

**Steigerung der Bildung des β -Amyloid Peptids
durch Protein-vermittelte Genese
Cholesterin-reicher Membrandomänen**

Sabine Matthiesen, geb. Anderie

**Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Ludwig–Maximilians–Universität München**

Kommissarischer Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. Dietrich Seidel

**Steigerung der Bildung des β -Amyloid Peptids
durch Protein-vermittelte Genese
Cholesterin-reicher Membrandomänen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig–Maximilians–Universität zu München

vorgelegt von

Sabine Matthiesen, geb. Anderie

aus

München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Engelmann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. N. Peters

Priv. Doz. Dr. med. K. Bürger

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. S. Dlugai-Esser

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2009

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>8</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>9</u>
1.1 Grundlagen der Alzheimer-Erkrankung	9
1.1.1 Einführung.....	9
1.1.2 Geschichte	11
1.1.3 Klinik	11
1.1.4 Diagnose.....	12
1.1.5 Therapie.....	13
1.1.6 Histopathologische Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung.....	13
1.1.6.1 Neurofibrilläre Bündel.....	14
1.1.6.2 β -Amyloid Plaques	14
1.2 Entstehung des β -Amyloid Moleküls	15
1.2.1 β -Amyloid Vorläuferprotein.....	15
1.2.2 Prozessierung des Vorläuferproteins durch die α -Sekretase.....	17
1.2.3 Spaltung durch die β -Sekretase und Bildung von A β	18
1.3 Einfluss von Cholesterin auf die β -Amyloid Bildung.....	19
1.3.1 Funktionen des Cholesterins im Säugetierorganismus	19
1.3.2 Aufbau der Plasmamembran und Cholesterin-reiche Membrandomänen	19
1.3.3 Funktion Cholesterin-reicher Membrandomänen.....	22
1.4 Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I	22
1.4.1 Grundlagen.....	22
1.4.2 Funktion des Scavenger Rezeptors BI.....	23
<u>2 ZIELSETZUNG</u>	<u>25</u>
<u>3 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>26</u>
3.1 Material.....	26
3.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....	26
3.1.2 Geräte und Materialien	27
3.1.3 Zellen, Medium und Antibiotika	28
3.1.4 Antikörper und Inhibitoren.....	29
3.1.5 Marker und Standards	30
3.1.6 Plasmide und Transfektionsreagenzien	30
3.1.7 Enzyme und Nukleotide	31
3.1.8 Kits	31
3.1.9 Schaeggengel	31

3.1.10 Puffer und Lösungen	32
3.2 Methoden	35
3.2.1 Zellkultur	35
3.2.1.1 Verwendete Zelllinien	35
3.2.1.2 Auftauen der Zellen	35
3.2.1.3 Kultivierung der Zellen	36
3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl	36
3.2.1.5 Einfrieren der Zellen	37
3.2.2 Transformation und Aufreinigung der Plasmide	37
3.2.2.1 Plasmide ausschneiden	37
3.2.2.2 LB-Medium und Agaroseplatten	38
3.2.2.3 Herstellung kompetenter Escherichia coli-Stämme mit der CaCl_2 -Methode	38
3.2.2.4 CaCl_2 -Transformation	39
3.2.2.5 Aufreinigung der Plasmide	40
3.2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung	41
3.2.3 Herstellung eines leeren Vektors	41
3.2.3.1 Plasmidverdau	41
3.2.3.2 Gelelektrophorese	43
3.2.3.3 DNA-Aufreinigung	43
3.2.3.4 Auffüllen bzw. Abbau der überstehenden DNA-Enden	44
3.2.3.5 Ligation	45
3.2.3.6 CaCl_2 -Transformation	45
3.2.3.7 Plasmid-Aufreinigung	46
3.2.4 Proteinbestimmung	46
3.2.5 Transiente Transfektion	47
3.2.6 Stabile Transfektion	47
3.2.7 SDS-PAGE und Western Blot	49
3.2.7.1 Gele gießen bzw. Gele vorbereiten	49
3.2.7.2 Auftragen der Proben und Auftrennung der Proteine	49
3.2.7.3 Geltransfer auf Nitrocellulosemembran	50
3.2.7.4 Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen und Zugabe der Antikörper	50
3.2.7.5 Entwickeln der Membran	51
3.2.7.6 Strippen der Membran	51
3.2.8 Einzelne Versuchsdurchführungen	51
3.2.8.1 APP, APP α und APP β in transient transfizierten Zellen	51
3.2.8.2 A β -Immunopräzipitation	52
3.2.8.3 Dichtegradient	54
3.2.8.4 Konfokale Laserscanmikroskopie	56

4.1 Wirkung der SR-BI Expression auf die APP-Prozessierung	59
4.1.1 APP-Expression im Überstand und im Zelllysate in nicht-neuronalen Zellen	59
4.1.2 Einfluss von SR-BI auf die APP-Spaltung in neuronalen SH-SY5Y Zellen.....	62
4.1.3 Spaltung des APP-Proteins durch die α -Sekretase.....	63
4.1.4 Prozessierung des APP-Proteins durch die β -Sekretase	65
4.2 Einfluss der SR-BI Expression auf die Bildung des β -Amyloid Peptids	66
4.2.1 A β in stabil SR-BI transfizierten nicht-neuronalen Zellen.....	66
4.2.2 Bildung des A β -Peptids in neuronalen Zellen.....	68
4.3 Lokalisation von APP und BACE in Detergens-resistenten Membrandomänen	69
4.4 Zelluläre Lokalisation von APP und BACE in Abhängigkeit der SR-BI Expression.....	71
4.4.1 Lokalisation von APP und SR-BI	71
4.4.2 Lokalisation von BACE und SR-BI	73
4.4.3 APP und BACE in Kontrollzellen.....	73
4.4.4 APP und BACE in SR-BI transfizierten Zellen.....	76
<u>5 DISKUSSION</u>	78
5.1 Cholesterin als pathogenetischer Faktor der Alzheimer-Erkrankung	78
5.2 Einfluss Cholesterin-reicher Membrandomänen auf die Prozessierung des APP-Proteins	79
5.3 Cholesterin-reiche Membrandomänen und die Bildung des β -Amyloid Peptids.....	80
5.4 Lokalisation des β -Amyloid Vorläuferproteins und der β -Sekretase und deren Aufeinandertreffen in DRM nach SR-BI Expression.....	81
5.5 DRM-Isolierung mit Detergenzien und das Konzept der Lipid Rafts	82
5.6 Intrazelluläre Lokalisation der APP-Prozessierung unter Einfluss Cholesterin-reicher Membrandomänen	83
5.7 Modell für den Einfluss Cholesterin-reicher Membrandomänen auf die APP-Spaltung	84
5.8 Ausblick: Cholesterinsenkung als Therapiemöglichkeit für die Alzheimer-Erkrankung?.....	85
<u>6 ZUSAMMENFASSUNG</u>	87
<u>7 LITERATURVERZEICHNIS</u>	88
<u>8 DANKSAGUNG</u>	99
<u>9 LEBENSLAUF</u>	100

Abkürzungsverzeichnis

A β	β -amyloid
AICD	β -amyloid precursor protein intracellular domain
AK	Antikörper
APP	β -amyloid precursor protein
APPs	sekretiertes β -amyloid precursor protein
APPs α	sekretiertes α -gespaltenes APP
APPs β	sekretiertes β -gespaltenes APP
BACE 1	β -site APP cleaving enzyme 1
CaCl ₂	Calciumchlorid
CTF	C-terminales Fragment
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRM	Detergens-resistente Membrandomänen
DSM	Detergens-soluble Membrandomänen
FBS	Fetal bovine serum
HEK-293	endogen APP exprimierende HEK-(human embryonic kidney) Zellen
HEK 293-1.1	APP überexprimierende HEK-Zellen
Min.	Minute
PAS	Protein-A-Sepharose
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen
SR-BI	Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I
Std.	Stunde
U/Min.	Umdrehungen/Minute
Üst	Überstand
ZL	Zellysat

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Alzheimer-Erkrankung

1.1.1 Einführung

Demenz ist ein Begriff, der in unserer heutigen Gesellschaft zunehmend an Präsenz und Bedeutung gewonnen hat. Das Wort „Demenz“ leitet sich von dem lateinischen Ursprung „dementia“ ab und bedeutet soviel wie „ohne Geist“ oder auch unvernünftig oder wahnsinnig. Die Demenz bildet den Überbegriff für eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit einer erworbenen Störung des Gedächtnisses und des Denkvermögens verbunden sind. Betroffen sind das Kurzzeitgedächtnis mit der Lernfähigkeit für neue Informationen und die Reproduktion früherer Erinnerungen, die dem Langzeitgedächtnis untergeordnet werden. Frühere intellektuelle Fähigkeiten, wie das abstrakte Denk- und Urteilsvermögen oder die Konzentrationsfähigkeit, gehen zunehmend verloren. Es kann weiterhin zu Veränderungen der eigenen Persönlichkeit kommen, die die Motivation, die Psychomotorik, die emotionale Kontrolle und das Sozialverhalten betreffen. Alle diese Störungen treten ohne Veränderung des Bewusstseins auf und beeinträchtigen den Patienten derart, dass alltägliche private und berufliche Aktivitäten nicht mehr ohne weiteres ausgeübt werden können (Möller et al. 2005).

Etwa 1,1 Millionen der älteren Menschen leiden heute in Deutschland an einer Form der Demenz. In der Europäischen Union wird die Anzahl auf insgesamt knapp 6 Millionen und weltweit auf mindestens 24 Millionen Erkrankte geschätzt (Bickel 2008). Die häufigste Demenzerkrankung ist mit etwa 60 % die primär degenerative Demenz vom Alzheimer Typ, gefolgt von vaskulären Formen und der Lewy-Körperchen-Erkrankung (10–15 %) sowie der Frontotemporalen Demenz (ca. 5 %) (DGN 2006). Die Alzheimer-Erkrankung tritt in zwei verschiedenen Formen auf. Die häufigste Form ist die sporadische- oder senile Form der Alzheimer-Demenz. Diese betrifft v.a. alte Menschen ohne offenkundige familiäre Häufung. Ihre Prävalenz beträgt etwa 1 % bei den 65- bis 69-Jährigen, verdoppelt sich im Abstand von jeweils etwa fünf Altersjahren und steigt bei den 95-Jährigen und älteren Menschen auf über 40-50 % an (Weyerer 2005). Die Ursache der senilen Alzheimer-Demenz ist bis heute noch unklar. Neben dem Alter als wichtigsten Risikofaktor vermutet man eine multifaktorielle Genese mit genetischer Komponente

(Gutzmann et al. 2005). Als ein genetischer Risikofaktor konnte bereits Apolipoprotein E herausgearbeitet werden. Apolipoprotein E ist das am meisten vorkommende Apolipoprotein im Plasma und spielt eine wichtige Rolle im Cholesterin-Stoffwechsel der Zelle. Besonders diejenigen Genträger, die das $\epsilon 4$ Allel von Apolipoprotein E aufwiesen, zeigten ein erhöhtes Risiko an der späten Form der Alzheimer-Krankheit zu erkranken (Huang et al. 2004; Packard et al. 2007).

Bei der zweiten Form handelt es sich um die familiäre- oder präsenile Form der Alzheimer-Erkrankung, die insgesamt einen Prozentanteil von weniger als 5 % einnimmt (Alzheimer-Forschung-Initiative-e.V. 2008). Hier bricht die Erkrankung häufig bereits im jungen Alter, d.h. vor dem 65. Lebensjahr des Patienten, aus und verläuft deutlich schneller und schlimmer als die senile Form. Als Auslöser konnten genetische Mutationen identifiziert werden, die meist über autosomal-dominanten Erbweg von einem oder beiden Elternteilen erworben wurden. Betroffen sind hauptsächlich das Gen des β -Amyloid Vorläuferproteins und die Presenilin-Gene 1 und 2, die nach ihrer Veränderung in hohem Maße die Bildung und Aggregation des toxischen β -Amyloid Moleküls fördern (Hoenicka 2006; Nikisch et al. 2008). Wichtig für das Verständnis der Pathogenese der familiären Form der Alzheimer-Erkrankung waren klinische Beobachtungen bei Trisomie 21 erkrankten Menschen. Das auf Chromosom 21 lokalisierte Gen für das β -Amyloid Vorläuferprotein liegt beim Down-Syndrom in dreifacher Ausführung vor. Dies führt zu einer dramatischen Überproduktion des β -Amyloid Proteins. Down-Patienten erkranken daher häufiger und früher an der Alzheimer-Erkrankung. Nach dem 30. Lebensjahr können bei allen Patienten bereits deutliche histopathologische Veränderungen festgestellt werden (Soliman et al. 1998; Zigman et al. 2007). Des Weiteren geht man davon aus, dass neben den bereits bekannten Gendefekten noch eine Vielzahl weitere, bisher unentdeckte, genetische Auslöser oder Risikofaktoren für die Entstehung der Alzheimer-Krankheit existieren.

In den westlichen industrialisierten Ländern ist in den letzten Jahrzehnten hauptsächlich durch die verbesserte medizinische Versorgung und eine gesündere Ernährung ein deutlicher Anstieg des Lebensalters erreicht worden. Die Lebenserwartung in Deutschland neugeborener Kinder lag im Berechnungszeitraum 2005/2007 für Jungen bei 76,9 und bei Mädchen bei 82,3 Jahren (Destatis 2008). Bis zum Jahr 2050 wird nach Vorausberechnungen des Statistischen Bundesamtes über 30 % der deutschen Bevölkerung 65 Jahre oder älter sein (Destatis 2006). Somit werden mehr Menschen das Alter erreichen,

in dem Demenzerkrankungen häufig sind. Diese erhöhte Anzahl an demenzkranken Patienten wird die gesamten Kostenträger, das medizinische und pflegerische Personal sowie die betroffenen Familien vor ein immenses Problem stellen, das dringend wirksame Präventions- und Therapiemöglichkeiten erfordert.

1.1.2 Geschichte

1901 begegnete der deutsche Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer (1864-1915) in der „Städtischen Anstalt für Irre und Epileptische“ in Frankfurt am Main der 51-jährigen Patientin Auguste Deter. Ihrem Ehemann war aufgefallen, dass sich das Verhalten seiner zuvor unauffälligen Frau während eines Jahres stark verändert hatte. Anfangs habe sie Eifersuchtsideen gegen ihn entwickelt, zu denen zunehmende Schwierigkeiten mit dem Gedächtnis hinzu kamen. In der Wohnung fand sie sich nicht mehr zurecht, sie schleppte Gegenstände hin und her, versteckte diese und schrie laut, da sie glaubte, man wolle sie umbringen. Bei der Untersuchung konnte Alois Alzheimer Symptome feststellen, die er bereits bei anderen älteren Patienten kennengelernt hatte. Dazu gehörten Orientierungsstörungen bezüglich Zeit und Aufenthaltsort, Erinnerungsdefizite an frühere Erlebnisse sowie starke Stimmungsschwankungen. Das Besondere an diesem Fall war aber, dass Auguste Deter deutlich jünger als seine bisherigen Demenzpatienten war, die im Allgemeinen über 70 Jahre alt waren. Fünf Jahre später starb Auguste Deter. Alois Alzheimer obduzierte ihr Gehirn und fand im gleichmäßig atrophem Gewebe steinharte plaqueartige Ablagerungen und abnorme Neurofibrillen. Während einer Versammlung in Tübingen im Jahr 1906 stellte er die damals überraschende These auf, dass es sich bei dem Verlauf seiner Patientin nicht um eine Folge des Älterwerdens handle, sondern um ein eigenes Krankheitsbild. Von Emil Kraepelin wurde diese Erkrankung 1911 nach ihrem Erstentdecker als Demenz vom Alzheimer-Typ bezeichnet.

1.1.3 Klinik

Die Alzheimer-Erkrankung äußert sich bei jedem Patienten in unterschiedlicher Form und Weise, gemeinsam ist aber allen ein fortschreitender Verlauf. Der erkrankte Angehörige wirkt zu Beginn meistens vergesslich und zerstreut. Er kann sich neue Dinge schlecht

merken und drückt sich umständlicher aus. In unbekannter Umgebung findet er sich nur sehr schwer zurecht. Das Verhalten kann anfangs auch durch ein depressives Bild geprägt sein und somit leicht mit einer depressiven Grunderkrankung verwechselt werden. Im weiteren Verlauf können weitere neuropsychologische und psychopathologische Symptome hinzutreten, die für die Angehörigen teilweise sehr belastend und verletzend sein können. Der Alzheimer-Patient erkennt seinen Partner oder Familienangehörige nicht mehr und findet sich selbst in vertrauter Umgebung nicht mehr zurecht. Im Endstadium der Erkrankung schließlich kann der Alzheimer-Patient kaum mehr schlucken oder kauen, wird harn- und stuhlinkontinent und weist schwerste Störungen des Gedächtnisses und aller kognitiven Funktionen auf. Viele Patienten erkranken in diesem Stadium an einer Lungenentzündung, einer Infektion oder einer anderen Krankheit, die dann oft auch zum Tode des Erkrankten führt (Möller et al. 2005). Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnose beträgt ungefähr 4-8 Jahre (Weyerer 2005). Je früher die Erkrankung eintritt, desto schneller ist meistens ihr Verlauf.

1.1.4 Diagnose

Eine wirklich sichere Diagnose der Alzheimer-Erkrankung ist erst nach dem Tod des Erkrankten möglich, wenn die für diese Krankheit typischen histopathologischen Veränderungen im Gehirn eindeutig nachgewiesen werden können. Zu Lebzeiten bleibt die Alzheimer-Erkrankung eine Ausschlussdiagnose. Ausgangsbasis ist eine gründliche psychiatrische Befunderhebung. Besonders wichtig ist dabei auch die Fremd- und Familienanamnese mit den Angehörigen des Patienten, denen Verhaltens- oder Persönlichkeitsveränderungen ihres Angehörigen meistens schon sehr früh auffallen. Neuropsychologische Testuntersuchungen wie der Minimal Status Test oder der Uhrentest, die die Bereiche Intelligenz, Sprache, verbales und visuelles Gedächtnis und die Psychomotorik überprüfen, können auf eine Alzheimersche Krankheit hinweisen. Zur Befundeingrenzung können weiterhin eine gründliche körperliche Untersuchung, Blut- und Liquoruntersuchungen, das EKG, das EEG, der Ultraschall der hirnversorgenden Gefäße, sowie bildgebende Verfahren wie die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie oder die Positronen-Emissionstomografie eingesetzt werden (DGN 2006). Ein zunehmend vielversprechender Ansatz scheint in Zukunft die

Liquordiagnostik von Amyloid- und Tauproteinen und deren Subspezies darzustellen (Knopman 2001; Marksteiner et al. 2007).

1.1.5 Therapie

Derzeit ist noch keine Heilung der Alzheimer-Erkrankung möglich. Wichtig ist es, die fortschreitende Erkrankung möglichst früh zu erkennen und die Alltagskompetenz des Patienten so lange wie möglich zu erhalten. Zwei therapeutische Prinzipien sind bisher im Gebrauch, die eine begrenzte Verlangsamung des Krankheitsprozesses und Besserung der Symptome bewirken können. Im frühen Stadium werden Achetylcholinesterase-Hemmer (z.B. Donezepil, Galantamin, Rivastigmin) eingesetzt (Doody 2005; Munoz-Torrero 2008). Bei der Alzheimer-Erkrankung kommt es zu einer veränderten Neusynthese von Achetylcholin, welche zu einer allgemeinen Leistungsschwächung des Gehirns führt. Achetylcholinesterase-Hemmer helfen den Signalaustausch zwischen den überlebenden Nervenzellen zu verbessern, indem sie das Achetylcholin abbauende Enzym Achetylcholinesterase blockieren und damit den Anteil am Überträgerstoff Achetylcholin im synaptischen Spalt erhöhen. Des Weiteren werden NMDA (= N-Methyl-D-Aspartat)-Antagonisten (z.B. Memantine) im mittelschweren bis schweren Stadium eingesetzt, die die neuronale Überstimulation durch den Botenstoff Glutamat, welcher Nervenzellen schädigt, verhindern (Reisberg et al. 2003; Doody 2008). Wichtig im Rahmen der Therapie erweist sich auch die pharmakotherapeutische Behandlung nicht kognitiver Symptome. Beispielsweise können durch den Einsatz von Neuroleptika Unruhe, Aggressivität und paranoide Symptome gemildert werden.

1.1.6 Histopathologische Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung

Man vermutet heute, dass die histopathologischen Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung schon mehrere Jahrzehnte beginnen, bevor die ersten Symptome auftreten. Wie Alois Alzheimer bereits bei der Untersuchung des Gehirns seiner ersten Patientin gesehen hatte, zeichnet sich die Alzheimer-Erkrankung durch zwei histopathologische Veränderungen aus, durch neurofibrilläre Bündel und β -Amyloid Plaques (Abb. 1).

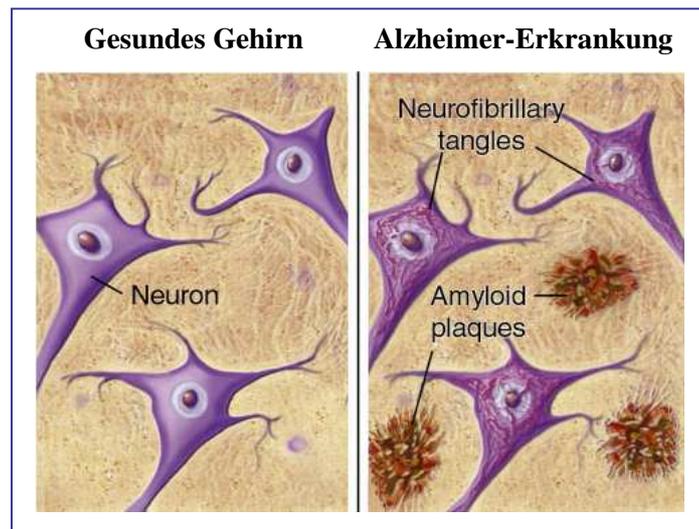


Abb. 1: Neurofibrillenbündel und β -Amyloid Plaques

Typische histopathologische Veränderungen der Alzheimer-Erkrankung. Die Neurofibrillenbündel entstehen aus aggregierten und verknäuelten Tau-Proteinsträngen innerhalb der Nervenzellen. Hauptsatzung der β -Amyloid Plaques, die außerhalb der Nervenzellen liegen, ist Protein β , welches enzymatisch aus dem Vorläuferprotein APP gespalten wird (nach American Health Assistance Foundation, Medical Illustrations 2008).

1.1.6.1 Neurofibrilläre Bündel

Innerhalb der Nervenzellen bilden sich faserige Eiweißablagerungen, die als neurofibrilläre Bündel bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um verknäuelte und umeinander gewundene Proteinstränge, die hauptsächlich aus Protein Tau bestehen. Protein Tau bindet normalerweise in Nervenzellen an Mikrotubulistränge und stabilisiert das Zellskelett. Bei der Alzheimer-Erkrankung werden die Tau-Proteine hochgradig phosphoryliert und verlieren ihre Bindung zu den Mikrotubulisträngen. Es kommt daraufhin zum Zerfall der Mikrotubuli und das Tau-Protein aggregiert zu dicht gepackten, abnormen Bündeln, die das Zellinnere verstopfen (Goedert et al. 2006; Iqbal et al. 2006; Iqbal et al. 2008). Ob die Neurofibrillenbündel unabhängig von β -Amyloid Plaques entstehen oder eine neuronale Antwort auf die kontinuierliche Ablagerung des β -Amyloid Proteins oder assoziierter Moleküle darstellen, ist noch nicht vollständig geklärt.

1.1.6.2 β -Amyloid Plaques

Bei der zweiten Veränderung handelt es sich um körnige Eiweißablagerungen, die neuritischen Plaques oder β -Amyloid Plaques, die hauptsächlich außerhalb der Nervenzellen gefunden werden. Das Zentrum dieser Plaques bildet das kurze β -Amyloid Protein (= A β), welches von dystrophen Axonen und Dendriten, aktivierter Mikroglia und reaktiven Astrozyten umgeben wird (Selkoe 2004; Octave 2005). A β entsteht durch Spaltung aus einem langen Vorläuferprotein, dem β -Amyloid Precursor Protein (= APP) (vgl. 1.2.1).

Neurofibrillenbündel und β -Amyloid Plaques behindern die Kommunikation der Nervenzellen untereinander, so dass im Laufe der Zeit die Nervenzellen und ihre synaptischen Verbindungen absterben (Carter et al. 2001; Pena et al. 2006). Besonders betroffen davon sind die Hirnrinde und der Hippocampus und damit die Regionen, die an der Entwicklung von Gedächtnis, Sprache und Denkfähigkeit beteiligt sind. A β -Ablagerungen konnten des Weiteren auch in Membranen von kortikalen und meningealen Blutgefäßen gefunden werden. Jedoch korrelieren diese nicht mit der Anzahl von β -Amyloid Plaques und Neurofibrillenbündeln im Gehirn (Zekry et al. 2003). Die A β -Bildung ist ein physiologischer Vorgang, der im Gehirn jedes Menschen abläuft und besonders bei älteren Menschen über 75 Jahren unabhängig von einer Demenzerkrankung gefunden werden kann. Normalerweise wird das A β außerhalb der Zelle von Enzymen degradiert oder mit Hilfe großer Proteinkomplexe aus dem Gehirn abtransportiert (Hardy et al. 2002). Welche Mechanismen, beispielsweise ein gestörter A β -Abbau oder eine erhöhte A β -Freisetzung, bei der Alzheimer-Erkrankung letztlich zu der deutlich erhöhten und irreversiblen A β -Aggregation führen, ist noch weitgehend unklar. Im Folgenden soll die Entstehung des A β -Moleküls genauer betrachtet werden.

1.2 Entstehung des β -Amyloid Moleküls

1.2.1 β -Amyloid Vorläuferprotein

Das β -Amyloid Vorläuferprotein (β APP oder APP) ist ein Typ-1 Membranprotein (Kang et al. 1987). APP besitzt einen langen extrazellulären N-Terminus, eine einzelne Transmembrandomäne und einen kurzen cytosolischen Anteil. Das darin enthaltene A β -Fragment liegt größtenteils außerhalb der Membran, zu einem kleinen Teil in der Transmembranregion (Selkoe 2004). APP wird in die Membran des Endoplasmatischen

Retikulums eingebaut. Im Golgi-Apparat findet anschließend eine N- und O-Glykosylierung und Tyrosin-Sulfatierung statt. Nur ein kleiner Anteil der APP-Moleküle (etwa 10 %) wird in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert. Der Großteil verbleibt im Golgi-Apparat oder im Transgolgi-Netzwerk. Das APP der Zellmembran kann durch Endozytose in das endosomal/lysosomale System aufgenommen und dort abgebaut werden (Tomita et al. 1998; Suzuki et al. 2008).

Durch alternatives Splicing der mRNA entstehen bei der APP-Proteinsynthese drei im Gehirn vorkommende Isoformen (Golde et al. 1990; Kang et al. 1990). APP 770 und 751 stellen das endogene APP dar und werden in allen Zellen des Körpers exprimiert. Ein geringerer Anteil findet sich aber auch in den Neuronen und v.a. in nicht-neuronalen Gliazellen. APP 695, das neuronale APP, wird hingegen fast ausschließlich in den Neuronen exprimiert. Von allen Isoformen existieren reife und unreife Formen. Die längeren Isoformen unterscheiden sich gegenüber der kurzen Form dadurch, dass sie in ihrem extrazellulären Anteil eine Aminosäure-Sequenz enthalten, die KPI-Domäne (= Kunitz-type serine protease inhibitors), die homolog zu bestimmten Inhibitoren von Serin-Proteasen ist (Tanzi et al. 1988; Selkoe 2004).

Die physiologische Funktion des APP-Moleküls ist heute noch nicht vollständig bekannt. APP spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Regulierung des Nervensystems, indem es das Zellwachstum stimuliert und die Synapsenbildung beeinflusst (Hung et al. 1992; Priller et al. 2006). Es ist Bestandteil einer größeren Genfamilie, zu der auch die APP-ähnlichen Proteine APLP1 und APLP2 (amyloid precursor-like proteins) zählen. In einigen Studien konnte anhand von Mäusen, die so manipuliert wurden, dass alle funktionellen Gene der drei APP-Familienmitglieder ausgeschaltet wurden (sogenannte triple knock-out Experimente) nachgewiesen werden, dass die Familie der APP-Proteine eine lebenswichtige Rolle bei der Hirnentwicklung und dem Überleben nach Geburt spielen (Herms et al. 2004). Durch knock-in rescue Experimente, bei denen die verlorengegangenen Informationen teilweise wieder eingefügt werden, versucht man derzeit zu klären, welche Genbereiche des APP-Proteins für seine Funktion verantwortlich sind (Ring et al. 2007). Sehr kontrovers diskutiert wird noch, welche Rolle APP beim axonalen Transport in Neuronen spielt und ob APP und seine Spaltungsproteine in gleichen Vesikeln in Axonen transportiert werden (Kamal et al. 2001; Lazarov et al. 2005). Weitere Arbeiten zeigten, dass der cytoplasmatische Anteil von APP mit verschiedenen cytosolischen Adaptorproteinen interagiert und somit als Signalmolekül an

endozytotischen und sekretorischen Vorgängen teilnimmt (Russo et al. 2005). APP scheint zudem der Zelladhäsion zu dienen, da es zum einen mit Adhäsionsproteinen wie Integrinen auf der Zelloberfläche von Axonen kolokalisiert, zum anderen dadurch, dass APP mit extrazellulären Matrixmolekülen wie Laminin und Kollagen interagieren kann (Storey et al. 1996; Yamazaki et al. 1997). Sekretierte APP-Isoformen, die eine KPI-Domäne enthalten, spielen eine wichtige Rolle bei der Hemmung von Trypsin und Chymotrypsin und im Blutgerinnungssystem. APP 751 konnte beispielsweise in menschlichen Blutplättchen nachgewiesen werden, wo es die Serinprotease Faktor XIa blockiert (Smith et al. 1990; Selkoe 2004).

1.2.2 Prozessierung des Vorläuferproteins durch die α -Sekretase

Das APP-Molekül kann auf zwei Arten gespalten werden (Abb. 2). Die APP-Spaltung findet hauptsächlich an oder nahe der Zelloberfläche statt (Haass 2004).

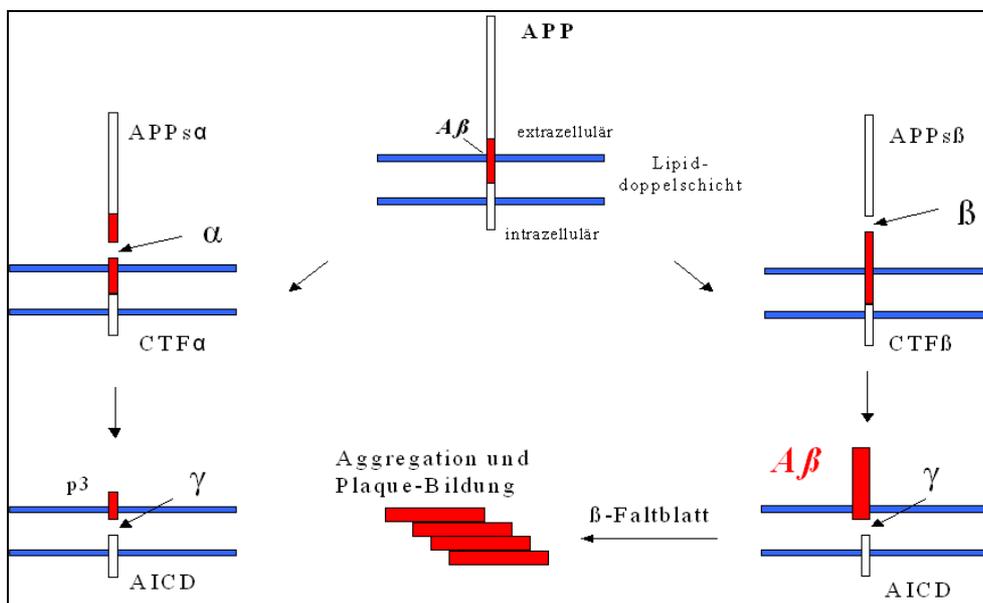


Abb. 2: Prozessierung des β -Amyloid Vorläuferproteins (APP)

Das APP-Protein kann auf zwei Arten gespalten werden. Entweder durch die α - und die γ -Sekretase oder durch die β - und die γ -Sekretase. Auf zweitem Weg entsteht Protein A β , welches aggregiert und die Plaquebildung initiiert. (A β = β -Amyloid Protein, APPs=sekretiertes APP, CTF=C-terminales Fragment, AICD= β -Amyloid Vorläuferprotein intrazelluläre Domäne).

Der größte Anteil des APP (etwa 90 %) wird von der in der Membran verankerten α -Sekretase gespalten, die das Protein in der Mitte der A β -Region schneidet. Die α -Sekretase ist assoziiert mit der ADAM-Familie (= a desintegrin and metalloprotease), deren Hauptvertreter Protease ADAM 10 darstellt (Kojro et al. 2005; Postina 2008). Durch die α -Sekretase Spaltung entstehen das neurotrophische und neuroprotektive Protein APPs α , welches nach extrazellulär sezerniert wird, sowie ein C-terminales Fragment. Dieses wird anschließend von der γ -Sekretase in die Proteine p3 und AICD (= β -amyloid precursor protein intracellular domain) gespalten. Beide Proteine werden anschließend in die Zelle aufgenommen und dort abgebaut. Diskutiert wird noch, ob ein Teil der AICD mit assoziierten Proteinen in den Zellkern eintreten und dort die Transkription bestimmter Gene regulieren kann (Hebert et al. 2006).

Die γ -Sekretase ist ein hochmolekularer Aspartyl Protease Komplex bestehend aus Presenilin 1 und 2, Nicastrin, APH-1 und PEN-2 (Kaether et al. 2006; Steiner et al. 2008; Yagishita et al. 2008). Das ungewöhnliche an der γ -Sekretase Spaltung ist, dass sie innerhalb der Plasmamembran stattfindet, die normalerweise eine Proteinspaltung unmöglich macht.

1.2.3 Spaltung durch die β -Sekretase und Bildung von A β

Ein kleinerer Teil des APP (etwa 10 %) kann durch die β -Sekretase gespalten werden. Die β -Sekretase BACE 1 (= β -amyloid cleaving enzyme 1) ist eine membrangebundene Aspartyl-Protease. Sie schneidet das APP-Molekül am Beginn der A β -Region und bildet APPs β und ein C-terminales Fragment (Vassar 2004; Cole et al. 2008; Venugopal et al. 2008). Darauf folgt erneut die γ -Sekretase an dem C-terminalen Fragment an. Je nachdem wo diese spaltet, entstehen beim gesunden Erwachsenen zwei alternative A β -Produkte, zu 95 % A β ₄₀ und zu etwa 5 % das deutlich gefährlichere A β ₄₂, welches sehr leicht aggregiert und unlösliche, toxische fibrilläre Strukturen bildet (Selkoe 2004; Liu et al. 2006). Nach seiner Freisetzung ändert A β seine Struktur von α -helikaler zu β -Faltblatt-Struktur und kann nun sehr stabile, unlösliche Aggregate mit sich selbst bilden. Die A β -Aggregate werden zum größten Teil von den Zellen sezerniert, können jedoch auch intrazellulär gespeichert werden (LaFerla et al. 2007).

1.3 Einfluss von Cholesterin auf die β -Amyloid Bildung

1.3.1 Funktionen des Cholesterins im Säugetierorganismus

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil von Säugetierorganismen, das eine Vielzahl von Funktionen erfüllt. Der größte Anteil des Cholesterins wird vom Körper selbst gebildet, nur ein geringer Teil wird mit der Nahrung aufgenommen. Hauptsyntheseort sind die Leber und die Darmschleimhaut, mit kleinen Ausnahmen können aber auch alle anderen Körperzellen Cholesterin herstellen. Rund $\frac{1}{4}$ der gesamten nicht-veresterten Cholesterinmenge befindet sich im Gehirn, wo es v.a. in den Plasmamembranen der Gliazellen und Neuronen und in den Myelinscheiden enthalten ist. Die Cholesterin-Homöostase des Organismus wird u.a. durch das Prinzip der negativen Rückkopplung reguliert, und zwar über Hemmung bzw. Aktivierung der HMG-CoA-Reduktase, einem Enzym der Cholesterinbiosynthese. Dieses Enzym bildet den Angriffspunkt für die medikamentöse Cholesterin-Behandlung. Cholesterin wird über die Gallensäure von der Leber ausgeschieden und zu 90 % im Ileum rückresorbiert (Reiss et al. 2004). Es ist Substrat für die Synthese von Gallensäuren in der Leber und spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus der fettlöslichen Vitamine A, D, E und K. In endokrinen Geweben, wie z.B. in den Nebennieren, in den Ovarien oder den Hoden, bildet es die Vorstufe von Steroidhormonen. In der Haut wird Cholesterin benötigt, um Vitamin D herzustellen. Da Cholesterin in Wasser unlöslich ist, erfolgt der Transport im Blutplasma zusammen mit anderen lipophilen Substanzen wie Phospholipiden, Triglyceriden oder Fettsäuren, in Transportvehikeln, den Lipoproteinen.

1.3.2 Aufbau der Plasmamembran und Cholesterin-reiche Membrandomänen

Eine besonders wichtige und unentbehrliche Aufgabe nimmt das Cholesterin weiterhin bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Zellmembranen ein. Unser heutiges Verständnis über den Aufbau und die Beschaffenheit der Plasmamembran wurde in besonderem Maße von den Untersuchungen von Singer und Nicolson geprägt, die 1972 das Fluid Mosaic-Modell etablierten (Singer et al. 1972). Die Plasmamembran aller pro- und eukaryontischen Lebewesen besteht demnach aus einer Lipiddoppelschicht, die das Innere

der Zelle, das Cytoplasma, vom äußeren Extrazellularraum abgrenzt und in die verschiedene Proteine eingebettet sind (Abb. 3).

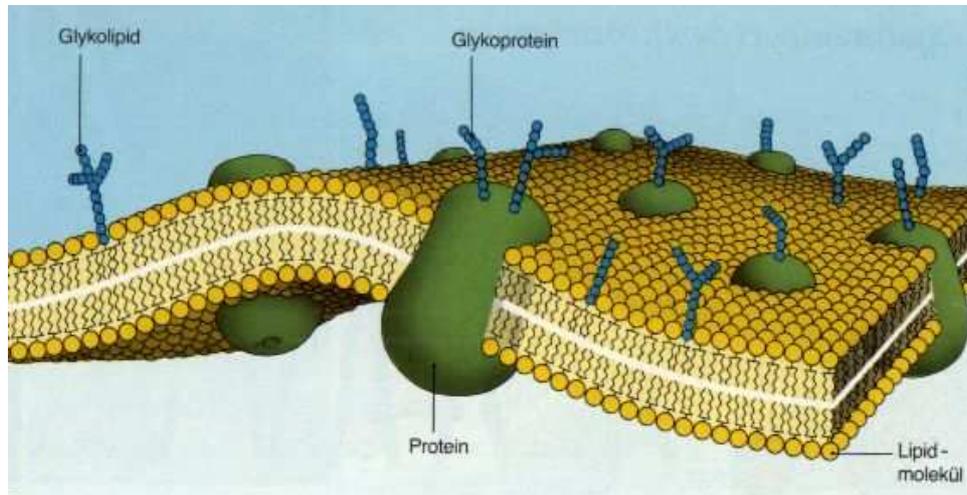


Abb. 3: schematischer Aufbau der Plasmamembran

Die Plasmamembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht aus Phospholipiden mit hydrophilem Kopf- und hydrophobem Fettsäureanteil, die das Cytoplasma vom Zellinneren abgrenzt. In die Membran sind verschiedene Proteine eingebettet oder haften an deren Innen- bzw. Außenseite (aus <http://www.bionet.schule.de>)

Die Plasmamembranen von Säugetierzellen bestehen aus Glycerophospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterin. Die Lipiddoppelschicht ist normalerweise fluide, d.h. die enthaltenen Lipide und Proteine sind in der Ebene der Membran beweglich. Die Anzahl der ungesättigten Doppelbindungen in den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten der Lipide entscheidet u.a. über die Fluidität der Membran. Glycerophospholipide und Sphingolipide unterscheiden sich in ihrer Schmelztemperatur, die bei den Sphingolipiden deutlich höher liegt. Die Sphingolipide, deren gesättigte Kohlenwasserstoffketten durch Van der Waals Interaktionen eine dichte und hoch geordnete Zusammenpackung erlauben, liegen bei 37°C in einer gelartig-kristallinen Phase vor. Die mehrfach ungesättigten, abgeknickten Kohlenwasserstoffketten der Glycerophospholipide verhindern hingegen eine dichte Packung. Deshalb ordnen sich die Glycerophospholipide in künstlichen Membranen in einer eher lockeren, ungeordneten, flüssig-kristallinen Phase an, von denen die Sphingolipide größtenteils ausgeschlossen sind. Cholesterin interagiert in diesem Zustand bevorzugt mit den Sphingolipiden und induziert dadurch eine Phasentrennung. In Plasmamembranen wird v.a. im äußeren Blatt von einer präferentiellen Sphingolipid-Cholesterin-Interaktion ausgegangen (Fantini et al. 2002; Edidin 2003; Simons et al. 2004). Die Sphingolipide und das Cholesterin nehmen eine intermediäre Phase zwischen Gel- und

flüssiger Phase ein, die als Flüssigkeit mit geordneter Struktur (= liquid-ordered phase) bezeichnet wird. Die Kohlenstoffketten der Sphingolipide sind straffer gepackt als in der Gel-Phase, sind aber wegen des eingefügten Cholesterins deutlich beweglicher. Da diese Membrandomänen wie Flöße auf der zweidimensionalen Flüssigkeit der Lipidmembran zu schwimmen scheinen, wurden sie als „Lipid Rafts“ bezeichnet. (Abb. 4) (Brown 2006).

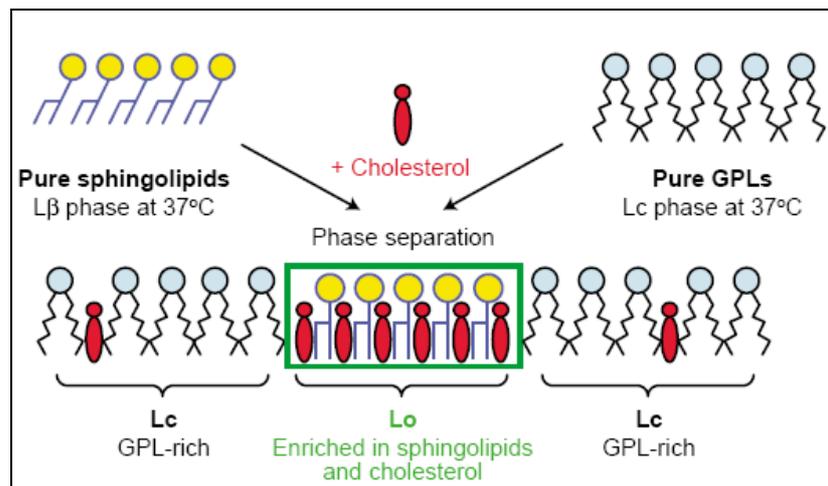


Abb. 4: Entstehung der Lipid Rafts

Zellmembranen bestehen aus Glycerophospholipiden, Sphingolipiden und Cholesterin. In künstlichen Membranen ordnen sich die Sphingolipide in einer gelartig-kristallinen und die Glycerophospholipide in einer lockeren, flüssig-kristallinen Struktur an. Cholesterin interagiert bevorzugt mit den dicht gepackten Sphingolipiden und führt zu einer Phasentrennung. (GPL=Glycerophospholipide, L_c=liquid-crystalline fluid Phase, L_o=liquid-ordered Phase, L_β=solide gel-like Phase) (nach Fantini et al. 2002)

Lipid Rafts sind sehr klein und sehr dynamisch (10-100 nm), so dass direkte Nachweismethoden äußerst schwierig sind. Sie zeichnen sich u.a. dadurch aus, dass sie gegenüber bestimmten Detergenzien wie z.B. Triton X-100 oder CHAPS bei 4°C unlöslich sind (Schroeder et al. 1998; London et al. 2000; Silvius 2005). Deshalb bezeichnet man sie häufig auch als Detergens-resistente Membrandomänen (= DRM). Mit Hilfe von Dichtegradienten und der Ultrazentrifugation können diese DRM isoliert und analysiert werden. Durch moderne mikroskopische Verfahren, wie z.B. der FRET-Methode (= Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) können typische Charakteristika von Lipid Rafts auch in vivo analysiert werden (Loura et al. 2008).

1.3.3 Funktion Cholesterin-reicher Membrandomänen

Lipid Rafts konnten bisher eine Vielzahl von Funktionen zugewiesen werden. Lipid Rafts der Plasmamembran spielen eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signalübertragung, sowie bei der Aufnahme und beim intrazellulären Transport von Proteinen und Lipiden (Ikonen 2001; Helms et al. 2004). In der Plasmamembran können Lipid Rafts etwa 50-100 nm große Membraneinstülpungen bilden, die aufgrund des darin vorkommenden Proteins Caveolin-1, Caveolae genannt werden (Parton 1996; Quest et al. 2004). Lipid Rafts allgemein und Caveolae im Besonderen sind reich an Zellsignalproteinen wie z.B. GPI-verankerten Proteinen, Transmembranproteinen wie dem IgE-Rezeptor oder doppelt acetylierten Proteinen wie den Tyrosinkinase der Src-Familie (Fantini et al. 2002). Weiterhin nutzen Viren, Parasiten, Bakterien oder deren Toxine Lipid Rafts oder in Lipid Rafts exprimierte GPI-verankerte Proteine als Eintrittspforte in die Wirtszelle (van der Goot et al. 2001). Verschiedene Hinweise lassen vermuten, dass Lipid Rafts auch an der Bildung der β -Amyloid Plaques beteiligt sein könnten (Kakio et al. 2002; Reid et al. 2007; Ariga et al. 2008).

1.4 Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I

1.4.1 Grundlagen

Scavenger Rezeptoren werden definiert als Zellmembranproteine, die chemisch veränderte Lipoproteine wie acetyliertes oder oxidiertes LDL und eine Reihe weiterer, strukturell teilweise sehr unterschiedliche Liganden, binden können. Wegen ihrer strukturellen Eigenschaften werden die Scavenger Rezeptoren in verschiedene Klassen (A, B und C) und in Typen eingeteilt. 1994 veröffentlichte die Arbeitsgruppe Acton et al. die Entdeckung eines neuartigen Scavenger Rezeptors, der der Subfamilie der CD36 Membranproteine zugeteilt werden konnte, nämlich Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (= SR-BI) (Acton et al. 1994). Der ursprünglich in Nagetieren identifizierte Scavenger Rezeptor BI entspricht dem humanen CLA-1, der von nun an hSR-BI genannt wurde (Calvo et al. 1993). Der 509 Aminosäuren lange SR-BI besitzt eine lange extrazelluläre Schleife, die durch zwei Transmembrandomänen in der Plasmamembran verankert ist. Sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen intrazellulär. Die extrazelluläre Domäne

von SR-BI ist mehrfach glykosyliert und enthält sechs Cysteine. Somit besitzt das Protein die Fähigkeit Disulfid-Brücken zu bilden. Die beiden C-terminalen cytosolischen Cysteine sind über eine Palmitinsäure bzw. Myristoylsäure mit der Membran verknüpft (Krieger 1999) (Abb. 5).

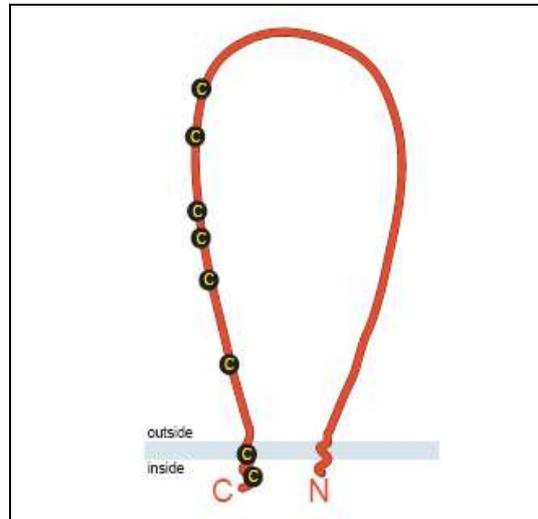


Abb. 5: Der Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I

Der Scavenger Rezeptor BI besteht aus 509 Aminosäuren und besitzt eine lange extrazelluläre Schleife, zwei Transmembrandomänen sowie zwei cytosolische Anteile. Die extrazelluläre Domäne von SR-BI ist mehrfach glykosyliert und enthält sechs Cysteine. (nach Krieger 1999)

Ob SR-BI mit Detergens-resistenten Membrandomänen wie den Caveolae bzw. Rafts assoziiert ist, wurde bisher widersprüchlich publiziert (Graf et al. 1999; Matveev et al. 2001; Frank et al. 2002).

1.4.2 Funktion des Scavenger Rezeptors BI

Scavenger Rezeptor BI bindet ebenso wie CD36 verschiedene Liganden. Neben der Bindung von HDL gilt dies für acetyliertes LDL, oxidiertes LDL, anionische Phospholipide, apoptotische Zellen und unmodifiziertes LDL bzw. VLDL (Krieger 1999; Rhains et al. 2004). Dies wird vermutlich durch mehrere Bindungsstellen in der extrazellulären Domäne des Proteins ermöglicht. Von besonderer Wichtigkeit ist, dass SR-BI die selektive Aufnahme von Lipiden aus Lipoproteinen in Zellen vermittelt. Hierzu gehören Cholesterinester, Cholesterinether und verschiedene Phospholipide (Urban et al. 2000; Thuahnai et al. 2001). Der Scavenger Rezeptor BI wird besonders in der Leber und

in steroidem Gewebe wie in den Nebennieren und im Ovar exprimiert. In steroiden Geweben vermittelt SR-BI die Aufnahme von Cholesterin, welches daraufhin für die Produktion der Steroidhormone benötigt wird. Im Sinne des Reversen Cholesterintransports vermittelt er auch die Aufnahme von großen Mengen Cholesterin in die Hepatozyten, die dann mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden (Rhainds et al. 2004). Des Weiteren findet sich das Protein auch in Makrophagen (Buechler et al. 1999), Endothelzellen (Goti et al. 2001), verschiedenen Zellen des Intestinaltraktes (Lobo et al. 2001) und in Monozyten (Urban et al. 2000). Auch im menschlichen Gehirn konnte SR-BI nachgewiesen werden (Husemann et al. 2001; Srivastava et al. 2002).

In der in unserer Arbeitsgruppe entstandenen Dissertationsarbeit von Markus Wiedmann (2006) konnte unlängst eine direkte Beziehung zwischen dem Scavenger Rezeptor BI und Cholesterin-reichen Membrandomänen gezeigt werden. Danach vermittelt SR-BI die selektive Aufnahme der beiden wichtigsten Raftbestandteile Cholesterin und Sphingomyelin und induziert dadurch die Bildung von Lipid Rafts in spezifischen subzellulären Kompartimenten, insbesondere den Early Endosomes (Wiedmann 2006).

2 Zielsetzung

In einer Reihe von Studien der letzten Jahre wurde der Einfluss von Cholesterin-reichen Lipid Rafts auf die β -Amyloid Bildung untersucht. Dabei ergaben sich teilweise widersprüchliche Aussagen, die möglicherweise u.a. durch die unterschiedlichen verwendeten Techniken der Cholesterin-Anreicherung bzw. -Depletion erklärt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die gesamte Fragestellung durch einen gezielten experimentellen Ansatz anzugehen, basierend auf der Beobachtung, dass der Scavenger Rezeptor BI Lipid Rafts in Kompartimenten induziert, in denen vermutlich präferentiell β -Amyloid gebildet wird. Hierzu wurden humane neuronale und nicht-neuronale Zellen mit dem Scavenger Rezeptor BI transfiziert und anschließend die Bildung von A β analysiert.

Anhand der vorliegenden Arbeit sollten u.a. folgende Fragen beantwortet werden:

- 1.) Welchen Einfluss hat eine erhöhte Bildung der Lipid Raft Domänen in endosomalen Kompartimenten auf die Spaltung des β -Amyloid Vorläuferproteins und auf die β -Amyloid Bildung?
- 2.) In welchen Membrandomänen können das β -Amyloid Vorläuferprotein und die β -Sekretase BACE 1 vor und nach Expression des Scavenger Rezeptors BI detektiert werden?
- 3.) Welche Konsequenzen ergeben sich hieraus für die Bedeutung von Rafts für die Entstehung des β -Amyloids?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Name	Firma
Acrylamid	Roth
Agarose	Invitrogen
Ammoniumperoxidsulfat (= APS)	Roth
BC Protein Assay Reagenz A+B	Uptima
N,N'-Methylen-bis-acrylamid (= Bisacrylamid)	Roth
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Bovine serum albumin Fraktion V (= BSA)	Serva
BSA 2 mg/ml	Uptima
Calciumchlorid (= CaCl ₂)	Sigma-Aldrich
Collagen A	Biochrom
Dithiothreitol (= DTT)	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic acid (= EDTA)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Life Technologies
D-Glucose	Merck
Glycerol	Merck
Glycin	Roth
Hydrochlorid (= HCl)	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (= KCl)	Roth
Magnesiumchlorid (= MgCl ₂)	Sigma
2-Mercapto-ethanol	Sigma
Methanol	Roth
2-Morpholinoethansulphonsäure (= MES)	Serva
Natriumchlorid (= NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (= SDS)	Roth
Natriumhydroxid (= NaOH)	Sigma
NP-40	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Protein-A-Sepharose	Sigma
Sucrose	Sigma

N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin (= TEMED)	Merck
Trichloressigsäure (= TCA)	Roth
Tricine	Sigma
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (= Tris)	Roth
Triton X-100	Sigma
Trypanblau (0,4 %)	Sigma
Tryptone	Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich
Yeast Extrakt	DIFCO Laboratories

3.1.2 Geräte und Materialien

Geräte	Firma
Autoklav	Integra Biosciences
Blotkammer	Amersham Biosciences
Biophotometer	Eppendorf
Entwicklungsmaschine	AGFA
Feinwaage SBC 21	Scaltec
Fluoreszenzmikroskop DM IRB SLR	Leica
Gefriercontainer	Nalgene
Konfokales Laserscanmikroskop LSM 510 META	Carl Zeiss
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Sepatech
Photometer Tecan Rainbow Microplate Reader	Tecan GmbH
pH-Meter HI 221	HANNA instruments
Rührer RCT basic	IKA-Labortechnik
Schüttelgerät KS 250 basic	IKA-Labortechnik
Schüttelinkubator Certomat R und HK	Braun
Southern Blot Kammer	Biorad
Sterilbank HLB 2472	Bio-Flow Technik
Stickstofftank	Cryoson
Tiefgefrierschrank (-80°C)	Heraeus
Ultrazentrifuge L8-M, Rotor SW 60	Beckmann
Vortex Genie-2	Bender und Habein
Waage	Sartorius
Wasserbad Julabo U3	Julabo Labortechnik
Wasserbad-Thermo-Cycler 60	bio-med GmbH
Wasserbadschüttler	Köttermann
Western Blot Kammer	Biorad
Zellkulturinkubator	Heraeus

Zellkulturmikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge Universal 32	Hettich Zentrifugen

Materialien

Deckgläser 18 x 18 mm	Menzel-Gläser
Eppendorfgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Eppendorfgefäße 2 ml	Eppendorf AG
Falcon-Röhrchen 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson
Fertiggele Tris-HCl 7,5 %	BioRad
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Gefrier Röhrchen	Nalgene Cryoware
Hamilton-Pipette	Micromesure N.V.
24- und 96-Multiwell Platten	Becton Dickinson
Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL)	Amersham Biosciences
Nitrocellulose-Membran (Protran BA 85)	Schleicher & Schuell
Parafilm „M“	American Can Company
	Greenwith
Petrischalen 94x16 mm	Greiner bio-one
Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen	Gilson
Röntgenfilm (Fuji Medical) 18 x 24 cm	W. Loy GmbH
6 cm Schalen (60 x 15 mm)	Becton Dickinson
Siedesteinchen Typ A	Roth
Spritzenfilter	Roth
Stripette 5 ml und 10 ml	Corning
Ultrazentrifugenröhrchen (11 x 60 mm)	Beckmann
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Becton Dickinson
Zentrifugenröhrchen 14 ml	Becton Dickinson

3.1.3 Zellen, Medium und Antibiotika

Zellen

humane Zelllinien:

Name	Herkunft	APP-Expression	erhalten von
HEK-293	embryonale Nierenzellen	endogen = normal	Dr. S. Lichtenthaler (Adolf-Butenandt-Institut der LMU München)

Name	Herkunft	APP-Expression	erhalten von
HEK 293-1.1	embryonale Nierenzellen	APP-Überexpression	Dr. S. Lichtenthaler (Adolf-Butenandt-Institut der LMU München)
SH-SY5Y	Neuroblastom-Zellen	endogen	Dr. S. Lichtenthaler (Adolf-Butenandt-Institut der LMU München)

bakterielle Zelllinie:

Name	Herkunft	von
DH5 α	Escherichia coli	Invitrogen

Medium und Antibiotika

Dimethylsulfoxide (= DMSO)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (= DMEM)	Invitrogen/Gibco
Fetal bovine serum (= FBS)	Invitrogen/Gibco
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (= PBS)	Sigma
Ampicillin	Sigma
Geneticin (= G-418)	Invitrogen/Gibco
Hygromycin B	Invitrogen/Gibco
Kanamycin	Sigma
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA-Laboratories

3.1.4 Antikörper und Inhibitoren

Antikörper

Erstantikörper:	Antigen:	erhalten von:
AK 22C11	N-Terminus von APP	Dr. S. Lichtenthaler (Adolf-Butenandt-Institut der LMU München)
AK W02	APPs α	
AK 192	APPs β	
AK 3552	A β	
AK 6E10	A β	
AK 7520	C-Terminus von BACE 1	
AK NB 400-104	Scavenger Rezeptor BI	Novus Biologicals
AK Flotillin-1	Flotillin	Becton Dickinson

Zweitantikörper:

anti-Mouse IgG conjugated peroxidase (POD)	Calbiochem
anti-Rabbit IgG conjugated peroxidase (POD)	Calbiochem

Inhibitoren

Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich

3.1.5 Marker und Standards

DNA-Leiter 1 Kb (0,1 µg/µl)	Invitrogen
Proteinleiter SM 0671 (10–180 kDa)	Fermentas GmbH

3.1.6 Plasmide und Transfektionsreagenzien**Plasmide**

für die Zellkultur

Name	Hintergrundvektor	Größe	AB-Resistenz	erhalten von
ph SR-BI	pDsRed I-NI	6,2 Kb	Kanamycin	B. L. Trigatti (Department of Biochemistry and Biomedical Sciences, Ontario)
pmRFP-hSR-BI	pmRFP-CI	6,2 Kb	Kanamycin	
pEGFP-(hSR-BI)	pEGFP-CI	6,2 Kb	Kanamycin	
leerer Vektor	pmRFP-hSR-BI	3,9 Kb	Kanamycin	selbst hergestellt

für die konfokale Laserscanmikroskopie

Name	Farbe	erhalten von
pmRFP-hSR-BI	rot	B.L. Trigatti
Bace-FL-wt*GFP	grün	Dr. S. Lichtenthaler
peak 12/HA-APP-GFP	grün	Dr. S. Lichtenthaler
pcDNA3/APP-YFP	gelb	C. Kaether (Leibniz Institut, Jena)

Transfektionsreagenzien

FuGene 6 Transfektionsreagenz	Roche
Lipofectamin TM 2000	Invitrogen

3.1.7 Enzyme und Nukleotide

BamH I, Mlu I, Nhe I, Not I, Stu I	Fermentas/New England Biolabs
Klenow Enzym (100 U)	Roche
T4-DNA Ligase	New England Biolabs
Desoxyribonukleosidtriphosphat (= dNTP)	Roche

3.1.8 Kits

ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences
Pure Yield Plasmid Midiprep System	Promega
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen
Wizard SV Gel und PCR Clean-Up System	Promega
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega

3.1.9 Schaeggengel

	16,5 % Trenngel	10% Spacergel	4% Sammelgel
	(10,5 ml)	(7,5 ml)	(6,25 ml)
Acrylamid (49,5 % T, 3 % C)	3,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Gelpuffer	3,5 ml	2,5 ml	1,55 ml
destilliertes Wasser	0	3,5 ml	4,2 ml
32 % Glycerol	3,5 ml	0	0
polymerisiert mit:			
10 % APS	32,5 µl	35 µl	25 µl
TEMED	3,25 µl	4 µl	5 µl
für ein Gel (1,5 mm):	5 ml	2,5 ml	~2 ml

3.1.10 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Lösung: 49,5 % T(otal), 3 % C(rosslinker)

Acrylamid	48 g
Bisacrylamid	1,5 g
mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt	

Anodenpuffer (5x):

TrisHCl 1 M	121,1 g
mit NaOH auf pH 8,9 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

Blocking Puffer:

10x TBS	15 ml
Tween 20	150 µl
BSA	7,5 g
mit destilliertem Wasser auf 150 ml aufgefüllt und filtriert	

Filling Puffer (10x):

Tris 1 M	500 µl
DTT 0,1 M	100 µl
MgCl ₂ 0,1 M	100 µl
BSA 10 mg/ml	50 µl

Gefriermedium:

FBS	25 ml
DMEM	20 ml
steriles DMSO	5 ml

Gelpuffer:

TrisHCl 3 M	182 g
in 300 ml destilliertem Wasser gelöst und mit HCl auf pH 8,45 eingestellt	
SDS	0,3 %
dann mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt und bei 4°C aufbewahrt	

Kathodenpuffer:

TrisHCl 0,1 M	12,11 g
Tricine 0,1 M	17,92 g
SDS (5 ml 20 % SDS)	0,1 %
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

Laufpuffer (5x):

Tris	30,25 g
Glycin	144 g
SDS 10 %	50 ml
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

LB-Medium:

Tryptone	1 %
Yeast	0,5 %
NaCl	1 %
mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt	

Lysispuffer:

Solubilisierungspuffer	5 ml
EDTA 0,5 M	20 µl
bei 4°C aufbewahrt	
vor Verwendung Protease- und Phosphatase-Inhibitor (auf 300 µl Lysispuffer je 25 µl Inhibitor) frisch zugegeben	

MNE-Puffer:

NaCl 150 mM	4,38 g
EDTA 2 mM	0,37 g
MES 25 mM	2,44 g
mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt	

PBS:

NaCl 136 mM	8 g
KCl 2,6 mM	0,2 g
KH ₂ PO ₄ 1,4 mM	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	1,42 g
mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

PBS/EDTA:

5x PBS	100 ml
EDTA 0,5 M	500 µl
mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt	

PBST:

10x PBS	100 ml
Tween 20	500 µl
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

Probenpuffer (5x):

10x Tris-HCl 3,1 M pH 6,8	1 ml
SDS	0,25 g
Glycerol	5 ml
Bromphenolblau	12,5 mg
in Ethanol gelöst und auf 10 ml aufgefüllt	
2-Mercaptoethanol	6,0 %

Solubilisierungspuffer:

Tris 50 mM pH 7,5	3,03 g
NaCl 150 mM	4,38 g
NP-40	5 ml
mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt	

2x STEN:

TrisHCl 1 M pH 7,6	50 ml
NaCl 5 M	30 ml
EDTA 0,5 M	4 ml
NP-40 10 %	20 ml

1x STEN:

2x STEN	25 ml
destilliertes Wasser	25 ml

STEN-NaCl:

2x STEN	25 ml
NaCl 5 M	1,75 ml
destilliertes Wasser	23,25 ml

STEN-SDS:

2x STEN	25 ml
SDS 10 %	0,5 ml
destilliertes Wasser	24,5 ml

Stripping Puffer:

Tris 62,5 mM	3,78 g
SDS	10 g
mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt	
2-Mercaptoethanol	350 µl
jeweils frisch zugegeben	

T4-DNA-Ligase-Puffer:

Tris-HCl 50 mM	
MgCl ₂ 10 mM	
ATP 1 mM	
DTT 1 mM	
Polyethylenglycol-8000	25 %
mit NaOH auf pH 7,6 eingestellt	

TBE-Puffer (10x):

Borsäure 89 mM	55 g
Tris-HCl 89 mM	107,8 g
EDTA-Na ₂ -Salz 2 mM	7,44 g
mit NaOH auf pH 8,3 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

TBS (10x):

Tris	24,2 g
NaCl	80 g
mit konzentrierter HCl auf pH 7,6 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

Transferpuffer:

Glycin	2,9 g
Tris	5,8 g
SDS 10 %	3,7 ml
Methanol	100 ml
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

Waschpuffer (TBST):

10x TBS	100 ml
Tween 20	3 ml
mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt	

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden mit drei Zelllinien durchgeführt (HEK 293, HEK 293-1.1 und SH-SY5Y), die freundlicherweise von Dr. Stefan Lichtenthaler (Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt wurden. HEK-293 ist eine humane Zelllinie, die Ende der 1970er Jahre geschaffen wurde. DNA-Teile des menschlichen Adenovirus 5 wurden in menschliche embryonale Nierenzellen (= **H**uman **E**mbyonic **K**idney cells) transformiert und in deren Erbgut stabil integriert. HEK-293 sind hypotriploide Epithelzellen, welche adhärent wachsen. Sie weisen eine für nicht-neuronale Zellen normale APP-Expression auf. Die Zelllinie HEK 293-1.1 wurde durch dauerhaftes Einfügen eines APP enthaltenden Vektors in die Zell-DNA normaler HEK-293 Zellen so verändert, dass eine Überexpression des APP-Proteins erreicht wurde. Somit war es möglich, Unterschiede und Veränderungen im Verhalten des APP-Proteins bei deutlich erhöhtem APP-Angebot zu studieren. Um anschließend die Zellbedingungen nachzuahmen, die bei der Alzheimer-Erkrankung anzutreffen sind, wurden anschließend neuronale Zellen der Zelllinie SH-SY5Y ausgewählt. Diese stammen in dritter Generation von menschlichen Neuroblastom-Zellen (SK-N-SH, SH-SY, SH-SY5, SH-SY5Y). Die ursprüngliche Zelllinie wurde aus einem Metastasen bildenden Knochentumor einer Frau im Jahre 1970 isoliert. In jeder aufeinander folgenden Generation wurde der Zellkern entfernt und in ein neues Zytoplasma umgesetzt. SH-SY5Y-Zellen zeigen eine für neuronale Zellen normale APP-Expression.

3.2.1.2 Auftauen der Zellen

Die bei -80°C eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut und anschließend unter einer Sterilbank in ein Falcon-Röhrchen mit 5 ml vorgelegtem Medium überführt. Um das zellschädigende Gefriermedium wieder zu entfernen, wurde nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1000 U/Min. der Überstand abgenommen, auf die Zellen 5 ml frisches Medium gegeben und das Zellpellet damit resuspendiert. Je nach gewünschter Zelldichte

wurde dann der Inhalt des Falcon-Röhrchens in eine große Zellkulturflasche (75 cm²) gegeben und der Gesamthalt unter Zugabe der benötigten Antibiotika auf 10 ml ergänzt.

3.2.1.3 Kultivierung der Zellen

Für die Zellkultur wurden die im folgenden angegebenen Medien und Antibiotika verwendet. Die HEK-293 Zellen sowie die neuronalen SH-SY5Y Zellen benötigten für eine Zellkulturflasche 10 ml Medium, bestehend aus DMEM mit 10 % FBS (= fetal bovine serum) und 100 µl Penicillin/Streptomycin. Das FBS wurde vor Gebrauch 1 Std. bei 50°C im Wasserbad inaktiviert und anschließend unter der Sterilbank mit einem Spritzenfilter steril filtriert. Die HEK 293-1.1 Zellen wurden in gleicher Weise behandelt, jedoch wurde dem Medium noch zusätzlich 100 µl Hygromycin beigefügt. Im weiteren Verlauf konnten somit nur die Klone überleben und für den Versuch eingesetzt werden, die den zusätzlich APP enthaltenden Vektor mit Hygromycin-Resistenz aufgenommen und stabil in ihr Genom integriert hatten. Die vorbereiteten Zellkulturflaschen wurden dann im Zellkulturschrank auf eine konstante Temperatur von 37°C eingestellt (bei einer Luftfeuchtigkeit von 80 % und einem CO₂-Gehalt von 5 %). Alle 2 bis maximal 3 Tage, oder wenn die Zellen unter dem Mikroskop als deutlich konfluent zu erkennen waren, wurden die Zellsuspensionen verdünnt. Um die Zellsuspensionen zu verdünnen, wurde zunächst der gesamte Überstand mit einer sterilen Pipette abgesaugt und verworfen. Die adhärennten Zellen wurden danach mit 3 ml PBS gewaschen und mit 3 ml PBS/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst. Dabei war es sehr hilfreich, die Zellen für 10-15 Min. in den Zellkulturschrank zu geben und danach mit der Hand vorsichtig an den Flaschenrand zu klopfen. Zu den abgelösten Zellen wurde danach 3 ml frisches Medium zugegeben, das Medium und die Zellen abgesaugt und je nach Bedarf mit frischem Medium und Antibiotika in neue Zellkulturflaschen verteilt.

3.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung wurde mit der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Diese besteht aus einer ca. 3 cm x 8 cm großen und ca. 5 mm dicken Glasplatte, auf der ein Linienraster genaue Flächensegmente definiert und einem Glasdeckplättchen, welches auf

zwei eingeschliffenen Glasstegen der Zählkammer aufliegt und die Höhe der Zählkammer bestimmt. Durch Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen lässt sich die Anzahl der Zellen pro Volumeneinheit errechnen. Zur Zellzahlbestimmung wurden 1 µl der zu bestimmenden Zellsuspension in ein mit 90 µl Medium vorbereitetes Eppendorfgefäß gegeben, dazu 100 µl Trypanblau hinzugefügt und alles gut gemischt. Das Trypanblau dient der Bestimmung der Lebendzellzahl, da Trypanblau durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol eindringen kann und diese Zellen somit tiefblau färbt. Lebende Zellen erscheinen hingegen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Die Oberfläche der Zählkammer wurde mit 70 %igem Isopropanol gereinigt und nach Anfeuchten der beiden Glasstege mit dem Deckgläschen bedeckt. Danach wurde eine Pipette an die Kante des Glasplättchens angesetzt, worauf die mit Trypanblau gefärbte Zelllösung durch Kapillarkraft in die beiden Zählkammern eingesogen wurde. Auf beiden Seiten der Kammer wurden jeweils vier diagonale Quadrate des Mittelfelds ausgezählt. Um doppelte Zählungen zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass diejenigen Zellen, die links und oben auf der Doppellinie lagen, mitgezählt wurden, Zellen auf der rechten oder unteren Doppellinie jedoch nicht.

Die Berechnung der Gesamtzellzahl erfolgte dann nach folgender Formel:

$$(\text{Gesamtzellzahl beider Seiten} : 2) \times 10 \times 80 = \text{Zellzahl pro } 1 \mu\text{l}$$

3.2.1.5 Einfrieren der Zellen

Nicht mehr benötigte Zellen wurden wieder in Gefrierröhrchen eingefroren. Dazu wurde eine große Zellkulturflasche wie zuvor bei der Zellverdünnung beschrieben, vorbereitet. Der abgelöste Zellinhalt wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 10 Min. bei 1000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin abgegossen und die Restzellen mit 1 ml Gefriermedium resuspendiert. Anschließend wurden die Röhrchen sofort in den -80°C Gefrierschrank gegeben.

3.2.2 Transformation und Aufreinigung der Plasmide

3.2.2.1 Plasmide ausschneiden

Plasmide sind kleine zirkuläre DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen vorkommen können aber nicht zur eigentlichen DNA des Bakterienchromosoms gehören. Sie enthalten mehrere Gene. Vermitteln diese Gene z.B. eine Antibiotika-Resistenz, kann daraus für das Wirtsbakterium ein Selektionsvorteil resultieren. Plasmide können als Klonierungsvektoren verwendet werden, um fremd eingebaute Gene zu vervielfältigen oder um ein Fremd-Gen in Zellen anderer Organismen einzuschleusen.

Um die auf Filterpapier erhaltenen Plasmide zu resuspendieren, wurde die mit einem Kreis markierte, Plasmid enthaltende Stelle unter der Sterilbank mit einer mit Alkohol desinfizierten Schere ausgeschnitten und mit einer ebenfalls desinfizierten Pinzette in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden anschließend 50 µl einer 10 mM Tris-HCl Lösung mit pH 7,6 pipettiert, alles gemischt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation bei 4000 U/Min. für 1 Min. konnten 6 µl des Überstandes für die Transformation in kompetente *Escherichia coli*-Stämme weiterverwendet werden.

3.2.2.2 LB-Medium und Agaroseplatten

Im nächsten Schritt wurden für die Transformation LB-Medium und Agaroseplatten hergestellt. In einem 500 ml Glaskolben wurden 4 g Agarose abgewogen und 250 ml LB-Medium dazugegeben. LB-Medium (= **L**ysogeny **B**roth) ist eine komplexe Nährlösung zur Anzucht von Bakterien, die Hefeextrakt, Peptide, Aminosäuren und Kochsalz enthält. In der Mikrowelle wurden Agarose und LB-Medium mehrmals aufgeköcht und umgerührt bis sich die Agarose weitgehend gelöst hatte. Zum kurzen Abkühlen kam der Glaskolben anschließend auf einen Rührer, danach wurde das benötigte Selektionsantibiotikum zugegeben (z.B. 250 µl Kanamycin 25 mg/ml). Unter der Sterilbank wurde alles abschließend auf große Petrischalen gegossen, bis diese gut bedeckt waren.

3.2.2.3 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Stämme mit der CaCl_2 -Methode

Die Transformation der Plasmide erfolgte in kompetenten *Escherichia coli*-Bakterien (Stamm DH5 α). Zu Beginn wurde ein 100 µl DH5 α -Zellen enthaltendes Eppendorfgefäß in 200 ml LB-Medium gegeben und die Optische Dichte bei 600 nm (= OD₆₀₀) gemessen. In einem sterilen Glaskolben wurden die Zellen danach bei 180 U/Min. und 37°C auf dem

Schüttelgerät gemischt und in regelmäßigen Abständen der OD_{600} -Wert kontrolliert. Die *Escherichia coli*-Zellen verdoppelten sich nach kurzer Latenzzeit alle 20 Min. einmal bis zu einem maximalen Wert, ehe die Zellzahl wieder kontinuierlich abnahm. Die Ernte der Zellen erfolgte bei einem OD_{600} -Wert von 0,4.

Für die Ernte wurden die Zellen zunächst in einen sterilen Becher umgefüllt und 20 Min. bei 4000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abpipettiert und verworfen und das entstandene Pellet erst mit 1 ml sterilem 0,1 M $CaCl_2$ gelöst. Nach Zugabe weiterer 19 ml sterilem $CaCl_2$ (= insgesamt 1/10 des Anfangsvolumens) wurde alles in ein Falconröhrchen umgefüllt. Das Falcon-Röhrchen wurde nochmals 20 Min. bei 4000 U/Min. zentrifugiert, der Überstand abermals verworfen und das Pellet wieder mit 1 ml sterilem $CaCl_2$ gelöst und mit weiteren 3 ml sterilem $CaCl_2$ ergänzt (= 1/50 des Ausgangsvolumens). Zu diesen wurde dann 12 % (= 600 μ l) steriles Glycerol zugegeben und alles gut gemischt. Nachdem das Falcon-Röhrchen auf Eis gestellt wurde, wurden Aliquots zu jeweils 100 μ l angefertigt und sofort im -80°C -Gefrierschrank eingefroren.

3.2.2.4 $CaCl_2$ -Transformation

Die Transformation ist eine Methode zur Übertragung genetischer Information, bei der freie DNA in Bakterien aufgenommen wird. Die Bakterienzellen werden durch Zugabe von Calciumchlorid so vorbehandelt, dass ihre Zellmembranen durchlässig werden und die fremde DNA leichter aufnehmen können.

Zunächst wurde 0,7 μ g Plasmid-DNA schnell auf 100 μ l gefrorene DH5 α -Zellen auf Eis pipettiert und 30 Min. inkubiert. Währenddessen wurde ein großer Glaskolben autoklaviert und eine Agaroseplatte zum Antrocknen in die Sterilbank überführt. Nach 30 Min. wurden die Zellen mit der DNA für 40 Sek. bei 42°C inkubiert und danach für 2 Min. auf Eis gegeben. An einem Bunsenbrenner erfolgte dann die Zugabe von 1 ml LB-Medium und das Mischen durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette. Die Suspension wurde danach für 60 Min. unter Schütteln bei 37°C inkubiert, das Eppendorfgefäß kurz bei 4000 U/Min. für 1 Min. zentrifugiert und 900 μ l Überstand abgenommen und verworfen. Der Rest wurde in 100 μ l frischem LB-Medium resuspendiert, auf der Agaroseplatte mit einem sterilen Spatel ausplattiert und im 37°C -Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden von jeder Platte 2 gut gewachsene und einzeln liegende Kolonien mit

einem sterilen Spatel gepickt. Jede Kolonie wurde dann in ein steriles Röhrchen mit 4 ml LB-Medium und 4 µl Selektionsantibiotikum überführt, so dass eine Endkonzentration von 50 µg/ml erreicht wurde. Die Suspensionen wurden daraufhin unter Schütteln bei 37°C für etwa 24 Std. inkubiert.

3.2.2.5 Aufreinigung der Plasmide

Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte nach dem PureYield™ Midiprep Kurzprotokoll. Zunächst wurden die Zellsuspensionen in sterile Becher gefüllt und 20 Min. bei 23°C und 4000 U/Min. abzentrifugiert. Der Überstand konnte danach abgeschüttet und gegebenenfalls der Rest mit einer Pipette noch vollständig entfernt werden. Anschließend erfolgte die Lyse der Bakterien und die Proteinfällung. Das Zellpellet wurde dazu mit 2 ml Cell Resuspension Solution abgelöst, dann nochmals 3 ml Cell Resuspension Solution zugegeben und alles in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Auf diese Lösung wurden dann 5 ml Cell Lysis Solution pipettiert und durch 5-maliges Invertieren alles vorsichtig aber gründlich gemischt und 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 8 ml Neutralization Solution mit erneutem 5-maligem Invertieren, 2-3 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und einem letzten Invertieren. Um die Zelltrümmer und die Proteine zu einem Pellet zu formen, wurde das Falcon-Röhrchen daraufhin für 20 Min. bei 5000 U/Min. zentrifugiert. Die nachfolgende DNA-Aufreinigung wurde an einer Vakuum-Station durchgeführt. Eine blaue Clearing Column wurde auf eine weiße Binding Column gesetzt und die Säulenkombination auf die Vakuum-Station gesteckt. Das zentrifugierte Lysat wurde vollständig in die blaue Clearing-Column gekippt, das Vakuum angelegt, die Flüssigkeit vollständig durch beide Säulen gesaugt und das Vakuum wieder abgestellt. Somit wurde die Plasmid-DNA an die Säulen-Matrix gebunden. Die Clearing Column wurde dann verworfen und es folgten zwei verschiedene Waschschritte. Zuerst wurden 5 ml Endotoxin Removal Wash Solution durch die Binding Column gesaugt, dann 20 ml Column Wash Solution und das Vakuum für noch weitere 30 bis maximal 60 Sek. aufrechterhalten. Die Säule wurde anschließend von der Vakuum-Station abgenommen, die Spitze auf einem Papiertuch abgetupft und in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Das Auswaschen der DNA erfolgte durch Zugabe von 600 µl 50–70°C heißem Nuclease-Free Water für 5 Min. Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen mit der enthaltenen Säule im Swing-Out-Rotor bei 4.230 U/Min. und

Raumtemperatur für 5 Min. zentrifugiert. Die erhaltene saubere DNA wurde dann in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und eine DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Photometer angeschlossen.

3.2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der DNA-(und RNA-) Extinktion wurden die folgende Formeln verwendet: DNA-Extinktion^{260nm} x 50 = (Extinktionskoeffizient) x Verdünnung

$$\text{RNA-Extinktion}^{260\text{nm}} \times 40 = (\text{Extinktionskoeffizient}) \times \text{Verdünnung}$$

Im Photometer wurde als erstes eine kleine Küvette mit 50 µl reinem Nuclease-Free Water als Nullwert gemessen. Die zu bestimmende DNA-Probe wurde auf 1:50 verdünnt (1 µl Probe + 49 µl Nuclease-Free Water), in eine zweite Küvette eingefüllt und ebenfalls gemessen. Man konnte davon ausgehen, dass die DNA sauber ist, wenn die Ratio 200/280 Werte zwischen 1,6 bis 2,0 aufwies.

3.2.3 Herstellung eines leeren Vektors

3.2.3.1 Plasmidverdau

Um Vergleiche zwischen SR-BI-positiven und nicht SR-BI enthaltenden Zellen zu ermöglichen, wurden die Kontrollzellen mit einem Vektor transfiziert, der nicht die cDNA für SR-BI aufwies. Dafür wurde das Plasmid pmRFP-hSR-BI ausgewählt (Abb. 6).

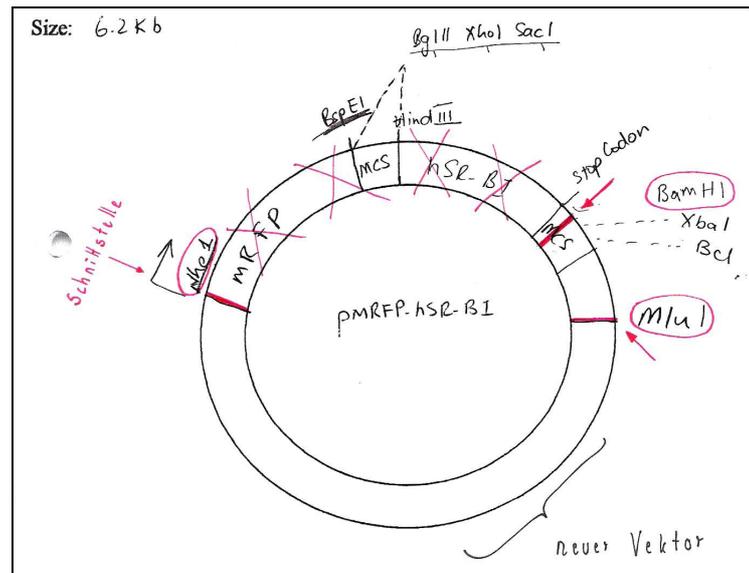


Abb. 6: Der Vektor pmRFP-hSR-BI und seine enzymatischen Schnittstellen

Zur Herstellung des leeren Vektors wurde der Vektor pmRFP-hSR-BI in zwei Ansätzen einmal mit den Enzymen NheI und BamHI und das andere Mal mit NheI und MluI aufgeschnitten. Die Schnittfragmente wurden anschließend in der Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt. Nachdem die offenen Vektorenden ergänzt und miteinander verknüpft wurden, wurden diese in die Versuchszellen transfiziert.

Der 6,2 Kb große Vektor sollte einmal durch Zugabe der Restriktionsenzyme Nhe I und BamH I und einmal durch Zugabe von Nhe I und Mlu I so geschnitten werden, dass ein kleineres, hSR-BI enthaltendes Teilstück und ein größeres Stück ohne hSR-BI entstehen. Das Größere wurde für den neuen Vektor benötigt. Für den Plasmidverdau wurden zwei Ansätze vorbereitet. Für den ersten Ansatz wurden

10 µl pmRFP-hSR-BI
 2 µl Puffer 2 (10x)
 1 µl Nhe I
 1 µl BamH I und
 6 µl steriles Wasser

und für den zweiten Ansatz

10 µl pmRFP-hSR-BI
 2 µl Puffer 2 (10x)
 1 µl Nhe I
 1 µl Mlu I und
 6 µl steriles Wasser

in einem sterilen Eppendorfgefäß zusammen suspendiert.

3.2.3.2 Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese können DNA-Stränge auf einer Gelmatrix ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Vergleicht man diese dann mit DNA-Strängen bekannter Länge (DNA-Leiter), so kann die exakte Größe der DNA-Stränge bestimmt werden. Die DNA-Stränge werden auf eine Gelmatrix pipettiert, an die ein elektrisches Feld angelegt wird. Die negativ geladene DNA wandert dann von der negativ geladenen Kathode zur positiv geladenen Anode, wobei kleinere Moleküle sich schneller durch das Gel bewegen, größere Moleküle dagegen langsamer laufen. Nach Zugabe von Ethidiumbromid, das sich in die DNA einlagert und im ultravioletten Licht fluoresziert, kann die DNA unter UV-Licht betrachtet, auf dem Schneidetisch ausgeschnitten und daraufhin aufgereinigt werden.

Für die Gelelektrophorese wurde zunächst ein 1,2 %iges Agarosegel gegossen. Dazu wurden 1,2 g Agarose in einem Glaskolben abgewogen, mit 100 ml TBE-Puffer (= TRIS-Borat-EDTA-Puffer) aufgefüllt, kurz gemischt und in der Mikrowelle mehrmals kurz aufgeköcht. Die vollständig aufgelöste Agarose wurde dann nach Abkühlen in eine vorbereitete Gelkammer eingefüllt und am oberen Rand ein Kamm eingesetzt. Nach 30–45 Min. war die Agarose auskristallisiert, so dass man den Kamm herausziehen konnte. Das fertige Gel wurde vollständig mit TBE-Puffer bedeckt und die durch den Kamm entstandenen Taschen mit dem Puffer kurz gespült. In die erste Tasche wurden mit einer dünnen Pipette 13 µl DNA-Leiter eingefüllt, in die übrigen Taschen jeweils 7 µl DNA-Probe, denen etwas Probenpuffer mit Farbmärker beigefügt wurde. Anschließend wurde eine elektrische Spannung von 50 V an die Gelkammer angelegt. Nach ungefähr 10 Min. wurde diese dann auf 100 V erhöht. Die Gelelektrophorese wurde so lange durchgeführt, bis sich die DNA-Fragmente gut aufgetrennt hatten. Das fertige Gel wurde anschließend in einer Wanne für 5 Min. mit Ethidiumbromid übergossen. Unter der UV-Lampe konnte die DNA anschließend betrachtet und fotografiert werden. Auf dem Schneidetisch wurde die 3,9 Kb-Bande (Probe aus Nhe I und BamH I) bzw. die 3,6 Kb-Bande (Probe aus Nhe I und Mlu I) ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß zur DNA-Aufreinigung überführt.

3.2.3.3 DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung der DNA-Moleküle aus dem Agarosegel erfolgte nach dem Quick Protocol von Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Als erstes wurden in einem 1,5

ml Eppendorfgefäß pro 10 mg Gelstück 10 µl Membrane Binding Solution dazugegeben und alles gut gemischt. Im 65°C warmen Wasserbad wurde das Gelstück vollständig aufgelöst, wobei das Eppendorfgefäß mehrmals invertiert werden musste. Anschließend wurde eine SV Minicolumn in eine Collection Tube gesteckt, das aufgelöste Gel in die Minicolumn gegeben und 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer darauf folgenden Zentrifugation bei 13000 U/Min. für 1 Min. wurde der Durchfluss weggeschüttet und die Säulenkombination wieder zusammen gesetzt. In gleicher Weise erfolgte erst die Zugabe von 700 µl Membrane Wash Solution mit erneuter Zentrifugation und dann die Zugabe von 500 µl Membrane Wash Solution mit einer Zentrifugation über 5 Min. Damit das restliche Ethanol noch verdampfen konnte, wurde abschließend noch einmal eine Zentrifugation bei 13000 U/Min. für 1 Min. jedoch ohne Zentrifugendeckel angeschlossen. Die Minicolumn wurde dann auf ein frisches Eppendorfgefäß gesetzt. Um die DNA aus der Membran zu lösen, wurden 35 µl Nuclease-Free Water zugegeben und die Suspension für 1 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 13000 U/Min. zentrifugiert. Nachdem die Minicolumn entfernt wurde, wurde das saubere Eluat in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt.

3.2.3.4 Auffüllen bzw. Abbau der überstehenden DNA-Enden

Um die nun aufgereinigten DNA-Stränge wieder zu einem ringförmigen Vektor zusammenzufügen, mussten in einem nächsten Schritt die durch die Restriktion entstandenen überstehenden Enden wieder aufgefüllt bzw. abgebaut werden. Dafür wurde das Klenow Enzym verwendet. Als Klenow-Fragment wird die größere der beiden Untereinheiten der DNA-Polymerase I von *Escherichia coli* bezeichnet. Es verfügt über eine 5'-3'-Polymerase-Funktion, mit der am 5'-Ende-überstehende, einzelsträngige DNA-Sequenzen mit Nukleotiden aufgefüllt werden, sowie eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, mit der am 3'-Ende-überstehende, einzelsträngige DNA-Sequenzen abgebaut werden. Es entstehen damit vollständige Enden, sogenannte blunt ends, die dann durch Ligation miteinander verbunden werden können.

Für den Klenow-Ansatz des 3,9 Kb DNA-Stückes (aus Nhe I und BamH I) wurden

8 µl DNA
1 µl Klenow Enzym (100 U)
2 µl 10x Filling Puffer
2 µl dNTPs (1 mM) und
7 µl steriles Wasser,

für den Klenow-Ansatz des 3,6 Kb DNA-Stückes (aus Nhe I und Mlu I)

15 µl DNA
1 µl Klenow Enzym (100 U)
2 µl 10x Filling Puffer und
2 µl dNTPs (1 mM)

in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und 15 Min. bei 37°C inkubiert. Die Enzyminaktivierung erfolgte anschließend bei 65°C (10 Min.).

3.2.3.5 Ligation

Bei der Ligation wurde mit Hilfe des Enzyms Ligase die 3'-Hydroxy- und die 5'-Phosphat-Enden der DNA verbunden und somit der lineare DNA-Strang mit den neu gebildeten vollständigen Enden zu einem zirkulären Vektor zusammengeführt.

Dazu wurden 6 µl des Klenow-Ansatzes mit

2 µl 10x T4-DNA Ligase Puffer
0,5 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl) und
11,5 µl steriles Wasser

vermischt und im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Ligase dann bei -80°C inaktiviert werden.

3.2.3.6 CaCl₂-Transformation

Im nächsten Schritt erfolgte wie zuvor beschrieben die CaCl₂-Transformation mit 5 µl DNA (für Nhe I+BamH I) und 10 µl DNA (für Nhe I+Mlu I) der vorherigen Ligation und die Aufreinigung der leeren Vektoren mit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System.

3.2.3.7 Plasmid-Aufreinigung

Je 2 ml der 4 ml Über-Nacht-Kultur wurden in ein großes Eppendorfgefäß geben und 5 Min. bei 9.460 U/Min. zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgeschüttet, die restlichen 2 ml Kultur dazugegeben, nochmals zentrifugiert und wieder der Überstand verworfen. Mit 250 µl Cell Resuspension Solution wurde das Zellpellet anschließend resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Cell Lysis Solution und 4-maligem Invertieren und 10 µl Alkaline Protease Solution und erneutem 4-maligem Invertieren wurde alles für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zufügen von 350 µl Neutralization Solution wurde das Eppendorfgefäß 10 Min. bei 13.500 U/Min. zentrifugiert. Daraufhin wurde eine Spin Column auf eine Collection Tube gesetzt und der Überstand in die Spin Column gegeben. Um die DNA an die Spin Column zu binden, wurden die Säulen bei 13.500 U/Min. für 1 Min. zentrifugiert, der Durchfluss weggeschüttet und die Säulenkombination wieder zusammengesetzt. Anschließend wurde mit 750 µl Wash Solution gefolgt von einer 1-minütigen Zentrifugation sowie 250 µl Wash Solution gefolgt von einer 2-minütigen Zentrifugation bei 13.500 U/Min. gewaschen. Die Spin Column wurde dann in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 35 µl Nuclease-Free Water 1 Min. bei 13.500 U/Min. eluiert. Zum Abschluss wurde die DNA-Konzentration bestimmt und die Proben bei -20°C eingefroren.

3.2.4 Proteinbestimmung

Alle durchgeführten Proteinbestimmungen wurden mit dem BC Assay (= **B**icinchoninic **A**cid) der Firma Uptima angefertigt. Peptidbindungen innerhalb der zu bestimmenden Proteine führen zunächst zu einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , wobei die Menge an reduziertem Cu^{2+} proportional zur Proteinmenge in der Probe ist. In einem zweiten Schritt bildet das BC Assay mit hoher Spezifität mit jedem Cu^+ -Ion einen Chelat-Komplex, so dass eine lilafarbene, wasserlösliche Lösung entsteht. Wird nun nach einem definierten Zeitraum das Absorptionsspektrum bei 562 nm gemessen, kann im Vergleich mit einer vorbekannten Proteinlösung die Proteinmenge in der Testlösung bestimmt werden. Zunächst wurden für die Proteinbestimmung Proben für eine Standardreihe nach den Vorschriften des Herstellers erstellt. In eine 96-well-Platte wurden anschließend pro Well 10 µl Standard bzw. Probe pipettiert. Dazu kamen 200 µl BC Assay Reagenz im Verhältnis

A:B = 50:1. Die Platte wurde dann kurz auf dem Schüttler bei niedriger Stufe gemischt und 30 Min. in den 37°C-Schrank gestellt. Nachdem die Platte bei Raumtemperatur kurz abgekühlt und alle Luftbläschen entfernt worden waren, wurde im Photometer die optische Dichte bei 562 nm bestimmt. Aus den vorbekannten Proben wurde eine Standardreihe erstellt, mit welcher dann auf den mg/ml-Gehalt der zu untersuchenden Proben rückgeschlossen werden konnte.

3.2.5 Transiente Transfektion

Unter der Transfektion versteht man das Einbringen von fremder DNA in eukaryontische Zellen. Für die Transfektion wurden die Zellkulturschalen und Wells zunächst mit Poly-L-Lysin vorbehandelt. Dazu wurde eine Mischung aus destilliertem Wasser und Poly-L-Lysin 1:1000 hergestellt und auf den Boden gegeben, bis dieser vollständig bedeckt war. Nach 30 Min. Inkubationszeit wurde das Poly-L-Lysin wieder entfernt, zweimal mit PBS gewaschen und danach das neue Medium eingefüllt.

Die transiente Transfektion wurde durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin durchgeführt. Transfiziert wurden die Plasmide ph SR-BI, pmRFP-hSR-BI, pEGFP-(hSR-BI) und ein leerer Vektor. Zunächst wurde die benötigte Menge DNA im vorgeschriebenen Volumen DMEM ohne FBS und ohne Antibiotika gelöst und gemischt. In einem zweiten Gefäß wurde dann das Lipofectamin mit dem DMEM gemischt und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesen 5 Min. wurde die DNA auf das Lipofectamin gegeben, alles nochmals kurz gemischt und für weitere 20 Min. bei Raumtemperatur belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde dann die Mischung in Tröpfchen und unter kreisenden Bewegungen der Zellkultur-Platte langsam zugegeben. Ein gutes Transfektionsergebnis konnte nach 24-48 Std. erreicht werden.

3.2.6 Stabile Transfektion

Um das SR-BI Plasmid dauerhaft in die Zell-DNA einzufügen, musste das Plasmid zunächst linearisiert werden. Zu Beginn wurde deshalb der Vektor ph SR-BI mit dem Enzym Not I in zwei Restriktionsansätzen verdaut.

Dazu wurden

- 1 µl Not I-Enzym (10 U)
- 2 µl Puffer 3
- 2 µl ph SR-BI (2,6 µg/µl) und
- 15 µl steriles Wasser

zusammengemischt, kurz zentrifugiert und dann 3 Std. bei 37°C inkubiert. Die nachfolgende Gelelektrophorese wurde mit 20 µl dieses Ansatzes zusammen mit 5 µl Probenpuffer auf einem 1,2 %igem Agarosegel durchgeführt. Die 6,2 Kb DNA-Stelle wurde anschließend auf dem Schneidetisch aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Kit der Firma Qiagen eluiert. Zu dem ausgeschnittenen Gelstück in einem Eppendorfgefäß wurde zunächst das 3-fache Gelvolumen an QG Buffer zugegeben, so dass sich das Gel nun gelb färbte. Das Eppendorfgefäß wurde dann in ein 50°C warmes Wasserbad für 10 Min. gestellt und 1 Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt. Danach wurde eine Säule auf ein Sammeltube gesetzt und die DNA in die Säule überführt. Nach einer Zentrifugation bei 13000 U/Min. für 1 Min. wurde der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde mit 500 µl QG Puffer gewaschen, zentrifugiert und dann in 750 µl PE Puffer resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Der Durchfluss wurde danach wieder abgeschüttet und die Matrix nochmals zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und 50 µl TE-Puffer zugefügt. Nach einer letzten Zentrifugation erhielt man eine lineare und stabile DNA, deren Konzentration dann bestimmt wurde.

Anschließend konnte die DNA in vorbereitete Flaschen mit HEK 293 und HEK 293-1.1 Zellen transfiziert werden. Zuerst wurden 752 µl DMEM ohne FBS in einem 2 ml Eppendorfgefäß vorgelegt. 24 µl des Transfektionsreagenz FuGene wurden dann direkt ins Medium gegeben, ohne das Gefäß zu berühren. Nachdem das Eppendorfgefäß vorsichtig gemischt wurde, wurden 24 µl DNA dazugegeben, alles nochmals gemischt und 40 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. 2 bis 3 Tage später wurde bei allen Flaschen das Medium gewechselt und 100 µl Antibiotika mit 100 µl des Selektionsantibiotikums Geneticin (= G 418) dazugegeben. Somit konnten im weiteren Verlauf nur die HEK-Zellen überleben, die das Plasmid auch wirklich in ihr Genom stabil integriert hatten. Sobald die Zellkulturflaschen relativ dicht bewachsen waren, wurden die Zellen auf eine 96-well Platte umgesetzt und zwar so, dass in jedem Well nur eine Zelle übrig blieb. Die zu größeren Haufen neu gewachsenen Monoklone wurden zum Abschluss dann wieder in große Zellkulturflaschen gegeben. Um den Transfektionserfolg zu überprüfen wurden die

transfizierten Zellen im letzten Schritt mit der SDS-PAGE und dem Western Blot auf ihre SR-BI Expression untersucht.

3.2.7 SDS-PAGE und Western Blot

3.2.7.1 Gele gießen bzw. Gele vorbereiten

In der SDS-PAGE (= PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) wird ein Proteingemisch, das auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen wird, im elektrischen Feld entsprechend seiner Größe in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine beim Blotten des Polyacrylamid-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper können einzelne Proteinbanden danach genauer identifiziert werden.

Alle Western Blot Versuche wurden mit einem 7,5 %igen Tris-HCl Gel der Firma BioRad durchgeführt. Für die A β -Messung wurde das Schaeegergel verwendet. Für das Schaeegergel wurden 5 ml 16,5 % und 2,5 ml 10 % Gel in einer vorbereiteten Gelkammer zwischen zwei Glasplatten, die durch einen Platzhalter voneinander getrennt wurden, eingefüllt und übereinander geschichtet. Darauf wurde vorsichtig etwas Isopropanol gegeben und beide Schichten für 10 Min. fest werden gelassen. Das Isopropanol wurde dann abgeschüttet, mehrmals kurz mit destilliertem Wasser gespült, dann das 4 % Sammelgel hinzugefügt, gleichzeitig der Kamm eingesetzt und wieder gewartet, bis die Gelschicht fest geworden war. Das fertige Gel konnte dann entweder sofort verwendet oder bei 4°C für längstens 24 Std. aufbewahrt werden. Für die A β -Immunopräzipitation wurde das Schaeegergel in eine Laufkammer eingespannt und mit zwei separaten Puffern befüllt. Außen wurde Anodenpuffer, innen Kathodenpuffer verwendet.

3.2.7.2 Auftragen der Proben und Auftrennung der Proteine

Das Gel wurde in eine Gelkammer eingespannt und mit Laufpuffer vollständig bedeckt. Die vorbereiteten Proteinproben wurden dann mit einer dünnen Pipette in die kurz vorgespülten Taschen des Gels eingefüllt. In die erste Bahn wurde eine Proteinleiter

gegeben, damit später die Größe der entstandenen Banden bestimmt werden konnte. Die Gelelektrophorese wurde mit 70–80 V gestartet und sobald die Proben das Trenngel erreicht hatten, auf etwa 110–120 V erhöht. Kurz bevor die Proben auf dem unteren Ende des Gels angekommen waren, wurde die Gelkammer abgeschaltet.

3.2.7.3 Geltransfer auf Nitrocellulosemembran

Nach der Gelelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Zuvor wurden eine Nitrocellulosemembran und zwei Filterpapiere in Transferpuffer eingelegt, auf dem Schüttler geschüttelt und danach mit dem Gel zu einem blasenfreien Sandwich bestehend aus Anode, Filterpapier, Nitrocellulosemembran, Gel, Filterpapier und Kathode, zusammengebaut. Bei 4°C und 280–300 mA wurden nach etwa 1–1½ Std. die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Nitrocellulosemembran gebunden. Das an die Proteine angelagerte SDS wurde bei diesem Vorgang ausgewaschen, so dass die Proteine renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur, jedoch nicht ihre Quartärstruktur wieder einnehmen konnten. Die Proteine konnten deshalb im Anschluss von Antikörpern erkannt werden.

3.2.7.4 Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen und Zugabe der Antikörper

Die geblottete Membran wurde im Anschluss in ein Falcon-Röhrchen gegeben und mit 5 ml Blocking Puffer 1 Std. lang inkubiert. Mit dem im Blocking Puffer enthaltenen BSA wurden unspezifische Bindungsstellen der Proteine blockiert. Anschließend wurden die Antikörper zugegeben. Der Primärantikörper wurde in 5 ml Blocking Puffer gelöst und 2 Std. auf der Membran belassen. Nach zweimaligem Spülen und 3x 10-minütigem Waschen mit TBST-Lösung, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde der Sekundärantikörper in 5 ml Blocking Puffer für 1 Std. hinzugefügt. Zum Abschluss wurde die Membran wie zuvor nochmals gewaschen und danach in eine durchsichtige Folie gegeben.

3.2.7.5 Entwickeln der Membran

In der Dunkelkammer wurden 1000 μl der ECL 1- und 1000 μl der ECL 2-Lösung in einem großen Eppendorfgefäß zusammengemischt und auf die in der Folie liegende vorbereitete Membran pipettiert. Nach 1 Min. wurde die Lösung mit Papier aus der Folie herausgestrichen und die Membran in eine Filmkassette gelegt. Ein darauf gelegter Röntgenfilm wurde unterschiedlich lange belichtet und der Film dann im Entwickler entwickelt und ausgedruckt. Die Membran wurde zum Schluss zur späteren weiteren Bearbeitung kurz getrocknet, in Alufolie eingepackt und aufbewahrt.

3.2.7.6 Strippen der Membran

Um den Western Blot eines Versuches auf unterschiedliche Proteine zu untersuchen, war es nötig, die zuvor verwendeten Antikörper von dieser Membran wieder zu entfernen (= strippen), bevor neue Antikörper hinzugefügt werden konnten. Dafür wurde die in Alufolie eingepackte, getrocknete Membran kurz in Waschpuffer eingelegt. Anschließend kam die Membran in ein gut verschließbares Gefäß mit 50 ml Stripping Puffer und 350 μl Mercaptoethanol und wurde 2 Std. bei 50°C geschüttelt. Nach den 2 Std. wurde unter dem Abzug der Stripping Puffer abgossen, die Membran zweimal mit Waschpuffer gespült und 5–6 Mal 5 Min. mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran wie gewohnt zunächst mit Blocking Puffer geblockt, ehe die neuen Antikörper zugegeben wurden.

3.2.8 Einzelne Versuchsdurchführungen

3.2.8.1 APP, APPs α und APPs β in transient transfizierten Zellen

Am ersten Tag wurden die Zellen ($2,5 \times 10^5$) auf die Wells einer mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-well Platte ausgesät. Nachdem jeweils 500 μl Medium und 5 μl Antibiotika zugegeben wurden, wurde die Well-Platte über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden danach pro Ansatz mit 0,5 μg DNA in 50 μl DMEM und 2 μl Lipofectamin in 50 μl DMEM

transfiziert. Alle Überstände wurden am dritten Tag vollständig abgesaugt und frisches Medium mit Antibiotika zugegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte der Zellen. Dazu wurde der Überstand abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 13000 U/Min. wurde der nun gereinigte Überstand wiederum in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und auf Eis gestellt. Auf die Zellen kamen daraufhin 400 µl 1x PBS, die vorsichtig am Rand reingelaufen lassen und gleich danach wieder abgesaugt wurden. Die Platte wurde dann auf Eis gestellt, 300 µl Lysispuffer bestehend aus Solubilisierungspuffer und Protease-/Phosphatase-Inhibitor, hinzugegeben und 10 Min. inkubiert. Nach den 10 Min. wurden die lysierten Zellbestandteile durch kreisförmiges Spritzen mit der Pipette vom Plattenboden abgelöst, in ein Eppendorfgefäß gefüllt und nochmals 10 Min. auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Eppendorfgefäße bei 4°C und bei 13000 U/Min. für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand davon in ein neues Eppendorfgefäß umgefüllt.

60 µl Probe vom Überstand und dem Zelllysats wurden dann mit 20 µl 4x Probenpuffer gemischt und im 95°C heißen Wasserbad für 5 Min. denaturiert. Nachdem von den Proben des Zelllysats die Proteinkonzentration bestimmt worden war, wurden alle Proben zusammen mit 7 µl Proteinstandard auf ein 7,5 %iges Gel aufgetragen. Das Gel wurde zunächst bei 90 V laufen gelassen, später wurde es dann auf 120/130 V erhöht. Anschließend wurde das Gel mit 75 V für 75 Min. geblottet und danach für 30–35 Min. in Milch geblockt (6 % Milchpulver + PBST). Für den Western Blot wurden folgende Antikörper verwendet:

- Test auf APP (im ZL) und APPs (im Üst.) → 22C11 (1:5000) und anti-Mouse (1:2000)
- Test auf APPs α (im Üst.) → W02 (1:1000) und anti-Mouse (1:2000)
- Test auf APPs β (im Üst.) → AK 192 (1:100) und anti-Rabbit (1:2000)
- Test auf SR-BI (im ZL) → NB 400-104 (1:2000) und anti-Rabbit (1:2000)

3.2.8.2 A β -Immunopräzipitation

Um die A β -Bildung zu bestimmen wurde eine A β -Immunopräzipitation durchgeführt. Dafür wurden HEK 293-1.1 und SH-SY5Y Zellen (2×10^6) auf 6 cm-Schalen, die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet worden waren, ausgesät. Nach Erreichen der Adhäsion wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden die Zellen mit 8 µg DNA (pmRFP-hSR-BI

bzw. für die Kontrolle mit leerem Vektor) in 500 μ l DMEM und 20 μ l Lipofectamin in 500 μ l DMEM transfiziert. Nach 24 Std. wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 1,5 ml frisches Medium mit 15 μ l Antibiotika hinzugegeben. Nach insgesamt 72 Std. Transfektionsdauer wurde das Transfektionsergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop kurz überprüft und dann mit der Ernte der Zellen begonnen.

Als erstes wurde der Überstand abgenommen, in Eppendorfgefäße überführt, für 1 Min. bei 13000 U/Min. zentrifugiert und der Überstand wiederum in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben. Die auf dem Schalenboden adhärenen Zellen wurden mit 600 μ l 1x PBS gewaschen und die Platte auf Eis gestellt. Dann wurde auf jede 6 cm-Schale 600 μ l Lysispuffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor dazugegeben und dieser für 10 Min. wirken gelassen. Danach wurden die lysierten Zellbestandteile durch kreisförmiges Spritzen mit der Pipette leicht vom Plattenboden gelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und nochmals 10 Min. auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde das Zelllysate für 5 Min. in einer 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 13000 U/Min. zentrifugiert und der Überstand in einem frischen Eppendorfgefäß aufbewahrt. Mit Hilfe der Proteinbestimmung wurde der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt. Die A β -Bestimmung der stabil SR-BI transfizierten Monoklone erfolgte auf ähnliche Weise. Von den großen Zellkulturflaschen wurden die Zellen ($2,6 \times 10^6$) auf eine 6 cm-Schale gesetzt und 1,5 ml Medium und 15 μ l Antibiotika hinzugefügt. Nach 15 Std. Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und zentrifugiert und die restlichen Zellen mit 300 μ l Lysispuffer und Protease- und Phosphatase-Inhibitor lysiert und zentrifugiert, ehe die Proteinbestimmung angeschlossen wurde.

Der gesamte Überstand aller Proben wurde danach mit 30 μ l Protein-A-Sepharose (= PAS) für 30 Min. bei 4°C auf dem Rotary Shaker vorgereinigt. Dabei war es wichtig, die PAS vor jedem Gebrauch gut zu mischen, die Pipettenspitze vorher etwas abzuschneiden und nach Zugabe der PAS die Probe nochmals gut zu mischen. Nach 30 Min. konnten dann die PAS bei 6000 U/Min. und 4°C für 5 Min. abzentrifugiert werden. Von den vorgereinigten Überständen wurde danach der vorher in der Proteinbestimmung errechnete μ l-Wert abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Für die Immunopräzipitation wurden 2 μ l Antikörper 3552 (1:400) und 40 μ l PAS hinzugefügt und alles über Nacht bei 4°C auf dem Rotary Shaker gelassen. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben zunächst bei 6000 U/Min. und 4°C für 5 Min. abzentrifugiert, so dass die entstandenen Komplexe aus PAS, Antikörper und Protein A β auf den Gefäßboden absanken und dort

verblieben. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, so dass ein kleiner Rest noch übrig blieb. Im Anschluss daran folgten drei Waschschriffe. Zuerst erfolgte die Zugabe von 1 ml STEN-NaCl, dann eine 5-minütige Zentrifugation bei 4°C. Der Überstand wurde entfernt und danach mit 1 ml STEN-SDS bzw. 1 ml 1x STEN gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen, 12 µl 5-facher Probenpuffer hinzugegeben und alles bei 95°C für 5 Min. im Wasserbad gekocht. Die Proben wurden zusammen mit 7 µl eines Proteinstandards auf ein Schaeegergel aufgetragen und dieses bei 80 V (später bei 120 V) für ca. 2 Std. entwickelt. Das Gel wurde dann bei 400 mA für 60 Min. in der Transferkammer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die gebloottete Membran wurde anschließend in einer Glasschale, gefüllt mit 1x PBS und einigen Siedesteinchen, jeweils 2½ Min. pro Seite auf der Heizplatte gekocht und anschließend 1 Std. bei Raumtemperatur in Blocking Puffer inkubiert. Nach dem Blocken erfolgte die Zugabe des Erstantikörpers 6E10 (1:2000) und die Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 Min. mit PBST gewaschen und dann der Zweitantikörper anti-Mouse (1:5000) in Blocking Puffer 60 Min. bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nach erneutem 3 x 10-minütigem Waschen mit PBST konnte die Membran entwickelt werden.

3.2.8.3 Dichtegradient

Mit dem Saccharose-Dichtegradienten können verschiedene Membranfraktionen getrennt werden. Dafür werden die Zellen zunächst lysiert und dann mit Suspensionen verschiedener Saccharosekonzentrationen, deren Anteil an Zucker kontinuierlich abnimmt, überschichtet. In der nachfolgenden Ultrazentrifugation, bei der die Röhrchen so befestigt sind, dass sie aufgrund der Zentrifugalbeschleunigung in die Horizontale ausgelenkt werden, wandern die einzelnen Zellpartikel durch die verschiedenen Schichten und lagern sich dann an dem Ort ab, wo ihre Dichte der Dichte des umgebenden Zuckers entspricht. Für den Dichtegradienten wurden acht 75 cm² große Zellkulturflaschen verwendet, die möglichst dicht mit neuronalen SH-SY5Y-Zellen bewachsen waren. Diese Flaschen wurden mit 3 ml 1x PBS gewaschen und mit 10 ml Medium ohne Antibiotika befüllt. Jede Flasche wurde daraufhin mit 28,6 µg pmRFP-hSR-BI in 1787 µl DMEM bzw. 8 µg pmRFP-hSR-BI und 20,6 µg BACE in 1787µl DMEM (für zusätzliche BACE Überexpression) oder 8 µg leerem Vektor mit 20,6 µg BACE in 1787µl DMEM (für die

Kontrolle) und 71,4 µl Lipofectamin in 1787 µl DMEM transfiziert. Am dritten Tag erfolgte nochmals ein Mediumwechsel mit Zugabe der Antibiotika und am vierten Tag konnte dann mit der Anfertigung der Proben begonnen werden. Dazu wurde zunächst der Überstand aller Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit jeweils 3 ml 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 3 ml PBS/EDTA und kurzer Wartezeit bei 37°C konnten die Zellen gut abgelöst werden. Der Zellinhalt von jeweils zwei Flaschen wurde dann in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt und 10 Min. bei 1000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet, das Zellpellet mit 1 ml 1x PBS resuspendiert und erneut 10 Min. bei 1000 U/Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig entfernt.

Alle weiteren Versuchsschritte wurden bei 4°C auf Eis ausgeführt. Dies war insofern wichtig, da die Lipid Raft-Regionen bei 4°C in Triton X-100, im Gegensatz zu den restlichen Teilen der Zelle, unlöslich sind und zur weiteren Untersuchung erhalten bleiben. Auf das Pellet wurden nun 230 µl MNE-Puffer mit 1 % Triton X-100 und 20 µl Protease- und 20 µl Phosphatase-Inhibitor gegeben, das Pellet gut durchgemischt und 30 Min. auf Eis stehen gelassen. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer 1 ml Spritze wurde das Pellet anschließend homogenisiert. Von dieser Zellsuspension kamen 250 µl auf den Boden eines Ultrazentrifugenröhrchens und auf dieses 250 µl einer 80 %igen Saccharose-Lösung (in MNE Medium ohne Triton X-100), so dass durch sorgfältiges Mischen 500 µl einer 40 %igen Saccharose/MNE Schicht entstanden. Es erfolgte dann die Zugabe der weiteren Schichten des Gradienten durch vorsichtiges Aufleiten von 1000 µl einer 31 %igen (0,9 M), 500 µl einer 27 %igen (0,8 M), 1000 µl einer 24 %igen (0,7 M) und 1000 µl einer 3,4 %igen (0,1 M) Saccharose/MNE-Schicht, so dass ein Endvolumen von 4 ml pro Probe erreicht wurde. Alle Zentrifugenröhrchen wurden dann in die vorgekühlte Ultrazentrifuge eingesetzt und für 16 Std. bei 4°C und 49000 U/Min. ohne Bremse ultrazentrifugiert. Danach wurden die 8 Fraktionen (jeweils 500 µl) vorsichtig abgenommen und in 2 ml Eppendorfgefäße auf Eis gefüllt. Der Inhalt von zwei Ultrazentrifugenröhrchen wurde wiederum in einem Eppendorfgefäß zusammengeführt. Die 2 x 8 Fraktionen wurden 1:1 mit 20 %iger Trichloressigsäure gefällt, 20 Min. auf Eis stehen gelassen und 30 Min. in der 4°C kalten Zentrifuge bei 13000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das entstandene weißliche Pellet vollständig luftgetrocknet. Auf das Pellet der Fraktionen 1-5 wurde nach dem Lufttrocknen 30 µl 0,2 N NaOH, auf Pellet 6-8 100 µl 0,2 N NaOH gegeben und alles 15 Min. auf Eis belassen. Wenn sich die Pellets danach noch nicht gelöst hatten, wurde weitere etwa 20–30 ml

NaOH dazugegeben, und durch Mischen das Pellet aufgelöst. Die Proben wurden dann in 1 x 8 Eppendorfgläsern vereinigt und davon eine Proteinbestimmung (zusammen mit BSA in NaOH gelöst) angefertigt. Um im darauffolgenden Western Blot die Proteine zu identifizieren, wurde eine relativ hohe Proteinmenge von 64 µg ausgewählt, bei geringerer Proteinkonzentration die maximal mögliche Menge von 35 µl. In den Fraktionen 1 und 2, in denen sich stets eine deutlich geringere Proteinmenge ergab, wurde weniger Protein aufgetragen und die Probe lediglich zum Vergleich mitlaufen gelassen. Die SDS-Page und der Western Blot erfolgten nach dem oben beschriebenen Schema. Die Membranen wurden dann untersucht auf APP und BACE und nach Membran Stripping auch auf Flotillin und SR-BI. Hierbei wurden die folgenden Antikörper eingesetzt:

- Test auf APP → 22C11 (1:5000) und anti-Mouse (1:2000)
- Test auf SR-BI → NB 400-104 (1:2000) und anti-Rabbit (1:2000)
- Test auf Flotillin → anti-Flotillin IgG1 (1:250) und anti-Mouse (1:2000)
- Test auf BACE → BACE CT 7520 (1:1000) und anti-Rabbit (1:2000)

3.2.8.4 Konfokale Laserscanmikroskopie

Bei der Konfokalen Laserscanmikroskopie werden fluoreszierende Gewebsstrukturen durch kurzwellige Strahlen angeregt, langwelligere Strahlung zu emittieren. Ein Laserstrahl mit der zur Anregung der Gewebsstruktur geeigneten Wellenlänge wird, nachdem er eine Lochblende passiert hat, im Inneren des Mikroskops von einem dichromatischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Der Spiegel hat eine kritische Wellenlänge, wobei er Licht mit kleineren Wellenlängen reflektiert, Licht mit größeren Wellenlängen hingegen durchlässt. Der Spiegel wird so gewählt, dass die kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum liegt. Das vom Objekt langwelligere emittierte Fluoreszenzlicht passiert wiederum den Spiegel und wird, bevor es von einem Detektor, einem Photomultiplier, aufgenommen wird durch eine Lochblende geführt. Der Lichtdetektor erzeugt je nach Stärke des Lichtsignals ein analoges elektrisches Signal. Beide Lochblenden sowie der Fokuspunkt im Objekt liegen in konjugierten Ebenen, sind also konfokal. Nur Licht aus der Brennebene gelangt zum Detektor, während Licht aus anderen Schichten ausgeblendet wird. Um ein komplettes Bild zu erhalten, muss der Laserstrahl mit Hilfe eines Scanners Punkt für Punkt über das Objekt bewegt werden. Aus den Einzelpunkten wird dann im Computer ein Gesamtbild rekonstruiert.

Nacheinander können mehrere Schichten des Objekts in der z-Achse gescannt und abgebildet werden und ermöglichen somit optische Schnitte durch das Präparat (Abb. 7).

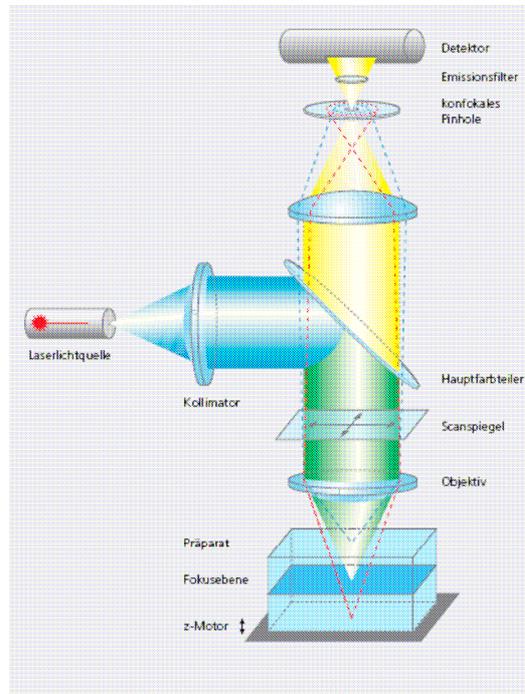


Abb. 7: Das Konfokale Laserscannmikroskop

Ein Laserstrahl mit geeigneter Wellenlänge passiert zunächst eine Lochblende und wird im Inneren des Mikroskops nach Ablenkung durch einen dichromatischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Das vom Präparat emittierte Licht wandert erneut durch den Spiegel und durch eine Lochblende und wird von einem Detektor registriert und in ein analoges elektrisches Signal umgewandelt (nach <http://www.zeiss.de>).

Die Laserscanversuche wurden in Zusammenarbeit mit Priv. Doz. Dr. Stefan Zahler (Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) angefertigt. Zunächst wurden in eine mit Poly-L-Lysin beschichtete 24 Well-Platte HEK 293-1.1 bzw. SH-SY5Y-Zellen (6×10^4) zusammen mit 500 μl Medium und 5 μl Antibiotika pro Well ausgesät. Nach Erreichen der Adhäsion wurden die Wells mit PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben (ohne Antibiotika). Die Zellen wurden mit 8 μg DNA in 50 μl DMEM und 2 μl Lipofectamin in 50 μl DMEM transfiziert. Im folgenden sind die verwendeten DNA-Mengen angeführt:

4 Ergebnisse

4.1 Wirkung der SR-BI Expression auf die APP-Prozessierung

4.1.1 APP-Expression im Überstand und im Zellysat in nicht-neuronalen Zellen

Um den Einfluss der SR-BI Expression auf die Prozessierung von APP zu untersuchen, wurden zunächst die nicht-neuronalen HEK-293 Zellen verwendet, die mit drei verschiedenen SR-BI Plasmiden (ph SR-BI, pmRFP-hSR-BI und pEGFP-(hSR-BI)) und zum Vergleich mit einem leeren Vektor transient transfiziert wurden. Bei den HEK 293-1.1 Zellen handelt es sich um veränderte HEK-293 Zellen, die eine Überexpression des APP-Proteins ermöglichen. Der für den Western Blot verwendete Antikörper 22C11 bindet an den N-Terminus des APP-Moleküls und erkennt daher sowohl das gesamte APP wie auch dessen Spaltprodukte APPs α und APPs β . Um den Erfolg der SR-BI Transfektion zu überprüfen, wurden die Membranen anschließend gestrippt und mit Hilfe des Antikörpers NB 400-104 die SR-BI Expression untersucht (Abb. 8 und 9).

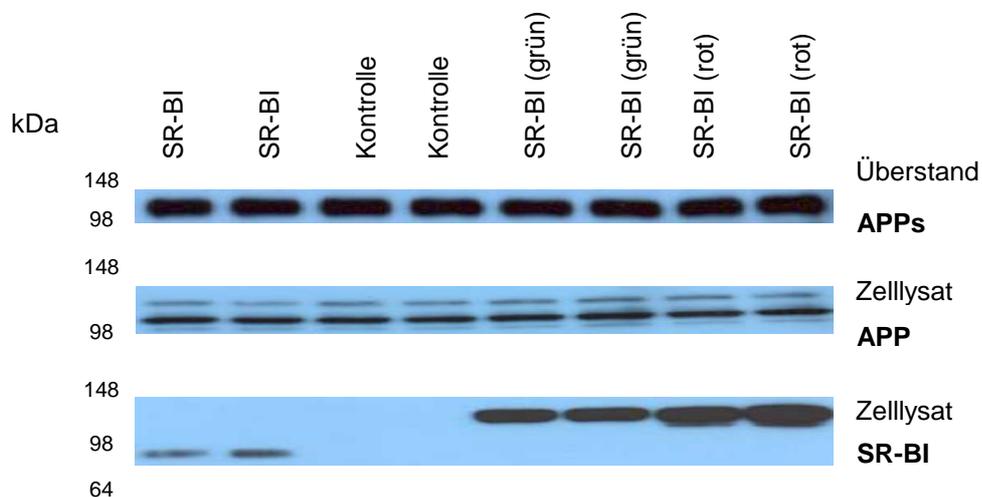


Abb. 8: Bestimmung von Gesamt-APP im Überstand und im Zellysat von SR-BI transfizierten HEK-293 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen.

HEK-293 Zellen wurden mit den Plasmiden ph SR-BI (SR-BI), pEGFP-(hSR-BI) (SR-BI grün) und pmRFP-hSR-BI (SR-BI rot) transient transfiziert. Die Ergebnisse wurden in einem unabhängigen Experiment bestätigt.

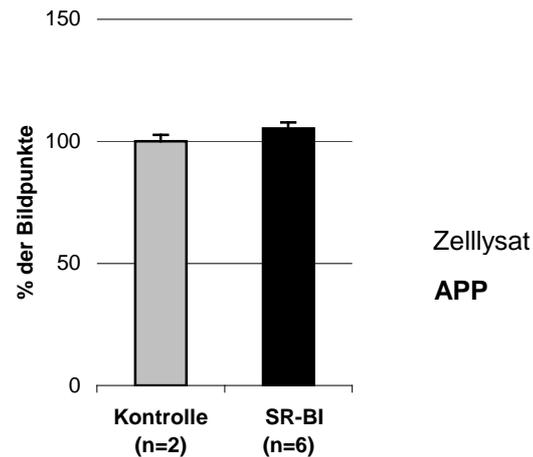


Abb. 9: Mittelwerte +/- Standardabweichung der Bildpunkte des Western Blots Gesamt-APP im Zelllysate von SR-BI transfizierten HEK-293 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen nach densitometrischer Auswertung.

Die HEK-293 Zellen zeigen nach Expression von SR-BI keine Änderungen in der APP-Expression in den Zelllysaten und in der Menge des sekretierten APP im Überstand. Die unterschiedlichen APP-Banden im Zelllysate erklären sich durch die verschiedenen APP-Isoformen (Abb. 10).

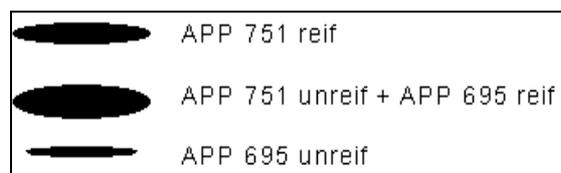


Abb. 10: Unterschiedliche Isoformen von APP

Durch alternatives Splicing der mRNA entstehen verschiedene im Gehirn vorkommende Isoformen (vgl. 1.2.1). APP 751 stellt das endogene APP dar, welches in allen Zellen des Körpers und v.a. in nicht-neuronalen Gliazellen exprimiert wird. APP 695 kommt hingegen ausschließlich in Neuronen vor. Von beiden Isoformen existieren reife und unreife Formen.

Danach wurde die Wirkung der SR-BI Expression auf die APP-Prozessierung in APP überexprimierenden HEK 293-1.1 Zellen analysiert. Hierbei wurde wieder keine Veränderung in der Menge des sezernierten APP im Überstand beobachtet. Hingegen war die Gesamtmenge an APP in den Lysaten der SR-BI transfizierten Zellen reduziert (Abb. 11 und 12).

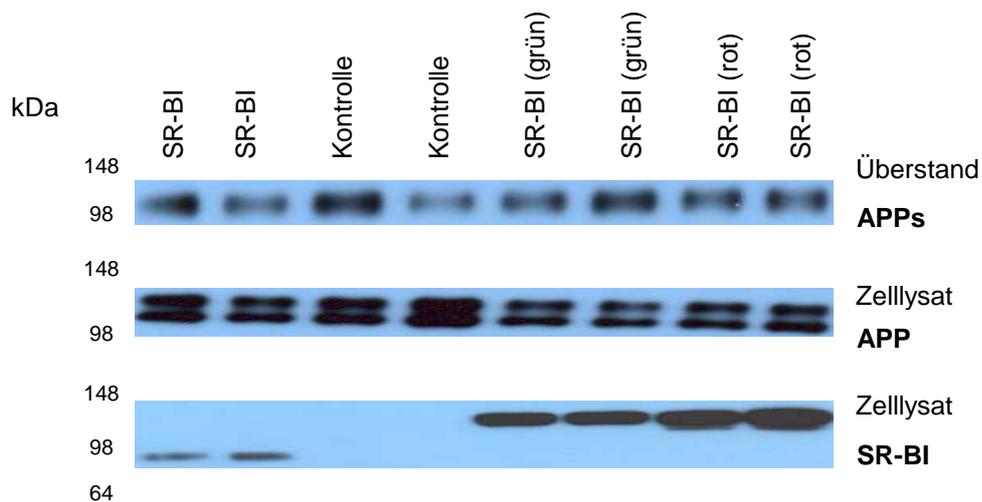


Abb. 11: Bestimmung von Gesamt-APP im Überstand und im Zelllysat von SR-BI transfizierten und APP überexprimierenden HEK 293-1.1 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen.

HEK 293-1.1 Zellen wurden mit den Plasmiden ph SR-BI (SR-BI), pEGFP-(hSR-BI) (SR-BI grün) und pmRFP-hSR-BI (SR-BI rot) transient transfiziert. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt 3 Experimenten.

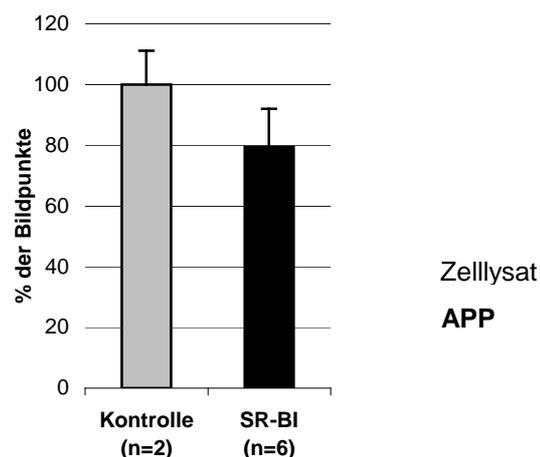


Abb. 12: Mittelwerte +/- Standardabweichung der Bildpunkte des Western Blots Gesamt-APP im Zelllysat von SR-BI transfizierten und APP überexprimierenden HEK 293-1.1 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen nach densitometrischer Auswertung.

4.1.2 Einfluss von SR-BI auf die APP-Spaltung in neuronalen SH-SY5Y Zellen

Um die Wirkung von SR-BI auf die APP-Prozessierung in neuronalen Zellen zu testen, wurden SH-SY5Y Zellen verwendet. Dabei war nach SR-BI Transfektion vergleichbar mit den HEK 293-1.1 Zellen kein Unterschied in der Menge des in den Überstand sezernierten APP festzustellen. Hingegen kam es zu einer Reduktion des Gesamt-APP in den Zelllysaten der SR-BI transfizierten Zellen (Abb. 13 und 14).

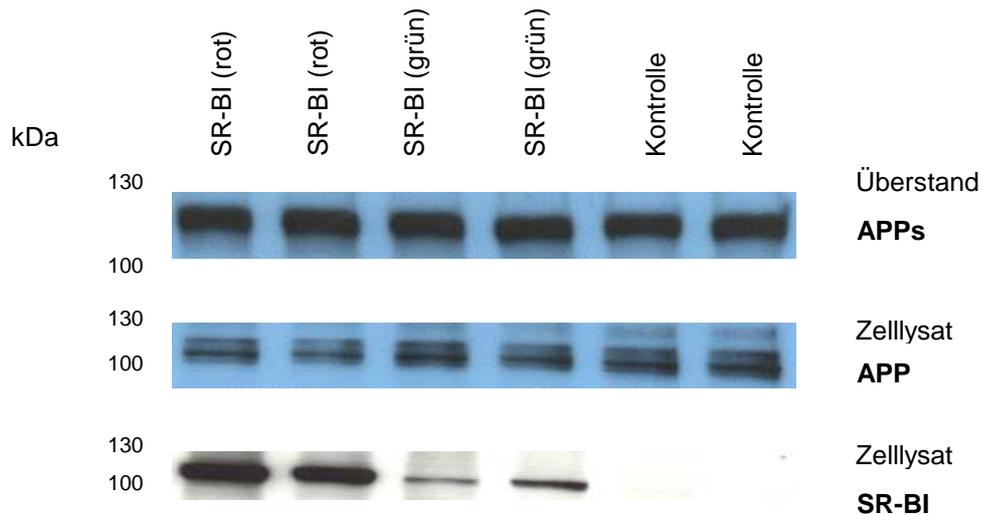


Abb. 13: Bestimmung von Gesamt-APP im Überstand und im Zelllysate von SR-BI transfizierten SH-SY5Y Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen.

SH-SY5Y Zellen wurden mit den Plasmiden pEGFP-(hSR-BI) (SR-BI grün) und pmRFP-hSR-BI (SR-BI rot) transient transfiziert. Die Ergebnisse wurden in einem unabhängigen Experiment bestätigt.

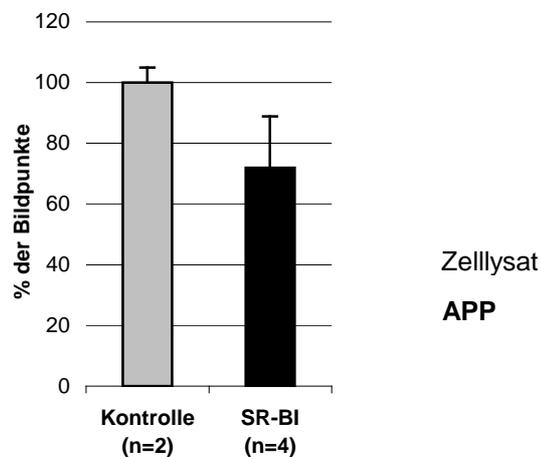


Abb. 14: Mittelwerte +/- Standardabweichung der Bildpunkte des Western Blots Gesamt-APP im Zelllysate von SR-BI transfizierten SH-SY5Y Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen nach densitometrischer Auswertung.

4.1.3 Spaltung des APP-Proteins durch die α -Sekretase

Da zwischen den Kontrollzellen und den SR-BI transfizierten Zellen kein Unterschied in der Menge des in den Überstand sezernierten APP bestand, war es nun von großem Interesse, ob möglicherweise Änderungen in der von der α - oder β -Sekretase gespaltenen APP-Menge aufgetreten waren. Dazu wurden die vorher angefertigten Proben der Überstände verwendet und mit dem Antikörper W02, der spezifisch nur durch α -Sekretase gespaltenes und sezerniertes APP erkennt, untersucht (Abb. 15 und 16).

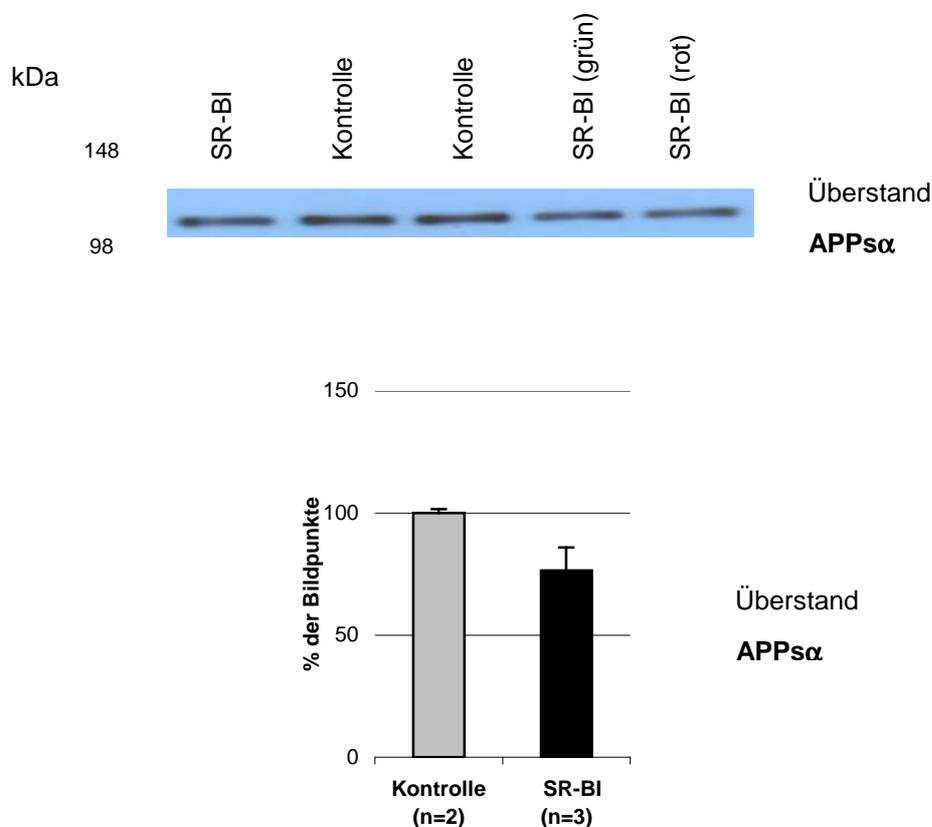


Abb. 15: Bestimmung von APP α im Überstand von SR-BI transfizierten HEK-293 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen.

Die Zellen wurden mit den Plasmiden ph SR-BI (SR-BI), pEGFP-(hSR-BI) (SR-BI grün) und pmRFP-hSR-BI (SR-BI rot) transient transfiziert. Repräsentatives Ergebnis von jeweils 2 Experimenten. Das untere Bild zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Bildpunkte des Western Blots APP α im Überstand von SR-BI transfizierten HEK-293 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen nach densitometrischer Auswertung.

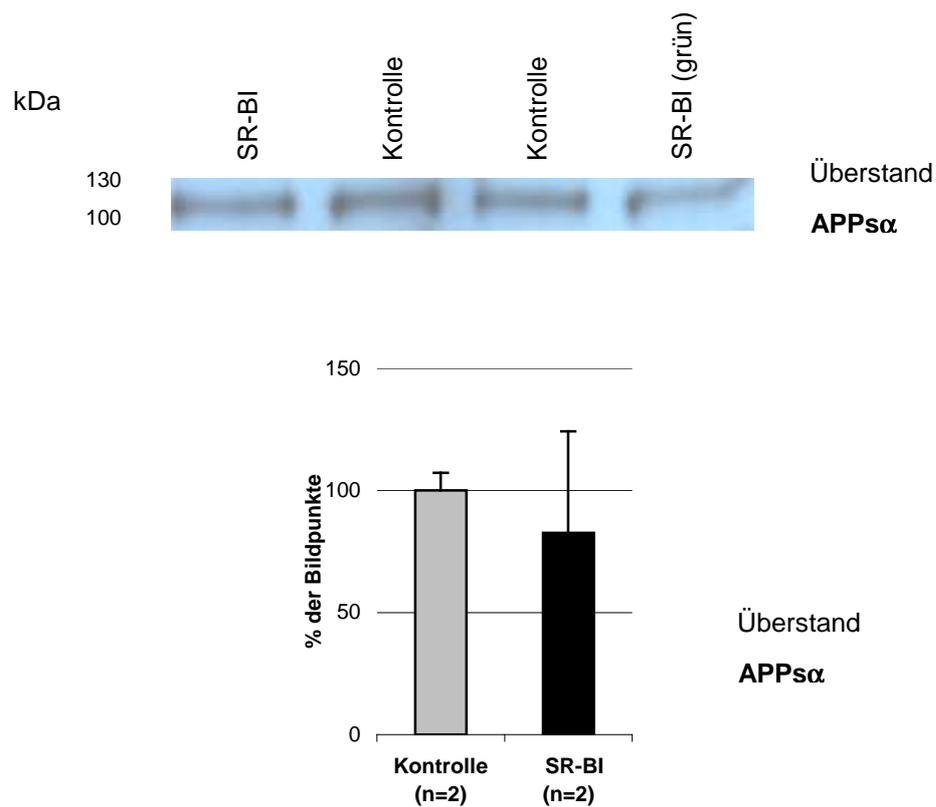


Abb. 16: Bestimmung von APP α im Überstand von SR-BI transfizierten HEK 293-1.1 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen.

Die Zellen wurden mit den Plasmiden ph SR-BI (SR-BI) und pEGFP-(hSR-BI) (SR-BI grün) transient transfiziert. Repräsentatives Ergebnis von jeweils 2 Experimenten. Das untere Bild zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Bildpunkte des Western Blots APP α im Überstand von SR-BI transfizierten HEK 293-1.1 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen nach densitometrischer Auswertung.

In den mit SR-BI transfizierten Zellen zeigte sich eine Abnahme des durch die α -Sekretase gespaltenen APP. Dies galt sowohl für die endogen APP exprimierenden HEK-293 Zellen, als auch für die APP überexprimierenden HEK 293-1.1 Zellen.

4.1.4 Prozessierung des APP-Proteins durch die β -Sekretase

Da die Menge des im Überstand befindlichen Gesamt-APP nach SR-BI Expression gleich blieb, die Menge des durch α -Sekretase gespaltenen APP aber abnahm, bestimmten wir im Anschluss das durch die β -Sekretase gespaltene APP (APPs β) im Überstand. APPs β wurde mit dem Antikörper 192 detektiert, welcher spezifisch nur das β -gespaltene APP erkennt (Abb. 17).

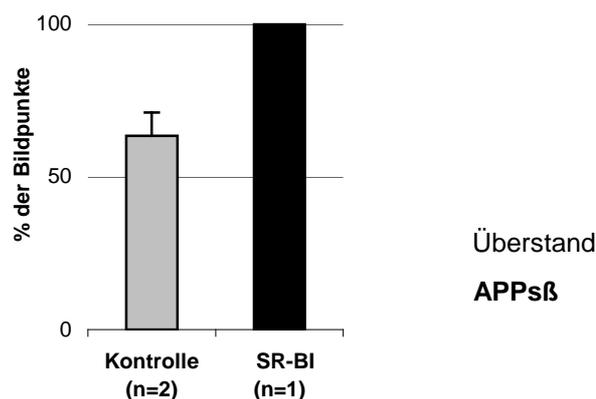
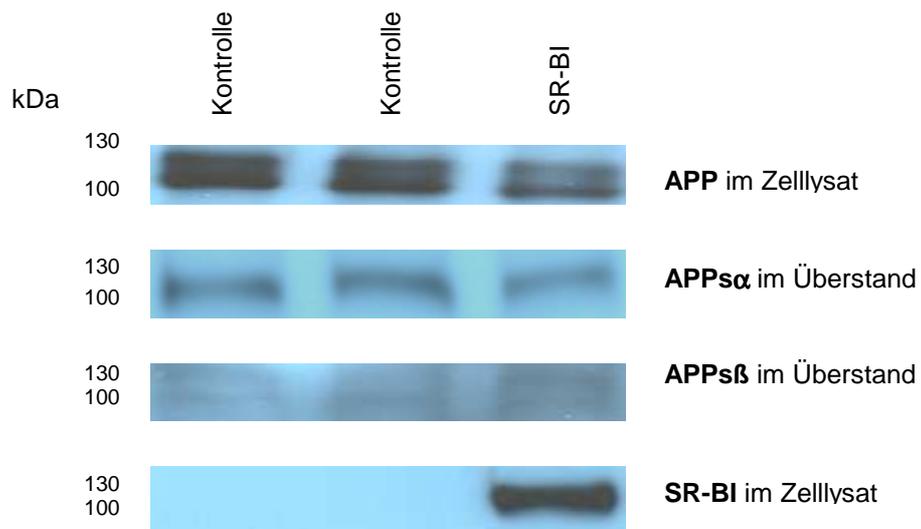


Abb. 17: Bestimmung von APPs α und APPs β im Überstand und von Gesamt-APP und SR-BI im Zelllysate von SR-BI transfizierten HEK 293-1.1 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen.

HEK 293-1.1 Zellen wurden mit dem Plasmid pmRFP-hSR-BI (SR-BI rot) transient transfiziert. Repräsentatives Ergebnis von 2 Experimenten. Das untere Bild zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Bildpunkte des Western Blots APPs β im Überstand von SR-BI transfizierten HEK 293-1.1 Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen nach densitometrischer Auswertung.

Wie schon zuvor beobachtet, induzierte die SR-BI Expression eine Abnahme von APP in den Zelllysaten. Auch war das von der α -Sekretase gespaltene APP im Überstand vermindert. Gleichzeitig kam es nach SR-BI Transfektion zu einem Anstieg des von der β -Sekretase gespaltenen APP im Überstand.

Gleiche Experimente wurden auch mit den neuronalen SH-SY5Y Zellen durchgeführt. Da die erhaltenen Spaltprodukte APPs α und APPs β im Überstand jedoch zu gering waren, waren keine verlässlichen Bestimmungen möglich.

4.2 Einfluss der SR-BI Expression auf die Bildung des β -Amyloid Peptids

4.2.1 A β in stabil SR-BI transfizierten nicht-neuronalen Zellen

Nachdem die bisherigen Experimente gezeigt hatten, dass SR-BI die Bildung des durch die β -Sekretase generierten Abbauprodukts von APP fördert, wurde als nächstes geprüft, ob der Scavenger Rezeptor die Bildung des A β -Peptids verändert. Dazu war es erforderlich, stabil mit SR-BI transfizierte HEK-293 bzw. HEK 293-1.1 Zellen zu präparieren. Die dabei erhaltenen Monoklonen zeigten eine unterschiedliche SR-BI Expression (Abb. 18).

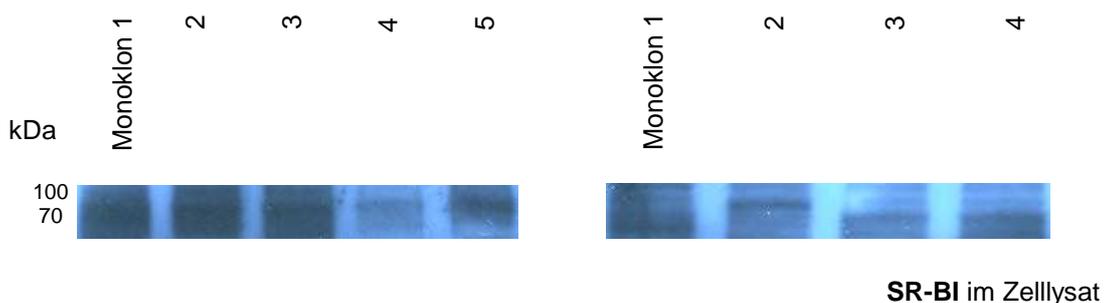


Abb. 18: Darstellung der Monoklonen der endogen APP exprimierenden (links) und APP überexprimierenden (rechts) HEK-Zellen nach stabiler SR-BI Transfektion. Die Monoklonen 1-3 und 5 (HEK-293 Zellen) und die Monoklonen 1 und 4 (HEK 293-1.1 Zellen) zeigen eine stabile SR-BI Expression.

Mit diesen Monoklonen wurde eine A β -Immunopräzipitation durchgeführt um das A β -Peptid nachzuweisen. Für die Immunopräzipitation von A β wurde der Antikörper 3552 verwendet. Anschließend wurde das A β -Peptid mit dem Antikörper 6E10 dargestellt. Allerdings war die SR-BI Expression in den HEK 293-1.1 Zellen nur sehr gering

ausgeprägt. Daher waren diese Zellen für die Analyse der A β -Bildung nicht verwendungsfähig. Nach stabiler Transfektion von SR-BI in den HEK-293 Zellen kam es zu einem Anstieg des sezernierten A β -Peptids (Abb. 19).

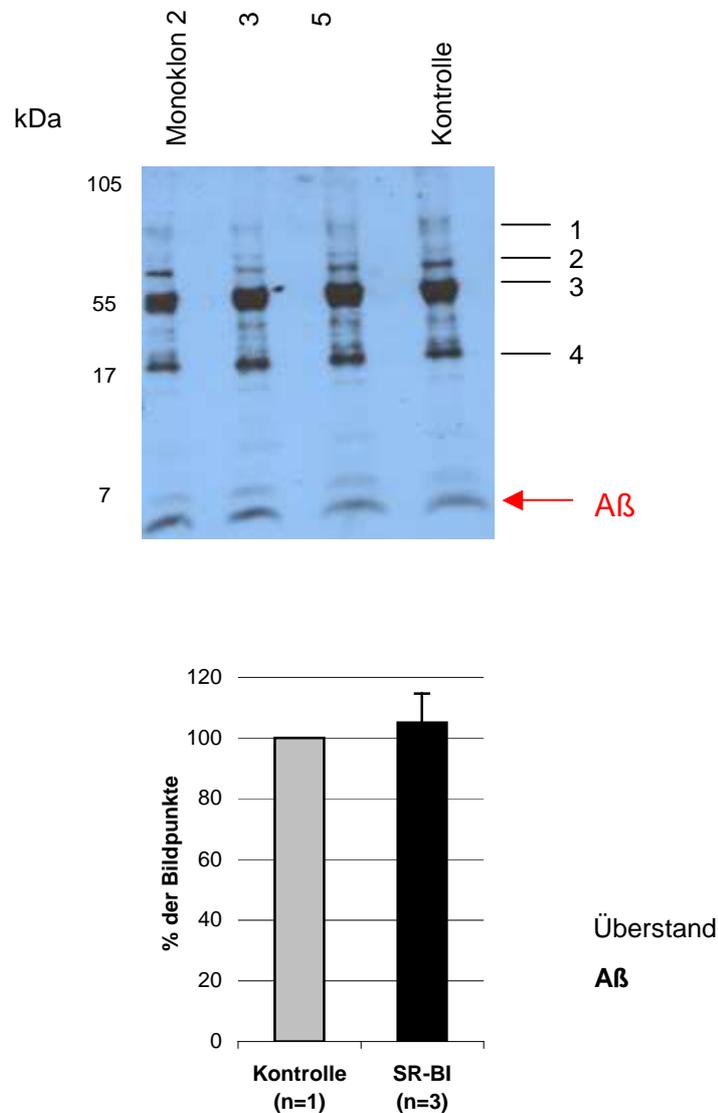


Abb. 19: Immunopräzipitation zum Nachweis des A β -Peptids im Überstand von stabil SR-BI transfizierten HEK-293 Monoklonen und in entsprechenden Kontrollzellen.

(1= sekretiertes ganzes APP, 2= APP-Reste, 3= schwere Kette des AK 3552, 4= leichte Kette des AK 3552, A β = β -Amyloid). Das untere Bild zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Bildpunkte der A β -Immunopräzipitation von stabil SR-BI transfizierten HEK-293 Monoklonen und entsprechenden Kontrollzellen nach densitometrischer Auswertung.

4.2.2 Bildung des A β -Peptids in neuronalen Zellen

Um die Wirkung von SR-BI auf die A β -Bildung in neuronalen Zellen zu analysieren, wurden die Zellen transient mit SR-BI transfiziert. Dabei wurde beobachtet, dass SR-BI die Entstehung von A β förderte (Abb. 20). Die in den HEK-293 Zellen gemessenen Ergebnisse konnten somit bestätigt werden.

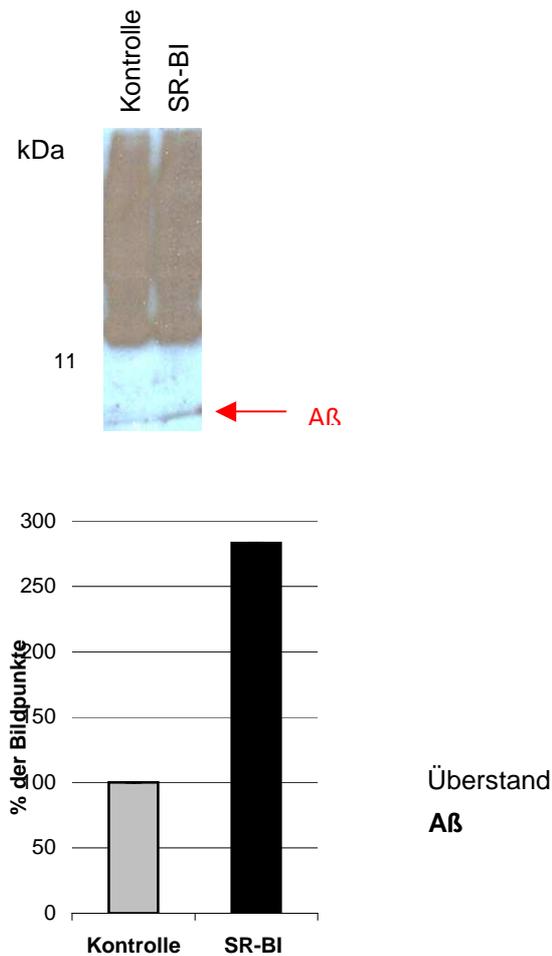


Abb. 20: Immunopräzipitation zum Nachweis des A β -Peptids im Überstand von transient SR-BI transfizierten SH-SY5Y Zellen und in entsprechenden Kontrollzellen.

SH-SY5Y Zellen wurden mit dem Plasmid pmRFP-hSR-BI (SR-BI rot) transient transfiziert. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt 2 Experimenten. Das untere Bild zeigt die Mittelwerte +/- Standardabweichung der Bildpunkte der A β -Immunopräzipitation von transient SR-BI transfizierten SH-SY5Y Zellen und entsprechenden Kontrollzellen nach densitometrischer Auswertung.

4.3 Lokalisation von APP und BACE in Detergens-resistenten Membrandomänen

Das Vorläuferprotein APP und die β -Sekretase BACE sind in unterschiedlichen Membrandomänen lokalisiert. So ist bekannt, dass sich APP ausschließlich in Detergens-löslichen Membranen (DSM) befindet, während BACE auch in Detergens-resistenten Membrandomänen (DRM) lokalisiert ist (Marlow et al. 2003; Abad-Rodriguez et al. 2004). Dabei sind die DRM besonders Cholesterin reich (Matsuura et al. 2007). Dies konnte hier an SH-SY5Y Zellen bestätigt werden (Abb. 21).

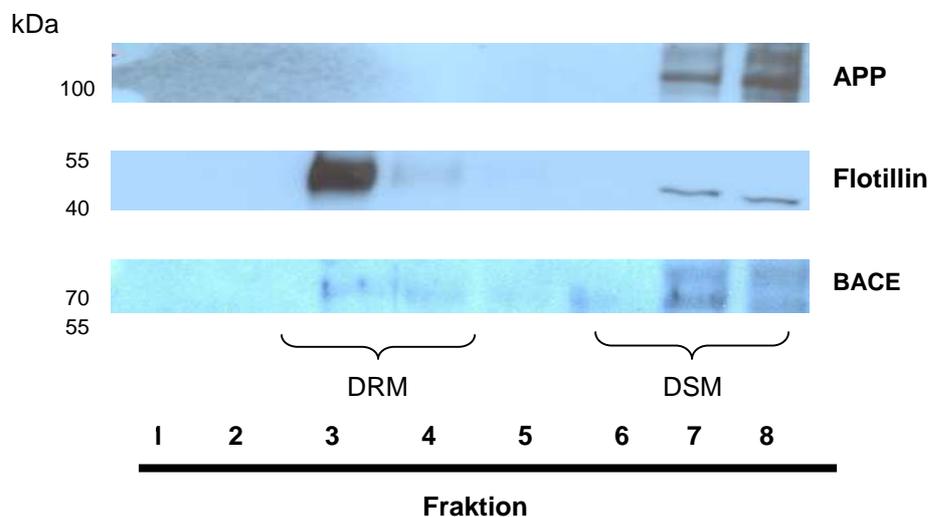


Abb. 21: Dichtegradient der Membranen von SH-SY5Y Zellen vor SR-BI Transfektion.

Die Fraktionen 3 und 4 stellen DRM, die Fraktionen 6, 7 und 8 DSM dar. Flotillin wurde als Marker für DRM mitbestimmt. Zum Nachweis von APP wurde der Antikörper 22C11, von Flotillin der Antikörper anti-Flotillin IgG1 und von BACE der Antikörper BACE CT 7520 verwendet.

APP akkumulierte in den Fraktionen 7 und 8, welche DSM repräsentieren. Flotillin stellte sich als Marker für DRM in den Fraktionen 3 und 4 dar. Die β -Sekretase BACE lag zum größeren Teil in DSM, zu einem kleinen Teil auch in DRM. Nach Transfektion mit SR-BI kam es zu deutlichen Veränderungen in der Lokalisation von APP. Dabei war das APP nun auch in den DRM nachweisbar (Abb. 22 und 23). BACE war in endogen BACE-exprimierenden Zellen und besonders nach Überexpression ebenfalls in DRM anzutreffen (Abb. 22 und 23). Dies könnte darauf hindeuten, dass SR-BI die Interaktion von APP und BACE in DRM fördert, wodurch es zu einer gesteigerten A β -Bildung kommt (vgl. Diskussion). SR-BI konnte sowohl in DSM, als auch in DRM nachgewiesen werden.

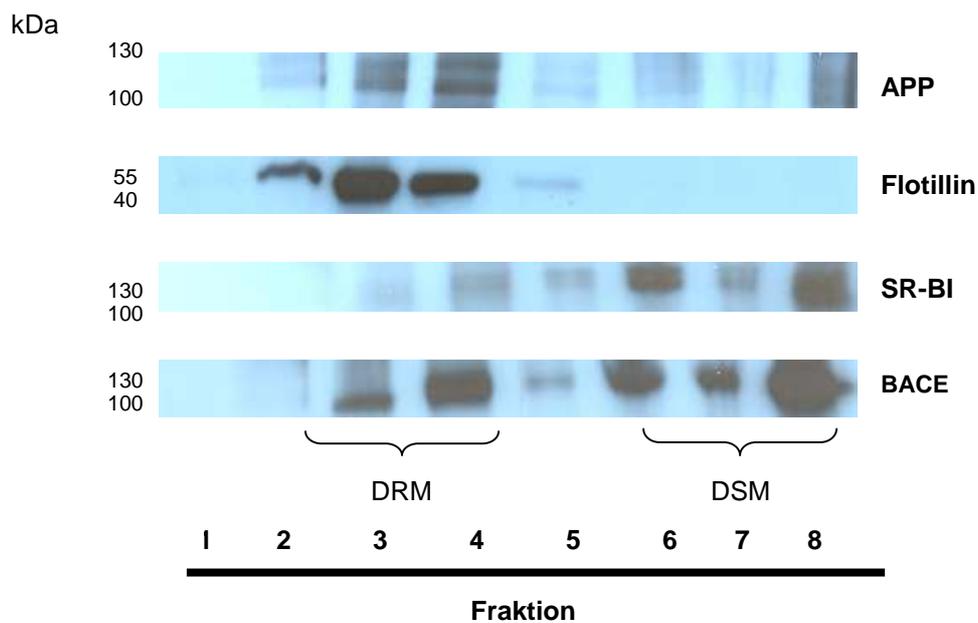
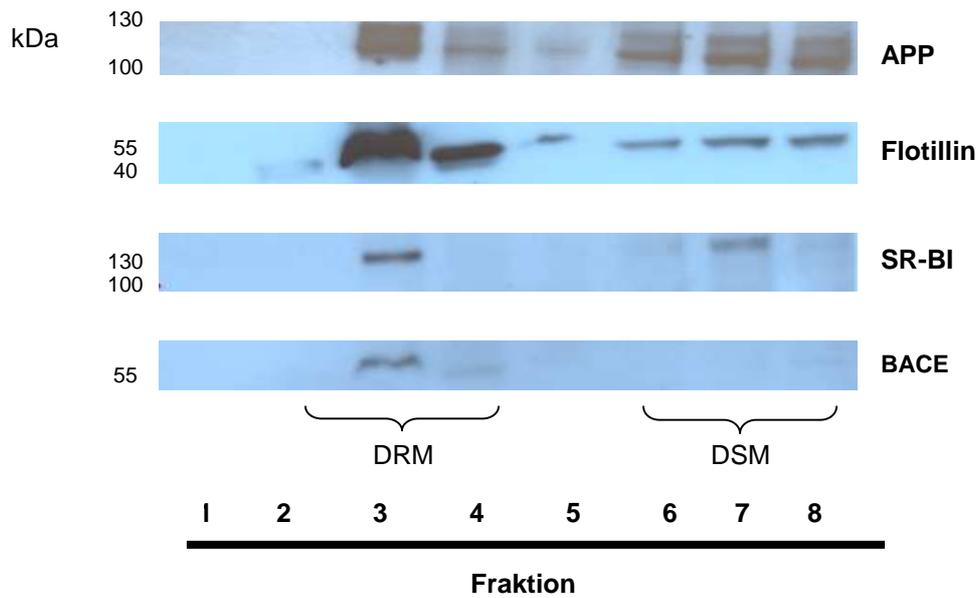


Abb. 22 und 23: Dichtegradienten der Membranen von SH-SY5Y Zellen nach SR-BI Transfektion (oben) und nach SR-BI Transfektion mit zusätzlicher BACE-Überexpression (unten).

SH-SY5Y Zellen wurden mit dem Plasmid pmRFP-hSR-BI transient transfiziert. Die Fraktionen 3 und 4 stellen DRM, die Fraktionen 6, 7 und 8 DSM dar. Flotillin wurde als Marker für DRM mitbestimmt. Zum Nachweis von APP wurde der Antikörper 22C11, von Flotillin der Antikörper anti-Flotillin IgG1, von SR-BI der Antikörper NB 400-104 und von BACE der Antikörper BACE CT 7520 verwendet.

4.4 Zelluläre Lokalisation von APP und BACE in Abhängigkeit der SR-BI Expression

4.4.1 Lokalisation von APP und SR-BI

Da SR-BI offensichtlich die Kolokalisation von APP und BACE in DRM fördert (vgl. 4.3), wurde als nächstes untersucht, in welchen subzellulären Kompartimenten diese Interaktion stattfinden könnte. Dazu wurden zunächst die Lokalisation von APP und SR-BI mit der Konfokalen Laserscannmikroskopie analysiert. Hierbei wurde eine relativ geringe Kolokalisation beobachtet, die ausschließlich intrazellulär war (Abb.24).

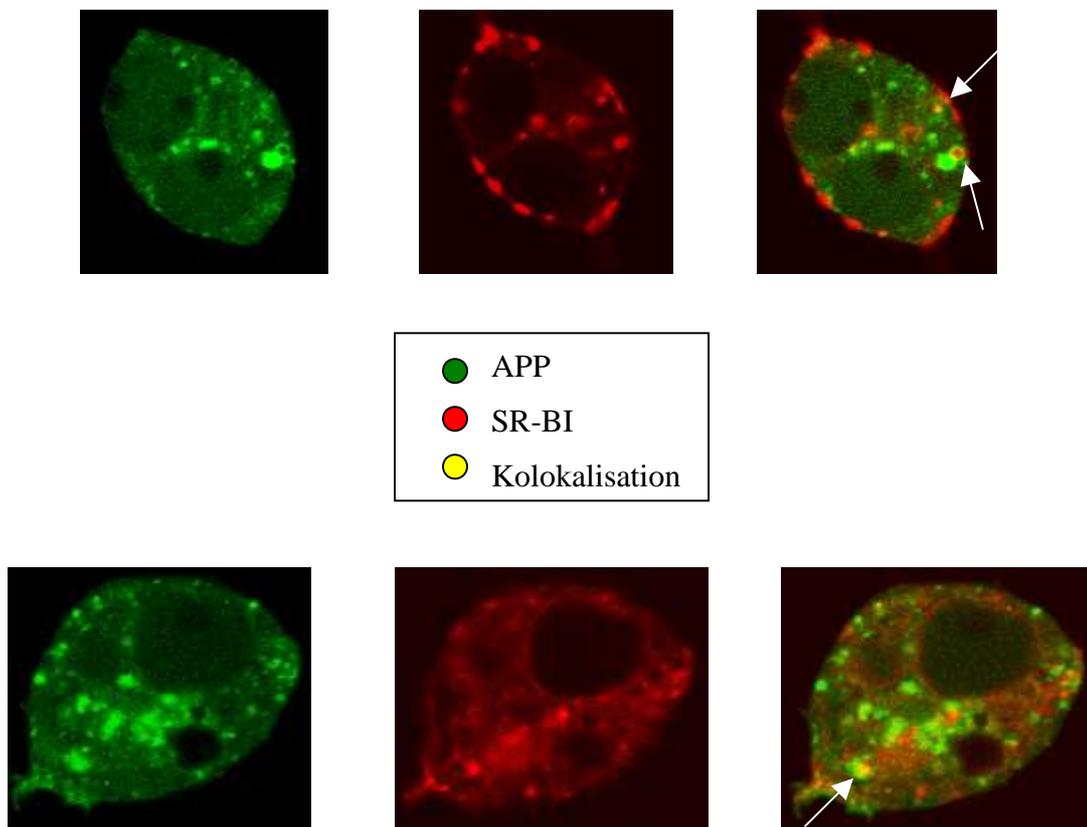


Abb. 24: Lokalisation von APP und SR-BI in HEK 293-1.1 Zellen.

Die HEK-293 Zellen wurden parallel mit pmRFP-hSR-BI (rot) und peak 12/HA-APP-GFP (grün) transient transfiziert. Die Pfeile zeigen Kolokalisationen an.

Ein ähnliches Ergebnis ergab sich in den neuronalen SH-SY5Y Zellen. Wiederum war die Kolokalisation ausschließlich intrazellulär (Abb. 25)

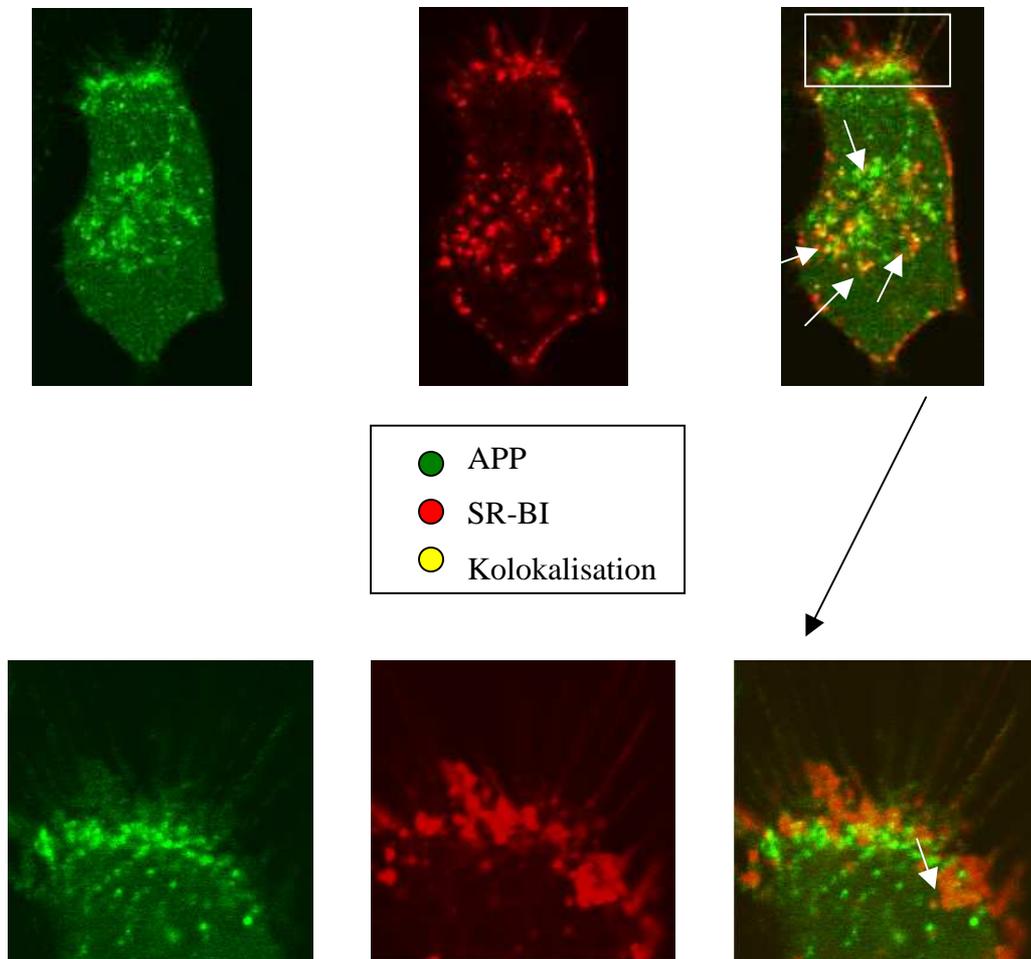


Abb. 25: Lokalisation von APP und SR-BI in neuronalen SH-SY5Y Zellen.

Die SH-SY5Y Zellen wurden parallel mit pmRFP-hSR-BI (rot) und peak 12/HA-APP-GFP (grün) transient transfiziert. Die Pfeile zeigen Kolokalisationen an.

4.4.2 Lokalisation von BACE und SR-BI

Bei der Visualisierung der Lokalisation von BACE und SR-BI konnte in beiden Zellen eine deutliche Kolokalisation gefunden werden. Diese war wiederum vorwiegend im Zellinneren, in der neuronalen Zelllinie teilweise auch unterhalb der Zellmembran festzustellen (Abb. 26).

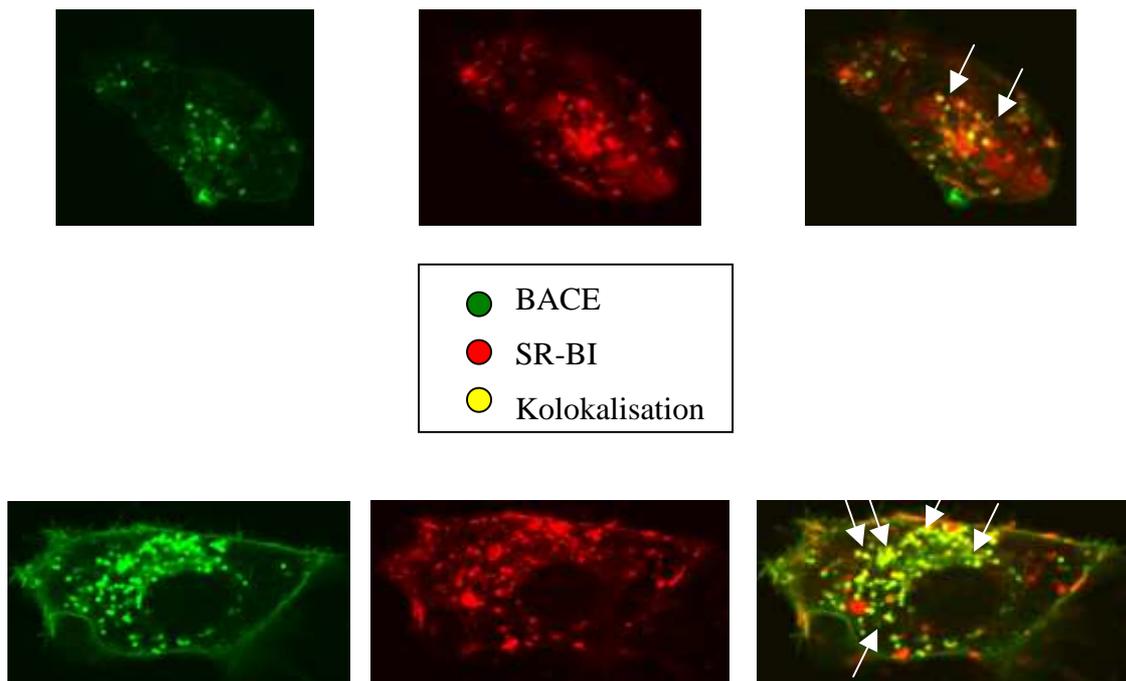


Abb. 26: Lokalisation von BACE und SR-BI in HEK 293-1.1 (oben) und SH-SY5Y Zellen (unten).

Die Zellen wurden parallel mit BACE-FL-wt*GFP (grün) und pmRFP-hSR-BI (rot) transfiziert. Die Pfeile zeigen die Kolokalisation von BACE und SR-BI in perinukleären und submembranösen Arealen.

4.4.3 APP und BACE in Kontrollzellen

Die Kolokalisation von APP und BACE in Kontrollzellen war besonders ausgeprägt in submembranösen Arealen in den Zellen, in den Zellausläufern (Protrusionen) und teilweise auch in perinukleären Arealen (Abb. 27 und 28). Die Zellen wurden parallel mit BACE-FL-wt*GFP (grün) und pcDNA3/APP-YFP (rot) und einem leeren Vektor transfiziert.

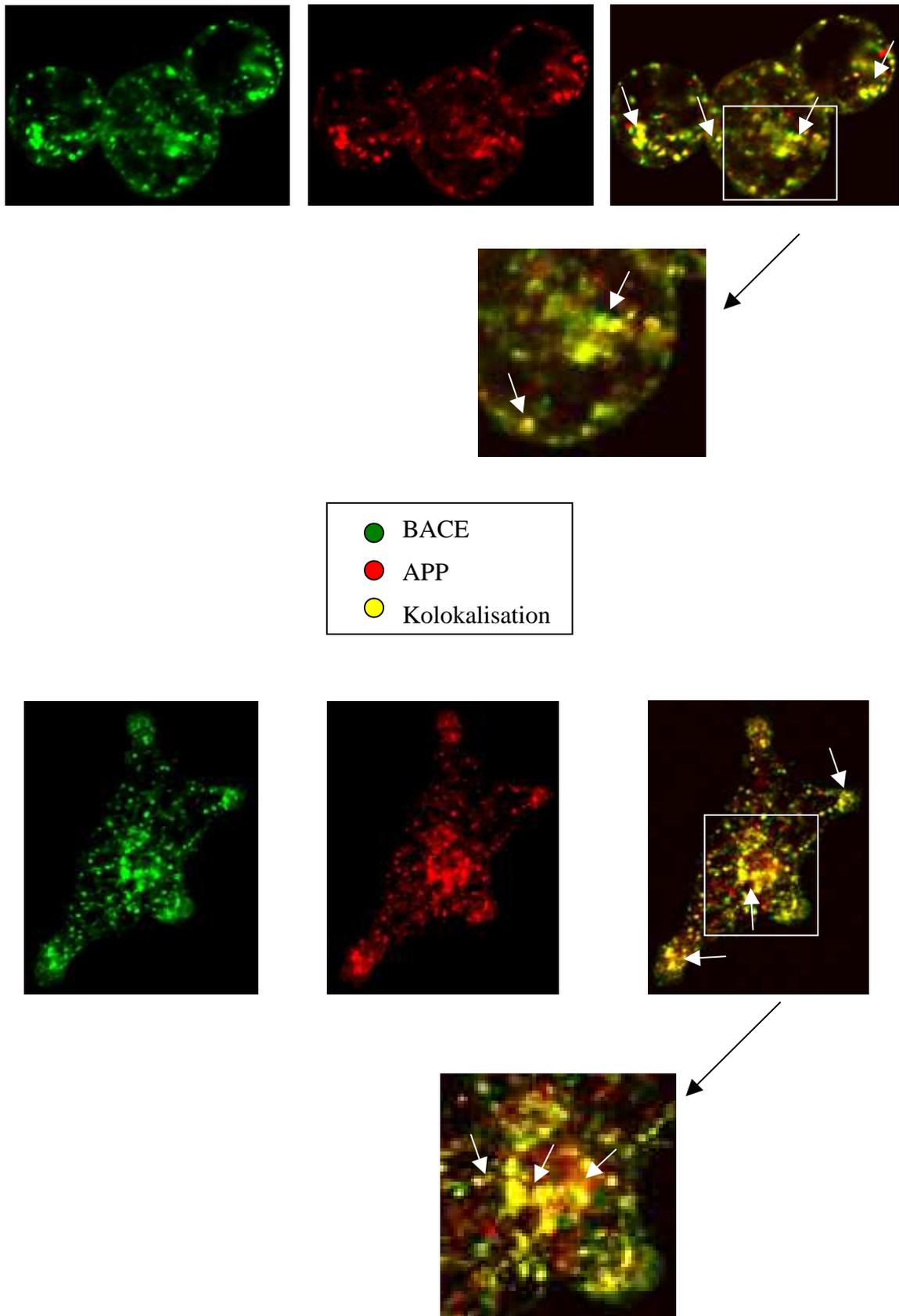


Abb. 27: Kolokalisation von BACE und APP in HEK 293-1.1 Zellen vor SR-BI Transfektion.

Die Zellen wurden parallel mit BACE-FL-wt*GFP (grün) und pcDNA3/APP-YFP (rot) und einem leeren Vektor transfiziert. Die Pfeile zeigen die Kolokalisation von BACE und APP in submembranösen und perinukleären Arealen der Zellen an.

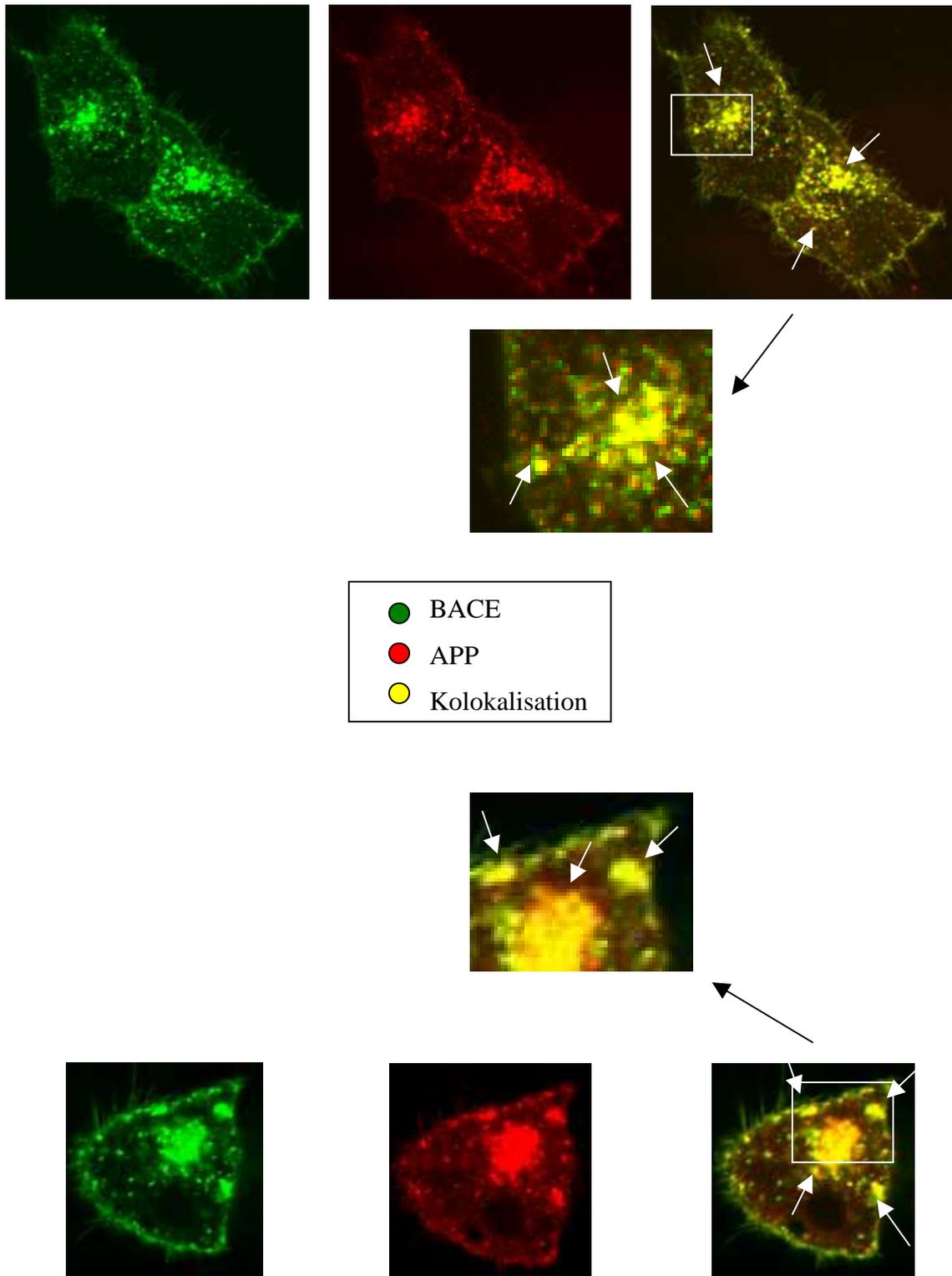


Abb. 28: Kolokalisation von BACE und APP in SH-SY5Y Zellen vor SR-BI Transfektion.

Die Zellen wurden parallel mit BACE-FL-wt*GFP (grün) und pcDNA3/APP-YFP (rot) und einem leeren Vektor transfiziert. Die Pfeile zeigen die Kolokalisation von BACE und APP in submembranösen und perinukleären Arealen der Zellen an.

4.4.4 APP und BACE in SR-BI transfizierten Zellen

Nach Transfektion von HEK 293-1.1 Zellen mit SR-BI ergaben sich zum Teil deutliche Veränderungen der Lokalisation von APP und BACE. Insbesondere waren die Proteine vermehrt in der Umgebung der Plasmamembran darstellbar. Hier und im Zellinneren war eine deutliche Kolokalisation zu beobachten (Abb. 29).

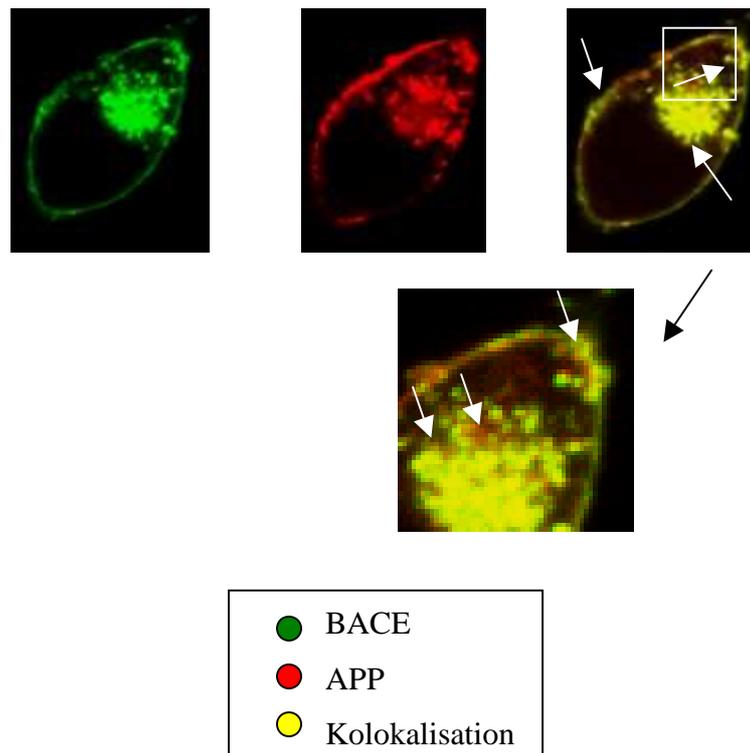


Abb. 29: Kolokalisation von BACE und APP in SR-BI transfizierten HEK 293-1.1 Zellen.

Die Zellen wurden parallel mit BACE-FL-wt*GFP (grün), pcDNA3/APP-YFP (rot) und pmRFP-hSR-BI transfiziert. Die Pfeile geben die Bereiche an, in denen die Kolokalisation am ausgeprägtesten war.

In SH-SY5Y Zellen die mit SR-BI transfiziert wurden, war insgesamt die Kolokalisation von APP und BACE weniger deutlich als in den Kontrollzellen. Jedoch war eine markante Kolokalisierung in der Umgebung der Plasmamembran und direkt submembranös zu verzeichnen (Abb. 30). Dies lässt darauf schließen, dass die SR-BI Expression v.a. die Interaktion von APP und BACE in der Plasmamembran fördert.

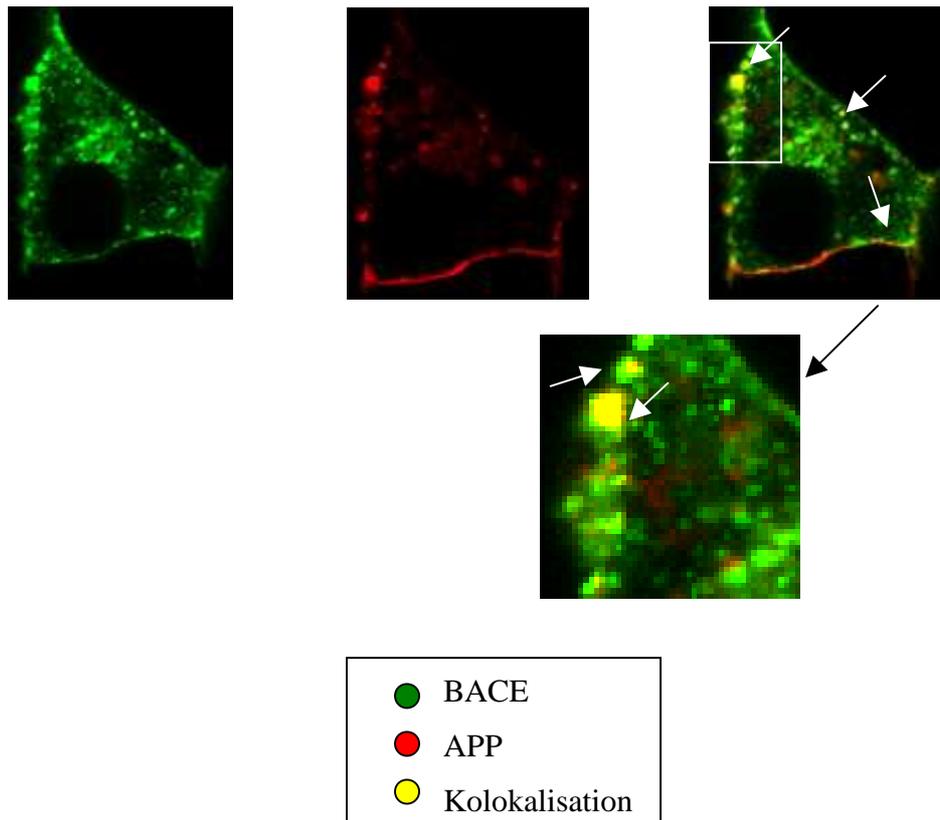


Abb. 30: Kolokalisation von BACE und APP in SR-BI transfizierten SH-SY5Y Zellen.

Die Zellen wurden parallel mit BACE-FL-wt*GFP (grün), pcDNA3/APP-YFP (rot) und pmRFP-hSR-BI transfiziert. Die Pfeile zeigen die Kolokalisationsstellen in der Umgebung der Plasmamembran und im Zellinneren.

5 Diskussion

5.1 Cholesterin als pathogenetischer Faktor der Alzheimer-Erkrankung

Die außerhalb von Nervenzellen gelegenen β -Amyloid Plaques stellen eine der Veränderungen dar, die für die Alzheimer-Erkrankung charakteristisch sind. Hierbei wird das APP-Vorläuferprotein statt üblicherweise durch die α - und γ -Sekretase von der β - und γ -Sekretase gespalten und das kurze A β -Protein generiert. A β ändert nach seiner Freisetzung seine Sekundärstruktur und bildet unlösliche Aggregate, die das Zentrum der β -Amyloid Plaques darstellen. Von besonderem Interesse ist es derzeit, die Faktoren zu identifizieren, die die normal ablaufende APP-Spaltung beeinflussen und zur vermehrten pathologischen A β -Bildung und A β -Aggregation führen.

Ausgangspunkt für die Cholesterinhypothese der Alzheimer-Erkrankung war die Beobachtung, dass Genträger des $\epsilon 4$ Allels von Apolipoprotein E im Gegensatz zu Nicht-Trägern ein erhöhtes Risiko aufwiesen, an der späten Form der Alzheimer-Krankheit zu erkranken. Besonders die Familien, die homozygot für das $\epsilon 4$ Allel waren, zeigten einen verfrühten Erkrankungsbeginn (Huang et al. 2004; Packard et al. 2007). Apolipoprotein E ist das am meisten vorkommende Apolipoprotein im Plasma und das Transportprotein für Cholesterin im Gehirn (Lane et al. 2005; Cedazo-Minguez 2007).

Nach diesen ersten Beobachtungen wurde in zahlreichen weiteren Studien eine Verbindung zwischen Cholesterin und der Alzheimer-Krankheit postuliert. So wurde beispielsweise gezeigt, dass ein hoher Cholesterin-Wert im mittleren Lebensalter das Risiko erhöht, später an Alzheimer zu erkranken (Kivipelto et al. 2002; Hartmann et al. 2007; Anstey et al. 2008). Der Serumgehalt an Gesamtcholesterin und LDL korrelierte mit dem Anteil an β -Amyloid im Gehirn verstorbener Alzheimer-Patienten (Kuo et al. 1998). Weiterhin wiesen Versuchstiere, die mit einer Cholesterin-reichen Nahrung gefüttert wurden, eine vermehrte β -Amyloid Bildung auf (Refolo et al. 2000; Shie et al. 2002). Wurde dagegen der Cholesterin-Gehalt medikamentös reduziert, ergab sich eine Abnahme der Plaque-Bildung (Fassbender et al. 2001; Refolo et al. 2001; Huttunen et al. 2008). Prinzipiell ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in Zellkultur-Versuchen nach Reduzierung bzw. Erhöhung des Cholesteringehaltes (Simons et al. 1998; Frears et al. 1999; Grimm et al. 2008).

Um den Zusammenhang zwischen Cholesterin und der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung auf molekularer Ebene zu erklären, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die APP-Bildung, Metabolisierung und Aggregation von Cholesterin-reichen Membrandomänen abhängt, den sogenannten Lipid Rafts (Cheng et al. 2007; Reid et al. 2007; Taylor et al. 2007). Diese könnten eine geeignete Umgebung bilden, in denen Proteine, die an der Prozessierung des APP-Moleküls beteiligt sind, akkumulieren und in besonderem Maße die toxische β -Amyloid Bildung fördern.

5.2 Einfluss Cholesterin-reicher Membrandomänen auf die Prozessierung des APP-Proteins

Im ersten Versuch dieser Arbeit wurde der Einfluss der SR-BI Expression auf die Prozessierung des β -Amyloid Vorläuferproteins untersucht. Frühere Untersuchungen hatten ergeben, dass SR-BI die Bildung der Lipid Rafts verstärkt (Wiedmann 2006). In nicht-neuronalen Zellen kam es nach SR-BI Transfektion zu einem Anstieg der APP-Prozessierung durch die β -Sekretase, während sich die α -Sekretase Spaltung verringerte. Dies beobachteten wir sowohl bei endogener APP-Expression wie auch in APP überexprimierenden Zellen.

Unser Ergebnis ist in prinzipieller Übereinstimmung mit mehreren früheren Arbeiten. Kojro et al. (2001) fanden, dass die Senkung des Cholesterin-Gehaltes mit Hilfe von Cyclodextrin und Lovastatin in verschiedenen peripheren und neuronalen Zelllinien zu einem Anstieg des von der α -Sekretase gespaltenen APP führte (Kojro et al. 2001). Auch Eehalt et al. (2003) beobachteten in Neuroblastoma-Zellen von Mäusen nach Behandlung mit Cyclodextrin und Lovastatin eine Abnahme der Spaltung des APP-Moleküls durch die β -Sekretase und eine Zunahme der α -Spaltung (Eehalt et al. 2003). Umgekehrt erbrachten APP transgene Mäuse, die mit einer Cholesterin-reichen Nahrung gefüttert wurden (Howland et al. 1998; Refolo et al. 2000) und stabil APP transfizierte HEK-293 Zellen, die mit Cholesterin inkubiert wurden (Bodovitz et al. 1996), eine Senkung des APP α -Produkts. Des Weiteren war im Hippocampus von Ratten, die über einen längeren Zeitraum mit Cholesterin gefüttert wurden, der Anstieg des Cholesterin-Gehalts in den Neuronen mit einer Zunahme der Aktivität der β -Sekretase BACE 1 verbunden (Ghribi et al. 2006).

Allerdings zeigen andere Arbeiten dass der Effekt des Cholesterins auf A β dosisabhängig ist. Diese untersuchten hauptsächlich die β -Amyloid Bildung nach einer Cholesterin-Reduzierung. Dabei stellte sich heraus, dass zwei offensichtlich unabhängige zelluläre Mechanismen beeinflusst werden. Eine mäßige Cholesterin-Reduzierung führe zu einer starken Zunahme des A β -Peptids. Ursache ist eine Disorganisation der Lipid Rafts, die ein vermehrtes Aufeinandertreffen von APP und BACE und eine vermehrte A β -Bildung ermögliche. Eine sehr starke Cholesterin-Reduzierung resultiere hingegen in einer deutlichen A β -Abnahme. Die β - und die γ -Sekretase würden durch die starke Cholesterin-Entfernung derart behindert, dass, obwohl APP und BACE direkt aufeinandertreffen, eine vermehrte A β -Bildung nicht mehr stattfinden könne (Abad-Rodriguez et al. 2004; Kaether et al. 2004). Aufgrund dieser Kontroversen ist es notwendig, die APP-Spaltung unter definierten Veränderungen der Lipid Raft-Bildung zu untersuchen, wie sie durch SR-BI erzielt werden können.

5.3 Cholesterin-reiche Membrandomänen und die Bildung des β -Amyloid Peptids

Nach dem ersten Hinweis, dass durch Cholesterinerhöhung eine bevorzugte β -Sekretase Spaltung stattfinden könnte, untersuchten wir im Anschluss genauer die Bildung des β -Amyloid Proteins. Dafür wurden zunächst stabil SR-BI exprimierende HEK-Monoklonen präpariert. Eine anschließende A β -Immunopräzipitation zeigte einen leichten Anstieg des β -Amyloid Peptids in den endogen APP exprimierenden HEK-Monoklonen. Dies wurde durch die Analyse in der neuronalen Zelllinie bestätigt. In diesen Zellen kam es ebenfalls zu einer Zunahme des β -Amyloids.

Puglielli et al. (2001) wiesen mit unseren Ergebnissen übereinstimmend nach, dass der Cholesterinester-Spiegel in der Zellkultur direkt mit der A β -Bildung korreliert (Puglielli et al. 2001). Weiterhin konnten im Tierversuch sowie in in-vitro Versuchsreihen eine intrazelluläre Anreicherung des Cholesterins mit einer vermehrten Produktion des β -Amyloids in Verbindung gebracht werden (Fassbender et al. 2001; Refolo et al. 2001; Shie et al. 2002).

5.4 Lokalisation des β -Amyloid Vorläuferproteins und der β -Sekretase und deren Aufeinandertreffen in DRM nach SR-BI Expression

Wie bereits erwähnt, könnten Detergens-resistente Membrandomänen (Lipid Rafts) den Hauptbildungsort für die A β -Bildung darstellen. Es wurde postuliert, dass ein hoher Cholesterin-Gehalt die Alzheimer-Erkrankung begünstigt, da er die Lokalisationen steigert, an denen die A β -Bildung prinzipiell statt finden kann (Eehalt et al. 2003). Aus diesem Grund untersuchten wir im Anschluss in der neuronalen Zelllinie die Lokalisation des β -Amyloid Vorläuferprotein (APP) und der β -Sekretase BACE 1 in Detergens-resistenten (DRM) und Detergens-löslichen Membrandomänen (DSM). Die Ergebnisse der Dichtegradienten zeigten, dass unter Normalbedingungen das APP-Protein ausschließlich in DSM vorhanden ist. Auch BACE 1 stellte sich zum größeren Teil in DSM, zu einem geringeren Anteil jedoch auch in DRM dar. Nach SR-BI Transfektion beobachteten wir, dass das APP-Protein vermehrt von Cholesterin-armen DSM in Cholesterin-reiche DRM transferiert war. Dies war auch die Domäne in der auch BACE 1 nach SR-BI Transfektion zu finden war.

Bisher wurde bereits nachgewiesen, dass APP in DRM und außerhalb der DRM lokalisiert sein könnte (Parkin et al. 1999; Hayashi et al. 2000; Eehalt et al. 2003). Dies würde erklären, warum das Vorläuferprotein auf zwei verschiedene Weisen und durch zwei verschiedene Membran-gebundene Sekretasen gespalten werden kann. In Übereinstimmung mit unserem Ergebnis wurde mittels Antikörper Vernetzung gezeigt, dass APP und BACE in DRM aufeinander treffen (Eehalt et al. 2003). Die Messung des A β -Peptids zeigte nach Antikörper-Vernetzung einen Anstieg, nach Cholesterin-Reduzierung und Desintegration der Lipid Rafts eine Abnahme. Die Autoren folgerten daraus, dass BACE APP in DRM spalten muss und die A β -Bildung von der Intaktheit der Lipid Raft Domänen abhängig ist. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Cordy et al. (2003), die dem BACE-Molekül einen GPI-Anker hinzufügten, so dass dieses ausschließlich mit Lipid Rafts assoziiert war. Dort wurde ebenfalls ein Anstieg des von der β -Sekretase gespaltenen APP und von A β erzielt (Cordy et al. 2003). Auch Abad-Rodriguez et al. (2004) stellen in drei verschiedenen Experimenten fest, dass unter normalen Zellbedingungen APP lediglich in DSM, BACE jedoch hauptsächlich in DRM lokalisiert ist. Nach Abnahme des Cholesterins blieb APP in DSM und BACE wechselte von DRM in DSM, welches durch eine Umorganisation der DRM erklärt werden könnte

(Abad-Rodriguez et al. 2004). In einer neueren Arbeit von Sakurai et al. (2008) wird ebenfalls ein Wechsel von APP hin zu BACE1 enthaltenden Mikrodomänen als Voraussetzung für die APP-Spaltung angesehen. Dieser scheint durch Cholesterin und neuronale Aktivität regulierbar zu sein (Sakurai et al. 2008). Im übrigen konnte auch gezeigt werden, dass die γ -Sekretase vorwiegend in DRM lokalisiert ist (Wahrle et al. 2002; Hur et al. 2008)

5.5 DRM-Isolierung mit Detergenzien und das Konzept der Lipid Rafts

Neuere Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass Lipid Rafts oder liquid-ordered domains nicht mit DRM gleichgesetzt werden sollten (Lichtenberg et al. 2005). Da Lipid Rafts sehr klein (<20 nm) und sehr dynamisch sind, ist es schwierig, sie direkt nachzuweisen. Eine indirekte Möglichkeit, Lipid Rafts zu isolieren und analysieren, stellt die häufig angewandte biochemische Isolierung mit dem Detergens Triton X-100 dar (Simons et al. 1997; Brown et al. 2000). Dabei wird die Plasmamembran mittels Triton X-100 bei 4°C extrahiert. Anschließend werden mit Hilfe eines Dichtegradienten und durch Ultrazentrifugation die DRM von den DSM getrennt. Da GPI-verankerte Proteine hauptsächlich in den DRM nachweisbar sind und die DRM vor allem aus Sphingomyelin und Cholesterin bestehen, ging man davon aus, dass diese Lipid Rafts repräsentieren und dass Membranproteine, die bei einer hohen Konzentration an Detergens unlöslich sind, in Lipid Rafts lokalisiert sind (Brown et al. 1992).

Allerdings weist diese Methode einige offensichtliche Nachteile auf. Dazu zählt beispielsweise die Isolierung der Domänen bei 4°C, die die in vivo Struktur der Plasmamembran verändern könnte (Chamberlain 2004). Somit könnten in der sehr temperaturempfindlichen Lipidmembran Lipid Rafts künstlich vergrößert oder durch eine durch die niedrige Temperatur hervorgerufene Phasentrennung auch direkt induziert werden (Heerklotz 2002). Weiterhin erbrachten Studien, die Lipid Raft assoziierte Proteine mit unterschiedlichen Detergenzien untersuchten, teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse (Taylor et al. 2002). DRM, die mit unterschiedlichen Detergenzien isoliert wurden, sind damit nicht unbedingt miteinander vergleichbar. Dabei ist aber zu bedenken, dass viele Detergenzien durchaus weniger effizient als Triton X-100 sind und liquid-ordered Domänen nicht ganz aufzulösen vermögen. Die Konzentration des Detergens und

das Verhältnis von Detergens zu zellulären Proteinen und Lipiden kann weiterhin einen Einfluss auf die Assoziation mit DRM haben (Brown 2006). Deshalb kann man nicht von einer ganz genauen Übereinstimmung zwischen den isolierten DRM und Lipid Rafts *in vivo* ausgehen.

Unabhängig von diesen Nachteilen stellt die Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender Trennung von DRM und DSM eine wichtige Methode für die Analyse von Lipid Rafts dar (Lingwood et al. 2007; Lingwood et al. 2008). Allerdings bedarf es zusätzlicher Methoden, die es erlauben sollen, die Dynamik der Lipid Rafts *in vivo* besser zu verstehen.

5.6 Intrazelluläre Lokalisation der APP-Prozessierung unter Einfluss Cholesterin-reicher Membrandomänen

Nachdem wir die DRM als APP-Prozessierungsort bestätigen konnten, war es nun von Interesse herauszufinden, in welchen subzellulären Kompartimenten die Raft-abhängige Bildung des β -Amyloids statt findet. Dazu transfizierten wir neuronale und nicht-neuronale Versuchszellen mit APP-, BACE- und SR-BI fluoreszierenden Plasmiden und detektierten deren Lokalisation mit dem Konfokalen Laserscannmikroskop. In Wildtyp-Zellen waren v.a. in den Zellausläufern, den sogenannten Protrusionen, und im Zellinneren deutliche Kolokalisationen von APP und BACE nachweisbar. Nach SR-BI Transfektion und Expression zeigte sich in den nicht-neuronalen Zellen eine deutliche Kolokalisation von APP und BACE in der Umgebung der Zellmembran und zu einem kleineren Teil im Zellinneren. APP stellte sich dabei besonders gut an den Zellkontaktstellen dar. An dieser Stelle war auch SR-BI sehr gut lokalisiert, so dass wir daraus folgerten, dass SR-BI zu einer Translokation von APP in die Umgebung der Plasmamembran führt. Damit sollte die durch SR-BI vermittelte gesteigerte A β -Bildung überwiegend in der Zellmembran und submembranös stattfinden. Diese Veränderungen wurden prinzipiell in den neuronalen Zellen bestätigt.

Übereinstimmend zu unserem Ergebnis zeigten frühere Immunfluoreszenz- und FRET (= Fluorescence resonance energy transfer)-Experimente, dass APP und BACE unter normalen Bedingungen bevorzugt an der Zelloberfläche und in Early Endosomes, jedoch kaum in lysosomalen Kompartimenten aufeinander treffen (Kinoshita et al. 2003). Auch Abad-Rodriguez et al. (2004) fanden in neuronalen Zellen eine Kolokalisation von APP

und BACE in der Zellmembran (Abad-Rodriguez et al. 2004). BACE lokalisierte auf der Zelloberfläche mit Thy-1, einem DRM-Marker, so dass BACE an der Zelloberfläche in DRM identifiziert werden konnte. Nach Blockierung der Endozytose beobachteten Eehalt et al. (2003), dass die β - nicht jedoch die α -Spaltung blockiert war. Daraus wurde gefolgert, dass BACE eher nach dessen Internalisierung als an der Zelloberfläche aktiv ist (Eehalt et al. 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass für die A β -Sekernierung die Aufnahme von der Zelloberfläche und nachfolgende intrazelluläre Spaltung des APP-Moleküls nötig ist (Haass et al. 1992; Koo et al. 1996; Jung et al. 1999; Walter 2006). Da die β -Sekretase BACE einen sauren pH-Wert für die APP-Spaltung benötigt, kamen als Lokalisationen der APP-Spaltung hier entweder die Early Endosomes oder der späte Golgi-Apparat in Frage, nicht aber die Lysosomen (Haass et al. 1993).

5.7 Modell für den Einfluss Cholesterin-reicher Membrandomänen auf die APP-Spaltung

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen abschließend in einem Schaubild zusammengefasst werden (Abb. 31).

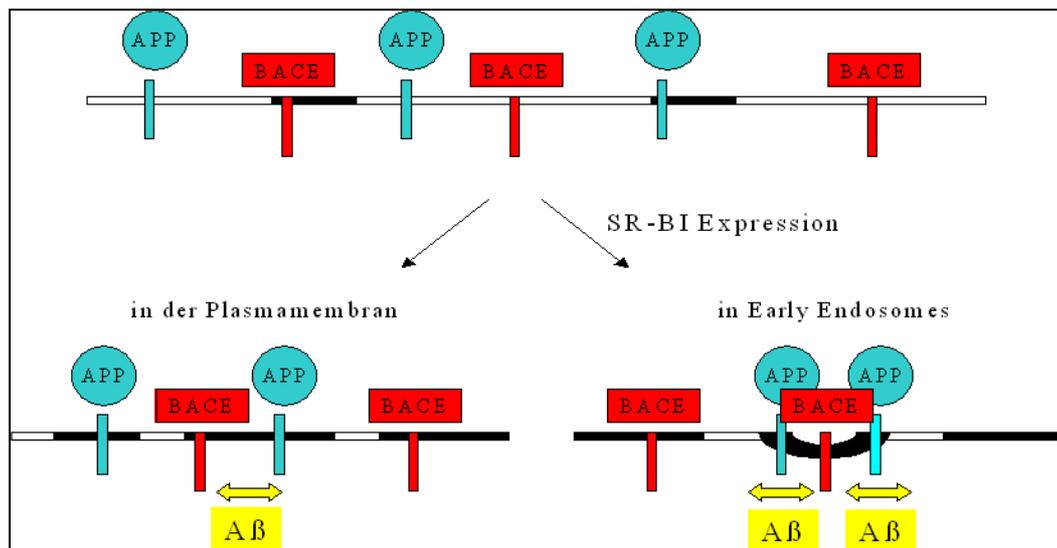


Abb. 31: Hypothese zum Einfluss Cholesterin-reicher Membrandomänen auf die APP-Spaltung

Nach Erhöhung des Cholesterin-Gehalts der Zelle und der Vermehrung bzw. Vergrößerung der Lipid Rafts durch SR-BI wechselt APP von Nicht-Raft zu Lipid-Raft Regionen und wird dort von der β -Sekretase gespalten. Dieser Vorgang findet wahrscheinlich vorwiegend in Early Endosomes und auf der Ebene der Plasmamembran statt. (schwarze Balken = Lipid Raft Domänen)

Das β -Amyloid Vorläuferprotein ist v.a. außerhalb von Cholesterin-reichen Membrandomänen lokalisiert, während BACE sich hauptsächlich in Rafts befindet. Da die Lipid Raft Domänen relativ klein sind und nur sehr wenige Proteine enthalten (Pralle et al. 2000), ist die Wahrscheinlichkeit eher gering, dass APP und BACE sich in der gleichen Lipid Raft Domäne befinden. Nach einer Erhöhung des Cholesterin-Gehalts und Vergrößerung der zellulären Lipid Rafts durch SR-BI transloziert das APP-Protein von Nicht-Lipid Raft zu Lipid Raft Domänen. Dort trifft es auf die β -Sekretase BACE, welche nun ebenfalls vermehrt in Lipid Rafts lokalisiert ist. Statt der nicht pathologischen α -Sekretase Spaltung, die gewöhnlich außerhalb der Lipid Raft Domänen stattfindet, kommt es nun vermehrt zur pathologischen β -Sekretase Spaltung und folglich zu einer erhöhten A β -Bildung. Diese Spaltung findet höchstwahrscheinlich in den Early Endosomes statt, möglicherweise zum Teil auch direkt in der Zellmembran.

5.8 Ausblick: Cholesterinsenkung als Therapiemöglichkeit für die Alzheimer-Erkrankung?

Als Therapiemöglichkeit erscheint es also sinnvoll, durch eine Cholesterin-Senkung den Lipid Raft Anteil der Zelle zu senken und somit die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, dass die β -Sekretase BACE und APP in der gleichen Membrandomäne aufeinander treffen. Dabei spielt offensichtlich der Grad der Cholesterin-Reduktion für die Modulierung der Amyloidogenese eine sehr entscheidende Rolle (Abad-Rodriguez et al. 2004; Kaether et al. 2004). Weiterhin umstritten ist, ob das Cholesterin selbst sowie die zur Cholesterin-Senkung eingesetzten Medikamente überhaupt die Blut-Hirn-Schranke passieren und in das ZNS eindringen können (Caballero et al. 2004). In zwei unabhängigen epidemiologischen retrospektiven Studien konnte allerdings beobachtet werden, dass Patienten, die Cholesterinsynthese hemmende Medikamente einnahmen, zu 70% weniger wahrscheinlich an der Alzheimer-Krankheit erkrankten (Jick et al. 2000; Wolozin et al. 2000). Neuere prospektive Studien mit Statinen ergaben teilweise bestätigende, teilweise konträre Ergebnisse dazu (Buxbaum et al. 2002; Simons et al. 2002; Sjogren et al. 2003; Scheen et al. 2008). Es mehren sich auch die Stimmen, dass anstatt der Cholesterin-senkenden, die anti-oxidierende und anti-entzündliche Wirkung von Statinen oder eine sekundär verbesserte Sauerstoffversorgung des Gehirns für deren Wirkung verantwortlich sind (Cucchiara et al. 2001; Zamvil et al. 2002; Bifulco et al. 2008). Zusätzlich scheint der

Prozess der Cholesterinsenkung und die damit verbundene Wirkung auf die β -Amyloid Bildung wegen der sehr langen (etwa 6-monatigen) Halbwertszeit des Cholesterins in vivo nur sehr langsam abzulaufen (Andersson et al. 1990).

Letztendlich gilt es aber zu bedenken, dass eine medikamentöse Senkung des Cholesterins im Organismus und besonders im Gehirn, aufgrund der Vielzahl der zu erfüllenden Funktionen mit gravierenden Folgen verbunden sein könnte. Ein Beispiel stellt die autosomal-rezessive Erbkrankheit des Smith-Lemli-Opitz-Syndroms dar. Aufgrund einer Genmutation kommt es bei dieser Erkrankung zu einer Störung der Cholesterin-Biosynthese und folglich zu einem Mangel an Cholesterin. Je nach Schweregrad endet diese Krankheit vor oder nach der Geburt bereits tödlich oder ist mit einer Vielzahl körperlicher Fehlbildungen verbunden.

6 Zusammenfassung

Obwohl seit der erstmaligen Beschreibung der Alzheimer-Erkrankung vor über 100 Jahren eine Vielzahl der ursächlichen histopathologischen Veränderungen und der beteiligten molekularen Mechanismen erforscht werden konnte, ist noch unklar, welche Faktoren die Spaltung des β -Amyloid Vorläuferproteins (APP) beeinflussen und zu der pathologischen β -Amyloid (A β) Bildung und Aggregation führen. In zahlreichen Studien ergaben sich Hinweise, dass Cholesterin einen wichtigen Modulator der Alzheimer-Erkrankung darstellt. Zusammen mit Sphingolipiden bildet Cholesterin laterale Membrandomänen, sogenannte Lipid Rafts, die bei der Bildung der β -Amyloid Plaques entscheidend beteiligt sein könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur dieser Domänen spezifisch verändert. Durch Transfektion mit dem Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I (SR-BI) der die selektive Cholesterin- und Phospholipidaufnahme in die Zelle erhöht, wurden neue Lipid Rafts generiert und bestehende Domänen vergrößert. SR-BI induzierte eine Abnahme des von der α -Sekretase gespaltenen APP, sowie eine Zunahme des von der β -Sekretase gespaltenen APP. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der Menge des A β -Peptids. Somit wurde gezeigt, dass ein Anstieg der Cholesterin-reichen Membrandomänen zu einer Abnahme der α -Sekretase Spaltung, einer Erhöhung der β -Sekretase Spaltung und einer Zunahme der pathologischen β -Amyloid Bildung führt. Während APP in Wildtyp-Zellen nahezu ausschließlich in DSM lokalisiert war, kam es durch die SR-BI Expression zu einer Translokation in DRM, die weitgehend Lipid Rafts repräsentieren. In den DRM konnte BACE damit mit APP interagieren. Um das subzelluläre Kompartiment zu identifizieren, an dem die APP-Spaltung stattfinden könnte, wurde mit Hilfe der Konfokalen Laserscanmikroskopie die intrazelluläre Verteilung von APP und BACE vor und nach SR-BI Expression untersucht. Nach SR-BI Transfektion war die Kolo-kalisation von APP und BACE in der Umgebung der Zellmembran deutlich verstärkt. Zusammen mit früheren Arbeiten lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die verstärkte APP-Prozessierung durch Induktion Cholesterin-reicher Domänen vorwiegend submembranös (Early Endosomes) und auf der Ebene der Plasmamembran stattfindet. Ob eine medikamentöse oder diätetische Cholesterin-Reduzierung, die den Lipid Raft Anteil der Zelle senkt und somit die Interaktion von APP mit BACE verhindert, als Therapiemöglichkeit für die Alzheimer-Erkrankung in Frage kommt, bedarf noch weiterer intensiver Forschung.

7 Literaturverzeichnis

- Abad-Rodriguez, J., Ledesma, M. D., Craessaerts, K., Perga, S., Medina, M., Delacourte, A., Dingwall, C., De Strooper, B. and Dotti, C. G.
Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation
J Cell Biol **167** (5): 953-60 (2004)
- Acton, S. L., Scherer, P. E., Lodish, H. F. and Krieger, M.
Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor
J Biol Chem **269** (33): 21003-9 (1994)
- Alzheimer-Forschung-Initiative-e.V.
Häufig gestellte Fragen
<http://www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/faqs.htm#jump1416> (2008)
- Andersson, M., Elmberger, P. G., Edlund, C., Kristensson, K. and Dallner, G.
Rates of cholesterol, ubiquinone, dolichol and dolichyl-P biosynthesis in rat brain slices
FEBS Lett **269** (1): 15-8 (1990)
- Anstey, K. J., Lipnicki, D. M. and Low, L. F.
Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis
Am J Geriatr Psychiatry **16** (5): 343-54 (2008)
- Ariga, T., McDonald, M. P. and Yu, R. K.
Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review
J Lipid Res **49** (6): 1157-75 (2008)
- Bickel, H.
Die Epidemiologie der Demenz
<http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01.pdf> (2008)
- Bifulco, M., Malfitano, A. M. and Marasco, G.
Potential therapeutic role of statins in neurological disorders
Expert Rev Neurother **8** (5): 827-37 (2008)
- Bodovitz, S. and Klein, W. L.
Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein
J Biol Chem **271** (8): 4436-40 (1996)
- Brown, D. A.
Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals
Physiology (Bethesda) **21**: 430-9 (2006)
- Brown, D. A. and London, E.
Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts
J Biol Chem **275** (23): 17221-4 (2000)
- Brown, D. A. and Rose, J. K.
Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface
Cell **68** (3): 533-44 (1992)
- Buechler, C., Ritter, M., Quoc, C. D., Agildere, A. and Schmitz, G.
Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages
Biochem Biophys Res Commun **262** (1): 251-4 (1999)

- Buxbaum, J. D., Cullen, E. I. and Friedhoff, L. T.
Pharmacological concentrations of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin decrease the formation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro and in patients
Front Biosci **7**: a50-9 (2002)
- Caballero, J. and Nahata, M.
Do statins slow down Alzheimer's disease? A review
J Clin Pharm Ther **29** (3): 209-13 (2004)
- Calvo, D. and Vega, M. A.
Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family
J Biol Chem **268** (25): 18929-35 (1993)
- Carter, J. and Lippa, C. F.
Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease
Curr Mol Med **1** (6): 733-7 (2001)
- Cedazo-Minguez, A.
Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities
J Cell Mol Med **11** (6): 1227-38 (2007)
- Chamberlain, L. H.
Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts
FEBS Lett **559** (1-3): 1-5 (2004)
- Cheng, H., Vetrivel, K. S., Gong, P., Meckler, X., Parent, A. and Thinakaran, G.
Mechanisms of disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease--targeting APP processing in lipid rafts
Nat Clin Pract Neurol **3** (7): 374-82 (2007)
- Cole, S. L. and Vassar, R.
BACE1 structure and function in health and Alzheimer's disease
Curr Alzheimer Res **5** (2): 100-20 (2008)
- Cordy, J. M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N. M. and 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** (20): 11735-40 (2003)
- Cucchiara, B. and Kasner, S. E.
Use of statins in CNS disorders
J Neurol Sci **187** (1-2): 81-9 (2001)
- Destatis
Statistisches Bundesamt Deutschland, Bevölkerung Deutschlands bis 2050
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pk/2006/Bevoelkerungsentwicklung/bevoelkerungsprojektion2050,property=file.pdf> (2006)
- Destatis
Statistisches Bundesamt Deutschland, Pressemitteilung Nr. 304 vom 22. August 2008
http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/08/PD08__304__12621.psml (2008)
- DGN
Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien: Diagnostik degenerativer Demenzen
<http://www.dgn.org/images/stories/dgn/leitlinien/diagnostikdemenzen.pdf> (2006)
- Doody, R. S.
Refining treatment guidelines in Alzheimer's disease
Geriatrics Suppl: 14-20 (2005)

- Doody, R. S.
Cholinesterase inhibitors and memantine: best practices
CNS Spectr **13** (10 Suppl 16): 34-5 (2008)
- Eddin, M.
The state of lipid rafts: from model membranes to cells
Annu Rev Biophys Biomol Struct **32**: 257-83 (2003)
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. and Simons, K.
Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts
J Cell Biol **160** (1): 113-23 (2003)
- Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R. and Yahi, N.
Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimers and prion diseases
Expert Rev Mol Med **2002**: 1-22 (2002)
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K. and Hartmann, T.
Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo
Proc Natl Acad Sci U S A **98** (10): 5856-61 (2001)
- Frank, P. G., Marcel, Y. L., Connelly, M. A., Lublin, D. M., Franklin, V., Williams, D. L. and Lisanti, M. P.
Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I
Biochemistry **41** (39): 11931-40 (2002)
- Frears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H. and Austen, B. M.
The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid
Neuroreport **10** (8): 1699-705 (1999)
- Ghribi, O., Larsen, B., Schrag, M. and Herman, M. M.
High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus
Exp Neurol **200** (2): 460-7 (2006)
- Goedert, M., Klug, A. and Crowther, R. A.
Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease
J Alzheimers Dis **9** (3 Suppl): 195-207 (2006)
- Golde, T. E., Estus, S., Usiak, M., Younkin, L. H. and Younkin, S. G.
Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR
Neuron **4** (2): 253-67 (1990)
- Goti, D., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Frank, S., van der Westhuyzen, D. R., Malle, E. and Sattler, W.
Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E
J Neurochem **76** (2): 498-508 (2001)
- Graf, G. A., Matveev, S. V. and Smart, E. J.
Class B scavenger receptors, caveolae and cholesterol homeostasis
Trends Cardiovasc Med **9** (8): 221-5 (1999)
- Grimm, M. O., Grimm, H. S., Tomic, I., Beyreuther, K., Hartmann, T. and Bergmann, C.
Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels
J Biol Chem **283** (17): 11302-11 (2008)
- Gutzmann, H. and Zank, S.
Demenzielle Erkrankungen: Medizinische und psychosoziale Interventionen
Kohlhammer Verlag, Stuttgart, (2005)

- Haass, C.
Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation
Embo J **23** (3): 483-8 (2004)
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Oltersdorf, T., Teplow, D. B. and Selkoe, D. J.
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)
- Haass, C., Koo, E. H., Mellon, A., Hung, A. Y. and Selkoe, D. J.
Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments
Nature **357** (6378): 500-3 (1992)
- Hardy, J. and Selkoe, D. J.
The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics
Science **297** (5580): 353-6 (2002)
- Hartmann, T., Kuchenbecker, J. and Grimm, M. O.
Alzheimer's disease: the lipid connection
J Neurochem **103 Suppl 1**: 159-70 (2007)
- Hayashi, H., Mizuno, T., Michikawa, M., Haass, C. and Yanagisawa, K.
Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains
Biochim Biophys Acta **1483** (1): 81-90 (2000)
- Hebert, S. S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M. A., Muller, U. and De Strooper, B.
Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes
EMBO Rep **7** (7): 739-45 (2006)
- Heerklotz, H.
Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures
Biophys J **83** (5): 2693-701 (2002)
- Helms, J. B. and Zurzolo, C.
Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking
Traffic **5** (4): 247-54 (2004)
- Hermes, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S. and Muller, U.
Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members
Embo J **23** (20): 4106-15 (2004)
- Hoenicka, J.
[Genes in Alzheimer's disease]
Rev Neurol **42** (5): 302-5 (2006)
- Howland, D. S., Trusko, S. P., Savage, M. J., Reaume, A. G., Lang, D. M., Hirsch, J. D., Maeda, N., Siman, R., Greenberg, B. D., Scott, R. W. and Flood, D. G.
Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol
J Biol Chem **273** (26): 16576-82 (1998)
- Huang, W., Qiu, C., von Strauss, E., Winblad, B. and Fratiglioni, L.
APOE genotype, family history of dementia, and Alzheimer disease risk: a 6-year follow-up study
Arch Neurol **61** (12): 1930-4 (2004)
- Hung, A. Y., Koo, E. H., Haass, C. and Selkoe, D. J.
Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage
Proc Natl Acad Sci U S A **89** (20): 9439-43 (1992)

- Hur, J. Y., Welander, H., Behbahani, H., Aoki, M., Franberg, J., Winblad, B., Frykman, S. and Tjernberg, L. O.
Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain
Febs J **275** (6): 1174-87 (2008)
- Husemann, J. and Silverstein, S. C.
Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain
Am J Pathol **158** (3): 825-32 (2001)
- Huttunen, H. J. and Kovacs, D. M.
ACAT as a drug target for Alzheimer's disease
Neurodegener Dis **5** (3-4): 212-4 (2008)
- Ikonen, E.
Roles of lipid rafts in membrane transport
Curr Opin Cell Biol **13** (4): 470-7 (2001)
- Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I.
Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention
J Cell Mol Med **12** (1): 38-55 (2008)
- Iqbal, K. and Novak, M.
From tangles to tau protein
Bratisl Lek Listy **107** (9-10): 341-2 (2006)
- Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S. and Drachman, D. A.
Statins and the risk of dementia
Lancet **356** (9242): 1627-31 (2000)
- Jung, S. S. and Cashman, N. R.
Processing of the beta-amyloid precursor protein in ex vivo human brain cells
Neuroreport **10** (18): 3875-9 (1999)
- Kaether, C. and Haass, C.
A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation
J Cell Biol **167** (5): 809-12 (2004)
- Kaether, C., Haass, C. and Steiner, H.
Assembly, trafficking and function of gamma-secretase
Neurodegener Dis **3** (4-5): 275-83 (2006)
- Kakio, A., Nishimoto, S., Yanagisawa, K., Kozutsumi, Y. and Matsuzaki, K.
Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raft-like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid
Biochemistry **41** (23): 7385-90 (2002)
- Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A. and Goldstein, L. S.
Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP
Nature **414** (6864): 643-8 (2001)
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B.
The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor
Nature **325** (6106): 733-6 (1987)
- Kang, J. and Muller-Hill, B.
Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain
Biochem Biophys Res Commun **166** (3): 1192-200 (1990)

- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C. and Hyman, B. T.
Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes
J Cell Sci **116** (Pt 16): 3339-46 (2003)
- Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A. and Soininen, H.
Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease
Ann Intern Med **137** (3): 149-55 (2002)
- Knopman, D.
Cerebrospinal fluid beta-amyloid and tau proteins for the diagnosis of Alzheimer disease
Arch Neurol **58** (3): 349-50 (2001)
- Kojro, E. and Fahrenholz, F.
The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases
Subcell Biochem **38**: 105-27 (2005)
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W. and Fahrenholz, F.
Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10
Proc Natl Acad Sci U S A **98** (10): 5815-20 (2001)
- Koo, E. H., Squazzo, S. L., Selkoe, D. J. and Koo, C. H.
Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody
J Cell Sci **109** (Pt 5): 991-8 (1996)
- Krieger, M.
Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI
Annu Rev Biochem **68**: 523-58 (1999)
- Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Bisgaier, C. L., Essenburg, A. D., Lampert, H. C., Drumm, D. and Roher, A. E.
Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels
Biochem Biophys Res Commun **252** (3): 711-5 (1998)
- LaFerla, F. M., Green, K. N. and Oddo, S.
Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease
Nat Rev Neurosci **8** (7): 499-509 (2007)
- Lane, R. M. and Farlow, M. R.
Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease
J Lipid Res **46** (5): 949-68 (2005)
- Lazarov, O., Morfini, G. A., Lee, E. B., Farah, M. H., Szodorai, A., DeBoer, S. R., Koliatsos, V. E., Kins, S., Lee, V. M., Wong, P. C., Price, D. L., Brady, S. T. and Sisodia, S. S.
Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited
J Neurosci **25** (9): 2386-95 (2005)
- Lichtenberg, D., Goni, F. M. and Heerklotz, H.
Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts
Trends Biochem Sci **30** (8): 430-6 (2005)
- Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P. and Simons, K.
Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature
Proc Natl Acad Sci U S A **105** (29): 10005-10 (2008)
- Lingwood, D. and Simons, K.
Detergent resistance as a tool in membrane research
Nat Protoc **2** (9): 2159-65 (2007)

- Liu, K., Solano, I., Mann, D., Lemere, C., Mercken, M., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M.
Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease
Acta Neuropathol **112** (2): 163-74 (2006)
- Lobo, M. V., Huerta, L., Ruiz-Velasco, N., Teixeira, E., de la Cueva, P., Celdran, A., Martin-Hidalgo, A., Vega, M. A. and Bragado, R.
Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids
J Histochem Cytochem **49** (10): 1253-60 (2001)
- London, E. and Brown, D. A.
Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)
Biochim Biophys Acta **1508** (1-2): 182-95 (2000)
- Loura, L. M., de Almeida, R. F., Silva, L. C. and Prieto, M.
FRET analysis of domain formation and properties in complex membrane systems
Biochim Biophys Acta (2008)
- Marksteiner, J., Hinterhuber, H. and Humpel, C.
Cerebrospinal fluid biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease: beta-amyloid(1-42), tau, phospho-tau-181 and total protein
Drugs Today (Barc) **43** (6): 423-31 (2007)
- Marlow, L., Cain, M., Pappolla, M. A. and Sambamurti, K.
Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP)
J Mol Neurosci **20** (3): 233-9 (2003)
- Matsuura, D., Taguchi, K., Yagisawa, H. and Maekawa, S.
Lipid components in the detergent-resistant membrane microdomain (DRM) obtained from the synaptic plasma membrane of rat brain
Neurosci Lett **423** (2): 158-61 (2007)
- Matveev, S., Uittenbogaard, A., van Der Westhuyzen, D. and Smart, E. J.
Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester
Eur J Biochem **268** (21): 5609-16 (2001)
- Möller, H. J., Laux, G. and Deister, A.
Psychiatrie und Psychotherapie
Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 3. überarbeitete Auflage, ISBN: 3-13-128543-5 (2005)
- Munoz-Torrero, D.
Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease
Curr Med Chem **15** (24): 2433-55 (2008)
- Nikisch, G., Hertel, A., Kiessling, B., Wagner, T., Krasz, D., Hofmann, E. and Wiedemann, G.
Three-year Follow-up of a Patient with Early-onset Alzheimer's Disease with Presenilin-2 N141I Mutation - Case Report and Review of the Literature
Eur J Med Res **13** (12): 579-584 (2008)
- Octave, J. N.
[Alzheimer disease: cellular and molecular aspects]
Bull Mem Acad R Med Belg **160** (10-12): 445-9; discussion 450-1 (2005)
- Packard, C. J., Westendorp, R. G., Stott, D. J., Caslake, M. J., Murray, H. M., Shepherd, J., Blauw, G. J., Murphy, M. B., Bollen, E. L., Buckley, B. M., Cobbe, S. M., Ford, I., Gaw, A., Hyland, M., Jukema, J. W., Kamper, A. M., Macfarlane, P. W., Jolles, J., Perry, I. J., Sweeney, B. J. and Twomey, C.
Association between apolipoprotein E4 and cognitive decline in elderly adults
J Am Geriatr Soc **55** (11): 1777-85 (2007)

- Parkin, E. T., Turner, A. J. and Hooper, N. M.
Amyloid precursor protein, although partially detergent-insoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein
Biochem J **344 Pt 1**: 23-30 (1999)
- Parton, R. G.
Caveolae and caveolins
Curr Opin Cell Biol **8** (4): 542-8 (1996)
- Pena, F., Gutierrez-Lerma, A., Quiroz-Baez, R. and Arias, C.
The Role of beta-Amyloid Protein in Synaptic Function: Implications for Alzheimer's Disease Therapy
Curr Neuropharmacol **4** (2): 149-63 (2006)
- Postina, R.
A closer look at alpha-secretase
Curr Alzheimer Res **5** (2): 179-86 (2008)
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K. and Horber, J. K.
Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells
J Cell Biol **148** (5): 997-1008 (2000)
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A. and Herms, J.
Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein
J Neurosci **26** (27): 7212-21 (2006)
- Puglielli, L., Konopka, G., Pack-Chung, E., Ingano, L. A., Berezovska, O., Hyman, B. T., Chang, T. Y., Tanzi, R. E. and Kovacs, D. M.
Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide
Nat Cell Biol **3** (10): 905-12 (2001)
- Quest, A. F., Leyton, L. and Parraga, M.
Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease
Biochem Cell Biol **82** (1): 129-44 (2004)
- Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Sambamurti, K., Duff, K. and Pappolla, M. A.
Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model
Neurobiol Dis **7** (4): 321-31 (2000)
- Refolo, L. M., Pappolla, M. A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S. D., Thomas-Bryant, T., Tint, G. S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S. S. and Duff, K. E.
A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease
Neurobiol Dis **8** (5): 890-9 (2001)
- Reid, P. C., Urano, Y., Kodama, T. and Hamakubo, T.
Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins
J Cell Mol Med **11** (3): 383-92 (2007)
- Reisberg, B., Doody, R., Stoffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. and Mobius, H. J.
Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease
N Engl J Med **348** (14): 1333-41 (2003)
- Reiss, A. B., Siller, K. A., Rahman, M. M., Chan, E. S., Ghiso, J. and de Leon, M. J.
Cholesterol in neurologic disorders of the elderly: stroke and Alzheimer's disease
Neurobiol Aging **25** (8): 977-89 (2004)
- Rhinds, D. and Brissette, L.
The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking. defining the rules for lipid traders
Int J Biochem Cell Biol **36** (1): 39-77 (2004)

- Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., Wolfer, D. P. and Muller, U. C.
The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice
J Neurosci **27** (29): 7817-26 (2007)
- Russo, C., Venezia, V., Repetto, E., Nizzari, M., Violani, E., Carlo, P. and Schettini, G.
The amyloid precursor protein and its network of interacting proteins: physiological and pathological implications
Brain Res Brain Res Rev **48** (2): 257-64 (2005)
- Sakurai, T., Kaneko, K., Okuno, M., Wada, K., Kashiwama, T., Shimizu, H., Akagi, T., Hashikawa, T. and Nukina, N.
Membrane microdomain switching: a regulatory mechanism of amyloid precursor protein processing
J Cell Biol **183** (2): 339-52 (2008)
- Scheen, A. J., Radermecker, R. P. and Sadzot, B.
[Statin for the brain: update in 2008]
Rev Med Liege **63** (5-6): 287-92 (2008)
- Schroeder, R. J., Ahmed, S. N., Zhu, Y., London, E. and Brown, D. A.
Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains
J Biol Chem **273** (2): 1150-7 (1998)
- Selkoe, D. J.
Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies
Ann Intern Med **140** (8): 627-38 (2004)
- Shie, F. S., Jin, L. W., Cook, D. G., Leverenz, J. B. and LeBoeuf, R. C.
Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain A beta accumulation in transgenic mice
Neuroreport **13** (4): 455-9 (2002)
- Silvius, J. R.
Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies
Biochim Biophys Acta **1746** (3): 193-202 (2005)
- Simons, K. and Ikonen, E.
Functional rafts in cell membranes
Nature **387** (6633): 569-72 (1997)
- Simons, K. and Vaz, W. L.
Model systems, lipid rafts, and cell membranes
Annu Rev Biophys Biomol Struct **33**: 269-95 (2004)
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G. and Simons, K.
Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons
Proc Natl Acad Sci U S A **95** (11): 6460-4 (1998)
- Simons, M., Schwarzler, F., Lutjohann, D., von Bergmann, K., Beyreuther, K., Dichgans, J., Wormstall, H., Hartmann, T. and Schulz, J. B.
Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial
Ann Neurol **52** (3): 346-50 (2002)
- Singer, S. J. and Nicolson, G. L.
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes
Science **175** (23): 720-31 (1972)

- Sjogren, M., Gustafsson, K., Syversen, S., Olsson, A., Edman, A., Davidsson, P., Wallin, A. and Blennow, K.
Treatment with simvastatin in patients with Alzheimer's disease lowers both alpha- and beta-cleaved amyloid precursor protein
Dement Geriatr Cogn Disord **16** (1): 25-30 (2003)
- Smith, R. P., Higuchi, D. A. and Broze, G. J., Jr.
Platelet coagulation factor XIa-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein
Science **248** (4959): 1126-8 (1990)
- Soliman, A. and Hawkins, D.
The link between Down's syndrome and Alzheimer's disease: 2
Br J Nurs **7** (14): 847-50 (1998)
- Srivastava, R. A. and Jain, J. C.
Scavenger receptor class B type I expression and elemental analysis in cerebellum and parietal cortex regions of the Alzheimer's disease brain
J Neurol Sci **196** (1-2): 45-52 (2002)
- Steiner, H., Fluhner, R. and Haass, C.
Intramembrane proteolysis by gamma-secretase
J Biol Chem **283** (44): 29627-31 (2008)
- Storey, E., Spurck, T., Pickett-Heaps, J., Beyreuther, K. and Masters, C. L.
The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites
Brain Res **735** (1): 59-66 (1996)
- Suzuki, T. and Nakaya, T.
Regulation of APP by phosphorylation and protein interactions
J Biol Chem (2008)
- Tanzi, R. E., McClatchey, A. I., Lamperti, E. D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J. F. and Neve, R. L.
Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease
Nature **331** (6156): 528-30 (1988)
- Taylor, C. M., Coetzee, T. and Pfeiffer, S. E.
Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane
J Neurochem **81** (5): 993-1004 (2002)
- Taylor, D. R. and Hooper, N. M.
Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid-beta proteins
Semin Cell Dev Biol **18** (5): 638-48 (2007)
- Thuahnai, S. T., Lund-Katz, S., Williams, D. L. and Phillips, M. C.
Scavenger receptor class B, type I-mediated uptake of various lipids into cells. Influence of the nature of the donor particle interaction with the receptor
J Biol Chem **276** (47): 43801-8 (2001)
- Tomita, S., Kirino, Y. and Suzuki, T.
Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism
J Biol Chem **273** (11): 6277-84 (1998)
- Urban, S., Zieseniss, S., Werder, M., Hauser, H., Budzinski, R. and Engelmann, B.
Scavenger receptor BI transfers major lipoprotein-associated phospholipids into the cells
J Biol Chem **275** (43): 33409-15 (2000)

- van der Goot, F. G. and Harder, T.
Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack
Semin Immunol **13** (2): 89-97 (2001)
- Vassar, R.
BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease
J Mol Neurosci **23** (1-2): 105-14 (2004)
- Venugopal, C., Demos, C. M., Rao, K. S., Pappolla, M. A. and Sambamurti, K.
Beta-secretase: structure, function, and evolution
CNS Neurol Disord Drug Targets **7** (3): 278-94 (2008)
- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A. C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Younkin, S. G. and Golde, T. E.
Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains
Neurobiol Dis **9** (1): 11-23 (2002)
- Walter, J.
Control of amyloid-beta-peptide generation by subcellular trafficking of the beta-amyloid precursor protein and beta-secretase
Neurodegener Dis **3** (4-5): 247-54 (2006)
- Weyerer, S.
Gesundheitsberichtserstattung des Bundes: Altersdemenz
http://www.rki.de/cln_091/nn_199850/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/altersdemenz,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/altersdemenz.pdf (2005)
- Wiedmann, M.
Zellulärer Lipidimport durch Klasse B Scavenger Rezeptoren und die Biogenese von Membrandomänen
http://edoc.ub.uni-muenchen.de/5639/1/Wiedmann_Markus.pdf (2006)
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G. G. and Siegel, G.
Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors
Arch Neurol **57** (10): 1439-43 (2000)
- Yagishita, S., Futai, E. and Ishiura, S.
In vitro reconstitution of gamma-secretase activity using yeast microsomes
Biochem Biophys Res Commun **377** (1): 141-5 (2008)
- Yamazaki, T., Koo, E. H. and Selkoe, D. J.
Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells
J Neurosci **17** (3): 1004-10 (1997)
- Zamvil, S. S. and Steinman, L.
Cholesterol-lowering statins possess anti-inflammatory activity that might be useful for treatment of MS
Neurology **59** (7): 970-1 (2002)
- Zekry, D., Duyckaerts, C., Belmin, J., Geoffre, C., Moulias, R. and Hauw, J. J.
Cerebral amyloid angiopathy in the elderly: vessel walls changes and relationship with dementia
Acta Neuropathol **106** (4): 367-73 (2003)
- Zigman, W. B. and Lott, I. T.
Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk
Ment Retard Dev Disabil Res Rev **13** (3): 237-46 (2007)

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. B. Engelmann für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, seine intensive Betreuung und seinem steten Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Das größte Dankeschön geht an meine Betreuerin Dr. rer. nat. Silke Dlugai-Esser, die mich mit Geduld und Verständnis in die Laborarbeit eingewiesen hat, von der ich alle wichtigen Tipps und Tricks gelernt habe und die immer ein offenes Ohr für meine beruflichen, wie auch privaten Fragen und Probleme gehabt hat.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Stefan Lichtenthaler und seiner Arbeitsgruppe, besonders Sylvia Fischer, aus dem Adolf-Butenandt-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, bei denen ich wichtige Arbeitsschritte erlernen konnte, die ich selbst bei größtem Stress mit allerlei Fragen löchern dürfte und von denen ich mit großer Hilfsbereitschaft viele Materialien bekommen habe.

Herrn Priv. Doz. Dr. Stefan Zahler aus dem Institut für Pharmazeutische Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität danke ich für die sorgfältige Anfertigung der Laserscanbilder.

Ein ganz spezieller Dank geht an meine Arbeitsgruppe und auch an alle Angestellten des Instituts für Klinische Chemie im Klinikum Großhadern, die mir stets eine wichtige Hilfe waren, mit denen man sich immer gut austauschen konnte und ohne die die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht hätte.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinem lieben Schatz, meinen lieben Eltern und meiner Familie, die immer für mich da waren und mich mit allen Kräften unterstützt haben. Mit Liebe, Geduld und Verständnis haben sie sich meiner Sorgen und Problemen angenommen, mich ermuntert, wenn es nötig war auch mal angetrieben und stets zu mir gehalten und an mich geglaubt.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Matthiesen, geb. Anderie
Vorname	Sabine Daniela
Geburtsdatum, -ort	29. September 1980 in München
Familienstand	verheiratet
Konfession	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

09.1987 – 07.1991	Grundschule an der Dieselstraße in München
09.1991 – 06.2000	Gymnasium München-Moosach
06.2000	Abitur
01.2001 – 04.2001	Aufenthalt als Au-Pair in London

Hochschulausbildung:

04.2001 – 11.2007	Studium der Medizin an der LMU München
03.2003	Physikum nach alter ÄAppO
02.2006 – 01.2007	Praktisches Jahr
	1. Tertial Innere Medizin - Gastroenterologie Klinikum Landshut
	2. Tertial Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum Starnberg
	3. Tertial Allgemein-, Unfall- und Kinderchirurgie Krankenhaus Dritter Orden München- Nymphenburg
10. und 11.2007	Zweite Ärztliche Prüfung

Promotion:

03.2004 – 03.2006	experimenteller Teil der Doktorarbeit im Institut für Klinische Chemie der LMU München
-------------------	---

Beruf:

seit 01.2008	Assistenzärztin in der Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum Landshut
--------------	--