinal fluid are associated with myelin damage and neuronal loss in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Ann Neurol* **76**, 813-25 (2014).
241. Sardar Sinha, M. et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol* **136**, 41-56 (2018).
242. Dinkins, M.B. et al. Neutral Sphingomyelinase-2 Deficiency Ameliorates Alzheimer's Disease Pathology and Improves Cognition in the 5XFAD Mouse. *J Neurosci* **36**, 8653-67 (2016).
243. Yuyama, K. & Igarashi, Y. Exosomes as Carriers of Alzheimer's Amyloid-ss. *Front Neurosci* **11**, 229 (2017).

## **11. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Glatzel für die Supervision, das kritische Hinterfragen und die herausragenden Inspirationen danken.

Des Weiteren möchte ich meiner Betreuerin Dr. Susanne Krasemann für ihre unendliche Geduld und den immerwährenden praktischen und theoretischen Beistand danken.

Besonderen Dank gilt auch dem gesamten Institut für Neuropathologie für die Unterstützung und die sehr lehrreiche Zeit.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie für ihre unermüdlichen Ermutigungen und guten Worte während meiner Arbeit an dieser Dissertation danken.

## **12. Lebenslauf**

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....