

Friedrich-Schiller-Universität Jena

---



---

seit 1558

# Untersuchung externer und intrazellulärer Faktoren und Mechanismen auf den Bildungsprozess von A $\beta$ -Amyloid

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

Der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von Diplom-Humanbiologin Katharina Tepper

Geboren am 03.08.1980 in Telgte

**1. Gutachter**

Prof. Dr. Stephan Diekmann  
Institut für Altersforschung – Fritz Lipmann Institut,  
Friedrich-Schiller Universität Jena

**2. Gutachter**

PD. Dr. Marcus Fändrich  
Max-Planck Forschungsstelle für  
Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale)

**3. Gutachter**

Prof. Dr. Jan Münch  
Institut für Virologie,  
Universitätsklinikum Ulm

**Tag der Disputation: 27.05.2011**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
1 Zusammenfassung.....	6
2 Summary .....	7
3 Einleitung.....	8
3.1 Amyloidosen .....	8
3.2 Sekundäre Komponenten amyloider Plaques .....	11
3.3 Alzheimer-Krankheit .....	12
3.4 Amyloid-Fibrillen .....	16
3.5 Mechanismus der Bildung von Amyloid-Fibrillen .....	19
3.5.1 Kinetik der Bildung von Amyloid-Fibrillen <i>in vitro</i> .....	19
3.5.2 Modulatoren der Aggregations-Kinetik .....	20
3.6 Zellen in der Plaque-Bildung .....	22
3.7 Zielsetzung dieser Arbeit .....	24
4 Material .....	25
4.1 Substanzen .....	25
4.2 Geräte .....	26
4.3 Assays und Protein-Marker.....	27
4.4 Materialien .....	28
4.5 Puffer und Lösungen.....	29
4.6 Antikörper .....	31
4.7 Konjugate und Farbstoffe.....	31
5 Methoden .....	32
5.1 Zellkultur.....	32
5.1.1 Allgemeine Zellkultur-Methoden .....	32
5.1.2 Induktion der Plaquebildung in der Zellkultur.....	33
5.1.3 Aufreinigung amyloider Plaques aus der Zellkultur .....	33
5.1.4 Vitalitätsbestimmung von Zellen .....	34
5.1.5 Immunfluoreszenz-Färbung .....	34
5.1.6 Fluorimetrische Analyse der Phagozytose.....	35
5.1.7 KR-Färbung .....	36
5.1.8 Alcianblau-Färbung .....	37
5.1.9 Ölrot-Färbung.....	37

5.2	Lipidmethoden .....	38
5.2.1	Lipid-Raft-Aufreinigung aus THP-1 Zellen .....	38
5.2.2	Lipid-Extraktion.....	39
5.2.3	Dünnschichtchromatographie .....	39
5.3	Proteinmethoden .....	41
5.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
5.3.2	SDS-Gelelektrophorese.....	41
5.3.3	Dot-Blot und Slot-Blot-Verfahren .....	42
5.3.4	Filter-Retentions-Assay .....	44
5.3.5	Elektronenmikroskopie .....	45
5.3.6	Enzymatischer Verdau .....	45
5.3.7	Herstellung von Amyloid-Fibrillen <i>in vitro</i> .....	46
5.3.8	Messung der Oberflächenspannung.....	47
5.3.9	Messung der Aggregations-Kinetik .....	48
5.4	Statistische Methoden .....	49
5.5	Computer-Programme.....	49
6	Ergebnisse .....	50
6.1	Einfluss des Puffersystems auf die A $\beta$ -Aggregation <i>in vitro</i> .....	50
6.1.1	Einfluss des Puffersystems auf die Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation .....	53
6.1.2	Einfluss des Puffersystems auf die Morphologie der A $\beta$ -Fibrillen .....	55
6.1.3	Vergleich der Puffereigenschaften mit der Lag-Zeit .....	59
6.1.4	Abhängigkeit der Lag-Zeit von der A $\beta$ -Konzentration .....	61
6.1.5	Einfluss von Nukleationskeimen auf die Lag-Zeit .....	63
6.2	Etablierung eines Zellkultur-Modells der Amyloid-Plaque-Bildung.....	65
6.2.1	Induktion der Plaque-Bildung in der Zellkultur.....	66
6.2.2	Amyloidnachweis mittels KR-grüner Doppelbrechung.....	67
6.2.3	Amyloid-Nachweis mittels Filter-Retentions-Assay .....	68
6.2.1	Nachweis sekundärer Komponenten.....	70
6.2.2	Verlangsamte Plaque-Bildung von A $\beta$ (1-40)Val18Pro .....	70
6.2.3	Durch die Plaque-Bildung induzierte Zell-Kumulation.....	72
6.2.4	Zusammensetzung der gebildeten Amyloid-Plaques .....	73
6.3	Bedeutung der Raft-Lipide in der A $\beta$ -Amyloid-Bildung in THP-1-Zellen.....	75
6.3.1	Etablierung der Lipid-Raft-Aufreinigung .....	75
6.3.2	Ko-Fraktionierung von A $\beta$ (1-40) und Lipid-Rafts .....	77
6.3.3	Immunfluoreszenz-Studie zur Lokalisation von A $\beta$ und Lipid-Raft-Markern .....	79
6.3.4	Amyloid-Bildung in Gegenwart von Lipidmetabolismus-Inhibitoren.....	81
6.3.5	Einfluss intrazellulärer Lipid-Ansammlung auf die Amyloid-Bildung .....	83
6.4	Stabilität der Amyloid-Fibrillen aus THP-1-Zellen .....	85
6.5	Internalisierung von A $\beta$ -Peptiden in der Amyloid-Bildung .....	87
6.5.1	Amyloid Bildung durch phagozytierende Zellen.....	87
6.5.2	Vergleich der Nukleations-Reaktion in der Zellkultur <i>und in vitro</i> .....	90

---

6.5.3	Einfluss der Amyloid-Bildung auf die Zellvitalität .....	92
7	Diskussion .....	94
7.1	Der Einfluss des Puffersystems auf die A $\beta$ -Aggregation .....	94
7.1.1	Puffersysteme stellen einen externen Faktor der A $\beta$ -Aggregation dar .....	94
7.1.2	Die Puffersysteme beeinflussen die Morphologie der A $\beta$ -Fibrillen .....	95
7.1.3	Eigenschaften der A $\beta$ -Fibrillen aus zwei Puffersystemen .....	95
7.1.4	Ausblick für die Verwendung der Puffersysteme für <i>in vitro</i> Modelle .....	97
7.2	Mechanismen der Amyloid-Bildung in THP-1-Zellen .....	98
7.2.1	Etablierung des Zellkultur-Modells zur Bildung amyloider Plaques .....	98
7.2.2	Internalisierung von A $\beta$ (1-40) durch Phagozytose .....	99
7.2.3	Intrazelluläre Amyloid-Bildung .....	100
7.2.4	Toxizität der Amyloid-Bildung .....	101
7.2.5	Freisetzung und Zusammensetzung der Plaques .....	102
7.2.6	Die Rolle der Makrophagen in der A $\beta$ -Plaque-Bildung .....	103
7.2.7	Abschließende Einordnung und Ausblick .....	104
8	Anhang .....	105
8.1.1	Abkürzungen .....	105
8.1.2	Übersicht zu den Puffereigenschaften .....	107
8.1.3	Verzeichnis der Bilder .....	109
8.1.4	Verzeichnis der Tabellen .....	110
8.1.5	Verzeichnis der Literatur .....	111
8.1.6	Lebenslauf .....	122
8.1.7	Selbstständigkeitserklärung .....	125
8.1.8	Danksagung .....	126

## 1 Zusammenfassung

Die Amyloidosen stellen eine Gruppe degenerativer Krankheiten dar, die durch organ- oder gewebetypische Proteinablagerungen charakterisiert sind, welche zu Schädigungen des Gewebes führen. Morbus Alzheimer ist eine zerebrale Amyloidose, die im hohen Alter vermehrt auftritt und mit starker Demenz einhergeht. Die amyloiden Ablagerungen, die im Alzheimer-Gehirn als senile Plaques bezeichnet werden, bestehen in dieser Krankheit aus fibrilliertem A $\beta$ -Peptid. Zwar ist bekannt, wie das A $\beta$ -Peptid in Neuronen aus dem Amyloid-Vorläuferprotein A $\beta$ PP entsteht, jedoch sind die darauffolgenden Prozesse und Mechanismen, die zur Bildung von A $\beta$ -Fibrillen und deren extrazelluläre Ablagerung führen, noch nicht vollständig geklärt. Eine Beteiligung der Gehirnmakrophagen (Mikroglia) wird in diesem Zusammenhang ebenso diskutiert wie die Hypothese einer zellunabhängigen Entstehung der amyloiden Plaques. Sicher ist, dass ein Kernpunkt dieser Plaque-Bildung die Aggregation von A $\beta$ -Peptiden zu A $\beta$ -Fibrillen ist.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Vorgänge und Mechanismen der A $\beta$ -Amyloid-Entstehung in Makrophagen und auf die Untersuchung externer Einflüsse auf die A $\beta$ -Aggregation *in vitro*. Die Analyse von A $\beta$ -Aggregations-Kinetiken in zwölf unterschiedlichen Puffersystemen konnte zeigen, dass die Lag-Zeiten der Aggregation durch die Puffer beeinflusst werden. Auch die Morphologie der A $\beta$ -Fibrillen variiert in den eingesetzten Puffersystemen. Damit stellen die Puffer einen weiteren externen Faktor dar, welcher die A $\beta$ -Aggregation *in vitro* beeinflusst. Die häufig eingesetzten *in vitro* Modelle zur Aggregation von Polypeptidketten sollten daher in Zukunft diesen Einfluss bei der Wahl des Puffers berücksichtigen. Mit der Etablierung eines auf Makrophagen basierenden Zellmodells zur A $\beta$ -Plaque-Entwicklung wurde die Möglichkeit geschaffen, die Entstehung amyloider Plaques in einem zellulären Kontext zu untersuchen. Für die Amyloid-Bildung in den THP-1-Makrophagen konnte die Rolle der Lipid-Rafts nicht verifiziert werden, die zuvor in primären Makrophagen beobachtet wurde. Die Internalisierung des A $\beta$ -Peptids durch Makrophagen mittels Phagozytose wurde im zellulären Kontext als Voraussetzung für die Entstehung amyloider Plaques identifiziert. Der nachfolgende Prozess der Amyloid-Bildung ist für die Makrophagen zytotoxisch und führt schließlich zur extrazellulären Ablagerung des Amyloids. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis der Rolle von phagozytierenden Zellen an der Amyloid-Bildung bei.

## 2 Summary

Amyloidosis refers to a group of local and systemic degenerative diseases derived by the deposition of amyloid fibrils in organs or tissues of the human body. Such amyloid deposits cause harm in the surrounding tissues leading to a number of pathologies. A well-known and age-related amyloidosis is Alzheimer's disease which results in dementia. The so called senile plaques, found in Alzheimer patient's brain, are composed of fibrils from A $\beta$ -peptide. The process of generating A $\beta$ -peptides from the amyloid precursor protein A $\beta$ PP in neurons is quite well understood, although the consecutive mechanisms of amyloid formation and its extracellular deposition still need to be clarified. The hypothesis that cells (i.e. microglia) are involved in the formation of amyloid is as well discussed as a cell independent aggregation and deposition of amyloid fibrils. Part of these investigations consists on the identification of factors showing impact on A $\beta$ -aggregation itself.

In this study I focused on mechanisms and processes of A $\beta$ -amyloid formation within a macrophage cell culture model and by using *in vitro* models of A $\beta$ -aggregation in twelve biological buffers. The aggregation of A $\beta$ (1-40) was found to be influenced by the buffer. This was observable through alterations in the duration of lag phase and a variety of fibril morphology. Hence the data here presented provides invaluable support for the selection of a suitable buffer system and the experimental setup of A $\beta$ -aggregation studies, considering the chosen buffer as another external factor to the A $\beta$ -aggregation.

The established cell culture model enabled us to follow the process of amyloid formation in a cellular context. The hypothesis of a general role of raft lipids in the process of amyloid plaques formation could not be verified by the obtained data. The internalization of A $\beta$ (1-40) via phagocytosis was shown to be essential for the amyloid plaque formation in this model. The following process of amyloid formation leads to an increasing cytotoxicity and finally ends with the extracellular deposition of the amyloid plaque. This work supports the idea of cell-dependent amyloid formation and gives rise to the understanding of phagocytic cells and their role in amyloid formation.

## 3 Einleitung

### 3.1 Amyloidosen

Der Pathologe Rudolf Virchow beschrieb im Jahre 1854 wachsartige Ablagerungen, welche er durch eine Stärke-Färbung entdeckte, mit dem Begriff Amyloid {Virchow, 1854}. Zwar wurde schon im Jahre 1859 durch Friedreich und Kekulé nachgewiesen, dass solche Ablagerungen hauptsächlich aus Proteinen bestehen {Friedreich und Kekulé, 1859}, dennoch hat sich der Begriff Amyloid etabliert. Daher wird die Gruppe der Proteinspeicherkrankheiten, denen die Ablagerung von Amyloid-Fibrillen gemein ist, als Amyloidosen bezeichnet. Hierbei polymerisieren körpereigene, ursprünglich lösliche Proteine oder Peptide und bilden fibrilläre Ablagerungen, die unlöslich sind {Sipe und Cohen, 2000}.

Es sind derzeit 27 Polypeptidketten bekannt, die zu solchen amyloiden Ablagerungen führen können {Westermarck *et al.*, 2007}. In der Tabelle 3.1 sind die verschiedenen Polypeptidketten mit ihren entsprechenden Vorläuferproteinen zusammengestellt. Die Nomenklatur der Amyloidosen richtet sich nach den Vorläuferproteinen und setzt sich aus dem Buchstaben „A“ und der Abkürzung für das Vorläuferprotein zusammen. Diese Definition wurde vom Internationalen Nomenklatur-Komitee für Amyloidosen festgelegt. Die Herkunft der Vorläuferproteine ist sehr verschieden und in der Regel gleichen sich die Aminosäure-Sequenzen nicht. Daher ist auch die physiologische Funktion der Vorläuferproteine sehr unterschiedlich und schließt Bereiche wie das Immunsystem (AL und AH), den Hormonhaushalt (AIns, ACal, AMed) oder das Zytoskelett (ATau, AGel) ein. Amyloid-Ablagerungen können sowohl intra- als auch extrazellulär auftreten und sind entweder lokal begrenzt oder systemisch {Braun, 1972}. Die reaktive systemische AA-Amyloidose ist ein Beispiel für eine systemische Amyloidose. Sie kann durch chronische Entzündungen entstehen, die zu einer erhöhten Konzentration des Akutphasen-Apolipoprotein Serum Amyloid A (SAA) führen {Pepys und Baltz, 1983}. Mit der Zeit bilden sich dabei extrazelluläre Amyloid-Ablagerungen in verschiedenen Organen (Milz, Leber, Nieren). Eine lokal begrenzte Amyloidose ist die Alzheimer-Krankheit, bei der sich das A $\beta$ -Amyloid extrazellulär im Gehirn ablagert. Zu einer vermehrten Produktion eines Vorläuferproteins kann es auch durch genetische Mutationen z.B. in Tumoren (APro, ACal) kommen. Einige Amyloidosen können mit fortschreitendem Alter in Erscheinung treten, wie die Alzheimer-Krankheit, die Vorhof-Amyloidose (AANF) oder die mediale Aorta-Amyloidose (AMed).

Tabelle 3.1: Amyloid-Fibrillen-Proteine und ihre Vorläufer

Amyloid-Protein	Vorläuferprotein	Systemisch (S) oder lokal, organ-begrenzt (L)	Syndrom oder beteiligte Gewebe
AL	Immunglobulin Leicht-Ketten	S, L	assoziiert mit Myelom
AH	Immunglobulin Schwere-Ketten	S, L	assoziiert mit Myelom
A $\beta$ 2M	$\beta$ 2-Microglobulin	S	assoziiert mit Hämodialyse
ATTR	Transthyretin	S	Senile systemische Amyloidose
AA	(Apo)serum AA	S	AA-Amyloidose
AApoAI	Apolipoprotein AI	S L	Familiäre Form Aorta, Meniskus
AApoAII	Apolipoprotein AII	S	Familiäre Form
AApoAIV	Apolipoprotein AIV	S	Sporadisch, assoziiert mit Altern
AApoAIV	Apolipoprotein AIV	S	Sporadisch, assoziiert mit Altern
AGel	Gelsolin	S	Familiäre Form (Finnisch)
ALys	Lysozym	S	Familiäre Form
AFib	Fibrinogen $\alpha$ -Kette	S	Familiäre Form
ACys	Cystatin C	S	Familiäre Form
ABri *	ABriPP	S	Familiäre britische Demenz
ADan*	ADanPP	L	Familiäre dänische Demenz
A $\beta$	Amyloid- $\beta$ Vorläuferprotein (A $\beta$ PP)	L	Alzheimer-Krankheit, Altern
APrP	Prionprotein	L	Creutzfeldt-Jacob-Krankheit
ACal	Calcitonin-Vorläuferprotein	L	C-Zell-Schilddrüsen-Tumor
AIAPP	Insel-Amyloid-Polypeptid (auch Amylin genannt)	L	Langerhans-Inseln, Pankreas-Tumor
AANF	Atrialer natriuretischer Faktor	L	Vorhof-Amyloidose
APro	Prolaktin	L	Alternde Hypophyse, Prolaktinom
AIns	Insulin	L	Diabetes (Typ I, iatrogen)
AMed	Lactadherin	L	Mediale Aorta-Amyloidose
AKer	Kerato-Epithelin	L	Familiäre Form, Kornea
ALac	Lactoferrin	L	assoziiert mit Kornea
AOaap	odontogenetisches ameloblasten-assoziiertes Protein	L	Odontogene Tumore
ASemI	Semenogelin I	L	assoziiert mit Bläschendrüse
ATau	Tau	L	Alzheimer-Krankheit, Altern, Frontotemporale-Demenz

ADan\* und ABrit\* entstehen aus demselben Gen. Die Tabelle wurde leicht modifiziert aus {Westermarck *et al.*, 2007} übernommen.

Obwohl die Ursachen und die Entstehungsgeschichte der Amyloidosen ein so breites Spektrum aufweisen, sind die Zusammensetzung und der Aufbau des abgelagerten amyloiden Materials sehr ähnlich. Die Kriterien zur Unterscheidung von Amyloid zu nicht-amyloiden Ablagerungen wurden auf der „Internationalen Tagung zur Nomenklatur der Amyloidosen“ zuletzt im Jahre 2007 neu definiert {Westermarck *et al.*, 2007}. Die fibrilläre Ultrastruktur der Ablagerungen, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen ist, wird durch die Protein-Fibrillen erzeugt, welche den Hauptbestandteil amyloider Ablagerungen bilden. Diese Amyloid-Fibrillen kommen in unterschiedlicher Länge vor und haben einen Durchmesser von etwa 10 nm. Das typische Beugungsmuster amyloider Proben in der Röntgenkristallographie ist ebenfalls durch die Amyloid-Fibrillen begründet (siehe auch Abschnitt 3.4). Der Standard-Nachweis von Amyloid in der Pathohistologie ist die Färbung mit KR, einem Farbstoff der an die Amyloid-Fibrillen bindet und dann unter polarisiertem Licht eine typische apfelgrüne Doppelbrechung zeigt {Puchtler *et al.*, 1962}. In Bild 3.1 ist ein solcher Amyloid-Nachweis durch Kongorot-Färbung (KR-Färbung) zu sehen.

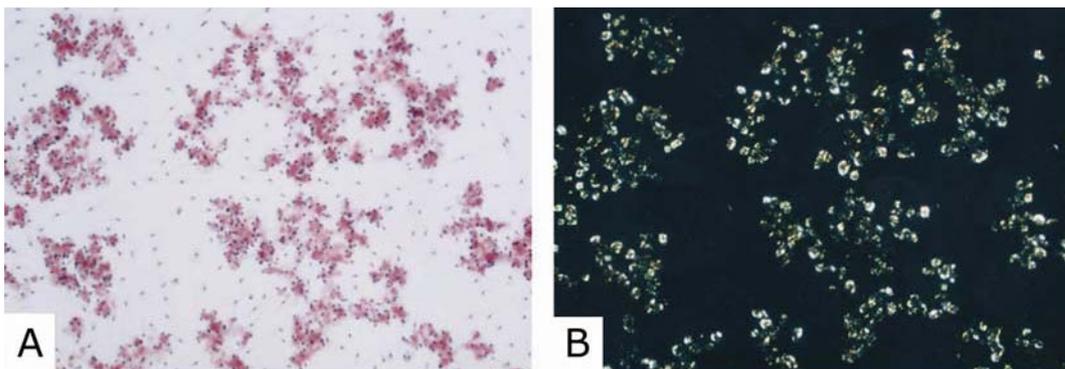


Bild 3.1: Amyloid-Nachweis durch KR-Färbung

KR-Färbung adherenter muriner Peritoneal-Zellen, die mit rekombinatem SAA und dem amyloid-verstärkenden Faktor (AEF) inkubiert wurden. Die Polarisations-Mikroskop-Aufnahmen zeigen das gebildete Amyloid im Hellfeld (A) und im Dunkelfeld mit typischer grüner Doppelbrechung (B) bei 3.200-facher Vergrößerung. Die Aufnahmen stammen aus {Kluve-Beckerman *et al.*, 1999}.

In den Amyloid-Ablagerungen finden sich neben den Protein-Fibrillen weitere assoziierte Komponenten. Die Assoziation von Glykosaminoglykanen, Apolipoprotein E und der Serum-Amyloid-P-Komponente mit den Amyloid-Fibrillen stellt ein weiteres Kriterium zur Amyloid-Identifikation dar (siehe auch folgender Abschnitt).

## 3.2 Sekundäre Komponenten amyloider Plaques

Amyloid-Ablagerungen aus verschiedenen Geweben und Amyloidosen enthalten neben den Amyloid-Fibrillen noch eine Anzahl weiterer assoziierter Komponenten. Der amyloide Kern ist der Hauptbestandteil der Ablagerungen und wird jeweils durch das krankheitsspezifische Peptid oder Protein gebildet. Die sogenannten Sekundäre Komponenten sind mit den Amyloid-Fibrillen assoziiert und bilden in ihrer Zusammensetzung ein wiederkehrendes Muster in den unterschiedlichen Amyloidosen {Kisilevsky, 2000; Armstrong *et al.*, 2008; Westermarck *et al.*, 2007}. Unabhängig ihrer Organ- oder Gewebeherkunft finden sich in den amyloiden Ablagerungen Proteoglycane (Heparinsulfate und Chondroitinsulfate), SAP, Laminin, Kollagen IV und ApoE {Kisilevsky, 2000}. Desweiteren konnte durch den Vergleich von Gewebeproben aus verschiedenen Amyloidosen, eine Gruppe von Lipiden (Cholesterol, Sphingomyelin) identifiziert werden, die ebenfalls als Nebenkompente beschrieben wurde {Gellermann *et al.*, 2005}. Die sogenannten *lipid rafts* („Lipid-Flöße“) sind Mikrodomänen der Plasmamembran mit einem hohen Anteil an Cholesterol und Sphingomyelin {Cinek und Horejsi, 1992}, die aufgrund des molekularen Aufbaus der Lipide relativ dicht gepackt sind {Simons und Ikonen, 1997}. Eine mögliche Rolle der Raft-Lipide an der Amyloid-Bildung wurde für ein Zellkultur-Modell in unserer Gruppe beschrieben {Gellermann *et al.*, 2006}.

Die Nebenkompenten scheinen aber nicht nur gemeinsam mit dem amyloiden Material abgelagert zu werden, sondern könnten zudem einen Einfluss auf deren Entstehung haben. Maus-Modelle mit einem *knock out* für die Gene von ApoE und SAP zeigten bei Induktion einer AA-Amyloidose eine verzögerte Amyloid-Bildung {Kisilevsky, 2000}.

Auch das Heparan-Sulfat-Proteoglycan (HSPG) scheint an der Genese von Amyloid beteiligt zu sein {Snow *et al.*, 1987}. Für HSPG konnten Bindungsstellen für verschiedene Amyloid-Polypeptidketten oder deren Vorläuferproteine identifiziert werden {Kisilevsky, 2000}. Durch diese stabilisierende Wechselwirkung verzögert es den Abbau von A $\beta$ -Amyloid, was *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte {Gupta-Bansal *et al.*, 1995; Snow *et al.*, 1994}. HSPG gehört zusammen mit den unverzweigten Polysacchariden Heparan-Sulfat, Chondroitin-Sulfat, Dermatan-Sulfat und Hyaluronsäure zu der Gruppe der Glykosaminoglycane.

### 3.3 Alzheimer-Krankheit

Im Jahre 1906 beschrieb der deutsche Psychiater Alois Alzheimer zum ersten Mal die nach ihm benannte Alzheimer-Krankheit. Bei der Autopsie des Gehirns einer 56-jährigen Patientin entdeckte er im Gewebe massive Ablagerungen, die er als „senile Plaques“ und „neurofibrilläres Gewirr“ bezeichnete {Alzheimer, 1906; 1907}. Auch heute noch ist eine sichere Diagnostik erst *post mortem* möglich {Dickson, 1997} und orientiert sich an eben diesen Alzheimer-Plaques und Neurofibrillären Bündeln (NFT, *neurofibrillar tangles*).

Hundert Jahre nach der Erstbeschreibung waren weltweit 29 Millionen Menschen von der Alzheimer-Krankheit betroffen und Prognosen des Instituts für Biostatistik (Boston, USA) zufolge wird sich die Häufigkeit der Erkrankung bis 2050 noch vervierfachen {Brookmeyer *et al.*, 2007}. Dazu trägt im Wesentlichen die steigende Lebenserwartung in vielen westlichen Ländern bei, denn der größte Risikofaktor für eine Erkrankung an Alzheimer ist ein hohes Alter. In den häufigsten Fällen (90 %) tritt die Krankheit sporadisch auf, seltener sind familiäre Formen, die dann z.T. schon in jüngeren Jahren in Erscheinung treten können {Caughey und Lansbury, 2003}.

#### *Pathologie der Alzheimer-Krankheit*

Die Alzheimer-Krankheit lässt sich bereits makroskopisch an *post mortem* entnommenen Gehirnen erkennen. Wie in Bild 3.2 zu sehen ist, hat das Alzheimer-Gehirn (rechts) ein kleineres Volumen und die Gyri (Gehirnwindungen) sind gegenüber einem gesunden Gehirn (links) weniger ausgeprägt. Auch im lebenden Gehirn finden sich Unterschiede zwischen einem Gesunden und einem Alzheimer-Patienten, wie die im unteren Bildabschnitt dargestellten Positronen-Emissions-Tomographie-Aufnahmen mit radioaktiv markierter Glucose zeigen. Die metabolische Aktivität ist im Gehirn des Alzheimer-Patienten in der vorderen und seitlichen Region deutlich vermindert {Mattson, 2004}. Das Stammhirn verliert neuronale Kontakte und die graue Substanz nimmt ab. Besonders betroffen sind davon der Hippocampus, die Temporallappen und der Frontallappen des Großhirns {Mattson, 2004}. Diese Regionen sind wesentlich an der Erinnerungs-Fähigkeit und an Lernprozessen beteiligt.

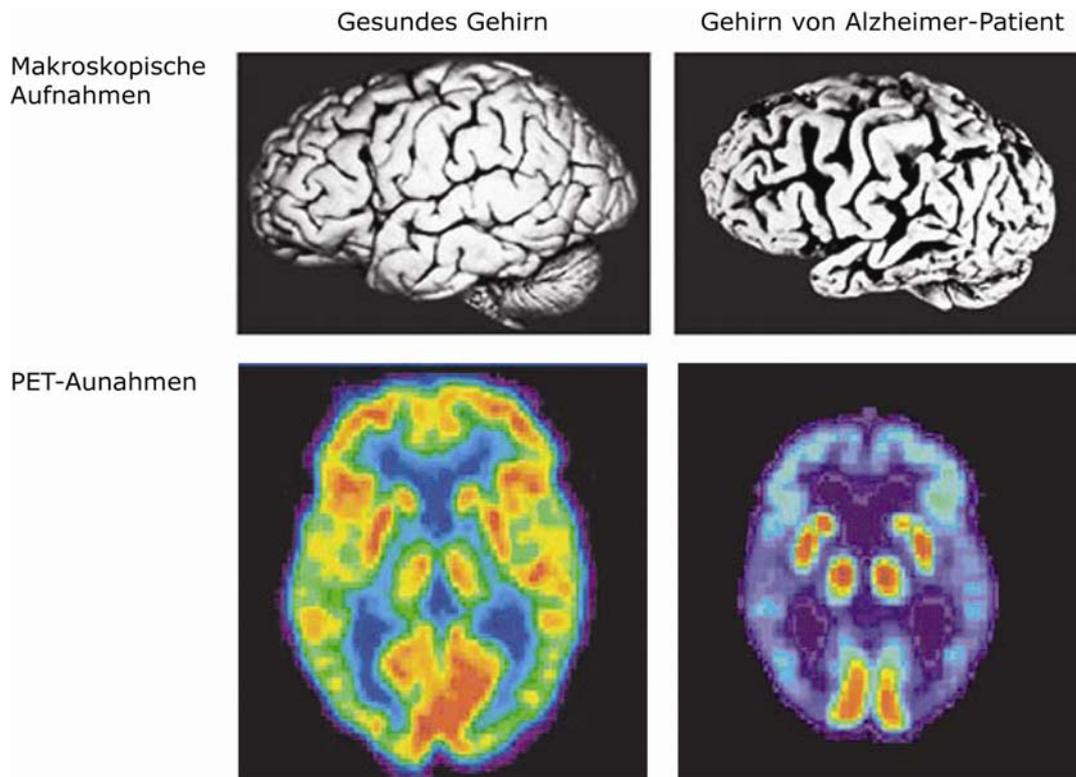


Bild 3.2: Gehirn eines Alzheimer-Patienten und eines gesunden Menschen im Vergleich  
 Die makroskopischen Aufnahmen zeigen die deutlich verringerte Hirnmass des Alzheimer-Patienten gegenüber dem Gesunden. Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nach Gabe radioaktiv markierter Glucose zeigt die Glucose-Aufnahme in lebenden Menschen (rot und gelb zeigen hohe Glucose-Aufnahme an). Der gesunde Mensch zeigt einen hohen Energie-Metabolismus in der vorderen Region (Frontallappen) und den seitlichen Regionen (Temporallappen) des Gehirns, die beim Alzheimer-Patienten wenig aktiv sind und kaum Glucose aufnehmen.  
 Aus {Mattson, 2004}

Mikroskopische Untersuchungen des Alzheimer-Gehirns offenbaren die für Amyloidosen typischen extrazellulären Ablagerungen, die Alzheimer-Plaques, welche sich aus  $A\beta$ -Fibrillen zusammensetzen. Intrazellulär finden sich gepaarte helikale Tau-Filamente (PHF, *paired helical filaments*) welche aus dem hyperphosphorylierten Protein Tau entstehen. {Crowther und Goedert, 2000}. Das mikrotubuli-assoziierte Tau Protein dient im physiologischen Kontext der Stabilisation des Zytoskeletts durch die Interaktion mit Mikrotubuli und wurde 1986 als Bestandteil der NFT identifiziert {Grundke-Iqbal *et al.*, 1986}.

### *Molekularbiologischer Hintergrund*

Das in den senilen Plaques aggregierte A $\beta$ -Peptid entsteht durch proteolytische Spaltung aus dem A $\beta$ -Amyloid-Vorläuferprotein (A $\beta$ PP, *amyloid precursor protein*). A $\beta$ PP ist ein integrales Membranprotein, welches hauptsächlich in Neuronen expremiert wird {Jung *et al.*, 1996}. Seine physiologische Funktion konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden. Allerdings weisen erste Untersuchungs-Ergebnisse auf eine Rolle in der embryonalen Entwicklung hin {Zheng und Koo, 2006} und auch die neuronale Plastizität der Synapsen ist von A $\beta$ PP abhängig {Priller *et al.*, 2006}. Die Bedeutung des A $\beta$ -Peptids, das auch bei gesunden Menschen im Blutplasma und der zerebrospinalen Flüssigkeit vorkommt {Haass *et al.*, 1992}, wird noch diskutiert.

In der Membran verankert sind Sekretasen, die das A $\beta$ PP prozessieren, wobei das aus 700 Aminosäuren bestehende Transmembranprotein zuerst von der  $\beta$ -Sekretase geschnitten wird. Aus dem in der Membran verbleibenden Teil geht dann das A $\beta$ -Peptid hervor, wenn nachfolgend die  $\gamma$ -Sekretase-Komplex schneidet. Auf Grund von drei möglichen Schnittstellen für den Enzym-Komplex entstehen A $\beta$ -Peptide variabler Länge (A $\beta$ (1-38), A $\beta$ (1-40) und A $\beta$ (1-42)) die in den extrazellulären Raum entlassen werden {Haass und Selkoe, 2007}. Die Alzheimer-Plaques bestehen hauptsächlich aus dem A $\beta$ (1-40)-Peptid {Mori *et al.*, 1992}, wobei es in familiären Fällen von Alzheimer zu erhöhten A $\beta$ (1-42)-Konzentrationen kommen kann {Lemere *et al.*, 1996}. Das A $\beta$ (1-42)-Peptid besitzt zudem eine höhere Aggregations-Wahrscheinlichkeit *in vitro* als das kürzere A $\beta$ (1-40) {Jarrett *et al.*, 1993}.

Der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex besteht aus 5 Komponenten und enthält unter anderem Presinilin 1 und 2 {Kaether *et al.*, 2006}. Mutationen in den Presinilin-Genen werden in familiären Formen der Alzheimer-Krankheit gefunden, die zwar relativ selten sind {Mattson, 2004}, aber bereits im Alter zwischen 30 und 50 Jahren auftreten können. Bei Patienten mit Down-Syndrom ist das Chromosom 21, auf welchem das Gen für A $\beta$ PP {Kang *et al.*, 1987} lokalisiert ist, dreifach vorhanden und sie erkranken ebenfalls relativ früh an Alzheimer. Allerdings ist die sporadische Form der Alzheimer-Krankheit wesentlich häufiger {Caughey und Lansbury, 2003} und ihre Ursachen deutlich komplexer, da sie nicht auf einen einzelnen Gen-Defekt beruhen. Bisher wurden neben dem Risikofaktor des hohen Alters einige weitere Faktoren beschrieben, die eine Alzheimer-Erkrankung begünstigen könnten. Dazu zählen eine bewegungsarme Lebensführung, erlittene Schädel-Hirn-Traumata, ein geringes Bildungsniveau und eine energiereiche, fettreiche Ernährung {Mattson, 2004}. Aber auch genetische Prädispositionen können die Entstehung der sporadischen Formen der Alzheimer-Krankheit begünstigen, wie z.B. die E4-Allele des Apolipoproteins E {Roses, 1996}, die zu einer vermehrten A $\beta$ -Ablagerung {Holtzman *et al.*, 2000} führt.

### *Die Amyloid-Hypothese*

Auf der Suche nach den Ursachen der Alzheimer-Krankheit wurde eine Hypothese aufgestellt, die einen kausalen Zusammenhang zwischen den Plaques und den NFT auf der einen Seite sowie den massiven Verlust von Neuronen {West *et al.*, 1994} und die neuropsychologischen Veränderungen {Katzman *et al.*, 1988} auf der anderen Seite erklären sollte. Die Forscher Haass und Selkoe {Selkoe, 1991; Hardy und Selkoe, 2002} trafen zunächst drei grundsätzliche Voraussagen. Erstens sollte die Ursache der Alzheimer-Krankheit in Beziehung zur Produktion und Abbau von A $\beta$ -Amyloid stehen. Zweitens würde A $\beta$ -Amyloid (oder A $\beta$ -Peptide) toxisch sein. Daraus folgte die dritte Aussage, dass A $\beta$ -Amyloid einen Einfluss auf die Entstehung der NFT haben sollte.

Die Entdeckung der Presinilin-Gene und deren direkter Einfluss auf die Amyloid-Bildung bestätigte die Bedeutung des A $\beta$ -Peptids für die Entstehung der Krankheit {De Strooper *et al.*, 1999}. Auch wurden A $\beta$ -Aggregate identifiziert, die mit sterbenden Neuronen assoziiert waren {Finder und Glockshuber, 2007}. Für das A $\beta$ -Peptid sind in den letzten Jahren verschiedene Theorien zur Toxizität diskutiert worden {Eisenhauer, 2000}. Obwohl zytotoxische Auswirkungen von Amyloid-Fibrillen auf neuronale Zellen gezeigt werden konnten {Irie *et al.*, 2005; Petkova *et al.*, 2005}, weisen vermehrt Studien auf die größere Bedeutung der nicht-fibrillären A $\beta$ -Aggregate hin. Für die löslichen Oligomere, die eine Vorstufe der Amyloid-Fibrillen darstellen, wurden neurotoxische Einflüsse beschrieben {Chimon *et al.*, 2007; Kaye *et al.*, 2003; Klein, 2002}. Als mögliche Mechanismen sind dabei vor allem membran-zerstörende Eigenschaften beschrieben worden {Lashuel *et al.*, 2002}. Obwohl viele Untersuchungen die Beteiligung des A $\beta$ -Peptids an der Neuro-Pathologie der Alzheimer-Krankheit belegen, konnte der Zusammenhang zwischen den NFT und dem A $\beta$ -Peptid noch nicht hinreichend aufgeklärt werden. Unklar ist weiterhin, wie die beiden Proteine (A $\beta$  und Tau) in ihrer neurotoxischen Wirkung voneinander abhängen {Roberson und Mucke, 2006; Rapoport *et al.*, 2002; Hardy, 2009}.

### *Therapieansätze*

Eine wesentliche Motivation der Amyloid-Hypothese war die Fokussierung auf ein gemeinsames Thema, welche es den unterschiedlichsten Ansätzen auf dem Gebiet der Alzheimer-Forschung erleichtern sollte, fundierte Therapien zu entwickeln {Hardy, 2009}. Bis heute ist es dennoch nicht gelungen, Therapien zu entwickeln, die in der Lage wären, die Alzheimer-Krankheit zu heilen oder deren Verlauf wesentlich zu erleichtern. Einige vielversprechende Ansätze werden in klinischen Studien untersucht und verfolgt sowohl immuntherapeutische Maßnahmen als auch die Verwendung von Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretase. Mit der passiven oder der aktiven Immunisierung {Schenk *et al.*, 1999; Mattson, 2004; Wolfe, 2006} sollten ebenfalls toxische A $\beta$ -Aggregate entfernt werden und es gibt erste Hinweise, dass es möglich ist, die Anzahl der bereits bestehenden Amyloid-Plaques zu verringern {Patton *et al.*, 2006}.

Die Verwendung eines Inhibitors der  $\gamma$ -Sekretase (Tarenflurbil) {Wilcock *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2009} sollte die Produktion von A $\beta$ (1-42)Peptid verringern. Bisher konnten Studien mit diesem Modulator jedoch keine Verbesserungen erzielen {Hardy, 2009}. Weitere therapeutische Ansätze verfolgen den Einsatz entzündungs-hemmender Substanzen, Cholesteroll-reduzierende Medikamente, Metall-Chelatoren oder eine zellbasierte Therapie {Hardy und Selkoe, 2002; Mattson, 2004; Wolfe, 2006}. Auch der gezielte Abbau von amyloiden Ablagerungen oder die Prävention der Fibrillenbildung wurde angestrebt {Wolfe, 2006; Wolfe, 2002}. Da diese Therapien aber vermehrt lösliche und vermutlich toxische A $\beta$ -Formen freisetzen würden {Kirkkitadze *et al.*, 2002}, ist der Nutzen dieser Methode fraglich.

## **3.4 Amyloid-Fibrillen**

Allen Amyloid-Fibrillen ist ein Merkmal der Quartär-Struktur gemeinsam, unabhängig von der Aminosäure-Sequenz der zugrundeliegenden Polypeptide {Sunde und Blake, 1998}. Amyloid-Fibrillen besitzen eine sogenannte Kreuz- $\beta$ -Struktur, welche durch die spezielle Anordnung der  $\beta$ -Faltblätter um die Längsachse der Fibrille charakterisiert ist. Die Untersuchung von Amyloid-Fibrillen mit der Röntgenkristallographie offenbart ein bestimmtes Muster der Reflexionen {Glenner *et al.*, 1968; Sachse *et al.*, 2008}. Dieses Muster wird durch die Kreuz- $\beta$ -Struktur hervorgerufen und ist so charakteristisch für Amyloid-Fibrillen, dass sie ein Teil der Amyloid-Definition ist {Westermarck *et al.*, 2005}. Das Röntgen-Beugungsmuster zeigt Reflexionen in der äquatorialen Ebene bei

4.8 Å und meridionale Reflexionen von etwa 10 bis 11 Å, welche durch die molekularen Abstände der regelmäßig angeordneten Strukturelemente der Fibrille hervorgerufen werden. Die  $\beta$ -Faltblätter sind dabei quer zur Fibrillen-Achse angeordnet. Über die Orientierung der  $\beta$ -Faltblätter zueinander, also ob sie parallel, antiparallel oder gemischt angeordnet sind, wird noch diskutiert {Fändrich, 2007; Sunde und Blake, 1998}. Auf Grund von Analysen der Röntgenbeugungsmuster wird eine parallele Anordnung der  $\beta$ -Faltblätter angenommen {Sunde und Blake, 1998}. Infrarotdaten sprechen dagegen für eine antiparallele Anordnung {Fink, 1998}.

Spezifische Farbstoffen können an diese besondere Struktur der Amyloid-Fibrillen binden {Wu *et al.*, 2007} und so werden KR {Puchtler *et al.*, 1962} und Thioflavin-Farbstoffe {LeVine, 1993; Townsend *et al.*, 1987} als Nachweise für Amyloid-Fibrillen in Diagnostik und Forschung eingesetzt. Für den Fluoreszenz-Farbstoff Thioflavin T (ThT) ist hier die Strukturformel dargestellt. Bindet dieses Molekül an Amyloid-Fibrillen, kommt es zur Verstärkung der Fluoreszenz-Intensität bei einer Wellenlänge von 482 nm {LeVine, 1993}. Eine Interaktion mit Monomeren führt aber zu keinem solchen Signal, weshalb sich dieser Farbstoff für die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Fibrillenbildung etabliert hat.

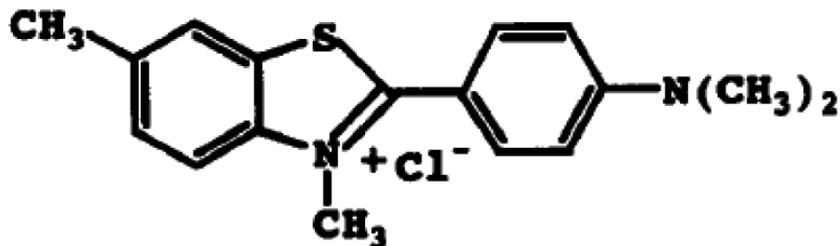


Bild 3.3: Strukturformel von Thioflavin T

Eine Amyloid-Fibrille besteht aus vielen Molekülen einer Polypeptidkette. In den Alzheimer-Fibrillen bilden die A $\beta$ -Peptide die kleinste Einheit. Diese monomeren A $\beta$ -Peptide können sich zu metastabilen Vorstufen von Fibrillen assoziieren, wie das Schema in Bild 3.4.A darstellt. Protofibrillen, die sich in *Atomic-Force*-Mikroskopie-Aufnahmen als kurze, wurmartige Fäden darstellen {Caughey und Lansbury, 2003}, bilden eine Vorstufe zu den reifen, längeren Fibrillen.

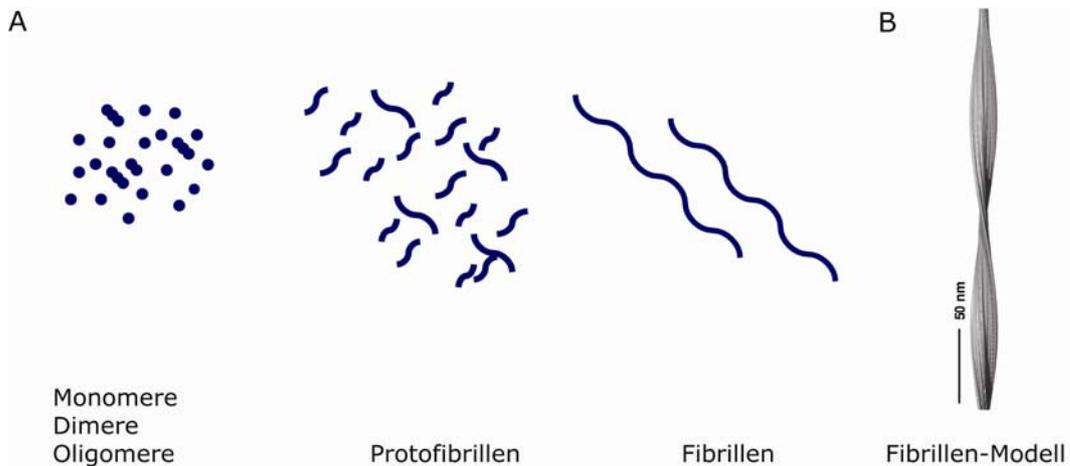


Bild 3.4: Schematische Darstellung der Amyloid-Fibrille und ihrer Vorstufen.

(A) Schematische Darstellung der möglichen Vorstufen in der Entstehung von Amyloid-Fibrillen. Aus dem monomeren A $\beta$ -Peptid bilden sich zunächst lösliche Oligomere. Größere Aggregate werden als Protofibrillen bezeichnet, sind wurmartig und kürzer als reife Fibrillen (B) Das Fibrillen-Modell zeigt eine 3-D-Rekonstruktion einer A $\beta$ -Fibrille aus Kryo-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen. Das Bild stammt aus {Sachse *et al.*, 2008}.

Das Bild 3.4.B zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion einer A-Fibrille aus Kryo-Elektronenmikroskopie-Aufnahmen {Sachse *et al.*, 2008}. Eine Fibrille ist aus Protofilamenten aufgebaut, die sich umeinander winden, wobei die  $\beta$ -Faltblätter quer zur Fibrillen-Achse gepackt sind. Eine Fibrille kann aus mehreren Protofilamenten aufgebaut sein, die genaue Anzahl und die daraus resultierende Breite kann variieren {Sunde *et al.*, 1997}. In der Regel zeigen Amyloid-Fibrillen einen linkshändigen Drehsinn {Goldsbury *et al.*, 2000} und haben typischerweise eine Breite von 8 bis 13 nm. Es gibt aber bei der Analyse von Insulin-Fibrillen Hinweise auf einen rechtshändigen Drehsinn {Jansen *et al.*, 2005}.

Amyloid-Fibrillen weisen eine hohe Stabilität und chemische Resistenz auf {Kayed *et al.*, 2003; Kheterpal *et al.*, 2001; Kheterpal *et al.*, 2000}. Ihre Resistenz gegenüber SDS findet Anwendung in dem Amyloid-Nachweis durch den Filter-Retentions-Assay {Wanker *et al.*, 1999}, der es auch ermöglicht *in vivo* oder in Zellkultur gebildete Amyloid-Fibrillen zu quantifizieren (siehe auch Abschnitt 5.3.4).

## 3.5 Mechanismus der Bildung von Amyloid-Fibrillen

### 3.5.1 Kinetik der Bildung von Amyloid-Fibrillen *in vitro*

A $\beta$ -Amyloid-Fibrillen werden aus A $\beta$ -Monomeren gebildet, die sich aneinander lagern. Dieser Polymerisation-Prozess stellt eine zweiphasige Reaktion dar, die aus einer Lag-Phase und der darauffolgenden Wachstums-Phase besteht {Wetzel, 2006}. Die Bildung eines Nukleus aus Monomeren in der Lag-Phase ist der initiale Schritt der Fibrillenbildung und kann nur oberhalb der sogenannten kritischen Konzentration erfolgen. Sie beschreibt die maximale Löslichkeit einer Polypeptidkette im thermodynamischen Gleichgewicht mit der Fibrillenbildung {O'Nuallain *et al.*, 2005}. Erst oberhalb der kritischen Konzentration findet Aggregation statt, wobei die Konzentration der Monomere in der Lösung dabei gleich der kritischen Konzentration bleibt. Das bedeutet umgekehrt, dass bereits gebildete Fibrillen, die sich in einer Lösung unterhalb der kritischen Konzentration befinden, dissoziieren {Harper und Lansbury, 1997}. Mit der Anwesenheit eines stabilen Nukleationskeims, an den sich weitere Monomere anlagern, beginnt die Wachstums-Phase der Aggregation. Diese ist durch ein exponentielles Wachstum von Fibrillen gekennzeichnet, welche schließlich als lange Polymere vorliegen. In der entstehenden Fibrillen-Lösung befinden sich die Fibrillen in einem Reaktions-Gleichgewicht mit den Monomeren, die in der kritischen Konzentration vorliegen {O'Nuallain *et al.*, 2005; Lomakin *et al.*, 1997}.

Durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes ThT, welcher spezifisch an Amyloid-Fibrillen bindet, kann eine solche Reaktion zeitlich dokumentiert und als Aggregations-Kinetik dargestellt werden (siehe Abschnitt 3.4 und 5.3.9). Ähnliche Kinetiken können auch erstellt werden, indem die Bindung von KR mit den entstehenden Fibrillen verfolgt wird. Die Bindung von KR an Fibrillen führt zu einer Rechts-Verschiebung des Absorptions-Maximums und einer Zunahme der Absorptions-Intensität, die in einem aufgenommenen Spektrum von 400 bis 700 nm (UV-VIS-Spektrophotometer) dokumentiert wird {Klunk *et al.*, 1989}.

### 3.5.2 Modulatoren der Aggregations-Kinetik

Die Aggregation von Fibrillen wird von Faktoren beeinflusst, die in der aggregierenden Polypeptidkette selbst begründet liegen (intrinsische Faktoren) oder von äußeren Gegebenheiten abhängen (externe Faktoren). Beide Arten von Einflüssen können sich auf die Dauer der Lag-Zeit auswirken sowie auf die Wachstumsrate der Fibrillen.

#### Intrinsische Faktoren

Die Varianz in der Aminosäure-Sequenz von Polypeptidketten kann eine sehr große Auswirkung auf die Aggregation haben {Christopeit *et al.*, 2005; Peim *et al.*, 2006; Lopez De La Paz *et al.*, 2002}. So ist hatte der Austausch der 18. Aminosäure Valin gegen Prolin bei dem A $\beta$ (1-40)-Peptid eine drastische Reduktion ihrer Fähigkeit zur Aggregation *in vitro* zur Folge {Peim, *et al.* 2006}. Ein weiterer Faktor ist die konformationelle Stabilität des nativen Proteins, wie in Versuchen mit Azyolphosphatase gezeigt werden konnte {Chiti *et al.*, 2002; Chiti *et al.*, 2000}. Auch die Anordnung von polaren und unpolaren Aminosäuren kann die Aggregation beeinflussen. Alternierende binäre Muster der Aminosäuren, wie sie in Amyloid-Fibrillen zu finden sind, begünstigen die Aggregation {Broome und Hecht, 2000}.

#### Externe Faktoren

Die Aggregation von Fibrillen ist außer von den Eigenschaften, die durch die Aminosäuresequenz bestimmt werden, auch von der Interaktion mit den meisten Faktoren der Umgebung abhängig. Die Auswirkungen der Peptid-Konzentration, dem pH-Wert und der Ionenstärke wurden für die Aggregation von Insulin untersucht. Ein saurer pH-Wert besitzt gegenüber einem neutralen pH-Wert einen aggregationsfördernde Einfluss {Nielsen *et al.*, 2001}. Eine denaturierende Umgebung, wie sie in Anwesenheit von Harnstoff besteht, führte zu einer Abnahme der Lag-Zeit für die Aggregation von Insulin {Nielsen *et al.*, 2001}.

Die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein konnte durch die Anwesenheit verschiedener Polymere beschleunigt werden, die durch eine Verringerung des Ausschluss-Volumens und eine Erhöhung der Viskosität eine sogenannte beengte Umgebung schaffen (*molecular crowding*) {Munishkina *et al.*, 2004}.

Die Anwesenheit von Salzen beschleunigt die Aggregation *in vitro*, wie für das A $\beta$ -Peptid und die N-terminale Domäne des nukleären Poly(A)-Bindeprotein gezeigt wurde {Klement *et al.*, 2007; Lodderstedt *et al.*, 2008}.

Ebenso stellen alle Substanzen, die zur Analyse in einen Aggregations-Prozess eingebracht werden, weitere externe Faktoren dar. Solche *in vitro* Studien zeigten z.B. den aggregations-hemmenden Einfluss von Kurkumin {Ono *et al.*, 2004} oder Polyphenolen aus Rotwein {Ono *et al.*, 2003}. Ebenso sind Stoffe identifiziert worden, die durch ihre aggregations-fördernde Wirkung möglicherweise die Pathologie von Amyloidosen verstärken könnten, wie einige Metalle {Maynard *et al.*, 2005; Molina-Holgado *et al.*, 2007}.

Um vergleichbare Aussagen treffen zu können, die einen Einfluss auf die Aggregations-Prozesse *in vitro* betreffen, müssen in jedem Falle die intrinsischen und externen Faktoren des eingesetzten Modells berücksichtigt werden.

### 3.6 Zellen in der Plaque-Bildung

Neben den assoziierten sekundären Komponenten amyloider Plaques finden sich auch Zellen in engem räumlichen Kontakt der Ablagerungen. Für die Entstehung der Alzheimer-Plaques wird eine mögliche Beteiligung von Gliazellen (Astrozyten, Oendrozyten und Mikroglia), Neuronen oder auch glatten Muskelzellen diskutiert {Wisniewski und Wegiel 1994; Wegiel und Wisniewski, 1990; Pappolla *et al.*, 1991; Nagele *et al.*, 2004}.

Auf Grund der Prozessierung des A $\beta$ PP und der anschließenden Freisetzung von A $\beta$ -Peptiden in den extrazellulären Raum (siehe Abschnitt 3.3) sind Neuronen sehr wahrscheinlich die ersten Zellen, die in Kontakt mit A $\beta$ -Peptiden oder Aggregaten kommen. Eine räumliche Nähe der Nervenzellen mit diffusen Plaques (die vermutlich frühe Stadien der Plaque-Bildung darstellen) bestärkt diese Überlegung {Pappolla *et al.*, 1991}. Eine Beteiligung der glatten Muskelzellen an der Produktion von A $\beta$ -Amyloid wurde aber auch in Aterien und Ateriolen von Alzheimer-Patienten im Gehirn nachgewiesen {Wisniewski und Wegiel, 1994}. Allerdings belegten neuere Untersuchungen in einem Maus-Modell der Alzheimer-Plaque-Bildung zwar die räumliche Nähe zwischen den Ablagerungen und den Gefäßen, jedoch keine unmittelbare Beteiligung dieser Zellen {Meyer-Luehmann *et al.*, 2008}.

Insbesondere die Mikroglia, die Makrophagen des Gehirns, sind in Bezug auf die Alzheimer-Krankheit von Interesse. Während der embryonalen Entwicklung wandern myelotische Stammzellen in das Gehirn ein und differenzieren zu Mikroglia-Zellen. Die Aktivierung von Mikrogliazellen spielt eine wichtige Rolle im Kontext entzündlicher Prozesse in der Alzheimer-Krankheit {Cameron und Landreth, 2009; Jucker und Heppner, 2008}. Beobachtungen an lebenden Zellen konnten die Anwesenheit von Mikrogliazellen unmittelbar mit Erscheinen von A $\beta$ -Ablagerungen nachweisen {Meyer-Luehmann *et al.*, 2008}. Die Diskussion, welche Rolle Mikrogliazellen für den Abbau amyloider Plaques haben könnten, bleibt kontrovers {Jucker und Heppner, 2008}, besonders vor dem Hintergrund neuerer Daten. Sie legen nahe, dass die Fähigkeit zur Phagozytose von A $\beta$ -Fibrillen bei den Mikrogliazellen weniger ausgeprägt sei, als bei eingewanderten peripheren Makrophagen {Town *et al.*, 2008}. Die Forschergruppe um Mandrekar konnte jedoch zeigen, dass Mikrogliazellen in der Lage sind, lösliches A $\beta$ -Peptid durch Pinophagozytose aufzunehmen {Mandrekar *et al.*, 2009}.

Für periphere Makrophagen, die in der systemischen AA-Amyloidose involviert sind, konnte dagegen eine gegensätzliche Rolle mit der Degradation des SAA durch die Makrophagen gezeigt werden {Lavie *et al.*, 1978}.

### *Modelle zur Amyloid-Plaque-Bildung in der Zellkultur*

In dieser Arbeit wurde ein Zellkultur-System etabliert, welches die Entstehung amyloider Plaques aus dem A $\beta$ (1-40)-Peptid modellieren sollte. Dieses Modell basiert auf dem von der Gruppe Kluve-Beckerman 1999 vorgestellten Zellkultur-System {Kluve-Beckerman *et al.*, 1999} und auf einem adaptierten Zellkultur-Modell, das in unserer Gruppe entwickelt wurde {Gellermann *et al.*, 2005; 2006}. Die Modelle sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

#### SAA-Amyloid-Bildung durch peritoneale Makrophagen

Die verwendeten peritonealen Zellen für dieses Modell wurden aus Mäusen durch eine Peritoneal-Lavage (Spülung des Bauchfellgewebes) gewonnen. Die so gewonnenen murinen, peritonealen Makrophagen wurden adherent kultiviert. Die Zugabe des rekombinant hergestellten murinen SAA-Proteins erfolgte anschließend in das Zellkultur-Medium und wurde alle 2-3 Tage wiederholt. Es bildeten sich Amyloid-Plaques, die mit KR-Färbung nachgewiesen werden konnten (siehe auch Bild 3.1). Durch die Zugabe des amyloid-verstärkenden Faktors konnte die Plaque-Bildung beschleunigt werden.

#### SAA-Amyloid-Bildung durch primäre Makrophagen

In diesem Zellkultur-Modell wurden primäre Makrophagen aus menschlichem Blut gewonnen und ebenfalls adherent inkubiert. Einen Tag nach der Aufreinigung wurde mit der Inkubation der Zellen mit rekombinant hergestelltem SAA begonnen und nach 12 Tagen konnten Amyloid-Plaques mit KR-Färbung nachgewiesen werden. {Gellermann *et al.*, 2005}

#### A $\beta$ -Amyloid-Bildung durch primäre Makrophagen

In diesem Zellkultur-Modell wurden primäre Makrophagen aus menschlichem Blut gewonnen und ebenfalls adherent inkubiert. Einen Tag nach der Aufreinigung wurde mit der Inkubation der Zellen mit rekombinant hergestelltem A $\beta$ (1-40)-Peptid begonnen. Innerhalb einer Woche entwickelten sich auch hier in der Zellkultur Amyloid-Plaques, die mit KR-Färbung nachgewiesen wurden. Ebenso waren diese Plaques positiv für Glykosaminoglykane, ApoE und Raft-Lipide. Mit dem etablierten Zellkultur-Modell konnten ferne Inhibitoren der Amyloid-Bildung identifiziert werden. {Gellermann *et al.*, 2006}

### 3.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Einfluss den eine Umgebung auf die Aggregation von Amyloid-Fibrillen hat, setzt sich aus vielen einzelnen Parametern zusammen. In den häufig eingesetzten *in vitro* Aggregations-Kinetiken sind diese Faktoren bereits gut untersucht worden und die mögliche Beeinflussung einer Aggregation durch Druck, Temperatur, pH-Wert, Salze oder die Konzentration der Polypeptidkette {Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004; Fezoui und Teplov, 2002; Hou *et al.*, 2002; Klement *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2001} wird für den Aufbau und die Beurteilung der Experimente berücksichtigt und darüber hinaus genutzt, um Vorhersagen über die Aggregation eines Proteins zu erstellen {DuBay *et al.*, 2004}. Die Untersuchung der umgebungsabhängigen Faktoren *in vivo* ist dagegen sehr schwierig, da sich diese Faktoren kaum eingrenzen oder klar definieren lassen. Außerdem spielen bei der Alzheimer-Krankheit Prozesse eine Rolle, die erst nach Jahren zum Tragen kommen. Zellkultur-Modelle, in denen isolierte Teilprozesse der Amyloid-Bildung untersucht werden können, stellen eine Möglichkeit dar, Faktoren zu identifizieren, welche die Amyloid-Bildung beeinflussen können.

Bisherige *in vitro* Aggregations-Studien haben das Puffersystem als einen möglichen externen Faktor weder berücksichtigt, noch eine vergleichende Studie zwischen verschiedenen Puffersystemen durchgeführt. In dieser Arbeit sollte daher der mögliche Einfluss von Puffersystemen auf die Aggregation untersucht werden. Zur Analyse des Aggregationsverhalten von A $\beta$ (1-40) sind zwölf biologische Puffersysteme ausgewählt worden, in denen die A $\beta$ -Aggregation durchgeführt wurden.

Mit der Etablierung eines auf Makrophagen basierenden Zellkultur-Modells zur Amyloid-Bildung aus A $\beta$ (1-40)-Peptid sollte eine mögliche Rolle von Makrophagen in dem Prozess der A $\beta$ -Plaques-Entstehung untersucht werden. Da für ein ähnliches Zellkultur-Modell der Einfluss der Raft-Lipide für die Amyloid-Bildung gezeigt worden ist {Gellermann *et al.*, 2006}, sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob es sich bei diesem Sachverhalt um einen Mechanismus handeln könnte, der auch in einem anderen Kontext gültig ist.

## 4 Material

### 4.1 Substanzen

Standard-Chemikalien wurden in hoher Reinheit von den Firmen Sigma-Aldrich GmbH, Carl Roth AG und Merck bezogen. Die Herkunft der verwendeten Puffersubstanzen sind in Tabelle 8.1 gesondert aufgeführt. Das in dieser Arbeit verwendete A $\beta$ (1-40) und die A $\beta$ (1-40)V18P-Mutante wurden in unserer Arbeitsgruppe durch rekombinante Expression in *Escherichia coli* hergestellt. Die Aufreinigung erfolgte über Nickel-Chelat und Ionenaustausch- und Reverse-Phase-Chromatographie {Hortschansky, 2005}.

Tabelle 4.1: Verwendete Substanzen

Substanz	Herkunft
Antibiotika/Antimykotika (Penicillin, Streptomycinsulfat, Amphotericin B)	PAA Laboratories GmbH
BSA (Bovines-Serum-Albumin)	PAA Laboratories GmbH
DTT (Dithiothreitol)	Carl Roth AG
PBS ( <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> )	PAA Laboratories GmbH
ECL-Reaganz ( <i>enhanced chemoluminescence</i> ); ECL Western Blotting System	GE Healthcare Deutschland
FBS (fötales bovines Serum)	PAA Laboratories GmbH
Formvar	Agar-scientific PLANO GmbH
Hämalaun-Lösung, sauer nach Mayer	Carl Roth AG
Histokit (Eindeck-Lösung)	Carl Roth AG
LumiPhos WB (Substrat für die Chemolumineszenz)	Thermo Fisher Scientific
PMA (Phorbol-12-myristate-13-azetat)	Merck (Calbiochem)
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Protease-Inhibitor-Coctail (Complete Mini)	Roche Deutschland Holding GmbH
Proteinase K (aus <i>Tritirachium album</i> )	Carl Roth AG
<u>Zellkulturmedien</u> RPMI ( <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> ) DMEM ( <i>Dulbecco's Modifikation des Minimal Essential-Mediums</i> )	PAA Laboratories GmbH

## 4.2 Geräte

In der folgenden Tabelle sind Geräte aufgelistet, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Auf Grund des Standortwechsels von Jena nach Halle sind einige Geräte doppelt aufgeführt.

Tabelle 4.2: Verwendete Geräte

Gerät	Herkunft
Analysewaage LE 6202 S	Sartorius AG
Block-Heizgerät SBH 130D	Stuart Scientific
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heracell 150	Kendro Laboratory Products GmbH
<u>Elektronenmikroskope</u> Transmissionselektronenmikroskop EM 400 T (in Jena) Transmissionselektronenmikroskop CEM 902A (in Jena und Halle)	Philips Deutschland GmbH  Carl Zeiss AG
Flachbrett- Scanner Epson Perfection V700	Epson Deutschland GmbH
Fluoreszenz-Microplatten-Lesegerät FLUOstar Omega	BMG Labtech
<u>Fluoreszenzmikroskope</u> Axiovert 200 Apotome (in Jena) Eclipse 80i (in Halle)	Carl Zeiss AG Nikon GmbH
Gel-Dokumentation  Film-Entwicklermaschine Agfa Curix 60 (in Jena) Geldokumentationssystem CN-3000.WL /LC mit Programm ChemiCapt™ (in Halle)	Agfa Graphics Germany GmbH & Co. KG  PeqLab Biotechnologie GmbH
Geltrockner BioRAD Gel Air Dryer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Konzentrator 5301 (SpeedVac)	Eppendorf AG
Lichtmikroskop CKX 41	Olympus Europa GmbH
pH-Elektrode InLab 422	Thermo Fisher Scientific
pH-Meter SevenEasy pH S20-K	Mettler-Toledo GmbH
<u>Polarisationsmikroskope</u> Leitz DM-RXE (in Jena) Eclipse 80i (in Halle)	Leica Mikrosysteme GmbH Nikon GmbH
Präzisionswaage LA 120 S	Sartorius AG
Reinstwasser-Anlage MilliQ, Advantage A10	Millipore GmbH
Schüttler MTS-4 (auch für 96-Loch-Platten)	IKA® -Werke

Gerät	Herkunft
Spannungsgeber BioRAD Power Pac HV	Bio-Rad Laboratories GmbH
Tensiometer K8	Krüss Optronic GmbH
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf AG
Tischzentrifuge Rotina R38 mit Rotor 1798 (für Reaktionsgefäße à 15 und 50 ml) und Rotor 1760 (für Zellkultur-Microplatten)	Hettich AG
Trockenschrank Hereaus 6000	Kendro Laboratory Products GmbH
Ultraschall-Gerät Sonorex digital 10P	Bandelin electronics GmbH
Ultrazentrifuge Beckman L-80 mit Rotor SW41Ti	Beckman Coulter GmbH
Ultrazentrifuge Beckman TLX UZ-120 mit Rotor TLA 120.2	Beckman Coulter GmbH
UV/VIS-Spektrometer Helios $\gamma$	Helios AG
Vakuum-Dot-Blot-System Minifold I mit den Aufsätzen: - Dot-Blot (12,5 mm <sup>2</sup> , 96-Loch, rund) - Slot-Blot (2 mm <sup>2</sup> , 96-Loch, rechteckig)	Schleicher & Schuell GmbH
Wasserbad GFL 1008 (20 L)	Gesellschaft für Labortechnik GmbH

### 4.3 Assays und Protein-Marker

In dieser Arbeit wurde der Assay zur Zytotoxizitäts-Bestimmung (Abschnitt 5.1.4) kommerziell erworben. Die hier aufgeführten Protein-Marker wurden in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt (Abschnitt 5.3.2).

Tabelle 4.3: Assays und Größenstandards

Bezeichnung	Herkunft
LDH-Zytotoxizitäts-Assay Kit II (Laktatdehydrogenase-Assay)	BIOVISION Biomaterial GmbH
Protein-Marker M12 für SDS-PAGE	Invitrogen GmbH
Protein-Marker SeeBlue für SDS-PAGE	Invitrogen GmbH

## 4.4 Materialien

In dieser Tabelle sind Materialien aufgeführt, die in der Arbeit eingesetzt wurden.

Tabelle 4.4: Verwendete Materialien

Material	Herkunft
Celluloseacetatmembran, Porengröße 0,2 µm	Schleicher & Schuell GmbH
Deckgläser und Objektträger	Carl Roth AG
Dispo-Dialyser/Flotalizer (500 Da MWCO)	Spectrum Europe B.V.
Filterpapier (3 mm dick)	Schleicher & Schuell GmbH
Haftetiketten Herma 2490	Herma GmbH
Kanüle, 26 x G	Braun Melsungen AG
Kupfer-Probeplättchen (quadratisch, 200 Loch)	Agar-scientific PLANO GmbH
Microplatte, 96-Loch, schwarz, steril, µClear, Polystyrol	Greiner-Bio-One International AG
Neubauer Zählkammer	Carl Roth AG
Nitrocellulosemembran, Hybond ECL, Porengröße 0,45 µm	GE Healthcare Deutschland
Parafilm	Thermo Fisher Scientific
<u>Plastikwaren für die Zellkultur:</u> Zellkulturflasche, steril (à 25, 50 oder 75 ml) Zellkultur-Microplatte, steril, klar (6, 24 oder 96 Löcher) Serologiesche Pipette, steril (1, 2, 5, 10 oder 25 ml Volumen)	Greiner-Bio-One International AG
Quarzglas-Küvette (10 mm Schichtdicke)	Hellma GmbH
Röntgenfilme Kodak BioMax Light Film	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rotilabo®-Abdeckfolie für Mikrottestplatten, Polyester (Stärke 50 µm)	Carl Roth AG
SDS-Gele (Gradienten-Gel 4-16%)	Invitrogen GmbH
Ultrazentrifugationsgefäße (Ultraclear, 10 ml und 1 ml)	Beckman Coulter GmbH
Vortex-Genie®2	Scientific Industries Inc. (USA)
Zellophan-Folie (Cellophane Support)	Bio-Rad Laboratories GmbH

## 4.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 4.5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Anwendung	Zusammensetzung
Alcianblau-Färbelösung	Glykosaminoglykan-Färbung	1 % (w/v) Alcianblau in 3%iger Essigsäure
Blockierungs-Lösung	Filter-Retentions-Assay	2 % BSA in TBS-T
Commassieblau-Lösung	SDS-Gel	30 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,25 % (w/v) Commassie Brilliantblau R-250
Entfärber-Lösung	SDS-Gel	70 % Ethanol 10 % Essigsäure
Equilibrierungs-Lösung	Filter-Retentions-Assay	0,1 % (w/v) SDS
Formvar-Lösung	EM-Probeplättchen	0,3 % Formvar in Chloroform
Guanidinium-Lösung	Protein-Konzentrations-Bestimmung	7,5 M Guanidinium-Hydrochlorid, 25 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6,5
Kongorot-Lösung	Kongorot-Färbung	80 % (v/v) Ethanol 3 % (w/v) NaCl 0,6 % (w/v) Kongorot (gesättigte Lösung)
Kupfersulfat-Färbelösung	Dünnschicht-Chromatographie	0,075 % (w/v) CuSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O in 85%iger Phosphorsäure
Laufmittel 1 (LM1)	Dünnschicht-Chromatographie	26,6 % (v/v) Essigsäure-ethylester 26,6 % (v/v) 1-Propanol 26,6 % (v/v) Chloroform 10,6 % (v/v) Methanol 0,024 % (w/v) KCl
Laufmittel 2 (LM2)	Dünnschicht-Chromatographie	75 % (v/v) n-Hexan 23 % (v/v) Diethylether 2 % (v/v) Essigsäure

Bezeichnung	Anwendung	Zusammensetzung
Laufmittel 3 (LM3)	Dünnschicht-Chromatographie	100 % n-Hexan
Lysis-Puffer	Filter-Retentions-Assay	50 mM Tris-HCl pH 8,8 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 0,5 % (v/v) NP-40 5 mg/ml Protease-Inhibitor-Coctail
MBS-Puffer	Lipid-Raft-Aufreinigung	25 mM MES, pH 6,5 150 mM NaCl
MBS-T-Puffer	Lipid-Raft-Aufreinigung	1 % (v/v) Triton-X100 in MBS-Puffer
Ölrot-Färbelösung	Lipid-Färbung	0,7 % (w/v) Ölrot in 100 % Propylenglycol (Lagerung bei 60 °C)
PBS-Blockierungslösung	Immunfluoreszenz	1 % BSA (w/v) in PBS
PFA-Lösung (Paraformaldehyd)	Immunfluoreszenz	4 % (w/v) PFA in PBS pH 7,2
Proteinase-K-Puffer	Proteinase-K-Verdau und Lipid-Extraktion	50 mM TRIS-HCl 5 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,5
SDS/DTT-Lösung	Filter-Retentions-Assay	4 % (w/v) SDS 100 mM DTT
SDS-Waschlösung	Filter-Retentions-Assay	0,1 % (w/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O
Saccharose-Lösung	Lipid-Raft-Aufreinigung	80 % (w/v) D-Saccharose in ddH <sub>2</sub> O (bei 70 °C)
TBS-Puffer	Filter-Retentions-Assay	20 mM Tris-HCl 137 mM NaCl pH 7,4
TBS-T	Filter-Retentions-Assay	20 mM Tris-HCl 137 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween-20 pH 7,4
Uranylazetat-Lösung	Elektronenmikroskopie	2 % (w/v) Natrium-uranylazetat

## 4.6 Antikörper

In den folgenden Tabellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet. Ihre Verwendung wird in Abschnitt 5.1.5 genauer beschrieben. Die Abkürzungen bedeuten hier IF: Immunfluoreszenz und IB: Immuno-Blot-Verfahren.

Tabelle 4.6: Primärantikörper

Antigen	aus Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Herkunft
A $\beta$ (1-16)	Maus	IF: 1/50 IB: 1/200	Chemicon (Millipore)
Flotillin-1	Maus	IF: 1/200 IB: 1/500	Becton, Dickinson GmbH

Tabelle 4.7: Sekundärantikörper

Antigen	Konjugiert mit	Eingesetzte Verdünnung	Herkunft
Maus IgG	Alkalische-Phosphatase	IB: 1/1500	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Maus IgG	Cy3 (rot in IF)	IF: 1/50	Chemicon (Millipore)
Maus IgG	FITC (grün in IF)	IF: 1/100	Dianova GmbH

## 4.7 Konjugate und Farbstoffe

Tabelle 4.8: Konjugate und Farbstoffe

Substanz-Konjugat	Verdünnung	Herkunft
Choleratoxin-B-HRP	IB: 1/15000	Invitrogen GmbH - Molecular Probes
Choleratoxin-B-FITC	IF: 1/1000	Invitrogen GmbH - Molecular Probes
Microsphären-Nilrot	500/Zelle	Invitrogen GmbH - Molecular Probes
Hoechst H33342	1/10 000	Hoechst AG
<sup>488</sup> A $\beta$ (Alexa-488 an A $\beta$ (1-40))	Mischung aus A $\beta$ (1-40) und <sup>488</sup> A $\beta$ im Verhältnis 1/10	Eigene Kopplung (durch Ralf Friedrich)

IF: Immunfluoreszenz; IB: Immuno-Blotting-Verfahren

## 5 Methoden

### 5.1 Zellkultur

#### 5.1.1 Allgemeine Zellkultur-Methoden

Alle Zellen wurden konstant bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen oder Lochplatten (Zellkultur-Microplatten) aus Plastik. Als Nährlösungen wurden *Dulbecco's Modifikation des Minimal Essential-Mediums* (DMEM) mit 4,5 g/ Glucose oder *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) verwendet. Durch Zusatz der Antibiotika Penicillin und Streptomycinsulfat, sowie des Antimykotikums Amphotericin B wurde das Risiko einer Infektion durch Pilze und Bakterien verringert. Die Nährmedien enthielten 1 % des kommerziell erhältlichen Antibiotika-Antimykotika-Gemisches. Zur Anreicherung von Wachstumsfaktoren wurde den Medien fötales bovines Serum (FBS) zugegeben. Die THP-1-Zellen wurden in Suspension, die J-774A.1-Zellen adhärent kultiviert. Eine Übersicht zur Herkunft der Zellen und den Kulturbedingungen findet sich in Tabelle 5.1.

Tabelle 5.1: Verwendete Zellen

Zelllinie	Herkunft, Art	Kultur	Kulturmedium
J-774A.1	Maus, Monozyten	Adhärent	DMEM, 10 % FBS
THP-1	Human, Monozyten	Suspension	RPMI, 10 % FBS

Zur Kryopreservation der Zelllinien wurden Aliquots der Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert. Die Medien wurden dabei mit 20 % Serum und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kälteschutzmittel versetzt. Das DMSO reduziert die Kristallbildung und verringert so die Schädigung der Zellen während des Gefrierprozesses. Bei der erneuten Überführung der Zellen in Kulturbedingungen wurden die Zellen zügig bei Raumtemperatur aufgetaut und das zytotoxische DMSO durch Zentrifugation aus der Zellsuspension entfernt. Um in Versuchen möglichst vergleichbare Bedingungen für Mehrfach-Bestimmungen zu erzielen, wurden die Zellen gleichmäßig in Plastikplatten mit Lochvertiefungen ausgesät. Die Platten waren mit 96, 24 oder 6 Löchern ausgestattet. Für einige Experimente (z.B. KR-Färbungen) wurden die Zellen dabei auf sterilen Deckgläsern ausgesät, die sich in den Löchern befanden.

Durch diese Anordnung konnten Zellen zu unabhängigen Zeitpunkten entnommen werden, ohne parallel laufende Experimente zu unterbrechen.

### 5.1.2 Induktion der Plaquebildung in der Zellkultur

THP-1 Zellen wurden mit einer Dichte von 100.000 Zellen/ml ausgesät und durch die Zugabe des Phorbolesters Phorbol-12-myristate-13-azetat (PMA) aktiviert und differenziert {Tsuchiya *et al.*, 1982}. Mit dem Aussäen der Zellen wurden 10 ng/ml PMA in das Medium gegeben und für einen Tag inkubiert. Die Monozyten adherierten auf Grund ihrer Aktivierung innerhalb eines Tages. Nach dem Entfernen des PMA-haltigen Mediums wurde mit der Zugabe von A $\beta$ (1-40) begonnen.

Dazu wurde zunächst gefriergetrocknetes A $\beta$ -Peptid in einer Konzentration von 10 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Durch eine maximal einminütige Ultraschall-Behandlung, sowie durch Vortexen wurde das Peptid in Lösung gebracht und anschließend abzentrifugiert (13.000 x rpm, 10 Minuten) um mögliche Aggregate zu entfernen. Diese A $\beta$ -Peptid-Lösung wurde mit dem Zellkulturmedium gemischt und zu den adherenten THP-1-Zellen gegeben, die Konzentration des A $\beta$ -Peptids im Medium betrug 60  $\mu$ g/ml. Jeden zweiten Tag wurde diese A $\beta$ -Zugabe mit der Erneuerung des Zellkulturmediums wiederholt, wobei das A $\beta$ -Peptid immer frisch aufgelöst wurde.

Für eine beschleunigte und gleichmäßige Amyloid Entstehung wurden *in vitro* gebildete A $\beta$ -Fibrillen bei der ersten Zugabe des A $\beta$ -Peptids als Nukleationskeime in das Medium gegeben. Die Menge der zugegebenen A $\beta$ -Fibrillen entsprach 0,2 % der A $\beta$ -Peptid-Menge im Zellkulturmedium. Sofern Substanzen zu den Kulturen gegeben wurden, erfolgte deren Zugabe ebenfalls an jedem zweiten Tag mit dem Wechsel des Zellkulturmediums, dabei wurden von den Substanzen zunächst Stammlösungen (z.B. in DMSO) hergestellt. Bei der Inkubation von Zellen mit den verschiedenen Substanzen lag die DMSO-Konzentration im Kulturmedium stets unter 0,5%.

### 5.1.3 Aufreinigung amyloider Plaques aus der Zellkultur

THP-1 Zellen wurden für 13 Tage auf Deckgläsern mit A $\beta$ (1-40) inkubiert (siehe oben). Die fortschreitende Plaquebildung wurde dabei durch KR-Färbungen überprüft. Die Zellen und das mit ihnen assoziierte Amyloid wurden einmal mit 200  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann in ca. 50  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O (pro Deckglas) mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst. Die entstandene Suspension wurde entweder sofort eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

### 5.1.4 Vitalitätsbestimmung von Zellen

Für die Bestimmung der Zellvitalität wurde der kommerziell erhältliche Laktatdehydrogenase-Assay von BIOVISION eingesetzt. Die Bestimmung der Zytotoxizität beruht hier auf der Freisetzung des zellulären Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) und die enzymabhängige Umsetzung von NADH bei der Oxidation von Laktat. NADH reagiert mit dem Substrat Tetrazoliumsalz Wst-1(WST-Substrat) dieses Assays und führt zu einer Freisetzung des Farbstoffes Formazan, der durch eine Absorptionsmessung bei 450 nm quantifiziert wird. Das Enzym wird während der Apoptose von Zellen vermehrt in den Überstand der Zellkultur abgegeben.

THP-1-Zellen wurden für einen definierten Zeitraum mit je 20.000 Zellen und 200 µl Medium pro Loch in einer 96-Loch-Platte inkubiert. Zur Bestimmung der freigesetzten LDH-Menge wurde ein Teil des Zellkulturmediums zu dem gewählten Zeitpunkt (1 Tag bis 5 Tage) entnommen. Die 96-Loch-Platten wurden inklusive Deckel für 5 Minuten zentrifugiert (4.000 rpm), um einen zellfreien Überstand zu erhalten. Pro Loch wurden 10 µl dieses Überstandes entnommen und in einer neuen 96-Loch-Platte mit 100 µl des WST-Substrates vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 450 nm mit dem Fluoreszenz-Microplatten-Lesegerät FLUOstar Omega gemessen. Die relative Zytotoxizität ergab sich aus dem Vergleich der gemessenen Absorptionen von unbehandelten Zellen ( $A_{\text{vitale Zellen}}$ ), lysierten Zellen ( $A_{\text{lysierte Zellen}}$ ) und den zu untersuchenden Zellen ( $A_{\text{Zellprobe}}$ ). Die Lyse von Zellen durch Zugabe von 10 µl der Zell-Lyse-Lösung des Assays erfolgte 10 Minuten vor Entnahme des Überstandes und stellte die höchstmögliche Menge an freigesetztem LDH dar. Die relative Zytotoxizität berechnete sich daraus wie folgt:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{(A_{\text{Zellprobe}} - A_{\text{vitale Zellen}})}{(A_{\text{lysierte Zellen}} - A_{\text{vitale Zellen}})} \times 100$$

### 5.1.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Die auf Deckgläsern ausgesäten Zellen wurden nach Absaugen des Mediums einmal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 4 % PFA-Lösung für 10 Minuten fixiert. Das Fixans wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 Minuten entfernt. Die darauffolgende 45-minütige Inkubation in PBS-Blockierungslösung sättigt unspezifische Bindungsstellen ab. Die Deckgläser wurden anschließend in einer Kammer mit hoher Luftfeuchte (geschlossene und abgedunkelte Petrischale mit feuchtem Filterpapier) transferiert für eine Stunde mit dem primären Antikörper

inkubiert. Die Antikörper wurden in PBS-Blockierungslösung gelöst und je 50 µl dieser Lösung auf ein Deckglas gegeben. (In Tabelle 4.6 sind die verwendeten primären Antikörper und die eingesetzte Verdünnung der Antikörper aufgeführt.) Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser mit je 250 µl PBS wurde der entsprechende sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 4.7) für eine Stunde inkubiert und dann ebenfalls durch Waschen entfernt. Eine Darstellung der Zellkerne wurde durch die anschließende 10-minütige Inkubation mit 50 µl des DNA-bindenden Farbstoffes Hoechst 333443 erreicht. Die Deckgläser wurden kurz in ddH<sub>2</sub>O getaucht, umgedreht und auf einen Objektträger mit ProLongGold eingedeckt. Anschließend wurden die Präparate fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Zur Darstellung des Gangliosid GM1 in der Zellmembran wurde fluoreszenzgekoppeltes Cholera toxin B eingesetzt, ein bakterielles Toxin, welches an Gangliosid GM1 bindet. THP-1 Zellen wurden auf Deckgläsern in 24-Loch-Platten ausgesät und für einen Tag mit PMA (wie in Abschnitt 5.1.2 beschrieben) und anschließend für einen weiteren Tag in Zellkulturmedium ohne PMA inkubiert. Für die Färbung wurde das Zellkulturmedium für 30 Minuten durch eine eiskalte Lösung des Cholera toxin-B-FITC (1 µg/ml) in PBS-Blockierungslösung ersetzt. Diese Inkubation wurde im Dunkeln bei 4 °C durchgeführt und die Lösung anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 Minuten) mit PBS entfernt. Entsprechend der zuvor beschriebenen Fluoreszenz-Färbung, wurden die Zellen fixiert und nachfolgend mit Antikörpern inkubiert. Mit der parallelen Färbung konnte so die Untersuchung der Lokalisation von Gangliosid GM1 und Aβ(1-40) durchgeführt werden.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop Nikon Eclipse 80i (in Halle) bzw. dem Zeiss Axiovert 200 Apotome (in Jena) unter Verwendung entsprechender Bandpass-Filter zur Anregung und Detektion des emittierten Laserlichts. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 wurde mit einem Bandpass-Filter [555/565] nm angeregt und detektiert; H33342 mit einem Bandpass-Filter [380/458 nm] und der Bandpass-Filter [494/518 nm] für den Farbstoff FITC. Die Mikroskopie-Aufnahmen wurden digital gespeichert und wenn nötig mit dem Programm *Photoshop* bearbeitet, um geringe Kontrast- oder Helligkeitsänderungen vorzunehmen.

### 5.1.6 Fluorimetrische Analyse der Phagozytose

Die Phagozytose-Leistung von Makrophagen wurde mit einem fluorimetrischen Assay untersucht, bei dem die Signal-Intensität der von Zellen aufgenommenen fluoreszenzgekoppelten Substanzen gemessen wurde.

Für diese Versuche wurden THP-1 Zellen in einer schwarzen 96-Loch-Platte mit klarem Boden (Microplatte, Greiner) ausgesät. Je 20.000 Zellen wurden pro Loch ausgesät und für einen Tag mit 10 ng/ml PMA inkubiert (siehe auch Abschnitt 5.1.2). Zur Analyse

der Aufnahmeleistung in Anwesenheit von Phagozytose-Inhibitoren wurden die Zellen anschließend für zwei Stunden mit 2,5  $\mu\text{M}$  Latrunculin B oder mit 6  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B inkubiert. Die Inhibitoren verblieben bei der darauffolgenden Zugabe der fluoreszenzgekoppelten Substanzen im Zellkulturmedium. Mikrosphären (Polystyrenkugeln) von 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser, die an den Fluoreszenz-Farbstoff Nilrot gebunden waren, wurden in das Medium gegeben (500 Mikrosphären/Zelle) und für 16 Stunden inkubiert. Für die Untersuchung der A $\beta$ -Aufnahme durch THP-1-Zellen wurde stattdessen A $\beta$ -Peptid verwendet, welches an den Fluoreszenz-Farbstoff Alexa 488 gekoppelt war (<sup>488</sup>A $\beta$ ). Das <sup>488</sup>A $\beta$ (1-40)-Peptid wurde im Verhältnis 1/10 mit unmarkiertem A $\beta$ (1-40)-Peptid vermischt und bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{g/ml}$  für 16 Stunden mit den Zellen inkubiert. Mit der gleichen Konzentration wurden auch <sup>488</sup>A $\beta$ (1-40)-Fibrillen (Bedingungen zur Herstellung von A $\beta$ -Fibrillen siehe im Abschnitt 5.3.7) für 16 Stunden zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 200  $\mu\text{l}$  PBS je Loch gewaschen und dadurch nicht aufgenommenes fluoreszierendes Material entfernt. Die 96-Loch-Platten wurden mit dem Fluoreszenz-Microplatten-Lesegerät FLUOstar Omega ausgelesen. Die ermittelte Signal-Intensität entsprach dabei der internalisierten Menge fluoreszenzgekoppelter Substanzen. Der Farbstoff Alexa-Fluor-488 wurde mit dem Filterpaar [495/519 nm] angeregt und detektiert, Nilrot mit dem Filterpaar [535/575 nm].

### 5.1.7 Kongorot-Färbung

Zellen, die auf Deckgläsern gewachsen waren, wurden nach einmaligem Waschen mit PBS in 100 % Methanol für 10 Minuten bei 4 °C fixiert. Die anschließende Färbung mit der Kongorot-Lösung erfolgte bei Raumtemperatur für 45 Minuten unter leichtem Schütteln. Drei kurze Waschschriffe mit ddH<sub>2</sub>O entfernten den überschüssigen Farbstoff, die darauffolgende zweiminütige Inkubation in Hämalaun-Lösung diente der Kernfärbung. Die Deckgläser wurden einmal kurz mit 70 % Ethanol und anschließend dreimal für je 5 Minuten mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Darauf folgte die Entwässerung der Proben in Alkohol und Xylol. Dazu wurden die Deckgläser dreimal in 90%igem Alkohol, dreimal in 100%igem Alkohol und dann zweimal in 100%iges Xylol getaucht. Um die Färbung dauerhaft zu erhalten, wurden 10  $\mu\text{l}$  Histokit auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläser (mit den Zellen zuunterst) auf den Histokit-Tropfen gelegt. Die Präparate wurden mit einem Polarisationsmikroskop (Leica Leitz DM-RXE in Jena bzw. Nikon Eclipse 80i in Halle) auf rot-grüne Doppelbrechung untersucht.

Die KR-Trockenfärbung stellte eine Modifikation dieses Nachweises dar, welche für die Untersuchung der aus Zellkultur gewonnenen Plaques entwickelt wurde (siehe Abschnitt 5.1.3). Ein Tropfen (5  $\mu\text{l}$ ) des extrahierten Materials wurde auf einen Objektträger gegeben und mit etwas Fett (Lippenpflegestift) umrandet, wodurch das Zerfließen des Tropfens verhindert wurde. Nach Antrocknen der Probe wurde diese für 5 Minuten mit 10  $\mu\text{l}$  KR-Lösung inkubiert und die Färbelösung anschließend sehr

vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt. Es folgte ein Waschschriff mit 70%igem Alkohol, der nach 1 Minute ebenfalls durch Absaugen mit einem Filterpapier entfernt wurde. Das entstandene Trockenpräparat wurde unmittelbar danach mikroskopiert.

### 5.1.8 Alcianblau-Färbung

Mittels des sauren Farbstoffes Alcianblau wurden Glycosaminoglykane in Zellpräparaten dargestellt. Auf Deckgläsern gewachsene Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS (5 Minuten) für 10 Minuten bei 4 °C in 100 % Methanol fixiert. Das Fixans wurde durch einmaliges Waschen mit Wasser (5 Minuten) entfernt und das Deckglas danach für 5 Minuten in der Alcianblau-Färbelösung bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem anschließendem Waschschriff in ddH<sub>2</sub>O für 5 Minuten wurde eine Gegenfärbung mit Kernechtrot (3 Minuten) durchgeführt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch kurzes Eintauchen und Schwenken des Deckglases in ddH<sub>2</sub>O entfernt. Zum Eindecken der Deckgläser wurde ProLongGold verwendet. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch untersucht.

### 5.1.9 Ölrot-Färbung

Lipide wurden mit Ölrot nachgewiesen. Dazu wurden die auf Deckgläsern gewachsenen Zellen zunächst eine Minute in HBSS und dann 5 Minuten in PBS gewaschen. Vorbereitend auf die Färbung wurden die Präparate 5 Minuten in 100 % Propylenglykol inkubiert, wodurch wässrige Lösungen aus dem Präparat verdrängt wurden. Die Färbung erfolgte für 5 Minuten in der Ölrot-Färbelösung bei 60 °C, anschließend wurde durch Schwenken des Deckglases in 85%igem Propylenglykol der überschüssige rote Farbstoff entfernt. Nach zwei kurzen Waschschriffen in ddH<sub>2</sub>O (je 10 Sekunden) wurde eine Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun-Lösung (5 Minuten) durchgeführt. Diese Lösung wurde anschließend durch dreimaliges Waschen (5 Minuten) in ddH<sub>2</sub>O wieder entfernt. Die Präparate wurden mit ProLongGold eingedeckt und mikroskopiert.

## 5.2 Lipidmethoden

### 5.2.1 Lipid-Raft-Aufreinigung aus THP-1 Zellen

Für eine Lipid-Raft-Aufreinigung wurden 5,8 Millionen Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden nach viertägiger Inkubation geerntet, indem die Zellen zweimal mit MBS-Puffer gewaschen und anschließend in 10 ml MBS-Puffer vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst wurden. Diese Zellsuspension wurde anschließend für 10 Minuten bei 600 x g zentrifugiert (Rotina R38), das entstandene Pellet in 1 ml kaltem MBS-T-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Charakteristisch für Lipid-Rafts ist ihre Unlöslichkeit in Triton-X-100 bei 4 °C daher enthielt der MBS-T-Puffer 1 % (w/v) Triton-X100. Nach diesem Schritt wurden die Zellen durch zehnmaliges Passieren durch eine 26 G Kanüle homogenisiert. Die nachfolgende zehnminütige Zentrifugation bei 1.000 x g (Rotina R38) und 4 °C lieferte den sogenannte postnukleären Überstand. Er enthält alle Zellbestandteile bis auf die Zellkerne. Zu gleichen Teilen wurde der postnukleäre Überstand mit einer 80 % (w/v)-Saccharose-Lösung gemischt. Die resultierende 40%ige Saccharose-Lösung bildete mit 2 ml Volumen die unterste Schicht des Saccharose-Dichte-Gradienten. Darüber wurden 6 ml einer 30%igen und 4 ml einer 5%igen Saccharose-Lösung geschichtet. Der dreistufige Dichte-Gradient wurde anschließend für 18 Stunden bei 4 °C und 18.7813 x g zentrifugiert (Beckman L-80, Rotor SW41Ti). Die Zellbestandteile ordneten sich während der Zentrifugation entsprechend ihrer spezifischen Dichte im Gradienten an. Bei der Zentrifuge wurde keine Bremse eingesetzt und ein langsamer Beschleunigungs-Modus gewählt. Nach der Ultrazentrifugation wurde der Gradient in 12 Fraktionen von je 1 ml aufgeteilt, wobei die Fraktionen von oben (beginnend mit Fraktion 1) abgenommen wurden.

Die Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigung wurden mittels verschiedener Techniken analysiert. Die Zusammensetzung der Lipide in den Fraktionen wurde nach der Extraktion der Lipide (siehe Abschnitt 5.2.2) mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (siehe Abschnitt 5.2.3) analysiert. Das Vorkommen spezifischer Marker für die Mikrodomänen wurde mit der Slot-Blot-Methode (siehe Abschnitt 5.3.3) untersucht. Sollten beide Analyse-Methoden für einen Gradienten angewendet werden, wurden die 1 ml Fraktionen des Gradienten aufgeteilt. Je 800 µl wurden für die Lipid-Extraktion und 200 µl wurden zur Identifizierung typischer Raft-Marker im Slot-Blot-Verfahren eingesetzt.

### 5.2.2 Lipid-Extraktion

Zur Extraktion der Lipide aus den Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigung wurden die Proben in einem Glasgefäß mit dem 3,2-fachen Volumen eines Chloroform-Methanol-Gemisch (1/2,2 Chloroform/Methanol) versetzt und für eine Minute gevortext. Das Gemisch wurde anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe eines Volumens Chloroforms und eines Volumens Essigsäure (40 mM), jeweils gefolgt von einer Minute vortexen, wurde die Trennung der wässrigen Phase von der Lipid-Phase durch Zentrifugation bei 1.000 x g (Rotina R38) erreicht. Die Phasen wurden anschließend separiert, indem die untere lipidhaltige Phase mit einer Glaspipette vorsichtig entnommen wurde. Die wässrige Phase wurde zur Steigerung der Extraktion erneut mit einem Volumen Chloroform versetzt, eine Minute gevortext und wie zuvor zentrifugiert. Die zweite lipidhaltige Phase wurde mit der zuvor entnommenen zusammengeführt und die Lösungsmittel unter gasförmigem Stickstoff verdampft. Die so ankonzentrierten Lipide wurden in 20 µl Chloroform resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Eine Alternative dieses Protokolls wurde für die Lipid-Extraktion von Proben entwickelt, welche für den enzymatischen Verdau durch Proteinase K bestimmt waren. Da die Anwesenheit der Lösungsmittel die Aktivität der Proteinase K beeinträchtigt, wurden die Bedingungen für den enzymatischen Verdau durch folgende Veränderungen optimiert. Statt eines Volumens Essigsäure (40 mM), wurde für Proben, die anschließend durch Proteinase K verdaut werden sollte, ein Volumen Proteinase-K-Puffer eingesetzt (3,2-fach konzentriert). In diesen Präparationen wurde außerdem auf eine zweite Chloroform-Extraktion verzichtet und auch die wässrige Phase nach der Prozedur für 5 Minuten mit gasförmigem Stickstoff bedampft, um mögliche Rückstände der Lösungsmittel zu entfernen. Die wässrige Phase enthielt die Proteine der ursprünglichen Probe in Proteinase-K-Puffer und wurde für den enzymatischen Verdau eingesetzt. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich die Effektivität der Extraktion durch diese alternativen Schritte nur gering vermindert.

### 5.2.3 Dünnschichtchromatographie

Die Identifizierung der extrahierten Lipide aus den Lipid-Raft-Fraktionen wurde durch die hochauflösende Dünnschichtchromatographie (TLC, *thin layer chromatography*) erreicht. Mit Hilfe polarer Kieselgelplatten und einem sukzessiven, unpolarem Laufmittelsystem war es möglich, Lipide entsprechend ihrer Polarität aufzutrennen und durch den Vergleich bekannter Lipide (Lipid-Standard-Mix) zu identifizieren.

Vertikale Glaskammern, deren Innenraum eine gesättigte Gas-Atmosphäre des jeweiligen Laufmittels enthielt, wurden zur Entwicklung der Platten eingesetzt. Die Kieselgelbeschichtung der Platten besaß eine Vortrennzone, in welcher die Proben

18 mm vom unteren Rand aufgetragen wurden. Für eine punktgenaue Auftragung wurden Hamilton-Pipetten eingesetzt. Das maximal aufgetragene Probenvolumen betrug 2 µl. Die Platten wurden erst entwickelt, wenn die Proben-Punkte trocken waren. Eine Vorentwicklung zur Aktivierung der Platten wurden durch die Entwicklung in Laufmittel-1 (LM1) und dem anschließendem Erhitzen für 10 Minuten auf 110 °C im Ofen erreicht und verringerte den Hintergrund. Die Entwicklungs-Schritte für die Platten erfolgte in geschlossenen Kammern, deren Boden mit dem jeweiligen Laufmittel bedeckt waren, wo sich zuvor für mindestens 20 Minuten eine gesättigte Gasatmosphäre aufgebaut hatte. Mittels einer Halterung wurden die Platten in Kontakt mit dem Laufmittel gebracht und so lange inkubiert, bis das Laufmittel 46 mm aufgestiegen war. Nach Entnahme aus der jeweiligen Kammer wurden die Platten für 1 Minute mit einem Fön getrocknet. Die Entwicklung in Laufmittel-1 diente der Trennung der Proben, wobei polare Lipidklassen auf Grund der starken Interaktion mit dem Kiesegel der Platten langsamer liefen. Nichtpolare Lipide gelangten dagegen mit der Laufmittelfront in den oberen Bereich der Platte. Die anschließende Entwicklung in Laufmittel-2 und Laufmittel-3 trug zur Fokussierung der Banden bei. Die Lipid-Banden wurden gefärbt, indem die Platten für 3 Sekunden vollständig in die Kupfersulfat-Färbelösung getaucht und danach bei 170 °C für 7 Minuten im Heizofen inkubiert wurden. Die entstandenen schwarzen Lipid-Banden konnte durch den Vergleich mit dem Lipid-Standard-Mix, der auf jeder Platte aufgetragen wurde, identifiziert werden. Zur Dokumentation wurden die entwickelten Platten bei mindestens 600 dpi eingescannt.

Zusammensetzung des Lipid-Standard-Mix:

- 1 mg/ml Cholesterol (Chol)
- 1 mg/ml Galactocerebroside (GC)
- 1 mg/ml Phosphatidylcholin (PC)
- 1 mg/ml Phosphatidylglycerol (PG)
- 1 mg/ml Phosphatidylethanolamin (PE)
- 1 mg/ml Phosphatidylserin (PS)
- 1 mg/ml Sphingomyelin (SM)

Diese Lipide waren in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (2/1,1) gelöst und wurden bei -20 °C gelagert. Lipide sind sehr empfindlich gegenüber oxidativen Reaktionen. Obwohl auf eine sachgemäße Handhabung der Lipide geachtet wurde, traten bei längerer Lagerung Degradations-Prozesse auf und führten zu Doppelbanden (für PE und SM) innerhalb des Lipid-Standard-Mix.

## 5.3 Proteinmethoden

### 5.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der A $\beta$ (1-40)-Peptid-Konzentration wurde nach der Methode von Gill und von Hippel {Gill und von Hippel, 1989} durchgeführt. Diese Methode berücksichtigt die spektralen Eigenschaften der Aminosäuren bei 280 nm und berechnet den jeweiligen polypeptid-spezifischen Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ . Für A $\beta$ (1-40) wurde ein theoretischer Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von 1280 [L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>] vereinbart. Die molare Konzentration  $c$  [L·mol<sup>-1</sup>] lässt sich auf der Grundlage des Lambert-Beer-Gesetzes durch die Bestimmung der Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ) berechnen. Die Schichtdicke  $d$  [cm] des durchstrahlten Körpers betrug für die hier verwendete Quarzglas-Küvette (Hellma) 1 cm.

Lambert-Beer-Gesetz:

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d .$$

Die Absorption  $A_{280}$  der zu messenden Polypeptidprobe wurde mit einem UV-VIS-Spektrometer (Helios  $\gamma$ ) ermittelt. Dazu wurden 200  $\mu$ l der Proteinprobe bzw. des Referenzpuffers mit 800  $\mu$ l der Guanidinium-Lösung vermischt und bei 280 nm gemessen.

### 5.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) eingesetzt. Es wurden 1 mm dicke Gradienten-Gele (4-12 % Acrylamid) der Firma Invitrogen mit 12, 15 oder 17 Beladungstaschen verwendet. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels für 5 Minuten bei 95 °C in SDS-Probenpuffer (NuPage, Invitrogen) gekocht. Als Protein-Standards wurden die Marker *SeeBlue* oder *Mark12* (Invitrogen) verwendet. Die eigentliche Gelelektrophorese erfolgte in einem MES-Laufpuffer (NuPage, Invitrogen) bei einer Spannung von 200 V (9 cm x 6 cm) für 30 Minuten. Die SDS-Gele wurden zur Darstellung der Proteine zunächst für 10 Minuten in 10 % Essigsäure fixiert und dann für eine Stunde in Commassieblau-Lösung gefärbt. Der ungebundene Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen (Inkubation für je 15 Minuten) in Entfärber-Lösung entfernt, das Gel anschließend gewässert und zwischen zwei Cellophan-Folien durch Heißluft getrocknet.

### 5.3.3 Dot-Blot und Slot-Blot-Verfahren

Beim Dot-Blot-Verfahren wurden Proteinproben mittels einer Lochmaske auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Durch Verwendung einer Vakuum-Apparatur (Minifold-System) war es möglich, die Proben gleichmäßig auf die Membran zu bringen. Die Blot-Apparatur (Bild 5.1) bestand aus einem Bassin, welches an eine Vakuum-Pumpe angeschlossen war. Auf das Bassin wurde eine Platte mit 96 kleinen Löchern (1 mm) befestigt, auf welche erst ein feuchtes Whatman-Filterpapier und darauf eine in TBS-Puffer equilibrierte Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 nm) gelegt wurde. Zuerst wurde eine Lochmaske befestigt, in deren 96 Löchern die Proben pipettiert wurden. Entweder wurde eine Dot-Blot-Maske mit runden Löchern ( $12,5 \text{ mm}^2$ ) für Probenvolumen bis  $500 \mu\text{l}$ , oder eine Slot-Blot-Maske mit Rechtecken ( $2 \text{ mm}^2$ ) für Probenvolumen bis  $200 \mu\text{l}$  eingesetzt.



Bild 5.1: Schematischer Aufbau der Blot-Apparatur

Die Proben (z.B. Lipid-Raft-Fractionen) wurden in die Lochplatte pipettiert und bei angeschlossenem Vakuum abgesaugt. Anschließend wurden die Löcher dreimal mit  $200 \mu\text{l}$  TBS-T-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Lochmaske entfernt und die Nitrocellulosemembran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungs-Lösung unter leichtem Schütteln inkubiert., für die Nachweise mit anti-Flottilin-1 und anti-A $\beta$ (1-16) wurden 2 % BSA in TBS-T-Puffer verwendet. Um die Blockierungs-Lösung zu entfernen wurde die Membran kurz in TBS-T-Puffer gewaschen und danach mit dem Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten in TBS-T-Puffer entfernt, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte. Die Antikörper wurden in der jeweils verwendeten Blockierungs-Lösung und der entsprechenden Verdünnung (siehe Tabelle 4.6) eingesetzt. Ungebundener Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen für 5 Minuten in TBS-T-Puffer entfernt und die Membran für 3 Minuten mit LumiPhos-Reagenz inkubiert. Die Membran wurde anschließend einmal in Wasser getaucht um das restliche Lumiphos-Reagenz zu entfernen und dann mit einer durchsichtigen Plastikfolie bedeckt. Die spezifisch gebundenen Sekundärantikörper waren mit dem Enzym Alkalische-Phosphatase konjugiert, welches das LumiPhos-Substrat umsetzte und dabei Licht emittierte. In der Dunkelkammer wurde auf die Membran ein

Röntgenfilm gelegt, der durch das emittierte Licht geschwärzt wurde. Das wurde durch die Entwicklung mit der Film-Entwicklermaschine (Agfa Curix) sichtbar gemacht. In Halle wurde aus technischen Gründen die Chemolumineszenz mit dem Geldokumentationssystem CN-3000 detektiert. Hierfür wurde die Membran nach Inkubation mit dem Lumiphos-Reagenz unter die integrierte Kamera des Gerätes gelegt und so das emittierte Licht digital erfasst (Programm *ChemiCapt™*). Zur Quantifizierung der detektierten Signale wurden die entwickelten Röntgenfilme auf einem Flachbrett-Scanner (Nikon) gescannt und die digitalen Aufnahmen als Tif-Datei im Graustufenmodus mit dem Programm *TotalLab100* ausgewertet. Dateien aus dem Programm *ChemiCapt™* waren mit dem Programm *TotalLab100* kompatibel.

Für den Nachweis von Gangliosid GM1 wurde das hier beschriebene Verfahren in einigen Punkten modifiziert. Für die Blockierung der Membran wurde 3%iges Milchpulver in TBS-T eingesetzt. Statt mit einem Primärantikörper wurde die Membran für eine Stunde mit dem GM1-bindendem Cholera toxin-B inkubiert, welches an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war (Cholera toxin B-HRP). Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und wie zuvor beschrieben entwickelt, wobei statt des LumiPhos-Reagenz das ECL-Reagenz verwendet wurde.

### 5.3.4 Filter-Retentions-Assay

Eine spezielle Anwendung des zuvor beschriebenen Dot-Blot-Verfahrens ist der Filter-Retentions-Assay, welcher den Nachweis amyloider Aggregate aus der Zellkultur ermöglicht. Die verwendete Celluloseacetatmembran wirkt dabei wie ein Filter, da sie SDS-stabile amyloide Fibrillen zurückhält, während die lysierten Zellbestandteile und nicht-fibrilläres, SDS-lösliches A $\beta$ -Peptid durchgesaugt wird.

THP-1-Zellen, die in 96-Loch-Platten inkubiert und zur Amyloid-Bildung angeregt worden waren (siehe Abschnitt 5.1.2), wurden für 5 Minuten mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden in jedes Loch 50  $\mu$ l Lyse-Puffer gegeben und die Zellen damit für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert, während die Platten mit 500 rpm geschüttelt wurden (Schüttler MTS-4). Anschließend wurden jeweils 50  $\mu$ l ddH $_2$ O und 100  $\mu$ l SDS/DTT-Lösung hinzugefügt und durch kurzes Schütteln der Platte vermischt. Die Löcher wurden dann mit einer Folie zugeklebt (Rotilabo®-Abdeckfolie) und die Platte zweimal für jeweils 8 Minuten schwimmend in einem Wasserbad bei 99 °C inkubiert. Die Zelllysate wurden anschließend aus der abgekühlten Platte in die Löcher der Blot-Apparatur überführt. Deren Aufbau entspricht dem in vorherigen Abschnitt beschriebenen, jedoch wurde statt der Nitrocellulosemembran eine Celluloseacetatmembran mit einer Porengröße von 0,2  $\mu$ m eingesetzt. Diese wurde zusammen mit dem Filterpapier in der SDS-Waschlösung equilibriert. Vor Zugabe der Zelllysate wurden die Löcher mit je 200  $\mu$ l SDS-Waschlösung gewaschen und anschließend 50  $\mu$ l SDS-Waschlösung vorgelegt, die dann zusammen mit den zugegebenen Lysaten durchgesaugt wurde. Danach wurde dreimal je 200  $\mu$ l SDS-Waschlösung durchgesaugt. Die folgenden Schritte (Blockierung und Antikörper-Inkubationen) sind identisch mit denen des Dot-Blot-Verfahrens (siehe oben), wobei hier die amyloiden Aggregate aus der Zellkultur durch den sequenzspezifischen Antikörper anti-A $\beta$ (1-16) detektiert wurden.

### 5.3.5 Elektronenmikroskopie

Präparate für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden mit 2%iger Uranylazetat-Lösung negativ-kontrastiert. Es wurden Kupfer-Probepättchen verwendet, die mit einem Formvar-Film beschichtet und mit Kohle bedampft wurden. Dazu wurde ein sauberer Glasobjektträger kurz in eine 0,3%ige Formvar-Lösung getaucht. Der so auf dem Objektträger entstandene Formvar-Film wurde durch das vorsichtige Eintauchen des Objektträgers in eine Schale mit ddH<sub>2</sub>O vom Glas gelöst und auf die Wasseroberfläche übertragen. Auf den schwimmenden Formvar-Film wurden nun die Kupfer-Probepättchen nebeneinander plziert. Ein weiterer Objektträger, der mit einem Papier beklebt war, wurde vorsichtig unter den Formvar-Film getaucht und zusammen mit den Probepättchen aus dem Wasser gehoben und bei Raumtemperatur getrocknet. Die auf dem Objektträger plzierten Probepättchen wurden dreimal für 7 Sekunden mit Kohlestaub bedampft.

Auf die so vorbereiteten Probepättchen wurde 5 µl der Probe pipettiert und für eine Minute inkubiert. Die Inkubationsdauer wurde bei zu geringer Probenhaftung auf bis zu 5 Minuten erhöht. Durch das seitliche Aufsetzen der Probepättchen auf ein Papiertuch wurde die flüssige Probe abgesaugt. Zum Waschen der anhaftenden Probe wurde das Probepättchen in einen Tropfen Wasser (50 µl) getaucht und die anhaftende Flüssigkeit anschließend durch ein Papiertuch abgesaugt. Dieser Vorgang wurde mit drei Tropfen Wasser zum Waschen und dann mit drei Tropfen 2%iger Uranylazetat-Lösung zum Färben der Probe durchgeführt. Für einen raschen Ablauf des Verfahrens wurden die sechs Tropfen jeweils in einer Reihe auf einem Stück Parafilm vorbereitet. Die Proben wurden mit dem Transmissionslektronenmikroskop Zeiss CEM 902A (in Halle und Jena) bzw. dem Transmissionslektronenmikroskop Philips EM 400T (in Jena) bei einer Spannung von 80 kV analysiert.

### 5.3.6 Enzymatischer Verdau

Um die Stabilität gegenüber enzymatischer Degradation zu testen, wurden verschiedene A $\beta$ -Proben mit dem Enzym Proteinase K inkubiert. Es wurde 0,53 mg/ml frisch aufgelöstes A $\beta$ (1-40), 0,3 mg/ml *in vitro* gebildete A $\beta$ -Fibrillen und jeweils 0,3 mg/ml amyloides Material aus THP-1-Zellen (vor und nach einer Lipid-Extraktion) eingesetzt. Alle Proben waren in Proteinase-K-Puffer gelöst und wurden bei 37 °C für 24 Stunden mit 429 µg/ml Proteinase K inkubiert. Während der Inkubation wurden insgesamt zehn Aliquots à 130 µl entnommen, wobei das erste Aliquot vor Zugabe des Enzyms nach 0 Minuten und das letzte 24 Stunden nach der Zugabe des Enzyms gewählt wurde. Die enzymatische Reaktion wurde sofort nach der Entnahme der Probe durch die Zugabe von 2 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) inhibiert. Diese Aliquots wurden

anschließend in einem Konzentrator (SpeedVac) ankonzentriert und in 30  $\mu$ l SDS-Probenpuffer (NuPage, Invitrogen) resuspendiert. Davon wurden je 12,5  $\mu$ l auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### 5.3.7 Herstellung von Amyloid-Fibrillen *in vitro*

Um A $\beta$ -Fibrillen *in vitro* herzustellen, wurde 1 mg/ml A $\beta$ (1-40) eingewogen und in 50 mM Natriumborat-Puffer (pH 9) gelöst. Nach zwei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur konnten in der Elektronenmikroskopie Fibrillen nachgewiesen werden. Tabelle 5.2 zeigt die jeweiligen Bedingungen für die Herstellung amyloider Fibrillen aus weiteren Polypeptiden. Diese *in vitro* gebildeten Fibrillen wurden unter anderem für Experimente zur Sequenzspezifität der Nukleation (siehe Abschnitt 6.5.2) eingesetzt.

Tabelle 5.2: Bedingungen für die Herstellung amyloider Fibrillen

Polypeptid (Herkunft)	Puffer/Lösung, pH-Wert	Konzentration	Temperatur	Inkubation
A $\beta$ (1-40) (AG Fändrich)	50 mM Natriumborat, 9,0	1 mg/ml	20 °C	2 Tage
<sup>488</sup> A $\beta$ (1-40) (AG Fändrich)	50 mM HEPES 7,4	1 mg/ml	20 °C	5 Tage
A $\beta$ (1-42) (Bachem)	10 mM Natriumborat, 9,0	0,2 mg/ml	20 °C	2 Tage
Apomyoglobin, Pferd (Sigma-Aldrich)	50 mM Natriumborat, 9,0	1 mg/ml	20 °C	2 Tage
Humanes Glucagon (Sigma-Aldrich)	50 mM Natriumphosphat, 3,0	1 mg/ml	4 °C	7 Tage
Humanes Insulin (Sigma-Aldrich)	H <sub>2</sub> O/HCl, 2,0	1 mg/ml	60 °C	7 Tage
Humanes Transthyretin (TTR) (von Jeff Kelly)	50 mM Natriumphosphat, 2,0	1 mg/ml	37 °C	4 Tage
Murines SAA (AG Fändrich)	50 mM Natriumphosphat, 2,0	10 mg/ml	65 °C	1 Tag
Myoglobin, G-Helix (Sigma-Aldrich)	50 mM Natriumborat, 9,0	1 mg/ml	20 °C	2 Tage

Für die Verwendung der A $\beta$ -Fibrillen als Nukleationskeime in der Zellkultur, wurde die *in vitro* hergestellte A $\beta$ (1-40)-Fibrillen für 24 Stunden gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert. Es wurde ein Dialyseschlauch (Dispo-Dialyser/Flotalizer) mit einer molekularen Ausschluss-Grenze von 500 Dalton verwendet und 1 ml A $\beta$ -Fibrillen-Lösung für zweimal 12 Stunden gegen je 5 Liter ddH<sub>2</sub>O dialysiert.

### 5.3.8 Messung der Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung wurde für 1 M Puffer-Lösungen (pH 7,4) mit einem Tensiometer (Tensiometer K8) experimentell bestimmt. Auf Grund der geringen Löslichkeit von POPSO, konnte für diesen Puffer keine Messung durchgeführt werden. Die Messung erfolgte nach der Wilhelmy-Platten-Methode, bei der eine Teflon-Metall-Platte frei hängend an einer elektrischen Waage angebracht ist. Die Puffer-Lösung befand sich unterhalb der Waage mit Wilhelmy-Platte in einem temperierten (22 °C) Becherglas.

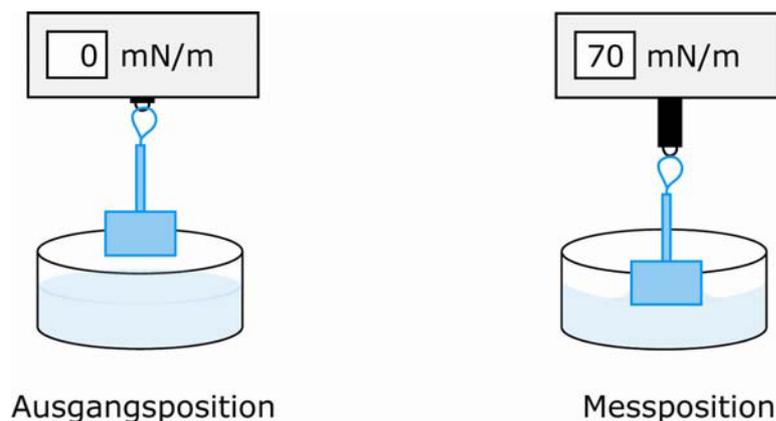


Bild 5.2: Schematische Darstellung der Oberflächenspannungsmessung

Das Schema stellt die beiden Messpositionen zur Bestimmung der Oberflächenspannung mit einem Tensiometer dar. Die Wilhelmy-Platte hängt frei an einer Waage, die in der Ausgangsposition ohne Kontakt zur Probe ist. In der Messposition berührt die Wilhelmy-Platte die Oberfläche der zu messenden Flüssigkeit und benetzt die Platte. Das Tensiometer zeigt die berechnete Oberflächenspannung an.

Bild 5.2 stellt diesen Aufbau schematisiert dar. In der Ausgangsposition ist die Waage tariert (0 mN/m), die Wilhelmy-Platte hängt frei über dem Becherglas. Zur Messung der Oberflächenspannung wurde Wilhelmy-Platte bis zur Oberfläche der Flüssigkeit heruntergefahren. Sobald sie in Kontakt mit der Oberfläche kam war die Messposition erreicht. Die Benetzung der Wilhelmy-Platte beim Eintauchen in die Lösung erhöhte die auf die Platte wirkende Gewichtskraft. Es wurden in dieser Position 10 einzelne Messungen (je 6 Sekunden) der Auslenkung (Gewichtskraft) durchgeführt. Das Computerprogramm der Waage berechnete aus der Gewichtskraft, den Maßen der Platte

(Länge  $l$  und Breite  $b$ ) und dem Kontaktwinkel  $\kappa$ , die Oberflächenspannung  $F_\sigma$  (mN/m). Dabei wird in der Regel der Kontaktwinkel als  $\cos(0)$  angenommen, da die Platte total benetzbar war. Folgende Formel beschreibt diesen Zusammenhang:

$$F_\sigma = 2(l+b) \cos(\kappa).$$

Die Messung der Oberflächenspannung ist sehr empfindlich gegenüber Verunreinigungen mit Fetten, Seifen und Detergenzien. Daher wurden ausschließlich Materialien aus Glas verwendet, welche nach gründlicher Reinigung mit ddH<sub>2</sub>O entweder autoklaviert wurden (Flaschen für die Lösungen) oder über offener Flamme ausglühten (Wilhelmy-Platte, Messbecher).

### 5.3.9 Messung der Aggregations-Kinetik

Die Aggregation von A $\beta$ -Peptid zu Amyloid-Fibrillen wurde durch den Farbstoff ThT dargestellt. Durch die spezifische Bindung des Farbstoffes an Amyloid-Fibrillen erhöht sich die Intensität des emittierten Fluoreszenz-Signals bei 482 nm {LeVine, 1993}. Um die Aggregation des A $\beta$ -Peptids über einen längeren Zeitraum zu verfolgen und dabei eine Aggregations-Kinetik zu erstellen, wurde frisch aufgelöstes A $\beta$ (1-40) in einer schwarzen 96-Loch-Platte mit klarem Boden (Microplatte, Greiner) in einem Fluoreszenz-Microplatten-Lesegerät (FLUOstar Omega) vermessen. Ein Ansatz (100  $\mu$ l pro Loch) enthielt 20  $\mu$ M ThT, 10 mM Natriumazid, eine 50 mM Pufferlösung (pH 7,4) und je nach Experiment zwischen 5  $\mu$ M und 50  $\mu$ M frisch aufgelöstes A $\beta$ (1-40). Die Wahl der Pufferlösung war ebenfalls von der experimentellen Fragestellung abhängig. Das A $\beta$ -Peptid wurde als konzentrierte Stammlösung zeitnah zur ersten Messung in ddH<sub>2</sub>O aufgelöst als letztes und zum Ansatz gegeben. Die Zeitspanne zwischen dem Auflösen des Peptids und der ersten Messung wurde notiert und als Totzeit in der Ermittlung der Lag-Zeit berücksichtigt.

Die Platten wurden mit einer Folie (Rotilabo®-Abdeckfolie) versiegelt, um die Verdunstung während der Messung zu reduzieren. Alle 30 Minuten wurde die Intensität des Fluoreszenz-Signals mit einem Extinktions-Emissions-Filter-Paar [450/490 nm] gemessen. Vor jeder Messung wurde die Platte automatisch für 10 Sekunden in einem doppelt-orbitalen Bewegungsmodus bei 100 rpm geschüttelt.

## 5.4 Statistische Methoden

Die in dieser Arbeit gezeigten Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom gezeigten Mittelwert dar.

Eine Prüfung der Signifikanz wurden auf der Grundlage des Zweistichproben t-Test (Student-t-Test) im Programm *Origin* durchgeführt, bei dem. anhand der Mittelwerte zweier Stichproben geprüft wird, ob die Erwartungswerte zweier Grundgesamtheiten gleich, kleiner oder größer sind. Die in dieser Arbeit durchgeführten Signifikanz-Tests wurden bei einem Signifikanz-Niveau von  $\alpha = 0,05$  berechnet und bei bestehender Signifikanz mit \* gekennzeichnet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten linearen Regressions-Analysen wurden mit dem Programm *Kaleidagraph* berechnet und sind mit dem Korrelations-Koeffizienten R in den entsprechenden Diagrammen angezeigt.

## 5.5 Computer-Programme

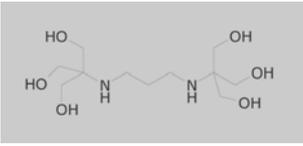
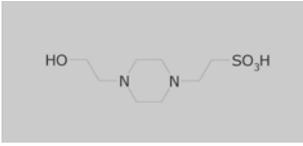
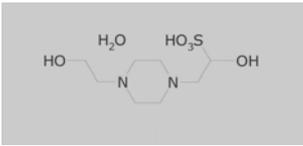
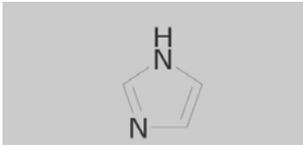
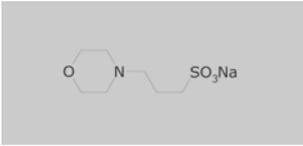
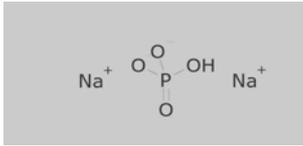
Die Auswertungen der Graphen für die THT-Kinetiken wurden mit dem Programm *Kaleidagraph* erstellt. Die Messung der Fibrillendicke in elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde mit dem Programm *Soft Image Viewer* durchgeführt. Weitere verwendete Computer-Programme sind im Zusammenhang der beschriebenen Methoden genannt.

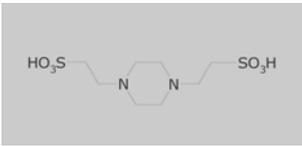
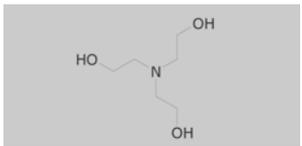
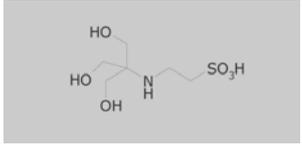
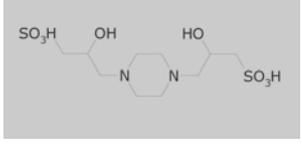
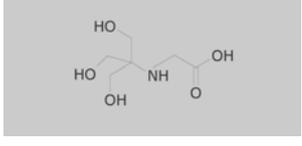
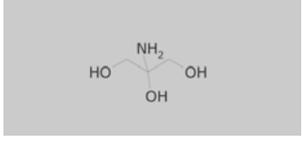
## 6 Ergebnisse

### 6.1 Einfluss des Puffersystems auf die A $\beta$ -Aggregation *in vitro*

Die Prozesse, die zur Entstehung der Alzheimer-Plaques führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei aber die Aggregation von A $\beta$ -Monomeren zu A $\beta$ -Fibrillen, ein Vorgang der mit *in vitro* Aggregations-Modellen untersucht werden kann. Die *in vitro* Modelle ermöglichen es, die A $\beta$ -Aggregation unter kontrollierten Bedingungen ablaufen zu lassen und den Einfluss einzelner Parameter auf die Entstehung von A $\beta$ -Fibrillen zu untersuchen. Es wurden Puffer ausgewählt, die den entsprechenden pH-Wert von 7,4 über einen mehrtägigen Zeitraum stabilisierten, da ein Absinken des pH-Wertes die Aggregation beschleunigen könnte {Nielsen *et al.*, 2001}. Der Einfluss von Puffersystemen auf die Aggregation wurde bisher kaum untersucht, ist aber für die Vergleichbarkeit von Experimenten zur Aggregation von großer Bedeutung. Norman Good und seine Mitarbeiter haben im Jahre 1966 zwölf neue Puffer vorgestellt, deren Eigenschaften für biochemische und zellbiologische Experimente besonders geeignet waren {Good *et al.*, 1966}. Auf Grundlage dieser Veröffentlichung und einiger Vorexperimente wurden für diese Arbeit zwölf Puffer ausgewählt und deren Einfluss auf das Aggregationsverhalten von A $\beta$ (1-40) untersucht. Es handelte sich dabei einerseits um Natriumphosphat-Puffer und andererseits um 11 biologische Puffer, deren Pufferkapazitäten einen stabilen pH-Wert von 7,4 gewährleisten. In Tabelle 6.1 sind die verwendeten Puffersubstanzen mit ihren jeweiligen Strukturformeln, Summenformeln, Molekulargewicht (MW) und der Säurekonstante (pK<sub>s</sub>-Wert) aufgelistet.

Tabelle 6.1: Verwendete Puffersubstanzen (mit Strukturformeln).

Name	Strukturformel Summenformel	MW(kDa)	pK <sub>s</sub> -Wert
Bis-Tris-Propan; 1,3 Bis[tris(hydroxymethyl)methylamino] propan	 <chem>C11H26N2O6</chem>	282,3	6,8 (pK1)
HEPES; (N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N-2-ethansulfonsäure)	 <chem>C8H18O4N2S</chem>	238,3	7,3
HEPSO; N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N- (2-hydroxypropan sulfonsäure)	 <chem>C9H20N2O5S</chem>	568,3	7,7
Imidazol; 1,3-Diaza-2,4-cyclopentadien	 <chem>C3H4N2</chem>	68,1	7,0
MOPS; 3-(N-Morpholino) propansulfonsäure	 <chem>C7H15NO4S</chem>	209,3	7,2
Natriumphosphat Biphosphat	 <chem>Na2HPO4/NaH2PO4</chem>	138,0/ 268,1	7,2

Name	Strukturformel Summenformel	MW(kDa)	pK <sub>s</sub> -Wert
PIPES; Piperazin-1,4- bis(2-ethansulfonsäure)	 <chem>C10H22N2O8S2</chem>	302,4	6,8
POPSO; Piperazin-1,4- bis(2-hydroxypropan sulfonsäure)- dihydrat	 <chem>C10H22N2O8S2 *H2O</chem>	398,5	7,6
TEA; Tris (2-hydroxyethyl)-amin	 <chem>C6H15NO3</chem>	149,2	7,8
TES; N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethansulfonsäure	 <chem>C6H15NO6S</chem>	229,3	7,4
Tricin; N-Tris(hydroxymethyl)-methyl- glycin	 <chem>C6H13NO5</chem>	179,2	7,8 (pK <sub>2</sub> )
TRIS-HCl; Tris- (hydroxymethyl)methylamin	 <chem>C4H11NO3</chem>	121,1	8,1

### 6.1.1 Einfluss des Puffersystems auf die Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Puffersysteme auf die Aggregation des A $\beta$ -Peptids haben, wurden Aggregations-Kinetiken in Anwesenheit der verschiedenen Puffer durchgeführt.

Die Ansätze für die ThT-Kinetiken enthielten je 50  $\mu$ M frisch aufgelöstes A $\beta$ (1-40) und 50 mM des jeweiligen Puffers, sowie 20  $\mu$ M ThT und 10 mM Natriumazid. Mit einem Fluoreszenz-Microplatten-Lesegerät (FLUOstar Omega) wurde halbstündlich die Intensität des Fluoreszenz-Signals gemessen. ThT bindet an A $\beta$ -Fibrillen, nicht jedoch an A $\beta$ -Monomere, so dass die detektierten Fluoreszenz-Signale ein Maß für die Aggregation darstellen.

Bild 6.1.A zeigt eine Aggregation mit dem typischen Kurvenverlauf einer biphasischen Reaktion. Während der Lag-Phase (Phase 1) findet keine Bildung von Fibrillen statt und die ThT-Kinetik zeigt eine Basislinie (a). Die Zeit bis zur Entstehung eines Nukleationskeimes, welcher den Beginn der Fibrillenbildung darstellt und die Elongationsphase (Phase 2) einleitet, ist die Lag-Zeit. Sie wurde in den durchgeführten Experimenten aus dem Schnittpunkt der Basislinie (a) mit der Geraden (b) ermittelt, die durch den linearen Bereich des Anstieges der Aggregationskurve verläuft. In der letzten Phase erreicht die Fibrillenbildung ein dynamisches Gleichgewicht und bildet das Plateau (Phase 3) der Kurve.

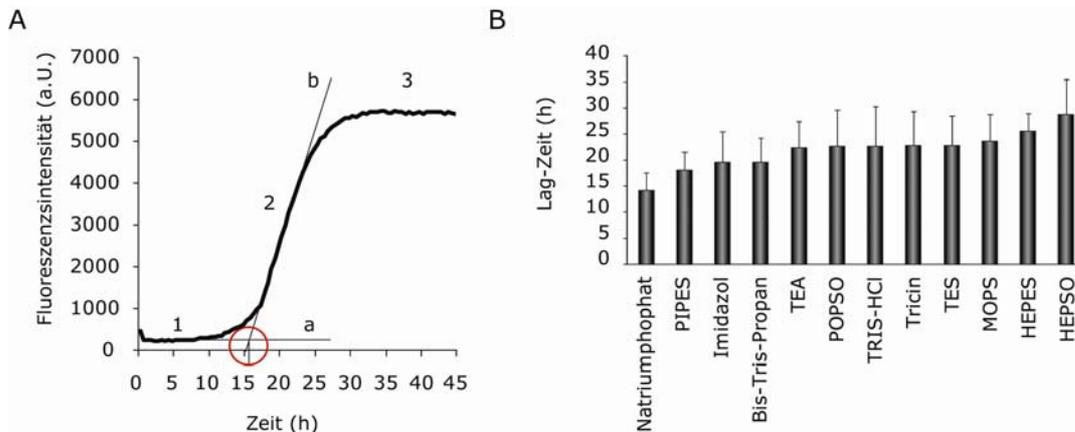


Bild 6.1: A $\beta$ -Aggregations-Kinetik in verschiedenen Puffersystemen.

(A) Beispiel einer ThT-Aggregations-Kurve mit manueller-graphischer Bestimmung der Lag-Zeit durch Schnittpunkt der Geraden a und b (roter Kreis). Eingezeichnet sind die Lag-Phase (1), die Elongationsphase (2) und die Plateauphase (3) der Kurve. (B) Lag-Zeiten der A $\beta$ -Aggregation in 50 mM des jeweiligen Puffers (pH 7,4) mit 50  $\mu$ M A $\beta$ (1-40), 10 mM Natriumazid und 20  $\mu$ M ThT, bei 37 °C (n = 24; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung).

Für alle zwölf Puffer wurden die Lag-Zeiten der A $\beta$ -Aggregation aus 24 Einzelmessungen der Aggregations-Kinetiken ermittelt. Sie sind in Bild 6.1.B vergleichend dargestellt. In Natriumphosphat-Puffer war die Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation mit 14 Stunden die kürzeste der verglichenen Puffersysteme. Mit mehr als 25 Stunden Lag-Zeit bildeten sich Nukleationskeime in den Puffersystemen HEPPO und HEPES deutlich später.

Mit Hilfe des Studenten-T-Test ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Lag-Zeiten in den verschiedenen Puffersystemen ermitteln. Diese sind aus Tabelle 6.2 ersichtlich. Auffallend ist, dass Natriumphosphat-Puffer deutlich abweichende Lag-Zeiten gegenüber sämtlichen anderen Puffern aufweist.

Tabelle 6.2: Signifikante Unterschiede zwischen den Lag-Zeiten der A $\beta$ -Aggregation.

	Puffer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Natriumphosphat		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	PIPES	*		-	-	*	*	*	*	*	*	*	*
3	Imidazol	*	-		-	-	-	-	-	-	*	*	*
4	Bis-Tris-Propan	*	-	-		-	-	-	-	-	*	*	*
5	TEA	*	*	-	-		-	-	-	-	-	*	*
6	POPSO	*	*	-	-	-		-	-	-	-	-	*
7	TRIS-HCl	*	-	-	-	-	-		-	-	-	*	*
8	Tricin	*	*	-	-	-	-	-		-	-	*	-
9	TES	*	*	-	-	-	-	-	-		-	*	*
10	MOPS	*	*	*	*	-	-	-	-	-		-	*
11	HEPES	*	*	*	*	*	-	-	-	*	-		-
12	HEPSO	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	

Kennzeichnung: (\*) Signifikanter Unterschied zwischen zwei Lag-Zeiten; (-) kein signifikanter Unterschied. (Die Signifikanz wurde mit  $p=0,05$  geprüft).

### 6.1.2 Einfluss des Puffersystems auf die Morphologie der A $\beta$ -Fibrillen

Um zu prüfen, welchen Effekt die Puffer-Umgebung auf die Morphologie der Fibrillen hat, wurde frisch aufgelöstes A $\beta$ (1-40) für zwei Wochen bei 37 °C in 50 mM des jeweiligen Puffers inkubiert. Der pH-Wert betrug für alle Puffer 7,4 und wurde unter Verwendung von Salzsäure und Natriumlauge eingestellt. Wie in Bild 6.2 zu erkennen ist, bildeten sich innerhalb dieses Zeitraumes in allen zwölf Puffersystemen A $\beta$ -Fibrillen. A $\beta$ -Fibrillen in den Puffersystemen Natriumphosphat, PIPES, POPSO, TEA und TRIS-HCl zeigten ausgeprägte, miteinander assoziierte Fibrillen-Bündel.

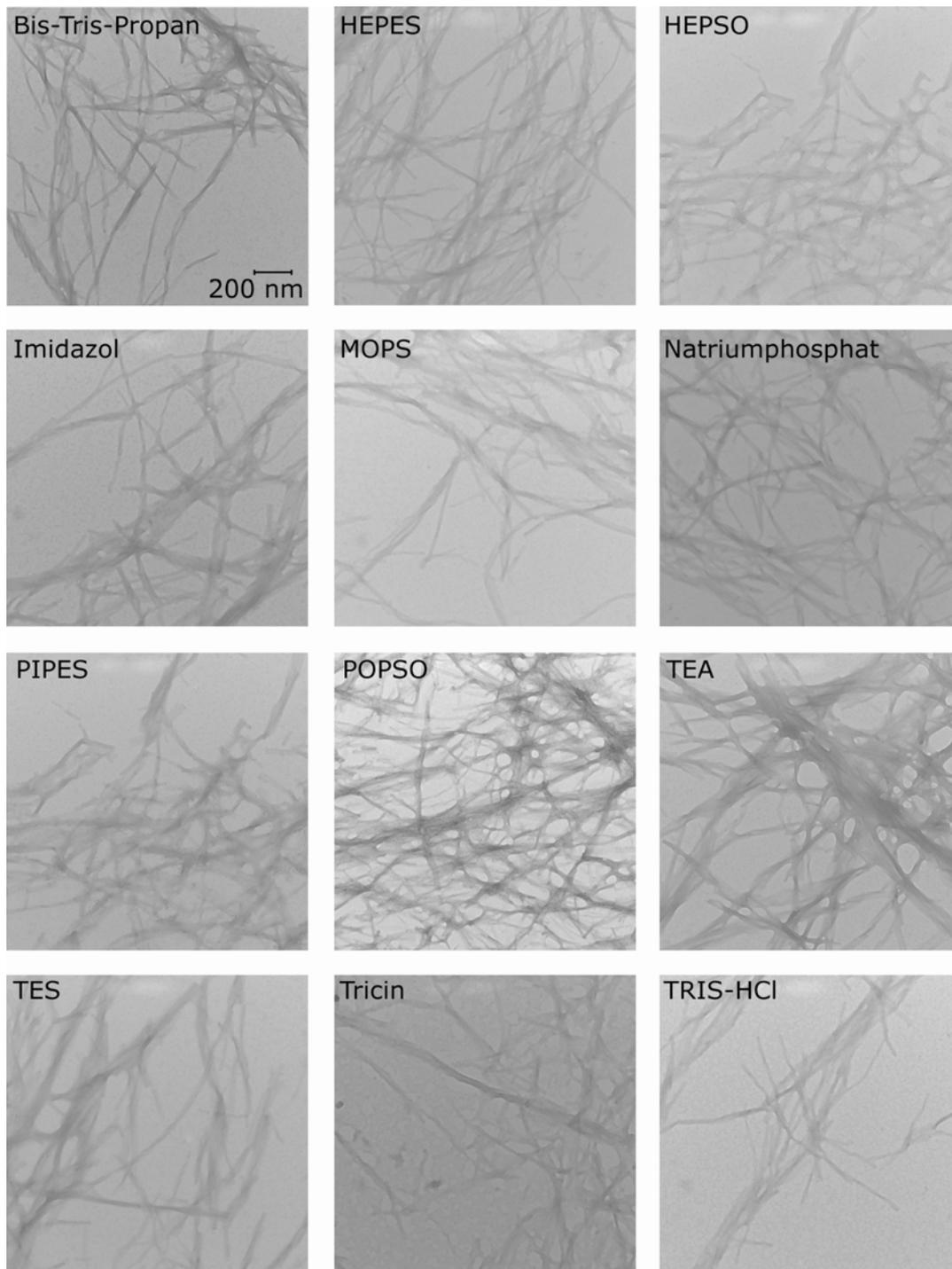


Bild 6.2: Morphologie der A $\beta$ -Fibrillen in verschiedenen Puffern.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von A $\beta$ -Fibrillen nach zwei Wochen Inkubation von je 50  $\mu$ M A $\beta$ (1-40) in 50 mM des jeweiligen Puffers bei 37 °C (Negativ-Kontrast-Färbung mit Uranylazetat).

Die morphologischen Unterschiede der gebildeten A $\beta$ -Fibrillen wurde an Hand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen genauer untersucht und die Dicke von 90 ausgewählten Fibrillen vermessen (Bild 6.3.A).

Die entstandenen A $\beta$ -Fibrillen zeigten in den 12 untersuchten Puffersystemen eine Dicke zwischen 19 nm und 32 nm. Die in POPSO gebildeten A $\beta$ -Fibrillen waren mit durchschnittlich 19 nm die dünnsten Fibrillen. Fibrillen mit einer mittleren Dicke von 32 nm entstanden in TRIS-HCL. In Natriumphosphat und HEPES gewachsene Fibrillen waren durchschnittlich 28 nm dick. Wie zuvor beschrieben, unterscheiden sich diese beiden Puffersysteme aber signifikant in der Lag-Zeit für die A $\beta$ -Aggregation.

Die signifikante Unterschiede zwischen der Dicke von A $\beta$ -Fibrillen findet sich für alle Puffer im Vergleich in Tabelle 6.3. Sie zeigt die Ergebnisse der Signifikanz-Prüfungen mit den Studenten-T-Test, die von jedem Puffersystem erstellt wurden.

Die Regressions-Analyse der Lag-Zeit mit der Fibrillen-Dicke wurde untersucht und ist im Diagramm in Bild 6.3.B dargestellt. Der ermittelte Korrelations-Koeffizienten von  $R=0,31$ , deutet nicht auf einen linearen Zusammenhang zwischen der Lag-Zeit und der Dicke von A $\beta$ -Fibrillen hin.

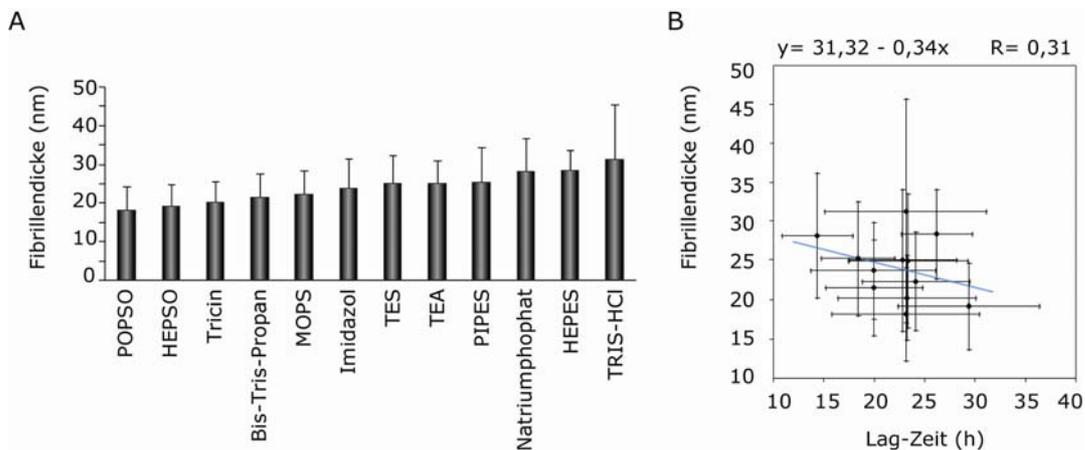


Bild 6.3: Dicke von A $\beta$ -Fibrillen in verschiedenen Puffersystemen.

(A) Dicke von A $\beta$ -Fibrillen, die in dem jeweiligen Puffer (Bedingungen siehe Bild 6.2) gewachsen sind ( $n = 90$ ; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). (B) Korrelation der Fibrillendicke ( $n = 90$ ) mit der Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation in den jeweiligen Puffersystemen ( $n = 24$ ; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung).

Tabelle 6.3: Signifikante Unterschiede in der Dicke von A $\beta$ -Fibrillen.

	Puffer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	POPSO		-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
2	HEPSO	-		-	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	Tricin	*	-		-	*	*	*	*	*	*	*	*
4	Bis-Tris-Propan	*	*	-		-	*	*	*	*	*	*	*
5	MOPS	*	*	*	-		-	*	*	*	*	*	*
6	Imidazol	*	*	*	*	-		-	-	-	*	*	*
7	TES	*	*	*	*	-	-		-	-	*	*	*
8	TEA	*	*	*	*	*	-	-		-	*	*	*
9	PIPES	*	*	*	*	*	-	-	-		*	*	*
10	Natriumphosphat	*	*	*	*	*	*	*	*	*		-	-
11	HEPES	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-		-
12	TRIS-HCl	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	

Kennzeichnung: (\*) Signifikanter Unterschied zwischen der Dicke von A $\beta$ -Fibrillen in den Puffersystemen; (-) kein signifikanter Unterschied (Die Signifikanz wurde mit  $p=0,05$  geprüft).

### 6.1.3 Vergleich der Puffereigenschaften mit der Lag-Zeit

Aufgrund der unter 6.1.1 beschriebenen Ergebnisse ergab sich die Frage, ob die unterschiedlichen Lag-Zeiten der A $\beta$ -Aggregation in einem direkten Zusammenhang mit den Eigenschaften der Puffersubstanzen stehen.

Zunächst wurden daher Parameter überprüft, welche die substanzspezifischen Eigenschaften der Puffer wiedergeben. Möglicherweise könnten intermolekulare Wechselwirkungen, die für die Aggregation von A $\beta$ -Monomeren eine Rolle spielen, durch die Größe der Puffer-Moleküle beeinflusst werden. Ebenso könnte die Säurekonstante (der pK<sub>s</sub>-Wert) Auswirkungen auf die Aggregation haben. Die Eigenschaften bzgl. dieser beiden Parameter sind im Anhang in Tabelle 8.1 aufgelistet.

Mit Hilfe der Regressionsanalyse wurde untersucht, in wieweit die Lag-Zeit mit dem Molekulargewicht (Bild 6.4.A) oder der Säurekonstante der Puffersubstanzen korreliert (Bild 6.4.B). Daraus ergab sich ein Korrelations-Koeffizient von R = 0,53 für das Molekulargewicht und von R=0,51 für die Säurekonstante. In beiden Fällen gibt es demnach keinen eindeutigen linearen Zusammenhang.

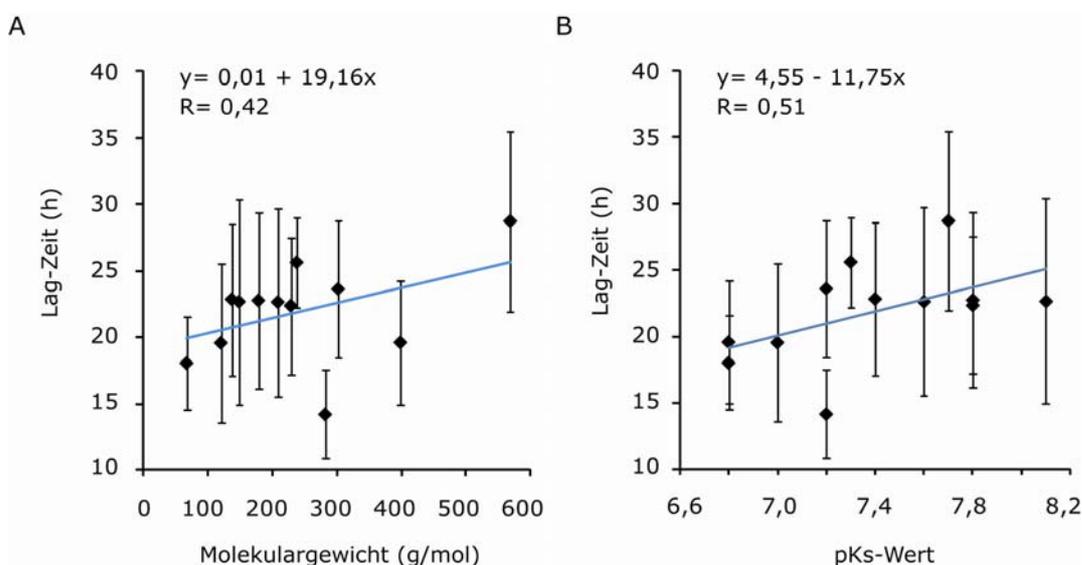


Bild 6.4: Vergleich der Lag-Zeit mit Eigenschaften der Puffersubstanzen

(A) Korrelation der Lag-Zeit (n = 24; Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung) mit dem jeweiligen Molekulargewicht (n = 1; ohne Fehlerbalken) der Puffersubstanzen. (B) Korrelation der Lag-Zeit (n = 24; Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung) mit den jeweiligen pK<sub>s</sub>-Werten (n = 1; ohne Fehlerbalken) der Puffersubstanzen. (Die Werte sind in Tabelle 8.1 und Tabelle 8.2 aufgeführt.)

Eine weitere biophysikalische Eigenschaft der Puffer ist ihre Oberflächenspannung. Es wurde gezeigt, dass Detergenzien, also Substanzen, welche die Oberflächenspannung herabsetzen, ebenfalls die Aggregation beeinflussen können {Sattarahmady *et al.*, 2008}. Daher wurde in einem weiteren Schritt geprüft, ob die Oberflächenspannung der Puffersysteme im Zusammenhang mit der Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation steht.

Dazu wurden zunächst die Oberflächenspannungen der Pufferlösungen experimentell bestimmt. Es wurden 1 M Pufferlösungen und ddH<sub>2</sub>O mit einem Tensiometer bei 22 °C vermessen. Der Literaturwert für Wasser beträgt 70 mN/m und konnte mit 70,4 mN/m bestätigt werden (Bild 6.5.A). Für den Puffer POPSO erfolgte aufgrund seiner geringen Löslichkeit (geringer als 1M in H<sub>2</sub>O) keine Messung.

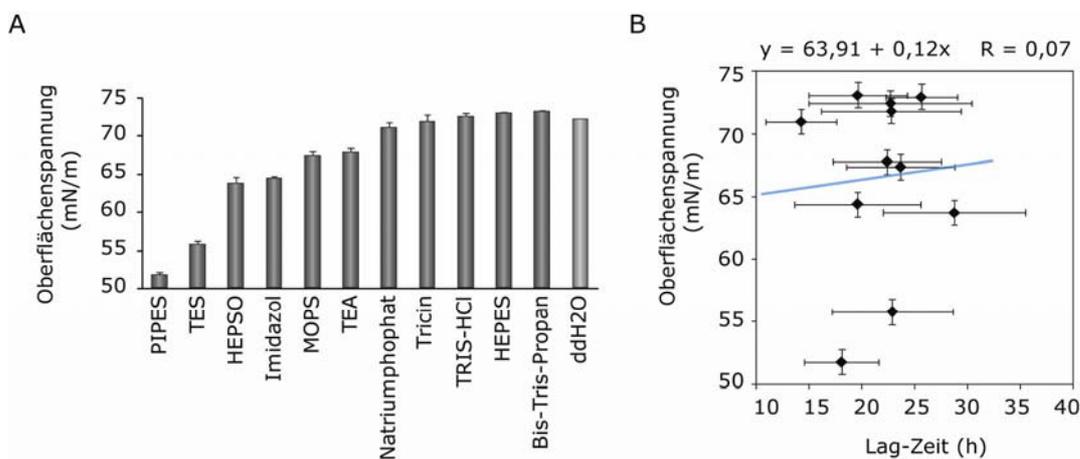


Bild 6.5: Oberflächenspannung der verwendeten Puffersysteme.

(A) Bestimmung der Oberflächenspannung von 1M Pufferlösungen und Wasser bei 22 °C (n = 30; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). (B) Korrelation der Lag-Zeit (n = 24; Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung) mit der Oberflächenspannung der jeweiligen der Puffersysteme (n = 30; Fehlerbalken entsprechen Standardabweichung).

Die Ergebnisse der Messung der Oberflächenspannung lassen sich in Bild 6.5.A und Tabelle 8.2 einsehen. Bis-Tris-Propan und HEPES zeigten mit 72 mN/m die höchste und PIPES mit 52 mN/m die niedrigste Oberflächenspannung. HEPES und HEPSO, welche beide zu einer ähnliche Lag-Zeit in der A $\beta$ -Aggregation führten, wiesen eine große Differenz bezüglich ihrer Oberflächenspannung auf. Wie die Regressions-Analyse und der errechnete Korrelations-Koeffizient von  $R = 0,07$  zeigte (Bild 6.5.B), besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Oberflächenspannung der Pufferlösungen und der Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation in diesen Puffern.

### 6.1.4 Abhängigkeit der Lag-Zeit von der A $\beta$ -Konzentration

Die Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation ist unmittelbar abhängig von der A $\beta$ -Konzentration {Nielsen *et al.*, 2001; Lomakin *et al.*, 1997}. Dieser Zusammenhang wurde für die Aggregation von A $\beta$ (1-40) in zwei ausgewählte Puffersysteme vergleichend untersucht. Da Natriumphosphat und HEPES jeweils eine besonders kurze bzw. lange Lag-Zeit zeigten, wurden sie daher für weitere Untersuchung als beispielhafte Puffersysteme ausgewählt. Obwohl HEPES die längste Lag-Zeit aufwies, erschien dieser Puffer aufgrund der großen Standardabweichung (siehe Bild 6.1.B) als ungeeignet. Die A $\beta$ -Aggregations-Kinetiken wurden bei gleichbleibender Pufferkonzentration (50 mM) und variierender A $\beta$ -Konzentration (5, 10, 25 und 50  $\mu$ M) durchgeführt.

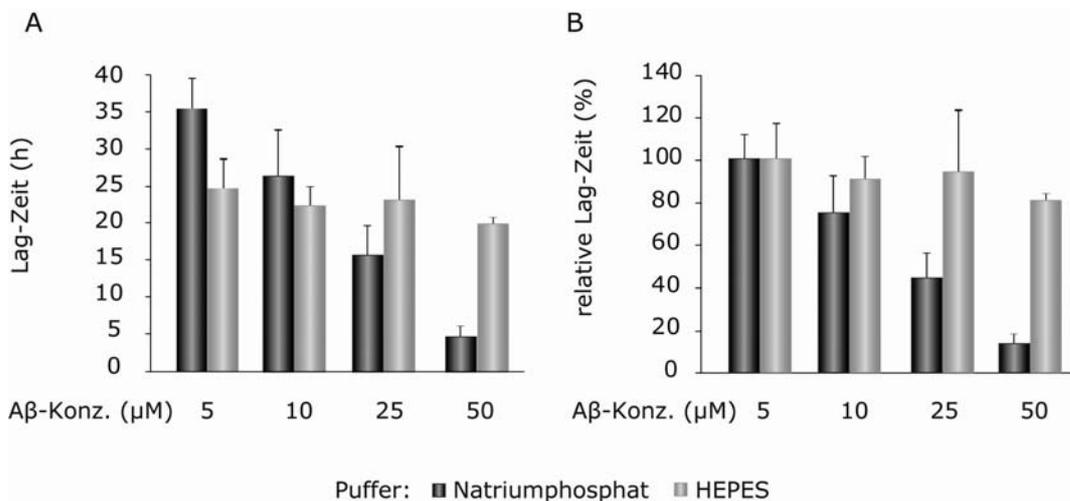


Bild 6.6: Abhängigkeit der Lag-Zeit von der A $\beta$ -Konzentration in zwei Puffersystemen

(A) Lag-Zeiten der A $\beta$ -Aggregations-Kinetiken bei verschiedener A $\beta$ -Konzentration in den Puffern Natriumphosphat oder HEPES (THT-Ansatz: 50 mM des jeweiligen Puffers bei pH 7,4; 10 mM Natriumazid; 20  $\mu$ M ThT, bei 37 °C und angegebener A $\beta$ -Konzentration); (n = 8; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). (B) Darstellung der Lag-Zeiten aus (A) als relative Lag-Zeiten, wobei die jeweils längste Lag-Zeit (bei 5  $\mu$ M A $\beta$ -Peptid) für jeden Puffer gleich 100 % gesetzt wurde.

Bei einer A $\beta$ -Konzentration von 50  $\mu$ M führten die beiden Puffersysteme zu deutlich unterschiedliche Lag-Zeiten (Bild 6.6). Die Lag-Zeit in Natriumphosphat-Puffer ist kürzer, als die in HEPES-Puffer. Bei einer geringeren A $\beta$ -Konzentrationen verlängerte sich in beiden Puffersystemen die Lag-Zeit. Dieser Effekt war im Natriumphosphat-Puffer sehr viel ausgeprägter als im HEPES-Puffer, so dass sich bei 5  $\mu$ M A $\beta$ -Konzentration ein umgekehrtes Verhältnis der Lag-Zeiten präsentierte. Die Lag-Zeit war bei dieser Konzentration im Natriumphosphat-Puffer länger (35 Stunden) als im HEPES-Puffer (25 Stunden).

In Bild 6.6.B wurde zum Vergleich jeweils die längste Lag-Zeit (bei 5  $\mu\text{M}$ ) in beiden Puffern mit 100 % gleichgesetzt. Deutlich erkennbar war die Abhängigkeit der Lag-Zeit von den untersuchten A $\beta$ -Konzentrationen in Natriumphosphat-Puffer. Eine Verdopplung der A $\beta$ -Konzentrationen von 5 auf 10  $\mu\text{M}$  reduzierte die Lag-Zeit in diesem Puffersystem auf 75 %; die fünffache Menge (25  $\mu\text{M}$ ) halbierte die Lag-Zeit. Die Unterschiede zwischen den Lag-Zeiten im HEPES-Puffer fallen dagegen geringer aus: so verkürzte sich hier bei der zehnfachen A $\beta$ -Konzentrationen die Lag-Zeit nur um 20 %.

Diese Daten geben einen ersten Hinweis auf die unterschiedlichen Auswirkungen der A $\beta$ -Konzentration in den beiden untersuchten Puffersystemen. Vor diesem Hintergrund ist es geboten, die Untersuchungen einerseits auf weitere A $\beta$ -Konzentrationen bis 150  $\mu\text{M}$  zu erweitern. Dabei sollte auch die genaue kritische Konzentration unter diesen Bedingungen bestimmt werden, um zu prüfen, ob die beschriebenen Effekte mit der kritischen Konzentration in Zusammenhang stehen. Diese liegt zwischen 10 und 40  $\mu\text{M}$  für A $\beta$ -Peptide {Harper und Lansbury, 1997}. Die Analyse der übrigen zehn Puffersysteme sollte andererseits zur weiteren Aufklärung der Zusammenhänge zwischen der Lag-Zeit und der A $\beta$ -Konzentration dienen.

### 6.1.5 Einfluss von Nukleationskeimen auf die Lag-Zeit

Die Zugabe vorgeformter Fibrillen zu Beginn einer Aggregations-Kinetik kann die Nukleation beschleunigen und die Lag-Zeit verkürzen {Jarrett *et al.*, 1993; Krebs *et al.*, 2004; Peim *et al.*, 2006; Vitrenko *et al.*, 2007; Harper *et al.*, 1997}. Dieser Effekt ist dabei umso stärker, je ähnlicher die zugegebene Vorlage den entstehenden Fibrillen ist {Sawaya *et al.*, 2007}.

Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, welchen Effekt die Zugabe von Nukleationskeimen auf die Aggregation in verschiedenen Puffersystemen hat. Die Untersuchung der A $\beta$ -Aggregations-Kinetiken wurde in 50 mM HEPES bzw. Natriumphosphat-Puffer durchgeführt. Als Nukleationskeime wurden *in vitro* gebildete A $\beta$ -Fibrillen verwendet, die in 50 mM HEPES bzw. Natriumphosphat-Puffer gewachsen waren. Bezogen auf die Endkonzentration des A $\beta$ -Peptids in der Aggregationskinetik wurden 5 % vorgeformte Fibrillen als Nukleationskeime zugegeben.

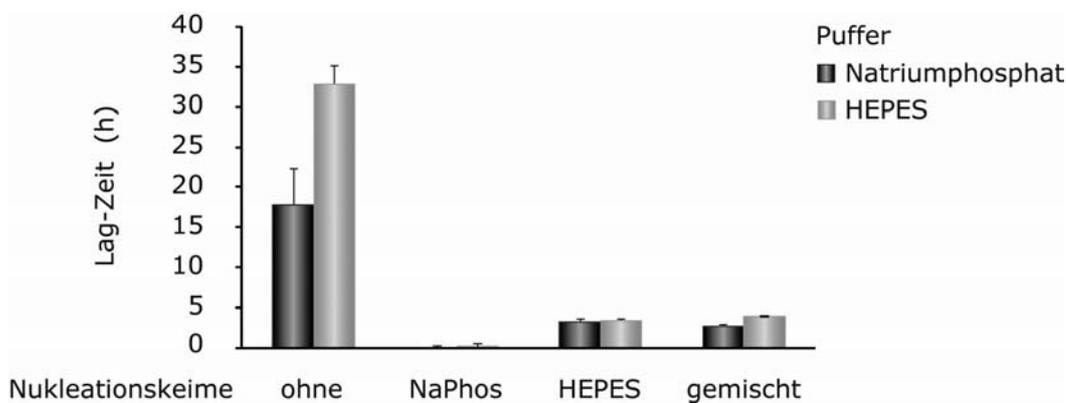


Bild 6.7: Einfluss von Nukleationskeimen auf die Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation

Lag-Zeiten der A $\beta$ -Aggregations-Kinetik in jeweils 50 mM Natriumphosphat bzw. HEPES. (THT-Ansatz: 50 mM Puffer bei pH 7,4; 10 mM Natriumazid; 20  $\mu$ M ThT, bei 37 °C und 50  $\mu$ M A $\beta$  A $\beta$ (1-40). Zugabe von 5  $\mu$ M A $\beta$ -Fibrillen als Nukleationskeime (entspricht 5 % der A $\beta$ -Konzentration). Herstellung der Nukleationskeime in 50 mM Natriumphosphat-Puffer (NaPhos) oder HEPES. Die (1:1)-Mischung dieser Fibrillen-Lösungen ergab die gemischten Nukleationskeime (gemischt). (n = 8; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung).

Bild 6.7 zeigt den Einfluss verschiedener Nukleationskeime auf die jeweiligen Lag-Zeiten der Aggregation in den beiden Puffern. In Aggregations-Kinetiken mit Natriumphosphat-Puffer verkürzte sich durch die Zugabe von Nukleationskeimen, welche in Natriumphosphat-Puffer gewachsen waren, die Lag-Zeit von 17 Stunden auf 12 Minuten. In Anwesenheit von Nukleationskeimen, die in HEPES entstanden waren, verringerte sich die Lag-Zeit auf 24 Minuten. Beide Nukleationskeime zusammen (im Verhältnis 1:1 gemischt) führten zu einer Lag-Zeit von 3 Stunden und zeigten damit einen weniger ausgeprägten Effekt als jeweils die homogenen Nukleationskeime. In Aggregations-Kinetiken mit HEPES verkürzte sich durch die Zugabe von Nukleationskeimen, welche in Natriumphosphat-Puffer gewachsen waren, die Lag-Zeit von 33 Stunden auf drei Stunden. Die Lag-Zeit reduzierte sich auf 3,5 Stunden, wenn die zugegebenen Nukleationskeime in HEPES gewachsen waren. Die Anwesenheit des Nukleationskeim-Gemisches reduzierte die Lag-Zeit in HEPES dagegen nur auf 4 Stunden.

A $\beta$ -Fibrillen, die in Natriumphosphat-Puffer gebildet wurden, hatten den stärksten Einfluss auf die Lag-Zeit in beiden Puffersystemen. Waren die Fibrillen dagegen in HEPES gewachsen oder wurden anschließend mit solchen Fibrillen gemischt, verringerte sich der Einfluss der Nukleationskeime auf die Lag-Zeit. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die in Natriumphosphat gebildeten A $\beta$ -Fibrillen eine Struktur besitzen, welche die Entstehung weiterer Fibrillen besonders begünstigt und sich dahingehend von der Struktur der Fibrillen aus HEPES unterscheidet. Detailliertere Untersuchungen der morphologischen Unterschiede zwischen den Fibrillen aus verschiedenen Puffersystemen sollten zu einer weiteren Klärung führen und ebenso wichtig ist auch hier die Analyse weiterer Puffersysteme.

## 6.2 Etablierung eines Zellkultur-Modells der Amyloid-Plaque-Bildung

Basierend auf dem Zellkultur-Modell der Gruppe Kluve-Beckermann {Kluve-Beckermann *et al.*, 1999} und der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Modelle mit humanen primären Makrophagen {Gellermann *et al.*, 2005; Gellermann *et al.*, 2006}, wurde ein optimiertes, auf Makrophagen basierendes Modell für die Entstehung von A $\beta$ -Amyloid entwickelt.

Die Modifizierung des ursprünglichen Systems war nötig, um die Reproduzierbarkeit der Plaue-Bildung zu erhöhen und weil das bisherige System, welches auf primären Makrophagen beruhte aufwendig zu bearbeiten war. Die Verwendung primärer (muriner und humaner) Makrophagen als amyloid-bildende Zellen war außerdem problematisch, da die Verunreinigung durch andere Zelltypen (z.B. Fibroblasten) nicht auszuschließen war, und ihre Anzahl, variierend mit jeder Aufreinigung, zu starken Schwankungen der Amyloid-Menge führten. Daher wurde eine stabile Zelllinie für das System gewählt. Die THP-1-Zelllinie entstammt menschlichen, leukämischen Blutzellen {Tsuchiya *et al.*, 1980} und stellt eine stabile Makrophagen-Linie dar. Mit dem THP-1-Zellsystem wurde eine Situation modelliert, in der gelöstes A $\beta$ (1-40)-Peptid mit den mononukleären, phagozytierenden Zellen in Kontakt gebracht wurde. Im Organismus gelangt das Alzheimer-Peptid A $\beta$ (1-40) durch neuronale Sekretion in den extrazellulären Raum (siehe auch Einleitung). Mit dem hier entwickelten Zellsystem konnten reproduzierbar amyloide A $\beta$ -Plaques generiert werden, welche sehr den pathologischen Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten ähnelten. Der Einsatz eines A $\beta$ -Peptid-basierten Systems ermöglichte außerdem einen direkten Vergleich mit den Daten des A $\beta$ -Modells zur Amyloid-Bildung, welches auf primären Makrophagen basiert {Gellermann *et al.*, 2006}.

Das hier beschriebene Zellkulturmodell wurde zusammen mit Ralf Friedrich entwickelt und publiziert {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010}. Für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge und der Interpretation meiner Daten sind in einigen Abschnitten experimentelle Daten aus den Arbeiten zu dem Manuskript übernommen worden. Diese Bilder sind entsprechend in der Bildbeschriftung gekennzeichnet.

### 6.2.1 Induktion der Plaque-Bildung in der Zellkultur

Zur Induktion der Plaque-Bildung wurden THP-1-Zellen ausgesät und mit frisch aufgelöstem A $\beta$ (1-40) Peptid inkubiert. Das folgende Schema (Bild 6.8) beschreibt den Ablauf der Plaque-Bildung in der Zellkultur.

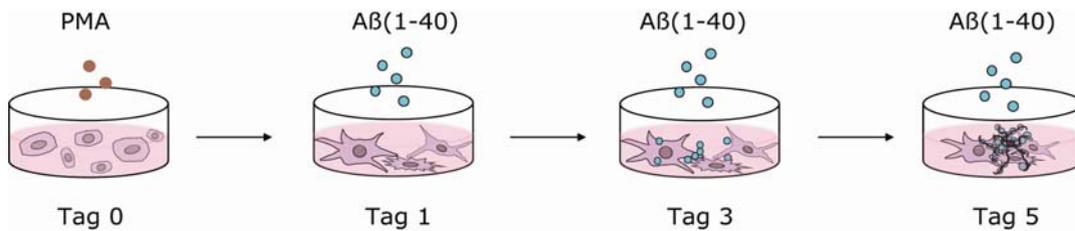


Bild 6.8: Schema des Zellkultur-Modells zur Plaque-Bildung

Bildung von amyloiden Plaques in der THP-1-Zellkultur. Die Zellen werden am Tag 0 durch Zugabe von PMA (braun) differenziert. Am Tag 1 wird frisch aufgelöstes A $\beta$ (1-40) Peptid (blau) mit dem Zellkulturmedium zugegeben und anschließend mit dem Medium an jedem zweiten Tag erneuert. Eine einmalige Zugabe von *in vitro* gebildeten A $\beta$ -Fibrillen als Nukleationskeime erfolgte an Tag 1.

THP-1 Zellen, die für mehrere Tage 14  $\mu$ M A $\beta$ (1-40) Peptid im Medium ausgesetzt wurden, entwickelten amyloide Plaques. Der Prozess der Plaque-Bildung war konzentrationsabhängig und nahm mit der Zeit zu. Es wurde eine Konzentration von 14  $\mu$ M A $\beta$ -Peptid im Medium gewählt, da die Entstehung von Plaques in der Kultur in weniger als einer Woche weit fortgeschritten war, aber die Zugabe von A $\beta$ -Peptid in den ersten Tagen nur einen geringen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hatte (siehe Abschnitt 6.5.3). Lyophilisiertes A $\beta$ (1-40) wurde in ddH<sub>2</sub>O (10 mg/ml) gelöst, für eine Minute Ultraschall ausgesetzt und für 10 Minuten zentrifugiert (16.000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge). Diese Schritte dienen zur Minimierung des Anteils voraggregierten A $\beta$ -Peptids. Das frisch aufgelöste A $\beta$ -Peptid wurde anschließend sofort mit Zellkulturmedium gemischt zu den Zellen gegeben. In Abhängigkeit von lebenden Zellen {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010} bildeten sich Plaques. Der Zellüberstand enthielt keine SDS-stabilen A $\beta$ -Aggregate, wie durch eine Kontrolle mit dem Filter-Retentions-Assay untersucht wurde (nicht gezeigt).

### 6.2.2 Amyloidnachweis mittels KR-grüner Doppelbrechung

Eine der Haupteigenschaften amyloider Plaques ist die charakteristische rot-grüne Doppelbrechung unter polarisiertem Licht bei der KR-Färbung, welche als typischer Nachweis für Amyloidosen dient. THP-1-Zellen, die für vier Tage mit A $\beta$ (1-40) inkubiert wurden, zeigten in der Polarisations-Mikroskopie nach KR-Färbung eine rot-grüne Doppelbrechung (Bild 6.9.A und B), die in unbehandelten Zellen nicht zu erkennen war (Bild 6.9.C und D). Das in der Zellkultur gebildete Amyloid war nach 4 Tagen bereits gut nachweisbar und mit dem Großteil der Zellen assoziiert.

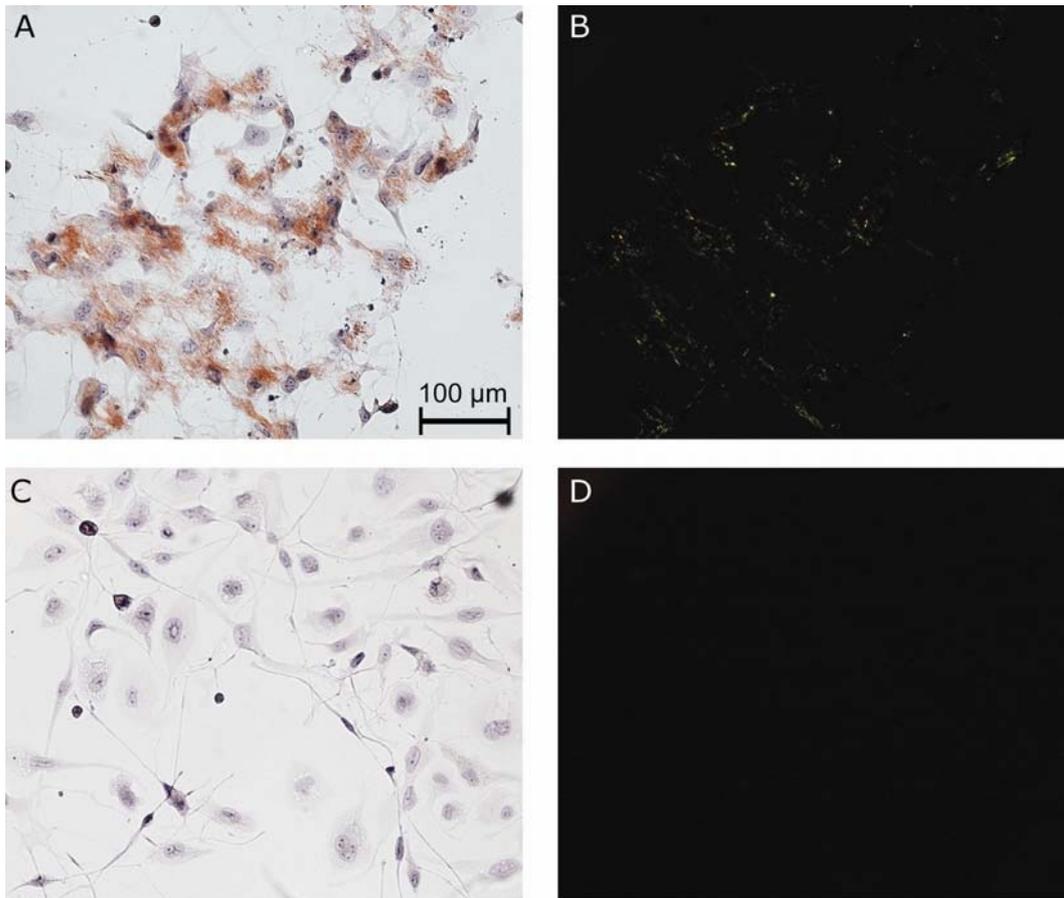


Bild 6.9: KR-Nachweis von Amyloid in THP-1-Zellen

(A-D) Polarisations-Mikroskop-Aufnahmen von THP-1-Zellen nach 4 Tagen. Hellfeld-Aufnahmen (A und C) und Dunkelfeld-Aufnahmen (B und D). Inkubation mit A $\beta$ (1-40) ist in A und B, Inkubation ohne A $\beta$ (1-40) in C und D gezeigt.

### 6.2.3 Amyloid-Nachweis mittels Filter-Retentions-Assay

Mit dem von E. Wanker entwickelten Filter-Retentions-Assay {Wanker *et al.*, 1999}, können SDS-stabile Amyloid-Ablagerungen identifiziert und quantifiziert werden. Dabei bildet eine Zellulose-Acetat-Membran den Filter, welcher die SDS-lysierten Proben passieren lässt, jedoch die SDS-stabilen Aggregate zurückhält (Retention). Die an der Membran zurückgehaltenen Aggregate werden über sequenzspezifische Antikörper nachgewiesen und die Signale densitrometrisch erfasst.

Das in der Zellkultur gebildete Material wurde durch den Filter-Retentions-Assay als A $\beta$ -Amyloid identifiziert (Bild 6.10). Die quantifizierte Plaque-Menge, welche THP-1-Zellen in 4 Tagen bildeten, ist im Diagramm (Bild 6.10.A) als maximal produzierte Plaque-Menge dargestellt. Die über den Säulen gezeigten Membran-Ausschnitte sind Beispiele für die Signale aus dem Filter-Retentions-Assay. Die Zugabe von KR, einem bekannten Inhibitor der Amyloid-Bildung {Gellermann *et al.*, 2005}, reduzierte die Amyloid-Bildung auf 20 %. Diese Reduktion durch einen Inhibitor belegte die Eignung des etablierten Zellkultur-Modells zur Untersuchung unbekannter Inhibitoren und Substanzen. Der Einfluss von Substanzen auf die Amyloid-Bildung konnte daher durch den Vergleich mit der maximal gebildeten Plaque-Menge untersucht werden.

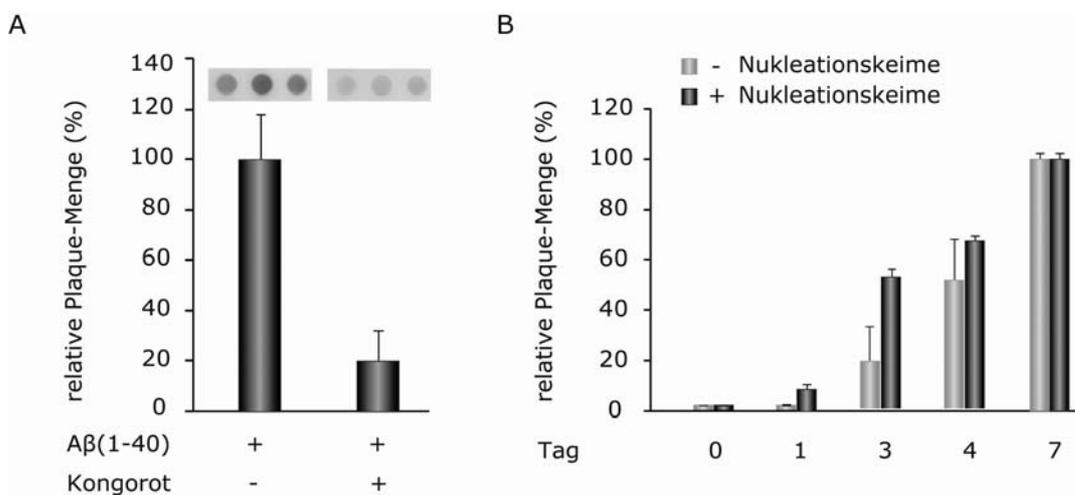


Bild 6.10: Nachweis amyloider Plaques mittels Filter-Retentions-Assay

(A) Quantifizierung des in der Zellkultur gebildeten und mittels Filter-Retentions-Assays nachgewiesenen A $\beta$ -Amyloids. Die nach 4 Tagen gebildete Amyloid-Menge wurde mit 100 % gleichgesetzt (linke Säule). Die Zugabe von 10  $\mu$ M KR reduzierte die gebildete Plaque-Menge (rechte Säule). Über den Säulen sind beispielhaft Signale aus dem Filter-Retentions-Assay gezeigt (n = 8; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). (B) In der Zellkultur gebildete Plaque-Mengen mit und ohne Nukleationskeime (*in vitro* gebildete A $\beta$ -Fibrillen; 0,5 ng/ml). Die produzierte Plaque-Menge an Tag 7 mit Nukleationskeimen wurde mit 100 % gleichgesetzt. (n = 6; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). Die Daten zu (B) stammen von R. Friedrich und das Diagramm wurde für {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010} erstellt.

Die einmalige Zugabe von *in vitro* gebildeten A $\beta$ -Fibrillen als Nukleationskeime beschleunigte die A $\beta$ -Amyloid-Bildung. THP-1-Zellen wurden dazu initial mit 0,5 ng/ml A $\beta$ -Fibrillen versetzt, was 0,2 % der totalen A $\beta$ -Menge im Medium entsprach (Zur Herstellung der Nukleationskeime siehe Abschnitt 5.3.7). Der Einfluss von Nukleationskeimen auf die Amyloid-Menge über einen Zeitraum von sieben Tagen ist in Bild 6.10.B gezeigt. Im Gegensatz zu Zellen ohne Nukleationskeime zeigten Zellen mit Nukleationskeimen neben einer beschleunigten Bildung von Amyloid auch eine geringere Standardabweichung der produzierten Plaque-Menge. Die Verwendung der *in vitro* gebildeten A $\beta$ -Fibrillen hatte zwar eine Beschleunigung und eine Steigerung der Gleichmäßigkeit der Amyloid-Bildung zum Ziel, nicht jedoch die prinzipielle Ermöglichung der Prozesse. Die einmalige Zugabe von Nukleationskeimen wurde daher in den folgenden Experimenten (in der Zellkultur) eingesetzt, um eine gleichmäßige und reproduzierbare Plaque-Bildung zu erreichen.

Nach einem Zeitraum von 7 Tagen war die von THP-1-Zellen gebildete Amyloid-Menge mit und ohne Nukleationskeimen gleich groß (Bild 6.10.B). Das zeigt, dass die Plaque-Bildung auch ohne Nukleationskeime stattfand. Die Bildung eines Nukleationskeimes unterliegt stochastischen Prozessen {Xue *et al.*, 2008}, daher ist die zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildete Amyloid-Menge Schwankungen unterworfen. Die Experimente zur Amyloid-Bildung wurden in Anwesenheit von Nukleationskeimen durchgeführt, um diese Schwankungen zu minimieren. Die Standardabweichung der in THP-1-Zellen gebildeten Plaque-Mengen, ließ sich dadurch auf  $\pm 10$  % reduzieren.

### 6.2.1 Nachweis sekundärer Komponenten

Glykosaminoglykane kommen in den extrazellulären Ablagerungen von Alzheimer Gehirnen vor und sind mit dem amyloiden Material assoziiert {Fukuchi *et al.*, 1998}. In dem hier etablierten Zellkultur-Modell wurde die Anwesenheit von Glykosaminoglykanen mit einer Alcianblau-Färbung nachgewiesen (Bild 6.11). 4 Tage nach der Induktion der Amyloid-Bildung in der Zellkultur zeigte sich eine starke Glykosaminoglykan-Färbung (Bild 6.11.A). Eine solche Färbung war bei unbehandelten Zellen nicht zu beobachten (Bild 6.11.B), die kaum eine blau angefärbt waren.

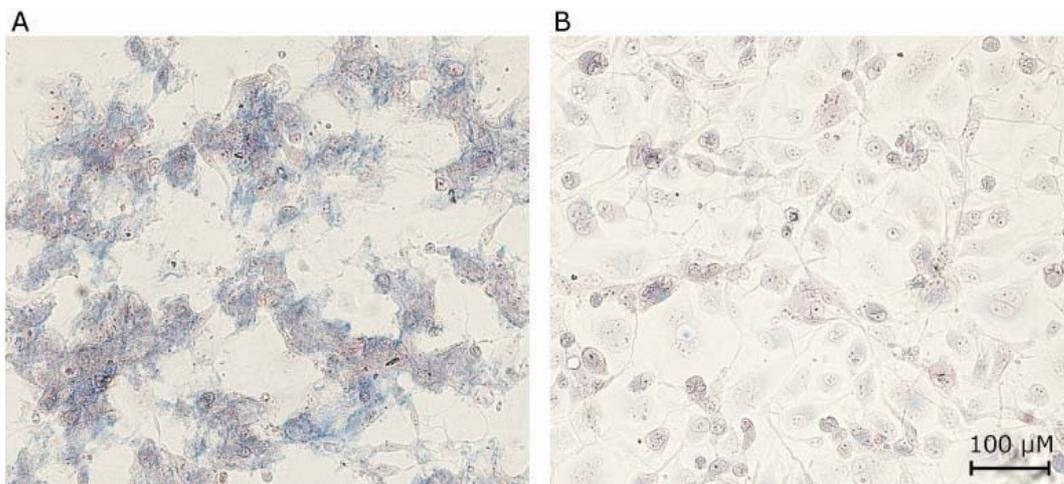


Bild 6.11: Glykosaminoglykan-Färbung

(A) Glykosaminoglykan-Färbung von THP-1-Zellen, die für 4 Tage mit A $\beta$ (1-40) inkubiert wurden. (B) Glykosaminoglykan-Färbung unbehandelter THP-1-Zellen nach 4 Tagen Inkubation.

### 6.2.2 Verlangsamte Plaque-Bildung von A $\beta$ (1-40)Val18Pro

Die A $\beta$ (1-40)Val18Pro-Mutante, bei welcher die 18. Aminosäure Valin durch Prolin ersetzt wurde, ist in ihrer Fähigkeit zur Aggregation *in vitro* stark eingeschränkt. Ihre kritische Konzentration ist gegenüber dem Wildtyp zweieinhalbfach erhöht und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen keine Fibrillen {Peim *et al.*, 2006}. Es wurde untersucht, inwiefern sich die A $\beta$ (1-40)Val18Pro-Mutante von dem Wildtyp-A $\beta$ (1-40)-Peptid in der Amyloid-Bildung in Zellen unterscheidet.

Dazu wurden neben der Induktion der Amyloid-Bildung durch A $\beta$ (1-40) auch Zellen mit der A $\beta$ (1-40)Val18Pro-Mutante in gleicher Konzentration (14  $\mu$ M) behandelt. Beide Ansätze wurden mit Nukleationskeimen (A $\beta$ (1-40)-Fibrillen) versetzt und für 4 Tage inkubiert. Die anschließende KR-Färbung zeigte eine starke Amyloid-Bildung für Zellen, die mit A $\beta$ (1-40) inkubiert worden waren (Bild 6.12.A und B). Dagegen waren für die A $\beta$ (1-40)Val18Pro-Mutante fast keine rot-grüne Doppelbrechung zu finden (Bild 6.12.C und D). Auch der Filter-Retentions-Assay bestätigte diesen Eindruck und zeigte für die A $\beta$ (1-40)Val18Pro-Mutante gegenüber dem Wildtyp-A $\beta$ -Peptid eine stark verminderte Plaque-Menge.

Die Fähigkeit zur Amyloid-Bildung in THP-1-Zellen ist für die hier untersuchte A $\beta$ (1-40)Val18Pro-Mutante stark vermindert. Das Ergebnis entspricht den Beobachtungen, die zuvor die verringerte Aggregations-Fähigkeit dieses Peptides *in vitro* beschrieben.

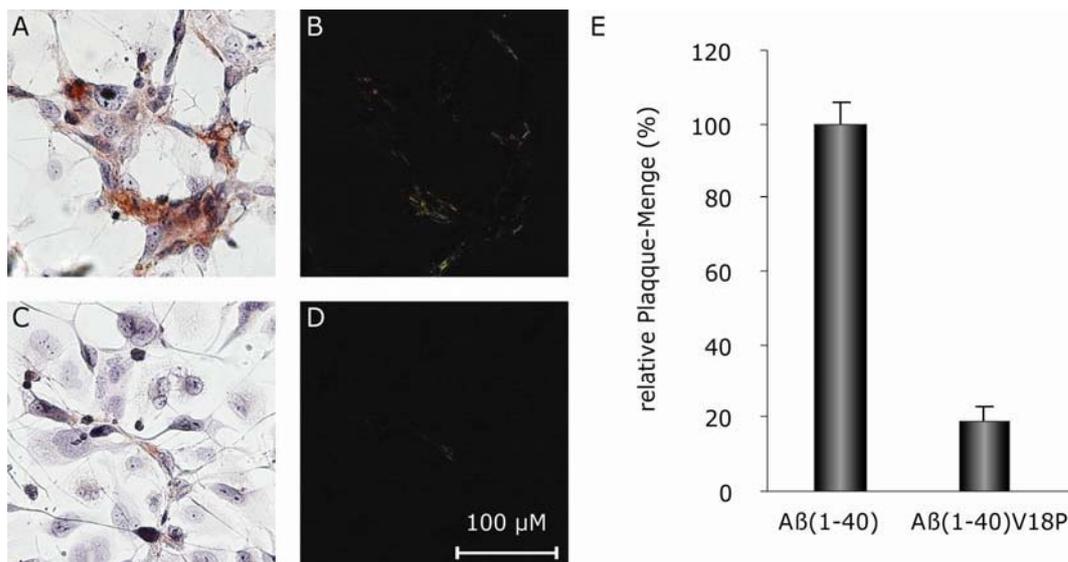


Bild 6.12: Amyloid-Bildung mit A $\beta$ (1-40)V18P-Mutante.

(A-D) KR-Färbung von THP-1-Zellen (A,C Hellfeld und B,D Dunkelfeld) nach 4 Tagen Inkubation mit A $\beta$ (1-40) (A,B) und A $\beta$ (1-40)Val18Pro (C,D). (E) Filter-Retentions-Assay von THP-1-Zellen nach vier Tagen Inkubation mit A $\beta$ (1-40) oder A $\beta$ (1-40)Val18Pro. Die mit A $\beta$ (1-40) gebildete Plaque-Menge wurde mit 100 % gleichgesetzt (n = 8; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung).

### 6.2.3 Durch die Plaque-Bildung induzierte Zell-Kumulation

Beobachtet man die Zell-Population während der Amyloid-Entstehung, fiel das Migrationsverhalten der einzelnen Zellen auf. THP-1-Zellen differenzierten nach Zugabe von PMA und adhärten gleichmäßig verteilt auf dem Untergrund (Bild 6.13.A). In Anwesenheit von A $\beta$ (1-40) begannen sie jedoch, sich während der Plaque-Bildung zu gruppieren und assoziieren (Bild 6.13.B). Dieser Prozess verstärkte sich mit der Zeit, so dass nach einer Woche kaum noch einzelne Zellen in der Kulturschale zu finden waren.

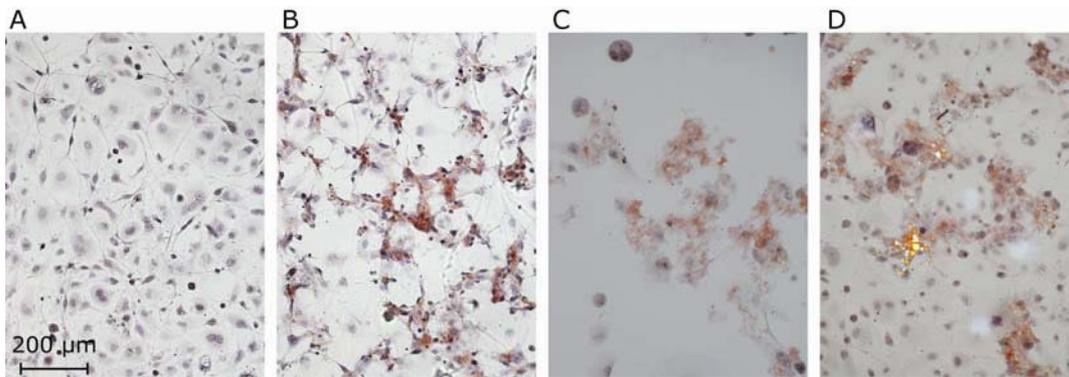


Bild 6.13: Zell-Kumulus-Bildung während der Amyloid-Bildung.

(A,B) KR-Färbung (nur Hellfeld gezeigt) von THP-1-Zellen nach 4 Tagen Inkubation ohne (A) und mit (B) A $\beta$ (1-40). (C) KR-Färbung von 8 Tage alten Amyloid-Plaques nach anschließender 4-tägiger Inkubation ohne weitere A $\beta$ -Zugaben. Die Plaques bleiben bestehen. (D) KR-Färbung von 8 Tage alten Amyloid-Plaques auf denen neue THP-1-Zellen ausgesät wurden, die anschließend für 4 weitere Tage ohne A $\beta$ -Zugaben inkubiert wurden. Diese Zellen wandern nicht zu den bereits bestehenden Amyloid-Plaques.

Die Kumulus-Bildung war nur während der Plaque-Bildung zu beobachten. Die Zellkumuli blieben bestehen, selbst wenn sie anschließend weiter inkubiert wurden, ohne dass dem Zellüberstand frisches A $\beta$ -Peptid zugegeben wurde (Bild 6.13.C). Wurden in einem nachfolgenden Versuch frische Zellen auf 8 Tage alte Amyloid-Plaques ausgesät, war kein derartiges Wanderverhalten der neuen Zellen zu beobachten (Bild 6.13.D). Die frisch ausgesäten Makrophagen verteilten sich gleichmäßig über die Zellkulturschale, ohne innerhalb der nachfolgenden Tage zu den bestehenden Plaques zu wandern.

Diese Beobachtungen führen zu der Schlussfolgerung, dass die gezielte Bewegung der Makrophagen nicht durch reife Amyloid-Plaques ausgelöst wird, sondern ein spezifisches Verhalten während der Amyloid-Bildungs-Phase ist.

Die Zellen bilden mit den amyloiden Ablagerungen einen sehr stabilen Komplex, welcher auch durch nachfolgende Medienwechsel und ohne weitere A $\beta$ -Zugaben bestehen bleiben.

Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen von THP-1-Zellen nach 6-tägiger Amyloid-Bildung belegten diese starke Assoziation zwischen Zellen und extrazellulären, fibrillären Strukturen (Bild 6.14). Die Zelloberfläche schließt unmittelbar an den amyloiden Plaque an, der sich durch seine fibrilläre Beschaffenheit klar von den Makrophagen unterscheidet in Bild 6.14.B rot eingefärbt wurde. Mit dem Amyloid-Plaque in Bild 6.14.A stehen zwei Makrophagen (blau eingefärbt) in Verbindung. Allerdings ist nicht erkennbar, ob beide Zellen durch Zellfortsätze in Kontakt mit dem Plaque stehen, oder eine amyloid-bildende Zelle mit einem Zellfortsatz zu einer weiteren Zelle Kontakt hat.

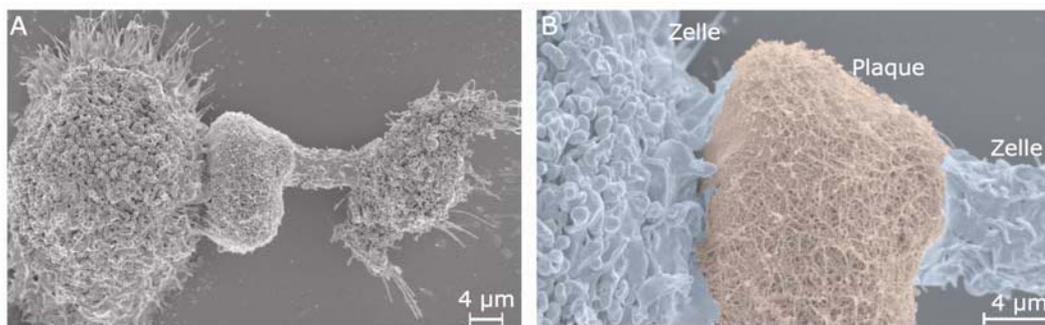


Bild 6.14: Ultrastruktur amyloider Plaques aus der Zellkultur.

(A,B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von THP-1-Zellen nach Inkubation mit A $\beta$ (1-40) für 6 Tage. Beide Aufnahmen zeigen dieselbe Zelle. (B) Eingefärbte Strukturen stellen die Makrophagen-Zellen (blau) mit assoziiertem, extrazellulärem Amyloid-Plaque (rot) dar.

*Die Aufnahmen stammen von M. Westermann (EMZ Jena).*

#### 6.2.4 Zusammensetzung der gebildeten Amyloid-Plaques

Die von THP-1-Zellen gebildeten A $\beta$ -Amyloid-Plaques wiesen wesentliche Merkmale der Alzheimer-Plaques auf. Es wurde weiter untersucht, ob die aus der Zellkultur gewonnenen Plaques auch nach der Aufreinigung noch die charakteristischen Eigenschaften des A $\beta$ -Amyloids besaßen. Die THP-1-Zellen wurden dazu für 13 Tage mit A $\beta$ (1-40) inkubiert und die entstandenen Amyloid-Plaques mechanischen vom Untergrund gelöst und in ddH $_2$ O aufgenommen. Mittels der KR-Trockenfärbung zeigte sich, dass der Amyloid-Nachweis mit KR-grüner Doppelbrechung im Polarisationsmikroskop auch nach der Aufreinigung positiv ist (Bild 6.15.A und B). Die elektronenmikroskopische Analyse belegte die fibrillären Eigenschaften des THP-1-Amyloid-Materials (Bild 6.15.C) nach der Präparation.

Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten intakte Fibrillen, welche während der Präparation erhalten blieben. Daneben waren hauptsächlich kleine Fragmente elektronendichter Substanz zu erkennen.

Um die aufgereinigte Menge des A $\beta$ -Peptids einzuschätzen, wurde das Zellkultur-Amyloid auf einem SDS-Gel mit A $\beta$ -Konzentrationen von 10 bis 100  $\mu$ M verglichen (nicht vollständig gezeigt). Die Ausschnitte dieses SDS-Gels (Bild 6.15.C) zeigen 0,65  $\mu$ g frisch aufgelöstes A $\beta$ (1-40) in Reihe 2 und das aus der Zellkultur stammende A $\beta$ -Peptid mit einer geschätzten Konzentration von 0,32 mg/ml (in Reihe 3). Dieser Wert ergab sich aus der densitrometrischen Auswertung und dem Vergleich der einzelnen A $\beta$ -Peptid-Banden mit einer A $\beta$ -Standardreihe auf dem SDS-Gel. Versuche zur Amyloid-Bildung in THP-1-Zellen, die für den gleichen Zeitraum mit der doppelten Konzentration des A $\beta$ -Peptids (28  $\mu$ M) inkubiert wurden, erbrachten keine größere Amyloid-Ausbeute (Daten nicht gezeigt). Mit den gewählten Kulturbedingungen von 14  $\mu$ M A $\beta$ (1-40) ist demnach die maximale Kapazität der Plaque-Bildung in THP-1-Zellen erreicht.

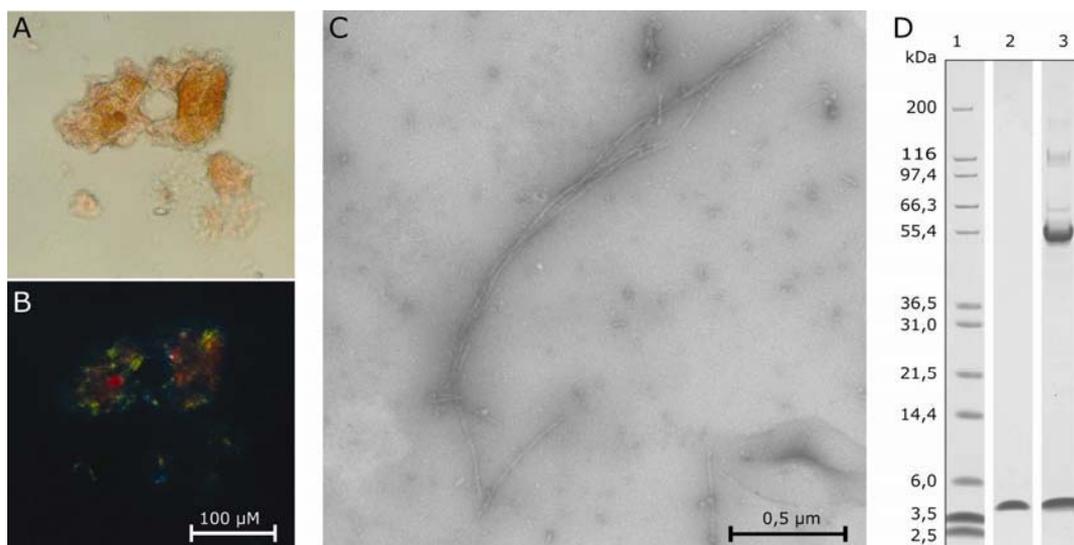


Bild 6.15: Charakterisierung von A $\beta$ -Amyloid aus THP-1-Zellen.

(A,B) KR-Trockenfärbung der aus THP-1-Zellen stammenden und aufgereinigten Amyloid-Plaques nach 13 Tage Inkubation. (C) Elektronenmikroskopische Aufnahme dieses amyloiden Materials nach Negativ-Kontrast-Färbung bei 20.000-facher Vergrößerung. (D) Ausschnitte eines SDS-Gels mit Proteinstandard M12 in Reihe (1), frisch aufgelöstes A $\beta$ -Peptids (0,65  $\mu$ M/Reihe) in (2) und dem extrahierten amyloiden Material in (3).

### 6.3 Bedeutung der Raft-Lipide in der A $\beta$ -Amyloid-Bildung in THP-1-Zellen

In der Alzheimer-Pathogenese spielen Mikrodomänen der Plasmamembran, die Lipid-Rafts, eine wichtige Rolle in der Prozessierung des A $\beta$ PP {Vetrivel *et al.*, 2000; Marlow *et al.*, 2003}. Unsere Arbeitsgruppe zeigte mit Hilfe des SAA-Zellkultur-Modells, dass eine Manipulation der Mikrodomänen Einfluss auf die gebildete Amyloid-Menge hat und eine Ko-Lokalisation zwischen dem SAA und Markern dieser Mikrodomänen existiert {Gellermann *et al.*, 2005}.

Da die Diskussion über die genaue Rolle der Raft-Lipide andauert, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die gewonnenen Erkenntnisse aus den vorangegangenen Zellkultur-Modellen in dem hier etablierte THP-1-Zellkultur-Modell zur A $\beta$ -Amyloid-Bildung bestätigen lassen.

Mit dem THP-1-Zellkultur-Modell konnte der Entstehungs-Prozess amyloider Plaques in humanen Makrophagen untersucht werden (siehe auch Abschnitt 6.2). Die mögliche Beteiligung der Raft-Lipide an der Amyloid-Bildung wurde mit Lokalisations-Studien (Abschnitt 6.3.2 und 6.3.3) und durch die Manipulation des Lipid-Metabolismus untersucht (Abschnitt 6.3.4 und 6.3.5). In einem weiterführenden Versuch wurden die Raft-Lipide in ihrer Eigenschaft als sekundäre Komponente amyloider Plaques {Gellermann *et al.*, 2005; Armstrong *et al.*, 2008} auf etwaige amyloid-stabilisierende Merkmale untersucht (Abschnitt 6.4).

#### 6.3.1 Etablierung der Lipid-Raft-Aufreinigung

Um eine mögliche Assoziation des A $\beta$ -Peptids mit Raft-Lipiden zu untersuchen, musste zunächst die Lipid-Raft-Aufreinigung für das amyloid-bildende THP-1-Zellkultur-System etabliert werden. Die Aufreinigung beruht auf der Unlöslichkeit von Raft-Lipiden gegenüber dem Detergenz Triton-X100 bei 4 °C {Bickel *et al.*, 1997} und ermöglicht es, durch Ultrazentrifugation eines Stufen-Dichte-Gradientens, Mikrodomänen aus Zellen oder Gewebe zu isolieren. Dazu wurde der postnukleäre Überstand adherent gewachsener THP-1-Zellen mit eiskaltem Triton-X100 inkubiert und zuunterst in einem dreistufigen Saccharose-Gradienten zentrifugiert. Die Mikrodomänen konzentrierten sich während der zwölfstündigen Ultrazentrifugation (18.7813 x g, bei 4 °C) im Gradienten an. Dieser wurde anschließend (von oben) in 12 Teile fraktioniert. Die Charakterisierung der Lipide dieser Fraktionen erfolgte durch eine Dünnschichtchromatographie.

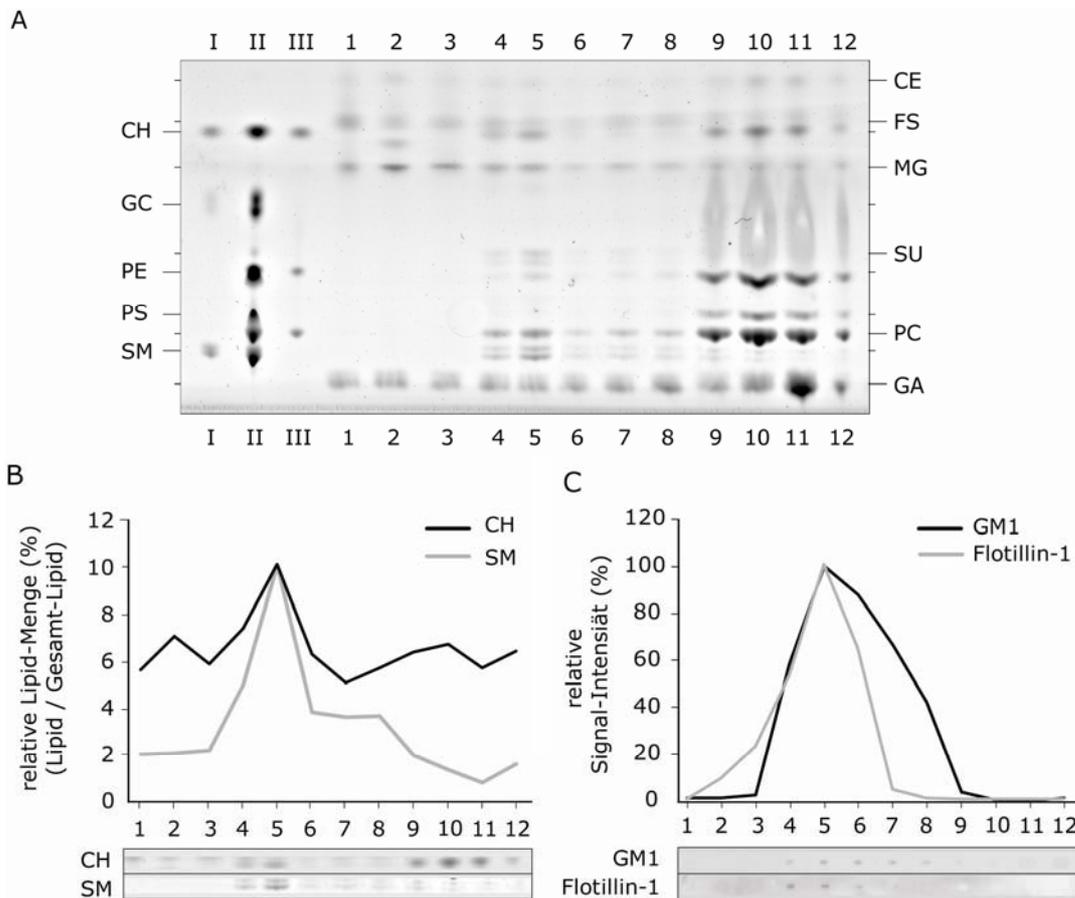


Bild 6.16: Charakterisierung der Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigung

(A) Dünnschichtchromatographie der extrahierten Lipide aus den 12 Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigung aus THP-1-Zellen nach 4 Tagen Inkubation. Lipid-Standards (I bis III) sind links an der TLC-Platte angezeigt, die über ihr Laufverhalten (Polarität) identifizierte Lipide rechts. *Abkürzungen der Lipide*: **CE**: Cholesterolester, **CH**: Cholesterin, **FS**: Fettsäuren, **GA**: Glykosaminoglykane, **GC**: Glycerin, **MG**: Monoglycerid, **PE**: Phosphatidylethanolamin, **PC**: Phosphatidylcholin, **PS**: Phosphatidylserin, **SM**: Sphingomyelin, **SU**: Sulfatide. (B) Quantifizierung der Lipid-Menge von Cholesterin bzw. Sphingomyelin bezogen auf die Gesamt-Lipid-Menge jeder Fraktion, welche je 100 % entspricht. Die entsprechenden Lipid-Banden sind als Ausschnitt unter dem Diagramm gezeigt. (C) Relative Verteilung der Raft-Marker Flotillin-1 und GM1 in den Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigung (siehe A). Das Diagramm zeigt die mittels Slot-Blot-Verfahren bestimmten Signal-Intensitäten jeder Fraktion, wobei jeweils der maximale Wert innerhalb der 12 Fraktionen gleich 100 % gesetzt wurde. Beispielhafter Ausschnitt des Slot-Blots ist unter dem Diagramm gezeigt.

Die Dünnschichtchromatographie in Bild 6.16 zeigt die Verteilung der Lipide aus den zwölf Fraktionen einer Raft-Aufreinigung aus THP-1-Zellen, die für 4 Tage inkubiert wurden. Die relative Häufung von Sphingomyelin (SM) und Cholesterol (CM) in den Fraktionen 4 und 5 ist typisch für Lipid-Rafts und lässt sich, wie in Bild 6.16.B gezeigt ist, durch den Vergleich der Lipide zur Gesamt-Lipidmenge auch quantitativ belegen. Ebenso charakteristisch ist die geringe Menge von Phospholipiden wie Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) in diesen Fraktionen, während ihr Anteil an der Gesamt-Lipidmenge in den Fraktionen 9 bis 12 deutlich erhöht ist. Neben diesen besonderen Lipid-Verhältnissen ist auch der Nachweis von Gangliosid GM1 und dem Protein Flotillin-1 ein Charakteristikum der Mikrodomänen. Diese Lipid-Raft-Marker wurden durch das Slot-Blot-Verfahren in den Fraktionen 4 bis 6 nachgewiesen. Das Auftreten der beiden Marker in den zwölf Fraktionen ist in Bild 6.16.C als Verteilung der gemessenen Blot-Signal-Intensitäten gezeigt. Weil der Nachweis im Slot-Blot-Verfahren in den Fraktionen 4 bis 6 zwar positiv für Flotillin-1 war, jedoch die Signal-Intensität schwach, wurden die Lipid-Rafts in weiteren Versuchen mit dem Nachweis von GM1 identifiziert.

Die Aufreinigung von Lipid-Rafts aus den THP-1-Zellen war damit erfolgreich etabliert. Die Fraktionen 4 bis 6 waren mit Cholesterol und Sphingomyelin angereichert und enthielten nachweislich die zwei Raft-Marker GM1 und Flotillin-1. Im folgenden werden die Fraktionen 4 bis 6 daher als Raft-Fraktionen bezeichnet werden.

### 6.3.2 Ko-Fraktionierung von A $\beta$ (1-40) und Lipid-Rafts

Gäbe es im Prozess der Plaque Entstehung eine direkte Interaktion mit den Mikrodomänen, so wäre zu erwarten, A $\beta$ (1-40) auch nach der Lipid-Raft-Aufreinigung in den entsprechenden Fraktionen zu finden. Um diese Annahme zu prüfen, wurden THP-1-Zellen für vier Tage mit frisch aufgelöstem A $\beta$ (1-40) (Lipid-Raft-Aufreinigung I) für wenige Minuten mit A $\beta$ (1-40) (II) oder für vier Tage mit *in vitro* gebildeten A $\beta$ -Fibrillen (III) inkubiert. Zusätzlich wurde A $\beta$ (1-40) ohne Zellen im RPMI-Kulturmedium für vier Tage inkubiert (IV) und entsprechend den Zellproben behandelt. Daraufhin erfolgte mit Hilfe des Slot-Blot-Verfahrens die Analyse der Verteilung des A $\beta$ -Peptids in den Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigungen I-V. Die Zellen, die in Aufreinigung I eingesetzt wurden, bildeten nachweislich amyloide Plaques (KR-Färbung, nicht gezeigt). Das Bild 6.17 zeigt für jede Aufreinigungen beispielhaft einen Slot-Blot-Ausschnitt. Die quantitative Analyse der Signal-Intensitäten aus den einzelnen Slot-Blots sind im Vergleich zueinander in drei Diagrammen dargestellt (Bild 6.17.B-D).

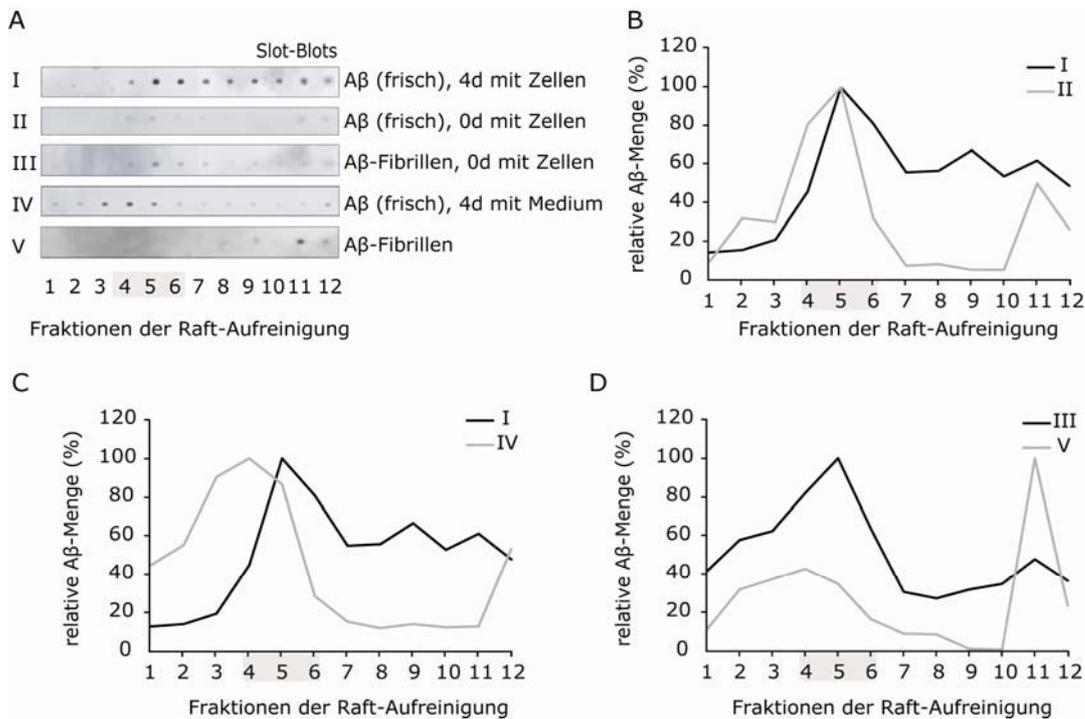


Bild 6.17: A $\beta$ -Verteilung in Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigung

(A) Slot-Blot der Fraktionen aus 5 verschiedenen Lipid-Raft-Aufreinigungen (Nachweis durch anti-A $\beta$ (1-16)). Ansätze I bis III mit THP-1-Zellen, IV und V ohne Zellen. Inkubationsdauer und Zugaben wie angegeben. 14  $\mu$ M A $\beta$ -Peptid wurde in den Ansätzen I-IV eingesetzt und 100  $\mu$ g A $\beta$ -Peptid direkt in den Gradienten V gegeben. (B-D) Die relative A $\beta$ -Menge wurde für alle Fraktionen der Aufreinigungen I-V aus den Slot-Blot-Signalen ermittelt, wobei der maximale A $\beta$ -Signal-Wert jeder Aufreinigung auf 100 % gesetzt wurde. Die Lipid-Raft-Fraktionen (4 bis 6) sind grau unterlegt.

Frisch aufgelöstes A $\beta$ (1-40), für vier Tage mit THP-1-Zellen inkubiert (I), fand sich nach der Aufreinigung deutlich konzentriert in den Raft-Fraktionen, wie in Bild 6.17.A im Slot-Blot dargestellt ist. Auch A $\beta$ -Peptid, welches frisch aufgelöst nur für wenige Minuten mit den Zellen in Kontakt kam (Bild 6.17.A, II), fand sich vermehrt in den Raft-Fraktionen (Bild 6.17.B). Aufgrund der niedrigeren Intensität des Signals, lässt sich schließen, dass die kurze Inkubation (wenigen Minuten) dem im Medium gelösten A $\beta$ -Peptid wenige Interaktionsmöglichkeiten mit zellulären Strukturen bot. Ebenfalls in der Raft-Fraktion lokalisiert waren A $\beta$ -Fibrillen, die für 0 Tage mit den THP-1-Zellen inkubiert worden waren (Bild 6.17.A, III). Diese Ko-Lokalisation von A $\beta$ (1-40) mit den Raft-Fraktionen scheint aber nur bedingt von Zellen abhängig zu sein, da eine viertätige Inkubation von A $\beta$ (1-40) ohne Zellen in der Zellkultur (Bild 6.17.A, IV) ebenfalls zu einer Lokalisation in den Raft-Fraktionen führte. Zwar ließ sich in diesem Fall die maximale A $\beta$ -Menge in Fraktion 4 und nicht in Fraktion 5 nachweisen (Bild 6.17.C), dennoch lagen für die Lipid-Raft-Aufreinigungen I-IV die Maxima alle in den Raft-Fraktionen.

*In vitro* gebildeten A $\beta$ -Fibrillen, welche direkt in die Lipid-Raft-Aufreinigung gegeben wurden (ohne vorherigen Kontakt zu Zellen oder Medium), fanden sich hauptsächlich in Fraktion 11 und 12 (Bild 6.17, V). In der Raft-Fraktion 4 ließ sich ein kleinerer Teil des A $\beta$ -Peptids (40 %) nachweisen. Die breite Streuung von A $\beta$ (1-40), die sich in der Aufreinigung I zeigte und neben den Raft-Fraktionen das Peptid auch in den nachfolgenden Fraktionen (8 bis 12) aufwies, war in Aufreinigung IV nicht zu beobachten (Bild 6.17.C). Eine mögliche Erklärung für diese Streuung hängt mit der Diversität der entstandenen A $\beta$ -Aggregaten in Aufreinigung I zusammen, denn die entsprechende Inkubation (III) mit *in vitro* geformten A $\beta$ -Fibrillen zeigte eine klare Lokalisation in den Raft-Fraktion (Bild 6.17.D).

Die Ko-Fraktionierung von A $\beta$ (1-40) und Lipid-Rafts, die sich bei der Aufreinigung der Lipid-Rafts aus amyloid-bildenden THP-1-Zellen zeigte, beruht nicht auf einer ausschließlich physiologischen Interaktionen zwischen A $\beta$ -Peptid und den Mikrodomänen. Denn auch ohne die Beteiligung der Zellen ko-fraktioniert A $\beta$ -Peptid mit den Lipid-Rafts, wobei die spezielle Verteilung des A $\beta$ -Peptids auf die Fraktionen der Aufreinigung auf die vorhergehende Interaktion mit Zellen zurückzuführen ist. Die bestehende Interaktionen zwischen Lipid-Rafts und A $\beta$ (1-40), die besonders durch den Vergleich zwischen der Aufreinigung III und V (Bild 6.17.D) ersichtlich wird, könnte also auf einer nicht physiologischen Assoziation des A $\beta$ -Peptids mit zellulären Strukturen beruhen. Allerdings ist eine ähnliche Affinität zwischen Bestandteilen des Zellkulturmediums und des A $\beta$ -Peptids gegeben, wie die Aufreinigung IV zeigte. Eine Bindung von A $\beta$ (1-40) an den Lipid-Raft-Marker GM1, wie sie in der Literatur beschrieben wurde {Yamamoto *et al.*, 2007; Kimura und Yanagisawa, 2007}, könnte sowohl intrazellulär (wie in Aufreinigung I), als auch während der Aufreinigung entstehen.

### 6.3.3 Immunfluoreszenz-Studie zur Lokalisation von A $\beta$ und Lipid-Raft-Markern

Als nächstes wurden Interaktionen zwischen A $\beta$ (1-40) und Lipid-Raft-Markern in THP-1-Zellen durch Immunfluoreszenz untersucht. Für das SAA-Modellsystem konnten eine Übereinstimmungen zwischen SAA und dem Lipid-Raft-Marker GM1 gezeigt werden {Gellermann *et al.*, 2005}. In dieser Arbeit wurde die Lokalisation der zwei Lipid-Raft-Marker Flotillin-1 und GM1 in THP-1-Zellen nach Zugabe von A $\beta$ (1-40) analysiert. Die THP-1-Zellen wurden dazu für 15 Minuten mit A $\beta$ (1-40) inkubiert und die A $\beta$ -Lokalisation anschließend mit den Lipid-Raft-Markern verglichen. Bild 6.18 enthält die Immunfluoreszenz-Aufnahmen zu diesen Untersuchungen. Das A $\beta$ -Peptid zeigte sich als punktförmige Färbung in der gesamten Zelle (Bild 6.18.A und D) Die Lipid-Raft-Marker wiesen ebenfalls eine punktförmige Färbung auf, die verstärkt an der Zellmembran lokalisiert war (Bild 6.18.B für GM1 und E für Flotillin-1). Die Überlagerung beider Aufnahmen und einer Aufnahme der Zelle mit dem Kernfarbstoff

Hoechst zeigte keine vermischten Signale zwischen A $\beta$ (1-40) und GM1 (Bild 6.18.C). Der Lipid-Raft-Marker Flotillin-1 (Bild 6.18.C und F) ko-lokalisierte ebenfalls nicht mit dem A $\beta$ -Peptid. Auch Untersuchungen zu weiteren Zeitpunkten der A $\beta$ -Inkubation (1-30 Minuten und bis zu 2 Tagen, Daten nicht gezeigt) wiesen keine Ko-Lokalisation zwischen den Raft-Markern und A $\beta$ (1-40) auf.

Das Ergebnis dieser Analysen war daher die Schlussfolgerung, dass in dem Zellkultur-System zur Amyloid-Bildung in THP-1-Zellen die Aufnahme des A $\beta$ -Peptids ohne eine nachweisbare Interaktion mit den charakteristischen Bestandteilen der Lipid-Rafts (Flotillin-1 und GM1) stattfand.

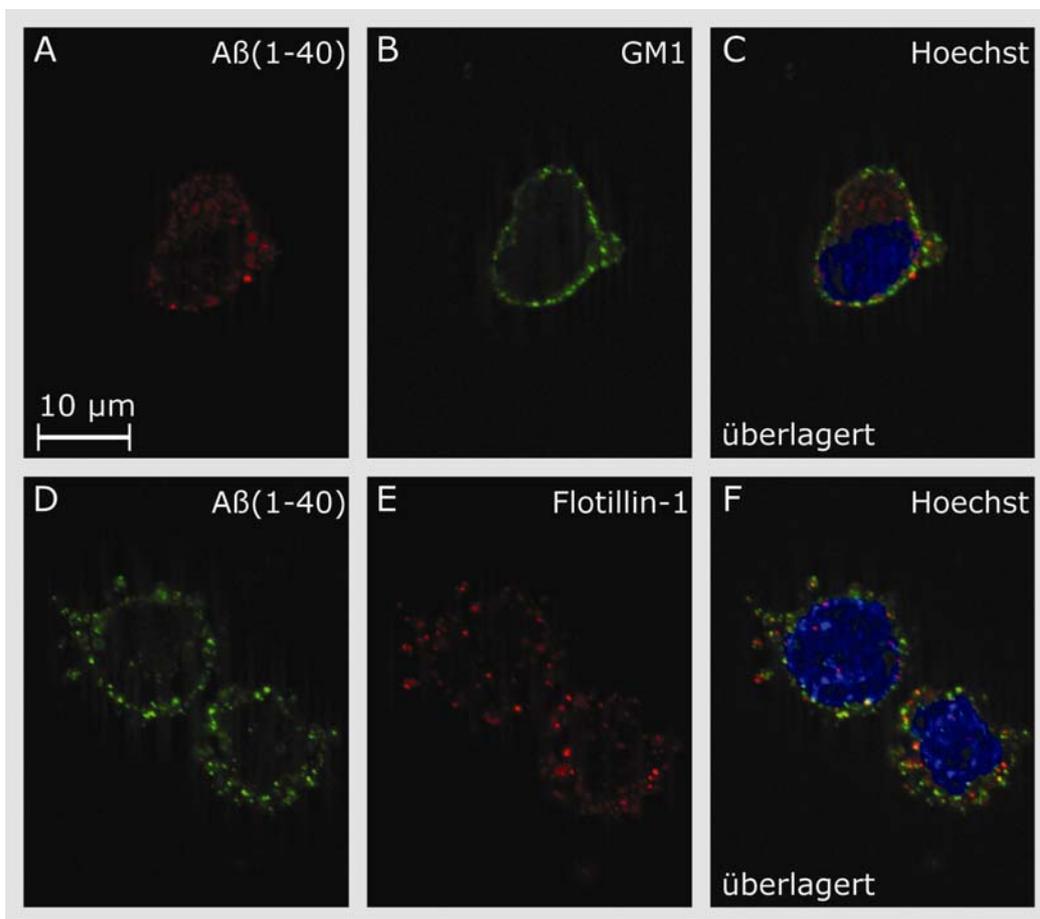


Bild 6.18: Ko-Lokalisations-Studie von A $\beta$ (1-40) und Lipid-Raft-Markern in THP-1-Zellen

(A-F) Immunfluoreszenz-Färbung von THP-1-Zellen nach 15 Minuten Inkubation mit A $\beta$ (1-40). Dargestellt ist A $\beta$ (1-40) in (A) und (D) (anti-A $\beta$ (1-16); anti-Maus-Cy3 bzw. anti-Maus-FITC). Die Lipid-Rafts wurden in (B) mit GM1 (Choleratoxin-B-FITC) und in E mit Flotillin-1 (anti-Flotillin-1; anti-Maus-Cy3) nachgewiesen. (C,F) Die Zellkerne wurden mit Hoechst H33342 angefärbt. (C,F) Überlagerte Bilder aus A und B, bzw. D und E. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden mit dem Axiovert 200 Apotome (Zeiss) aufgenommen.

### 6.3.4 Amyloid-Bildung in Gegenwart von Lipidmetabolismus-Inhibitoren

Als drittes wurde untersucht, ob ein intakter Lipidmetabolismus für die Plaque-Bildung notwendig ist, auch wenn keine physiologischen Interaktionen zwischen den Raft-Lipiden nachgewiesen wurden (siehe vorherige Abschnitte). Hierzu wurden in dem THP-1-Zellkultur-System der Metabolismus der Mikrodomänen durch die Zugabe von Substanzen gestört und die Auswirkung auf die Entstehung von Amyloid verfolgt.

Die verwendeten Substanzen sind in Tabelle 6.4 aufgelistet. Amphotericin B bildet Poren in der Plasmamembran. Lovastatin, BM 15.766, Filipin und Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin vermindern den Cholesterolgehalt in der Plasmamembran und verändern damit maßgeblich die Zusammensetzung der Mikrodomänen. Während Lova und BM 15.766 den Metabolismus und Transport des Cholesterols hemmen, ersetzt Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin das vorhandene Cholesterol des äußeren Membranblattes. Ein zweiter Angriffspunkt, um die Lipid-Rafts in der Zellmembran zu beeinflussen ist die Synthese des Sphingomyelins, ebenfalls ein essentielles Lipid der Lipid-Rafts. Der Wirkstoff Myriocin hemmt den initialen Schritt der Sphingomyelin-Synthese.

KR, ein bekannter Inhibitor der amyloiden Plaque-Bildung, wurde zum Vergleich als Nachweis der inhibitorischen Wirkung eingesetzt (10  $\mu$ M).

Tabelle 6.4: Inhibitoren des Lipidmetabolismus

Substanz	Beschriebene Wirkung	Konzentration im Medium
Amphotericin B (AmB)	Porenbildner in der Plasmamembran; verlangsamt Prionen-Erkrankungen und bindet an A $\beta$ -Fibrillen {Hartsel und Weiland, 2003; Bolard, 1986}	50 mM
BM 15.766 (BM)	Inhibitor der Cholesterol-Biosynthese {Aufenanger <i>et al.</i> , 1985}	10 $\mu$ M
Filipin (Fil)	Hemmt die Sterolbindung im ER und stört damit den Transport von Cholesterol an die Plasmamembran {Schnitzer <i>et al.</i> , 1994}	10 $\mu$ M
Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD)	Ersetzt Cholesterol im äußeren Blatt der Plasmamembran {Rodal <i>et al.</i> , 1999}	10 mM
Myriocin (My)	Inhibiert den initialen Schritt der Sphingomyelin-Synthese {Miyake <i>et al.</i> , 1995}	10 $\mu$ M
Lovastatin (Lov)	Hemmt die HMG-CoA-Reduktase und damit die Cholesterol-Synthese {Eghdamian und Ghose, 1998}	10 $\mu$ M

Die Substanzen wurden jeweils in den angegebenen Konzentrationen, während der gleichzeitigen Inkubation mit A $\beta$ (1-40), zu den THP-1-Zellen gegeben. Die Konzentration von 10  $\mu$ M der zu testenden Substanz wurde wegen der Vergleichbarkeit und bereits publizierter Angaben zur Wirkung gewählt. Für Amphotericin B und Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin wurde eine höhere Konzentration gewählt, da deren Wirksamkeit bei einer 10  $\mu$ M Konzentration nicht belegt sind.

Die gebildete Amyloid-Menge war in Anwesenheit der zugegebenen Substanzen, welche den Lipidmetabolismus beeinträchtigen in keinem Fall signifikant verschieden (Bild 6.19). Die reduzierte Plaque-Menge bei Zugabe von KR bestätigte die Sensitivität der Nachweis-Methode.

Die Inkubation der Substanzen vor dem Beginn der Amyloid-Bildung zeigte ebenfalls keine Unterschiede zur Plaque-Bildung in Abwesenheit von Inhibitoren des Lipidmetabolismus (Daten nicht gezeigt). Zum Beispiel hatte die Zugabe von Myriocin für 2 Tage beispielsweise keine Auswirkungen auf die nachfolgende viertägige Amyloid-Bildung. Für den Sphingomyelin-Synthese-Inhibitor Myriocin wurde die Reduktion der Sphingomyelin-Menge in einer TLC für das THP-1-Zellsystem gezeigt (nicht gezeigt). Diese Daten lassen daher die Schlussfolgerung zu, dass die Beeinflussung der Mikrodomänen in THP-1-Zellen keine unmittelbaren Effekte auf die gebildete Amyloid-Menge haben.

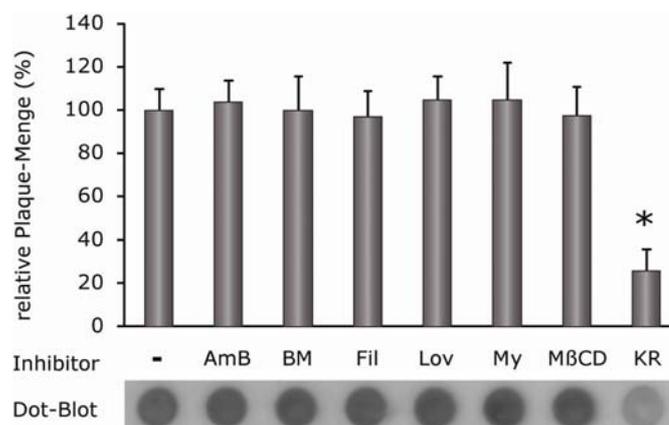


Bild 6.19: Einfluss von Raft-Lipid-Inhibitoren auf die Amyloid-Bildung

Gebildete Amyloid-Menge in THP-1-Zellen nach viertägiger Inkubation mit A $\beta$ (1-40) und den angezeigten Substanzen (siehe Tabelle 6.4). Beispielhaft ist jeweils ein entsprechender Dot-Blot-Ausschnitt unter dem Diagramm gezeigt. Die von THP-1-Zellen ohne Inhibitoren gebildete Amyloid-Menge wurde mit 100 % gleichgesetzt (n = 16; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; \* Signifikanz (p=0,05) wurde jeweils gegenüber THP-1-Zellen ohne Inhibitoren geprüft).

### 6.3.5 Einfluss intrazellulärer Lipid-Ansammlung auf die Amyloid-Bildung

Neben der Reduktion von Sphingomyelin oder Cholesterol, stellt die massive Anreicherung von Lipiden eine weitere Manipulation des Lipidmetabolismus der Zelle dar. Durch die Aufnahme von azetyliertem *Low Density Lipoprotein* (acLDL) verwandeln sich Makrophagen in sogenannte Schaumzellen, deren Zytoplasma mit Lipidtropfen angereichert ist {Mori *et al.*, 2001}. Es sollte daher näher geprüft werden, ob sich durch die intrazelluläre Lipid-Ansammlung in THP-1-Schaumzellen die Fähigkeit zur Amyloid-Bildung verändert.

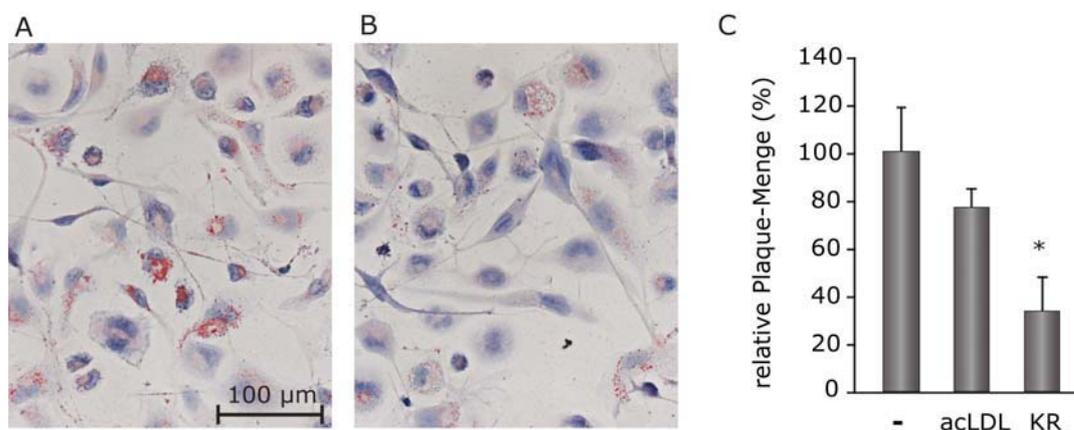


Bild 6.20: Einfluss intrazellulärer Lipid-Ansammlungen auf die Amyloid-Bildung.

(A) Lichtmikroskopische Aufnahmen der Lipid-Färbung von THP-1-Zellen nach 2 Tagen Inkubation mit 50 µg/ml acLDL. Lipid Ansammlungen zeigen sich durch eine starke intrazelluläre Rotfärbung. (B) Lipid-Färbung un behandelter Zellen nach 2 Tagen Inkubation. (C) Durch THP-1-Zellen gebildete Amyloid-Menge nach 2 Tagen Inkubation mit A $\beta$ (1-40) wurde mit 100 % gleichgesetzt. Plaque-Menge bei zusätzlicher Inkubation mit 50 µg/ml acLDL oder 10 µM KR (n = 8; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; die \* Signifikanz (p=0,05) wurde jeweils gegenüber THP-1-Zellen ohne weitere Zusätze geprüft).

Dazu wurden zunächst THP-1-Zellen zu Schaumzellen transformiert, indem sie für zwei Tagen mit 50 µg/ml acLDL inkubiert wurden. Die erfolgreiche Schaumzell-Bildung zeigte sich durch eine deutliche Ansammlung intrazellulärer Lipide in Form roter Tropfen in der Lipid-Färbung (Bild 6.20.A). Unbehandelte THP-1-Zellen (Bild 6.20.B) zeigten keine massive Rot-Färbung von Zellen, sondern nur vereinzelt kleinere Lipidtropfen in manchen Zellen (Bild 6.20.B). Amyloid-produzierende THP-1-Zellen, die durch zeitgleiche Zugabe von 50 µg/ml acLDL in Schaumzellen transformiert wurden, zeigten keine signifikante Änderung der Plaque-Menge gegenüber un behandelten THP-1-Zellen (Bild 6.20.C). Auch geringere Konzentrationen des acLDL oder eine kürzere Inkubationszeit (1 Tag) zeigten keine Unterschiede in der produzierte Plaque-Menge (Daten nicht gezeigt).

Der fehlende Unterschied bezüglich der gebildeten Plaque-Menge von THP-1-Zellen und THP-1-Schaumzellen lässt darauf schließen, dass die vermehrte Anwesenheit intrazellulärer Lipidtropfen keinen Einfluss auf die Amyloid-Bildung hat.

Die Hypothese, dass die Raft Lipide durch ihre Rolle als sekundäre Komponenten auch eine allgemein gültige und generelle Bedeutung in der Amyloid-Entstehung haben, bestätigte sich in diesem auf Makrophagen basierten Modell nicht. Weder die Ko-Fraktionierung, noch die Ko-Immunfluoreszenz-Studien zeigten eine eindeutige physiologische Assoziation von A $\beta$ (1-40) mit Markern der Lipid-Rafts. Es gibt aber eine Interaktion von Teilen des Zellmaterials, die sich im postnukleären Überstand wiederfindet, die zu einer *in vitro* Interaktion führen kann. Auch die auf verschiedenen Mechanismen beruhende Veränderung der Mikrodomänen-Zusammensetzung führte zu keiner Änderung in der produzierten Plaque-Menge. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass intakte Lipid-Rafts für die zellabhängige Entstehung von Amyloid nicht nötig sind.

## 6.4 Stabilität der Amyloid-Fibrillen aus THP-1-Zellen

Sekundäre Komponenten amyloider Plaques können einen stabilisierenden Einfluss auf die Amyloid-Fibrillen haben (siehe Einleitung). Daraus ergab sich die Frage nach der Bedeutung der Lipid-Rafts für die Stabilität der Amyloid Plaques, denn sie stellen ebenfalls eine sekundäre Komponente dar. Ein Maß für die Stabilität der amyloiden Plaques ist die Resistenz gegen den Abbau durch Enzyme, die in dieser Arbeit mit dem Enzym Proteinase K untersucht wurde.

Frisch aufgelöstes A $\beta$ -Peptid wurde für 24 Stunden bei 37 °C mit dem Enzym Proteinase K inkubiert. Das Bild 6.21 zeigt die zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubation entnommenen Proben in SDS-Gel I. Das A $\beta$ -Peptid war nach einer Stunde vollständig verdaut und nicht mehr auf dem Gel nachzuweisen. Im Vergleich dazu erwiesen sich *in vitro* geformte A $\beta$ -Fibrillen als sehr viel stabiler, nach 24 Stunden waren sie als schwächere A $\beta$ -Peptid-Bande zu noch erkennen (Bild 6.21, II). Einen ähnlichen Widerstand gegen den Verdau zeigte auch das amyloide Material, welches aus THP-1-Zellen gewonnen wurde (Bild 6.21, III). THP-1-Amyloid war auch nach 24 Stunden noch nicht vollständig enzymatisch verdaut.

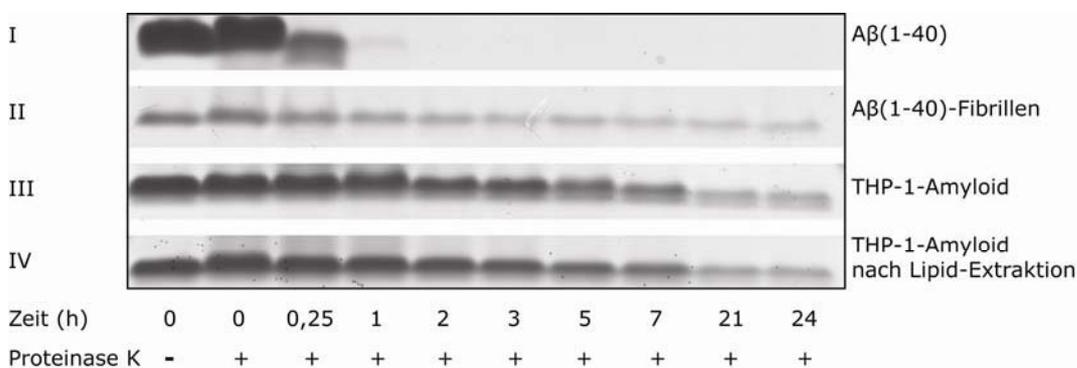


Bild 6.21: Enzymatischer Verdau verschiedener A $\beta$ -Spezies durch Proteinase K.

SDS-Gele mit Proben des Proteinase-K-Verdaus (Ausschnitte auf der Höhe der A $\beta$ -Peptid-Band bei 4,3 kDa). Jeweils 10 Aliquots, zu verschiedenen Zeiten entnommen, der Ansätze I bis IV wurden aufgetragen. **Gel I:** Verdau von 0,53 mg/ml frisch aufgelösten A $\beta$ (1-40). **Gel II:** Verdau von 0,3 mg/ml A $\beta$ -Fibrillen. **Gel III:** Verdau von 0,32 mg/ml THP-1-Amyloid (siehe Abschnitt 6.2.4). **Gel IV:** Verdau von 0,32 mg/ml THP-1-Amyloid nach Extraktion der Lipide. Alle Ansätze wurden mit 429  $\mu$ g/ml Proteinase K in Proteinase-K-Puffer bei 37 °C inkubiert und die Aliquots zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Das erste Aliquot enthielt keine Proteinase K.

Die mit dem THP-1-Amyloid assoziierten Lipide wurden durch eine Lipid-Extraktion entfernt und die Probe anschließend verdaut (Bild 6.21, IV). Die A $\beta$ -Fibrillen aus der Zellkultur verhielten sich auch ohne Lipide sehr resistent gegenüber dem Verdau durch Proteinase K. Sie unterschieden sich diesbezüglich nicht von dem THP-1-Amyloid (Gel III), welches mit Lipiden assoziiert war.

Lipide, wie sie in dem aus der Zellkultur extrahierten Material amyloider Plaques vorkommen, zeigen keine protektive und damit stabilisierende Eigenschaften gegen den enzymatischen Abbau der A $\beta$ -Fibrillen. Sie verhalten sich damit nicht so, wie das Glykosaminoglykan HSPG, welches durch die Interaktion mit den Amyloid-Fibrillen ihren Abbau verzögert {Gupta-Bansal *et al.*, 1995; Snow *et al.*, 1994}. Die Hypothese, dass Lipid-Rafts in ihrer Funktion als sekundäre Komponenten eine ähnliche Wirkung auf A $\beta$ -Fibrillen haben könnten, widerlegte dieser Versuch.

## 6.5 Internalisierung von A $\beta$ -Peptiden in der Amyloid-Bildung

Nachdem für das THP-1-Zellkultur-Modell zur Amyloid-Bildung System gezeigt wurde, dass lebende Zellen essentiell für den Bildungsprozess sind {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010}, sollten die folgende Versuche klären, welche Rolle der zellulären Prozess der Internalisierung spielt. Des Weiteren wurde geprüft, ob das *in vitro* beobachtete Aggregationsverhalten den Aggregations-Prozessen im intrazellulären Raum ähnelt. Welche Auswirkungen die Internalisierung des A $\beta$ -Peptids auf die Vitalität der amyloid-bildenden Zellen hatte, ist im Abschnitt 6.5.3 beschrieben.

### 6.5.1 Amyloid Bildung durch phagozytierende Zellen

Um die Rolle der Phagozytose für die Amyloid-Bildung zu untersuchen, wurden amyloid-bildende THP-1-Zellen mit Phagozytose-Inhibitoren behandelt. Die Aufnahme von A $\beta$ -Peptiden wurde dabei mit dem fluoreszenz-basierten Phagozytose-Assay analysiert und die gebildete Plaque-Menge mit dem Filter-Retentions-Assay bestimmt. Die Phagozytose wurde durch die Zugabe der Phagozytose-Inhibitoren Latrunculin B und Cytochalasin B inhibiert. Beide Substanzen stören die Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts und beeinflussen so unmittelbar die Endo- und Phagozytose der Makrophagen.

In Bild 6.22.A ist die durch THP-1-Zellen aufgenommene Menge von fluoreszenzgekoppelten Mikrosphären,  $^{488}$ A $\beta$ -Peptid und  $^{488}$ A $\beta$ -Fibrillen nach 16 Stunden Inkubation dargestellt. Die von unbehandelten Zellen aufgenommene Menge wurde jeweils mit 100 % gleichgesetzt, um sie mit der quantifizierten Menge zu vergleichen, die unter dem Einfluss der Phagozytose-Inhibitoren aufgenommen wurde. Nach der Inkubation der THP-1-Zellen mit Latrunculin B oder Cytochalasin B war die Aufnahme von Mikrosphären um mehr als 40 % vermindert (linkes Diagramm, Mikrosphären). Ebenso führte die Inhibition der Phagozytose in dem THP-1-Zellsystem zu einer geringeren Aufnahme von  $^{488}$ A $\beta$ (1-40) und  $^{488}$ A $\beta$ -Fibrillen. Unter dem Einfluss von Latrunculin B sank die Aufnahme in beiden Fällen auf 70 % der Phagozytose-Leistung unbehandelter Zellen (siehe Diagramme in Bild 6.22.A). Die Inhibition der Phagozytose mit Cytochalasin B reduzierte die aufgenommene A $\beta$ -Menge in beiden Fällen auf 55 % gegenüber Zellen mit intakter Phagozytose. Die Phagozytose-Leistung ist dabei für die Aufnahme von  $^{488}$ A $\beta$ -Fibrillen vergleichbar mit der Aufnahme von frisch aufgelösten  $^{488}$ A $\beta$ -Peptid.

Inwieweit die verminderte Fähigkeit zur Phagozytose von A $\beta$ (1-40) auch die Plaque-Bildung in THP-1-Zellen beeinflusst, wurde mit dem Filter-Retentions-Assay untersucht. THP-1-Zellen, die für 2 Tage zur Amyloid-Bildung angeregt wurden, zeigten bei gleichzeitiger Inkubation mit Latrunculin B oder Cytochalasin B eine signifikant erniedrigte Amyloid-Menge gegenüber Zellen mit intakter Phagozytose (Bild 6.22.B). Beide Phagozytose-Inhibitoren führten zu einer verminderten Plaque-Bildung, wobei jedoch Cytochalasin B (wie auch im Phagozytose-Assay) die größere Wirkung zeigte und zu einer Reduktion der Plaque-Menge auf 55 % führte. Die Inkubation mit Latrunculin B reduzierte die gebildete Plaque-Menge um 30 %. Dies belegt, dass die Internalisierung von A $\beta$ (1-40) einen sehr wichtigen Teil des Amyloid-Bildungs-Prozesses darstellt. Die Plaque-Bildung in diesem Zellkultur-Modell hängt daher von einer intakten Phagozytose-Aktivität der Makrophagen ab.

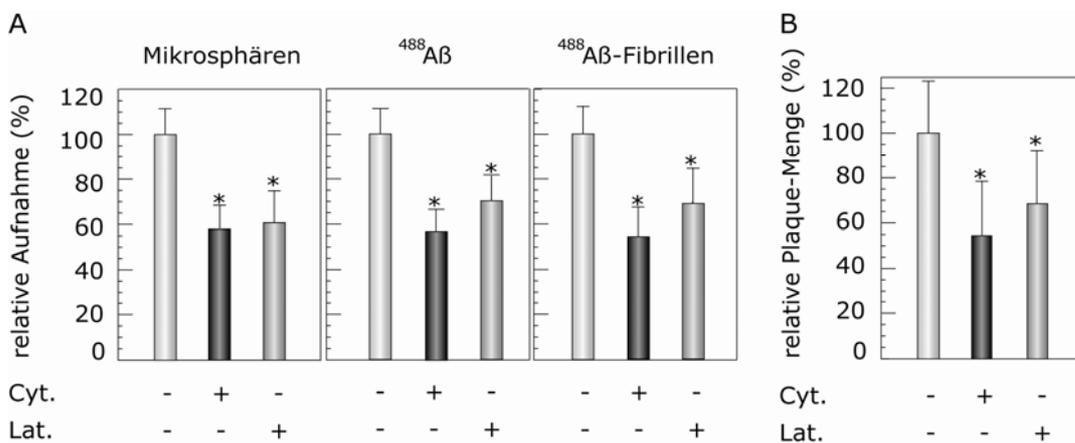


Bild 6.22: Bedeutung der Phagozytose für die Amyloid-Bildung

(A) Fluoreszenzbasierter Phagozytose-Assay zur Bestimmung der durch THP-1-Zellen aufgenommenen Menge von Mikrosphären, <sup>488</sup>A $\beta$ (1-40)-Peptid (<sup>488</sup>A $\beta$ ) oder <sup>488</sup>A $\beta$ -Fibrillen nach 16 Stunden Inkubation. Die Inkubation mit Phagozytose-Inhibitoren (6  $\mu$ M Latrunculin (Lat) oder 2,5  $\mu$ M Cytochalasin (Cyt)) begann 2 Stunden davor. Die Aufnahme-Leistung der Zellen in Abwesenheit der Inhibitoren wurde jeweils mit 100 % gleichgesetzt. (n = 8; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; \*Signifikanz wurde jeweils gegenüber Zellen ohne Phagozytose-Inhibitor getestet). (B) Filter-Retentions-Assay von THP-1-Zellen nach 2 Tagen Inkubation mit 14  $\mu$ M A $\beta$ (1-40) und 6  $\mu$ M Latrunculin (Lat) bzw. 2,5  $\mu$ M Cytochalasin (Cyt). Die gebildete Plaque-Menge in Abwesenheit der Inhibitoren wurde mit 100 % gleichgesetzt. (n = 32; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; Die \*Signifikanz (p=0,5) wurde jeweils gegenüber den Zellen ohne Phagozytose-Inhibitor getestet)

Um auszuschließen, dass die verwendeten Inhibitoren die Aggregationsfähigkeit des A $\beta$ -Peptids beeinträchtigten und die Plaque-Menge dadurch vermindert würde (siehe dazu auch Abschnitt 6.2.2), wurde die A $\beta$ -Aggregation *in vitro* getestet. Je 50  $\mu$ M A $\beta$ (1-40) wurden in 50 mM HEPES-Puffer bei pH 7,4 für zwei Wochen mit und ohne Phagozytose-Inhibitoren inkubiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Bild 6.23.A (oben) zeigen, dass die sich auch bei gemeinsamer Inkubation des A $\beta$ -Peptids

mit 6  $\mu\text{M}$  Latrunculin oder 2,5  $\mu\text{M}$  Cytochalasin  $\text{A}\beta$ -Fibrillen bildeten. Eine Ultrazentrifugation (Beckman, 120.000 rpm), die nach der zweiwöchigen Inkubation der Proben durchgeführt wurde, belegte die Vollständigkeit dieser Fibrillenbildung, da sich nicht aggregiertes  $\text{A}\beta$ -Peptid ansonsten im Überstand befinden würde. Im unteren Teil des Bild 6.23.A sind jeweils die Fibrillen-Proben vor der Zentrifugation (T), sowie der Überstand (S) und das Pellet (P) nach der Zentrifugation aufgetragen worden. Der Ausschnitt des SDS-Gels zeigt die Protein-Banden auf der Höhe des  $\text{A}\beta$ -Peptids (bei 4,3 kDa). Da in keinen der Überstände eine entsprechende Protein-Bande nachzuweisen war, beeinflussen die eingesetzten Substanzen nicht die Fibrillenbildung.

Zur Überprüfung des Aggregationsverhaltens wurden außerdem  $\text{A}\beta$ -Aggregations-Kinetiken (50  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta(1-40)$ ; 50 mM HEPES, pH 7,4; 37 °C) mit 6  $\mu\text{M}$  Latrunculin bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  Cytochalasin durchgeführt. Die ermittelten Lag-Zeiten der Aggregations-Kinetiken (Bild 6.23.B) zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der Inkubation mit oder ohne Phagozytose-Inhibitor. Die zuvor beschriebenen Unterschiede in der Plaque-Bildung sind daher sicher von der Inhibition der Phagozytose hervorgerufen worden und nicht durch ein verändertes Aggregationsverhalten von  $\text{A}\beta(1-40)$  in Anwesenheit dieser Substanzen.

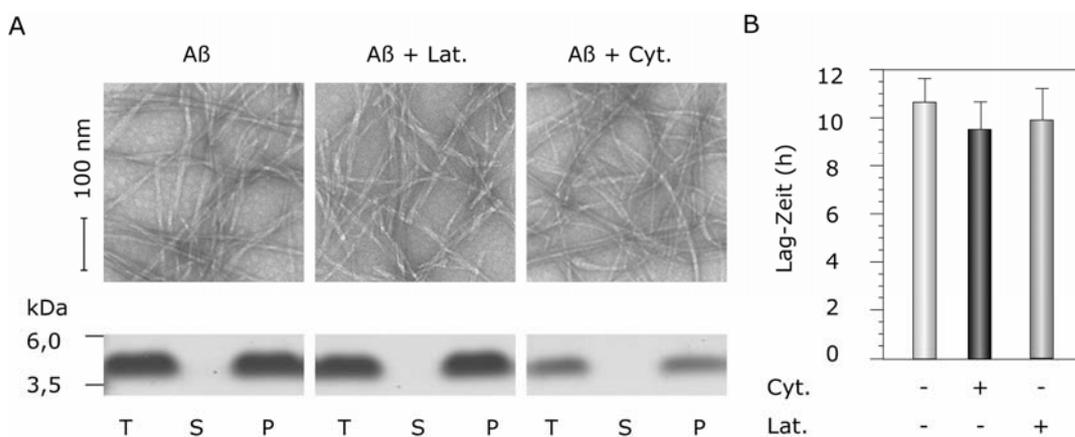


Bild 6.23: Einfluss der Phagozytose-Inhibitoren auf die  $\text{A}\beta$ -Aggregation

(A) EM-Aufnahmen (oben) der gebildeten  $\text{A}\beta$ -Fibrillen nach 2 Wochen Inkubation von jeweils 50  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta(1-40)$  in 50 mM HEPES (pH 7,4) und 6  $\mu\text{M}$  Latrunculin (Lat.) bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  Cytochalasin (Cyt.) bei 37 °C. (A, unten) Ausschnitte des SDS-Gels, mit diesen Fibrillen-Proben vor der Ultrazentrifugation (T), sowie den Überständen (S) und den Pellets (P) nach der Ultrazentrifugation (2 Stunden; 120.000 rpm). Zu erkennen ist jeweils die  $\text{A}\beta$ -Peptid-Bande bei 4,3 kDa in T und P der Proben, nicht jedoch in den Überständen S. (B) Lag-Zeiten der THT-Kinetik mit je 50  $\mu\text{M}$   $\text{A}\beta(1-40)$  in 50 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM Natriumazid, 20  $\mu\text{M}$  ThT und wahlweise 6  $\mu\text{M}$  Lat. bzw. 2,5  $\mu\text{M}$  Cyt. bei 37 °C. (n = 8; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; Signifikanz-Test (p=0,5) war negativ).

### 6.5.2 Vergleich der Nukleations-Reaktion in der Zellkultur *und in vitro*

In dem vorhergehenden Abschnitt wurde aufgezeigt, dass phagozytotische Aufnahme von A $\beta$ (1-40) einen wichtigen Beitrag zu Plaque-Bildung im THP-1-Zellsystem darstellen. Daraus folgt, dass zumindest ein Teil der Amyloid-Bildung intrazellulär stattfindet. Für das THP-1-Zellmodell konnte ferner gezeigt werden, dass dieser Entstehungs-Prozess auch bei der Bildung eines einzelnen A $\beta$ -Plaques die Kinetik einer *in vitro* A $\beta$ -Aggregation mit charakteristischer, biphasischer Reaktion (Lag-Phase und Wachstumsphase) widerspiegelt {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010}. Daher wurde weiter untersucht, ob die *in vitro* beschriebenen Eigenschaften von Amyloid-Fibrillen als Nukleationskeime {Harper, 1997} im Zell-Modell ebenfalls ähnlich sind. Insbesondere sollte hierbei die Sequenz-Spezifität der Nukleations-Reaktion analysiert werden.

Dazu wurden Amyloid-Fibrillen unterschiedlicher Herkunft (siehe Tabelle 5.2) eingesetzt, die als Vorlage (Nukleationskeim) für die A $\beta$ -Fibrillenbildung den Bildungsprozess beschleunigen sollten. Abschnitt 6.2.3 enthält bereits die Beschreibung des Effektes einer beschleunigten Fibrillenbildung in der Zellkultur.

Mit einer THT-Kinetik wurden die Auswirkungen der einzelnen Nukleationskeime auf die Aggregation von A $\beta$ (1-40) *in vitro* untersucht und die ermittelten Lag-Zeiten in Bild 6.24.A dargestellt. Die Lag-Zeit ohne zugesetzte Nukleationskeime wurde mit 100 % gleichgesetzt, um die Auswirkungen der verschiedenen Fibrillen miteinander vergleichen zu können. Die kürzeste Lag-Zeit und damit den stärksten positiven Effekt auf die Fibrillenbildung zeigte die Zugabe von A $\beta$ (1-40)-Fibrillen. Auch die Anwesenheit der ähnlichen Nukleationskeime von A $\beta$ (1-42) und dem THP-1-Amyloid reduzierten die Lag-Zeit eindeutig.

Nach Zugabe dergleichen Amyloid-Fibrillen in die Zellkultur wurde die gebildete Plaque-Menge nach 4 Tagen Inkubation bestimmt (Bild 6.24.B). Auch in diesem Fall führte die Anwesenheit der A $\beta$ (1-40)-Fibrillen zu dem stärksten Effekt, also zur maximalen Amyloid-Bildung in den THP-1-Zellen. Dieser Wert wurde dementsprechend mit 100 % gleichgesetzt. Ebenso wie in der *in vitro* Aggregation hatten auch hier die A $\beta$ (1-42)-Fibrillen einen großen Einfluss und bildeten 50 % der maximalen Plaque-Menge. Dagegen war das aus der Zellkultur extrahierte amyloide Material (THP-1-Amyloid) nur bedingt in der Lage, die Amyloid-Bildung zu beschleunigen. Diese vergleichsweise geringere Eigenschaft des extrahierten Amyloids gegenüber den ursprünglichen A $\beta$ (1-40)-Fibrillen erklärt sich möglicherweise mit einer Maskierung der Fibrillen durch die assoziierten sekundäre Komponenten (siehe dazu Abschnitt 6.2.4 und 6.2.1). Insulin-Fibrillen verstärkten zwar die A $\beta$ -Plaque-Bildung, sie zeigten auch große Schwankungen in der resultierenden Menge (große Standardabweichung) und trugen auch ohne Zellen zur Fibrillenbildung des A $\beta$ -Peptids bei.

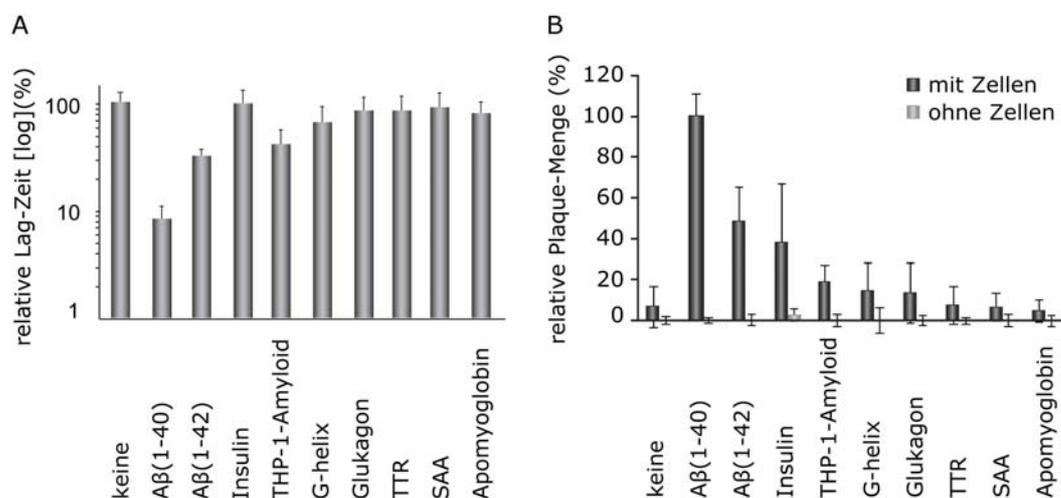


Bild 6.24: Sequenzspezifität der Nukleation in Zellkultur und *in vitro*

(A) Relative Lag-Zeiten der THT-Kinetik mit je 50  $\mu$ M A $\beta$ (1-40) in 50 mM HEPES (pH 7,4), 10 mM Natriumazid, 20  $\mu$ M ThT und mit oder ohne Nukleationskeimen verschiedener Herkunft (je 500 ng/ml). Die ermittelte Lag-Zeit ohne Nukleationskeime wurde mit 100 % gleichgesetzt. (n = 24; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). (B) In der Zellkultur gebildete Plaque-Menge mit und ohne Zellen nach initialer Zugabe der angegebenen Nukleationskeime unterschiedlicher Herkunft (je 250 ng/ml) und Inkubation für 4 Tage mit 60  $\mu$ g/ml A $\beta$ (1-40). Die gebildete Plaque-Menge von Zellen mit A $\beta$ (1-40)-Nukleationskeimen wurde mit 100 % gleichgesetzt. (n = 28 mit Zellen; n = 24 ohne Zellen; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). Zur Herkunft der Nukleationskeime siehe Tabelle 5.2 und Abschnitt 6.2.4). Daten zu (A) stammen aus von R. Friedrich {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010}.

Bild 6.25 zeigt die Regressionsanalyse der *in vitro* gemessenen Lag-Zeit mit der relativen Plaque-Menge, die von THP-1-Zellen unter Einfluss der verschiedenen Nukleationskeime gebildet wurden. Für die beiden Datensätze ergab sich der Korrelations-Koeffizient R= 0,7. Das legt nahe, dass die Nukleations-Reaktion in den Zellen von der gewählten Fibrillen-Vorlagen ähnlichen abhängig, wie die *in vitro* ist.

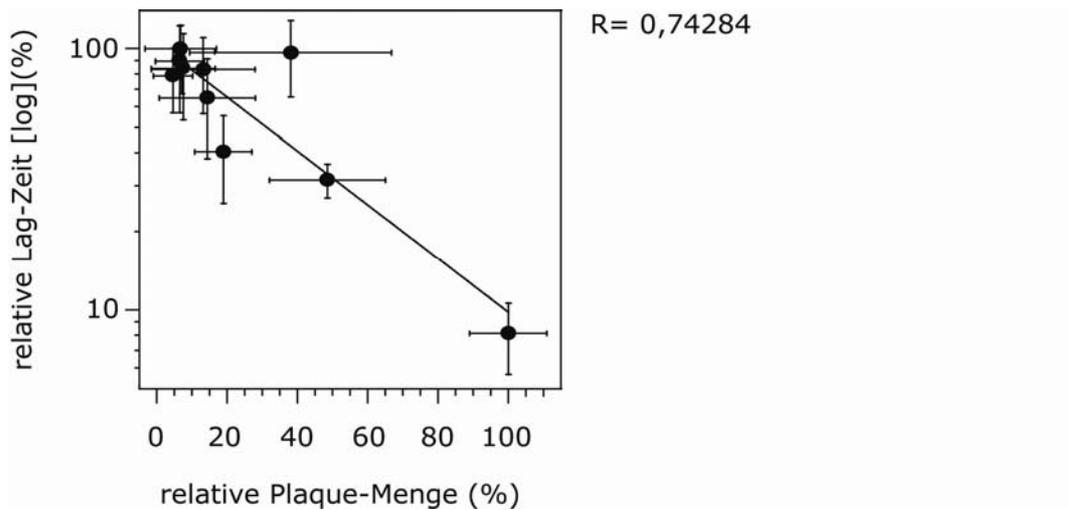


Bild 6.25: Sequenzspezifität der Nukleation in der Zellkultur und *in vitro*

Die Regressionsanalyse der relativen Lag-Zeit (y-Achse; Daten aus Bild 6.24.A) und der relativen Plaque-Menge in THP-1-Zellen (x-Achse; Daten aus Bild 6.24.B mit Zellen) ergibt einen Korrelationskoeffizienten von  $R=0,74$ .

### 6.5.3 Einfluss der Amyloid-Bildung auf die Zellvitalität

Die toxischen Auswirkungen von  $A\beta(1-40)$  wurden bereits für verschiedene Zelltypen in Zellkultur-Systemen gezeigt {Xu *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2009; Bruinsma *et al.*, 2009}. In dieser Arbeit wurde die Vitalität von THP-1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Bildungsprozesses von  $A\beta$ -Amyloid untersucht.

Dazu wurden THP-1-Zellen für die Dauer von 1 bis 5 Tagen mit  $A\beta(1-40)$  inkubiert und jeweils die durch Apoptose freigesetzte LDH-Menge im Zellüberstand gemessen. Durch den Vergleich mit der maximalen LDH-Menge von lysierten Zellen wurde die relative Zytotoxizität berechnet (siehe dazu die Methoden-Beschreibung in Abschnitt 5.1.4). Das Bild 6.26.A stellt die relative Zytotoxizität an den verschiedenen Zeitpunkten der Amyloid-Bildung dar. THP-1-Zellen, die für 5 Tage ohne  $A\beta$ -Peptid inkubiert wurden, zeigten eine Zytotoxizität von 20 %. Eine ähnliche niedrige Zytotoxizität wiesen THP-1-Zellen während Tag 1 und 2 der  $A\beta$ -Zugaben auf. Eine längere Inkubation von 3 und 4 Tagen erhöhte die freigesetzte LDH-Menge auf 50 % des maximalen Wertes lysierter Zellen. Zu diesem Zeitpunkt traten in den Zellen schon sehr ausgeprägte Plaques auf (vergleiche Bild 6.9). Nach 5-tägiger  $A\beta$ -Inkubation erreichte die Zytotoxizität 60 % des maximalen Wertes lysierter Zellen.

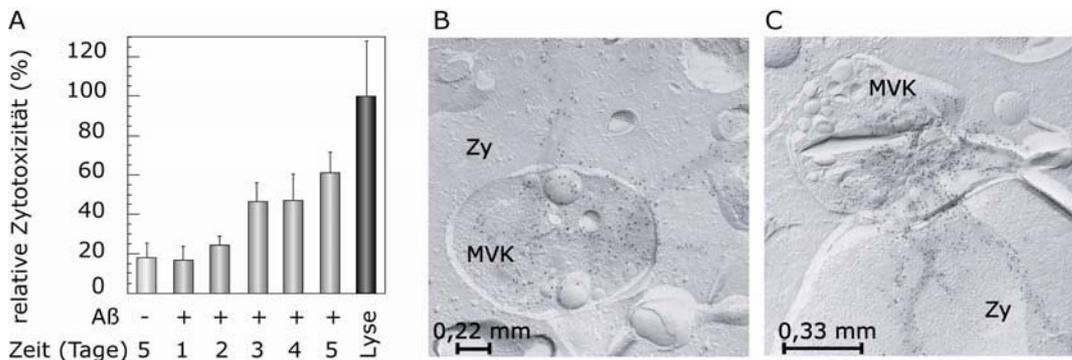


Bild 6.26: Einfluss der Amyloid-Bildung auf die Zellvitalität.

(A) Bestimmung der Zytotoxizität (mittels LDH-Assay) während der Plaque-Bildung in THP-1-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Inkubation der THP-1-Zellen mit A $\beta$ (1-40) für 1-5 Tage. Inkubation ohne A $\beta$ (1-40) für jeweils 5 Tage. Unbehandelte Zellen wurden nach 5 Tagen lysiert und die ermittelte Zytotoxizität mit 100 % gleichgesetzt. (n = 14; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung). (B,C) TEM-Aufnahmen der Gefrierbruch-Präparationen von Makrophagen (J774A.1) nach 6 Tagen Inkubation mit A $\beta$ (1-40). Durch Immunogold-Färbung (anti-A $\beta$ 1-16; anti-Maus-Gold-Antikörper) stellt sich das A $\beta$ -Peptid als elektronendichte Substanz (schwarze Punkte) dar, die in Multivesikuläre Körperchen (MVK) und im Zytosol (Zy) lokalisiert sind und fibrilläre Bündel bilden. *Diese Aufnahmen stammen von M. Westermann (EMZ Jena); das Bild wurde modifiziert aus dem Manuskript zu {Friedrich, Tepper et al., 2010} übernommen.*

Die Experimente zur Phagozytose von A $\beta$ -Peptiden (Abschnitt 6.5.1) belegten, dass das A $\beta$ -Peptid innerhalb eines Tages internalisiert wurde. Da in den ersten beiden Tagen die Vitalität der Zellen erhalten blieb, ist der Prozess der A $\beta$ -Aufnahme nicht nachweisbar zytotoxisch. Mit abnehmender Zellzahl (durch vermehrte Apoptose) änderte sich allerdings auch das Verhältnis zwischen A $\beta$ -Konzentration und lebenden Zellen, da eine gleichbleibende Menge des A $\beta$ -Peptids im Medium einer verringerten Anzahl vitaler Zellen gegenüberstand. Daher konnte aus dieser experimentellen Bestimmung der Zellvitalität zunächst nur gefolgert werden, dass sich mit andauernder Inkubation der Zellen mit A $\beta$ (1-40) die Zytotoxizität während der Amyloid-Bildung stark erhöht. Eine mögliche Erklärung für diese Zunahme der Zytotoxizität während der Plaque-Bildung bot die morphologische Analyse amyloid-bildender Makrophagen auf subzellulärer Ebene. Bild 6.26.B und C zeigen elektronenmikroskopische Gefrierbruch-Aufnahmen von Makrophagen nach 6-tägiger Inkubation mit A $\beta$ (1-40) gezeigt. Die elektronendichten (schwarzen) Punkte stellen das A $\beta$ -Peptid dar (Immunogoldfärbung), welches fadenförmige Bündel bildete und aus Multivesikulären Körperchen (MVK) der Zelle in das Zytosol herausragten. Möglicherweise stören die wachsenden A $\beta$ -Fibrillen durch die Penetration der intrazellulären Membranen die intrazelluläre Homöostase und vesikel-abhängige Transportabläufe.

## 7 Diskussion

### 7.1 Der Einfluss des Puffersystems auf die A $\beta$ -Aggregation

#### 7.1.1 Puffersysteme stellen einen externen Faktor der A $\beta$ -Aggregation dar

Obwohl der Einfluss externer Faktoren auf die Aggregation von verschiedenen Proteinen und Peptiden in zahlreichen Studien untersucht wurde, sind die Auswirkungen von Puffersystemen bislang noch nicht genauer analysiert worden. Die Bedeutung externer Faktoren für die Wahrscheinlichkeit zur Aggregation wird nicht nur in experimentellen Studien untersucht {Nielsen *et al.*, 2001}, sondern wird auch in der computergestützten Vorhersage der Aggregations-Wahrscheinlichkeiten berücksichtigt {DuBay *et al.*, 2004}. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die Wahl des Puffersystems ein zu berücksichtigender Faktor der Aggregation ist.

Die in verschiedenen Puffersystemen durchgeführten A $\beta$ -Aggregations-Kinetiken zeigten signifikant voneinander abweichende Lag-Zeiten (siehe Abschnitt 6.1.4). In den durchgeführten Experimenten betragen sie 14 Stunden für Natriumphosphat-Puffer und 28 Stunden für die A $\beta$ -Aggregation in HEPSO-Puffer. Zwar gab es jeweils einige Puffer, die sich in ihrer Lag-Zeit nicht signifikant voneinander unterschieden, aber es lassen sich daraus keine Gruppen von Puffern mit gemeinsamen Eigenschaften definieren. Die Korrelationen zwischen dem Aggregationsverhalten von A $\beta$ (1-40) in diesen Puffersystemen mit dem Molekulargewicht der Puffer, ihrer Oberflächenspannung und ihren pK<sub>s</sub>-Werten konnte keine eindeutigen Zusammenhänge aufzeigen.

Die Dauer der Lag-Zeit wird durch die Bildung eines stabilen Nukleus determiniert {Wetzel 2006}. Eine Beeinflussung dieses Ereignisses ist zum einen denkbar durch eine direkte Interaktion der Puffer-Moleküle mit dem A $\beta$ -Peptid, zum anderen könnten die Puffer über unspezifische Wechselwirkungen Einfluss auf die Umgebung nehmen. Eine Art der direkten Beeinflussung ist durch das Amyloid-bindende Molekül KR bekannt {Wu *et al.*, 2007} und auch die Anwesenheit von Chaperonen kann durch intermolekularen Kontakt die Aggregation beeinträchtigen {Ben-Zvi und Goloubinoff, 2001; Raman *et al.*, 2005}. Dagegen wirken Salze, z.B. über die Erhöhung der

Dielektizitätskonstante des Wassers (Debye-Hickel-Effekt) auf die Aggregation von A $\beta$ -Peptid oder Insulin {Nielsen *et al.*, 2001; Klement *et al.*, 2007; Sikkink und Ramirez-Alvarado, 2008}. Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten, kann noch keine eindeutige Aussage über die Natur der Wechselwirkungen zwischen Puffermolekülen und A $\beta$ (1-40) getroffen werden. Allerdings erscheint die Hypothese einer direkten Beeinflussung durch eine Bindung an die entstehenden A $\beta$ -Fibrillen, wie sie für ThT oder KR beschrieben wurde, eher unwahrscheinlich.

### 7.1.2 Die Puffersysteme beeinflussen die Morphologie der A $\beta$ -Fibrillen

In den verwendeten Puffersystemen bildeten sich A $\beta$ -Fibrillen unterschiedlicher Dicke aus. Und obwohl sich die entstandenen Fibrillen diesbezüglich signifikant unterscheiden, korrelieren diese Daten nicht mit der zuvor beobachteten Auswirkung auf die Lag-Zeit in der A $\beta$ -Aggregations-Kinetik. Deutlich zu erkennen ist dieser Sachverhalt bei den Puffern Natriumphosphat und HEPES, die einen großen Unterschied in der Lag-Zeit aufweisen, sich jedoch in der Fibrillen-Dicke kaum unterscheiden. Um detailliertere Informationen über die Struktur der entstandenen Amyloid-Fibrillen unter dem Einfluss der verwendeten Puffersysteme zu erhalten, sind Röntgenbeugungs-Analysen sinnvoll. Variationen der Fibrillen-Struktur {Sunde *et al.*, 1997} könnten so durch geringe Abweichungen in den Reflexionen analysiert werden.

### 7.1.3 Eigenschaften der A $\beta$ -Fibrillen aus zwei Puffersystemen

Die beschleunigte A $\beta$ -Aggregation in Anwesenheit eines vorgeformten Nukleationskeimes ist von der Ähnlichkeit zwischen der Vorlage und dem neuen Nukleationskeim abhängig {Snyder *et al.*, 1994; O'Nuallain *et al.*, 2005; Lomakin *et al.*, 1997; Hortschansky *et al.*, 2005}. Die Eigenschaften der in zwei verschiedenen Puffern gebildeten A $\beta$ -Fibrillen wurden daher miteinander verglichen. Die in HEPES bzw. Natriumphosphat-Puffer gebildeten A $\beta$ -Fibrillen unterschieden sich in ihrer Eigenschaft als Nukleationskeim für eine neue Aggregation des A $\beta$ -Peptids. Die Puffersysteme scheinen demnach einen Einfluss auf die Struktur der entstehenden A $\beta$ -Fibrillen zu haben, der ausreichend stark ist, um als Vorlage für einen neuen Nukleationskeim zu dienen. Auf Grund der gleichen Dicke von A $\beta$ -Fibrillen (siehe Tabelle 6.3), die in den beiden Puffersystemen entstehen, kann dies nicht die Ursache sein. Es bleibt zu prüfen, ob ein Nukleationskeim, der in einem Puffersystem entstanden ist, auch nach

Überführung in ein anderes Puffersystem, seine ursprünglichen Eigenschaften als Vorlage beibehält oder sich diesbezüglich verändern würde. Insbesondere für A $\beta$ -Fibrillen, die in Natriumphosphat gebildet wurden, sollte außerdem untersucht werden, ob diese in jedem anderen Puffersystem zu einer kürzeren Lag-Zeit führen würden, als die vorgeformten Nukleationskeime des anderen Puffersystems. Außerdem wäre es sinnvoll zu analysieren, ob die Beobachtungen zu den Nukleationskeimen und der Lag-Zeit auch für weitere Puffersysteme zutreffen. Da möglicherweise die amphipatische Natur des Natriumphosphat-Puffers einen Einfluss auf die A $\beta$ -Aggregation haben könnte, sollte z.B. ein ähnliches Puffersystem untersucht werden (z.B. Kaliumphosphat). Bisher wurden die verschiedenen Einflüsse der Puffersysteme nur für A $\beta$ (1-40) untersucht. Durch Aggregations-Kinetiken mit weiteren Proteinen (z.B. SAA oder Lysozym) ließe sich prüfen, ob sich die beobachtete Reihenfolge der Lag-Zeiten in den Puffersystemen als allgemein gültig erweisen würde.

Die A $\beta$ -Konzentration ist ausschlaggebend für die Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines Nukleationskeims {Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004; Wegiel und Wisniewski, 1990}. Untersucht man diesen Zusammenhang in den beiden ausgewählten Puffersystemen HEPES und Natriumphosphat kann man eine Verkürzung der Lag-Zeit bei steigender A $\beta$ -Konzentration feststellen (siehe Abschnitt 6.1.4). Allerdings ist die Abnahme der Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation im Puffersystem HEPES gegenüber der Abnahme in Natriumphosphat-Puffer sehr gering. Um dieses Phänomen genauer beurteilen zu können, sind in jedem Fall weitere Analysen nötig. Der bisher untersuchte Konzentrationsbereich von 0 bis 50  $\mu$ M A $\beta$ (1-40) sollte auf bis zu 200  $\mu$ M ausgeweitet werden. Möglicherweise gibt es einen Bereich der A $\beta$ -Konzentration, indem der HEPES-Puffer den Effekt auf die Lag-Zeit zeigt, der in dieser Arbeit für den Natriumphosphat-Puffer beschrieben wurde. Dabei könnte auch die Pufferkonzentration von derzeit 50 mM variiert werden, um zu klären ob das Verhältnis zwischen Puffermolekülen und A $\beta$ -Peptiden ebenfalls eine Rolle spielt.

#### **7.1.4 Ausblick für die Verwendung der Puffersysteme für *in vitro* Modelle**

Es bedarf zwar noch detaillierter Analysen, um die Ursachen des Einflusses der Puffersysteme auf die A $\beta$ -Aggregation vollständig zu verstehen. Doch schon jetzt sollten die beschriebenen Effekte zu Konsequenzen in der Wahl eines Puffers für die *in vitro* Modelle der Amyloid-Bildung führen. Besonders für Studien, in denen die Wirksamkeit von aggregations-hemmenden Substanzen geprüft wird, ist die Wahl des Puffersystems für die Vergleichbarkeit der Daten wichtig, da die Aussagen auf der Analyse der Lag-Zeit beruht. Bisher sind die Einflüsse der zwölf Puffersysteme auch nur in Bezug auf die Aggregation von A $\beta$ (1-40) untersucht worden. Für andere Peptide und Proteine muss dieser Einfluss auf die Aggregations-Kinetiken noch verifiziert werden.

## 7.2 Mechanismen der Amyloid-Bildung in THP-1-Zellen

### 7.2.1 Etablierung des Zellkultur-Modells zur Bildung amyloider Plaques

Die Etablierung des A $\beta$ -basierten Zellkultur-Modell ermöglichte eine schnelle und gut reproduzierbare Bildung amyloider Plaques. In ihrer Zusammensetzung aus A $\beta$ -Fibrillen und assoziierten Nebenkomponten (Raft-Lipiden, Glykosaminoglykane) entsprechen sie *in vivo* entstandenen amyloiden Plaques {Westermark *et al.*, 2005}. Die Reduktion der Plaque-Menge bei Zugabe des bekannten Amyloid-Inhibitors KR {Gellermann *et al.*, 2006}, belegt die Eignung des Zellkulturmodells, Einflüsse auf die Amyloid-Bildung zu untersuchen. Der Zusatz *in vitro* gebildeter A $\beta$ -Fibrillen als Nukleationskeim findet häufig Anwendung bei Aggregations-Kinetiken. Die Nutzung dieses Prinzips für die Zellkultur trug in dieser Arbeit wesentlich zur Optimierung der Reproduzierbarkeit der Amyloid-Bildung bei. Ohne die Nukleationskeime variierten die Plaque-Mengen zu Beginn der Amyloid-Bildung sehr stark (siehe Bild 6.10) und die Bildung nachweisbarer Plaque-Mengen dauerte entsprechend länger. Die Entstehung eines einzelnen Plaques ist ein relativ schneller Prozess, wie in einem Alzheimer-Maus-Modell mit dem Auftauchen eines Plaques nach einem Tag und dessen Wachstum in den folgenden Tagen gezeigt werden konnte {Meyer-Luehmann *et al.*, 2008}. Diese Zeitspanne stimmt mit der Plaque-Bildung in THP-1-Zellen nach zwei bis vier Tagen überein (siehe KR-Färbungen und Filter-Retentions-Assay in Abschnitt 6.2). Durch die Quantifizierung von fluoreszierenden <sup>488</sup>A $\beta$ -Peptid in Echtzeit-Aufnahmen {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010} ließ sich der Entstehungsprozess in unserem Zellkulturmodell verfolgen. Der Prozess der Plaque-Bildung unterteilte sich in eine Lag-Phase ohne Fibrillenbildung (in diesen Untersuchungen zwischen 18 und 51 Stunden) und eine nachfolgende Wachstumsphase von etwa 10 Stunden erkennen. Dieses kinetische Verhalten spiegelt den typischen Verlauf einer biphasischen Aggregations-Kinetik *in vitro* wieder.

## 7.2.2 Internalisierung von A $\beta$ (1-40) durch Phagozytose

Entscheidend für die Produktion amyloider Plaques sind vitale Zellen {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010.} mit intakter Fähigkeit zur Phagozytose. Die Blockierung phagozytotischer und endozytotischer Prozesse führte zu einer deutlichen Reduzierung der Plaque-Menge (Abschnitt 6.5.1). Die Fähigkeit zur Phagozytose von A $\beta$ -Fibrillen {Koenigsknecht und Landreth, 2004; Familian *et al.*, 2007; Majumdar *et al.*, 2007; Frackowiak *et al.*, 1992} und die Aufnahme von A $\beta$ -Oligomeren {Zaghi *et al.*, 2009; Chung *et al.*, 1999} durch Mikroglia wurde schon zuvor gezeigt. Allerdings kann die Bedeutung der Internalisierung von frisch aufgelöstem A $\beta$ (1-40) für die Amyloid-Bildung durch Makrophagen nicht ohne weitere Experimente auf Mikroglia übertragen werden. Denn obwohl die Fähigkeit zur Amyloid-Bildung auch für weitere Zellen in der Zellkultur belegt werden konnte {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010}, weisen Makrophagen von Alzheimer-Patienten eine verminderte Phagozytose-Fähigkeit auf {Fiala *et al.*, 2005}.

Ko-Lokalisations-Studien in THP-1-Zellen mit Transferrin (Friedrich, Tepper *et al.*, 2010), einem Marker der clathrin-abhängigen Endozytose, lassen bei einer teilweisen Ko-Lokalisation mit A $\beta$ (1-40) auf eine Internalisierung schließen, welche die clathrin-abhängige Endozytose nur teilweise nutzt. Neuronen nehmen das A $\beta$ -Peptid dagegen kaum oder gar nicht über clathrin-abhängige Endozytose auf {Saavedra *et al.*, 2007}. Dem entsprechend zeigten Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5Y) in diesem Zellkultur-Modell auch eine geringere Amyloid-Bildung als Makrophagen (Friedrich, Tepper *et al.*, 2010). Kandimalla und Mitarbeiter weisen ebenfalls auf die unterschiedlichen Mechanismen der A $\beta$ -Aufnahme zwischen Neuronen und Endothelzellen hin {Kandimalla *et al.*, 2009}. In diesem Kontext erscheint eine ausführlichere Untersuchung der Phagozytose für die Amyloid-Bildung in verschiedenen Zellkulturmodellen und *in vivo* sinnvoll.

### 7.2.3 Intrazelluläre Amyloid-Bildung

Die Internalisierung durch Phagozytose als Voraussetzung für Amyloid-Bildung impliziert eine intrazelluläre Lokalisation des A $\beta$ -Peptids während der Bildungsprozesse. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Gefrierbrüchen amyloid-bildender Makrophagen zeigten die intrazelluläre Lokalisation von goldmarkiertem A $\beta$ -Peptid (Bild 6.26.B-C). Zusätzlich offenbarten konfokal-ähnliche Immunfluoreszenz-Aufnahmen (Friedrich, Tepper *et al.*, 2010) die Ko-Lokalisationen von A $\beta$ (1-40) und Markern der endosomalen/lysosomalen Kompartimente. Die Anwesenheit des A $\beta$ -Peptids in vesikulären Organellen ist wiederholt beschrieben worden {Ling *et al.*, 2009; Nixon, 2007; Shie *et al.*, 2003}. In den THP-1-Zellen ist die Ko-Lokalisation mit endosomalen Markern nur partiell zu sehen, das A $\beta$ -Peptid folgt also möglicherweise nur zum Teil dem endosomalen Transport. Eindeutig ist jedoch die Akkumulation von A $\beta$ (1-40) in den Multivesikulären Körperchen (MVK) amyloid-bildender Makrophagen (Bild 6.26), wo sich fadenförmige Strukturen zeigen, die ins Zytosol ragen. Die MVK, die als ein Zusammenschluss vesikulärer Strukturen in Erscheinung treten und vermutlich durch Fusion endosomaler Vesikel entstehen {Piper und Katzmann., 2007}, stellen möglicherweise einen intrazellulären Raum dar, welcher die A $\beta$ -Aggregation begünstigen könnte. Für diese Annahme gibt es einige Hinweise. Die Akkumulation von A $\beta$ -Spezies in MVK tritt in Neuronen verschiedener Alzheimer-Modelle auf {Almeida *et al.*, 2006; Langui *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2002} und führt zu pathologischen Veränderungen der Synapsen und zerstörten MVK {Takahashi *et al.*, 2002}. Die Internalisierung des frisch aufgelösten A $\beta$ -Peptids aus dem Zellkulturmedium in die zellulären Kompartimente der Makrophagen bedeutet eine massive Veränderung der Umgebung für das Peptid. Die lokale Erhöhung der A $\beta$ -Konzentration in den Vesikeln könnte die Aggregations-Wahrscheinlichkeit während der Transport-Prozesse begünstigen {Lomakin *et al.*, 1997}. Der ebenfalls aggregations-fördernde Einfluss einer beengten Umgebung {Munishkina *et al.*, 2004}, *crowded environment* genannt, die gekennzeichnet ist durch eine hohe Dichte verschiedener Makromoleküle, erleichtert intermolekulare Kontakte. Der leicht saure pH-Wert in den späten Endosomen bzw. MVK {Gorman *et al.*, 2003}, der zwischen 5 und 6 liegt, begünstigt die A $\beta$ -Aggregation {Snyder *et al.*, 1994} zusätzlich.

Durch den besonderen Aufbau der MVK aus einzelnen kleinen Vesikeln innerhalb eines membranumschlossenen Raumes, kommen die A $\beta$ -Peptide mit der Innen- und Außenseite vesikulärer Membranen in Kontakt. Ein Bestandteil der Außenmembran zellulärer Vesikel ist das Gangliosid GM1 {Mobius *et al.*, 1999}, welches als beschleunigender Faktor der Amyloid-Bildung beschrieben wurde {Tashima *et al.*, 2004}. Auch weitere Bestandteile der Mikrodomänen könnten einen aggregations-begünstigenden Einfluss zeigen {Puglielli *et al.*, 2003; Kawarabayashi *et al.*, 2004}.

Es ist nicht auszuschließen, dass in den Organellen gleichzeitig abbauende Prozesse stattfinden, welche die Amyloid-Bildung negativ beeinflussen. Cathepsine, die auch in extrazellulären Amyloid-Plaques gefunden wurden {Yang *et al.*, 1998}, sind lysosomale Enzyme mit der Fähigkeit Proteine zu verdauen; wie z.B. die Degradation von A $\beta$ -Peptid durch Cathepsin D zeigt {McDermott und Gibson, 1996}.

Die Prozesse der Amyloid-Bildung zeigten in einigen Punkten große Ähnlichkeit zu den bekannten Abläufen einer *in vitro* Aggregation: Zum einen der zuvor erwähnte biphasische Verlauf der Bildung einzelner Amyloid-Plaques (siehe Abschnitt 7.2.1) und zum anderen die Wirkung verschiedener vorgeformter A $\beta$ -Fibrillen unterschiedlicher Herkunft als Nukleationskeime auf die Fibrillenbildung (Bild 6.24). Die Lag-Zeit der Aggregation *in vitro* korrelierte dabei mit der Menge gebildeter Plaques in der Zellkultur. Da diese *in vitro* gültigen Prinzipien auch im intrazellulären Raum ihre Entsprechung finden, wäre es möglich, dass (abgesehen von den Transport-Prozessen) die Zelle keinen weiteren aktiven Einfluss auf die Amyloid-Bildung nimmt und die Makrophagen-Zelle vor allem einen aggregations-begünstigenden Raum darstellt. Einen weiteren Beleg für diese Überlegung bietet die A $\beta$ (1-40)Val18Pro-Mutante, welche eine sehr geringe Fähigkeit zu Aggregation *in vitro* zeigt {Peim *et al.*, 2006} und auch in der Zellkultur zu einer verminderten Amyloid-Bildung führte (siehe Abschnitt 6.2.2).

#### 7.2.4 Toxizität der Amyloid-Bildung

Der Prozess der Amyloid-Bildung ist für die Makrophagen zytotoxisch. Ihre Vitalität nimmt mit zunehmender Plaque-Menge ab und sie sterben innerhalb von vier bis fünf Tagen (Bild 6.26.A). Berücksichtigt man die mögliche intravesikuläre Bildung von A $\beta$ -Fibrillen, könnte die Penetration der Vesikel-Membranen die Ursache für den Zelltod sein. Eine solche Zerstörung lysosomaler Membranen konnte durch das A $\beta$ (1-42)-Peptid in neuronalen Zellen beobachtet werden, wobei die freiwerdenden lysosomalen Inhalte zur Neurotoxizität führten {Yang *et al.*, 1998}. Für das hier beschriebene Zellkultur-Modell könnten weiterführende biochemische Analysen des Zytoplasmas und der Vesikel während der Amyloid-Bildung durchgeführt werden, um ein mögliches Auslaufen der Vesikel zu bestätigen. In jedem Fall hätte die A $\beta$ -Aggregation in den Vesikeln einen störenden Einfluss auf die hochregulierten Transport-Abläufe der Zelle. Große Mengen des A $\beta$ -Peptids und seine Aggregation zu A $\beta$ -Fibrillen könnten die Fusion später Endosomen mit MVK beeinträchtigen {Piper und Katzmann, 2007}.

Diese zytotoxische Auswirkung der Amyloid-Entstehung in Makrophagen ist nicht mit der toxischen Wirkung verschiedener A $\beta$ -Spezies auf Neuronen zu verwechseln. Denn

der Verlust neuronaler Zellen in Alzheimer-Patienten korreliert kaum mit der Entstehung amyloider Plaques, sondern eher mit dem Auftreten neurofibrillärer Bündel {Gomez-Isla *et al.*, 1997}. Auch die Präsenz amyloider Plaques in einem Alzheimer-Maus-Modell führte kaum zum Sterben der Neuronen {Duyckaerts *et al.*, 2008}. So wurde die ursprünglich aufgestellte Hypothese, dass die Toxizität von A $\beta$ -Amyloid oder anderen A $\beta$ -Spezies zum massiven Zellverlust der Alzheimer-Krankheit beitragen könnte, kürzlich neu bewertet und in Frage gestellt {Hardy, 2009}. Die toxischen Auswirkungen der Amyloid-Bildung könnte jedoch Mikroglia-Zellen betreffen, sollte sich diese entsprechend den in dieser Arbeit untersuchten Makrophagen verhalten. Um diese Vermutung zu belegen, sind noch weiterführende Experimente zum Aufnahme- und Amyloid-Bildungs-Verhalten von Mikroglia notwendig.

### 7.2.5 Freisetzung und Zusammensetzung der Plaques

Die Freisetzung der gebildeten Amyloid-Strukturen erfolgt wahrscheinlich mit der Zerstörung der Plasmamembran durch wachsende A $\beta$ -Fibrillen. Die enge Assoziation der entstandenen Plaques mit den Zellen (Bild 6.14) lässt vermuten, dass die Zelle nicht birst, sondern die Plasmamembran der Zellfortsätze mit dem Plaque abschließt. Die Zusammensetzung amyloider Plaques ist immer abhängig von ihrer Entstehungsgeschichte {Armstrong *et al.*, 2008}. Neben den charakteristischen NebenkompONENTEN finden sich in amyloiden Ablagerungen auch weitere assoziierte Moleküle. Dies lässt Rückschlüsse auf intrazelluläre Kontakte zu, wie die Anwesenheit von Proteasen aus Lysosomen und Endosomen {Armstrong *et al.*, 2008; Cataldo *et al.*, 1996; Langui *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 1998} oder von molekularen Chaperonen {Wilhelmus *et al.*, 2007; Roher *et al.*, 1993} zeigt. Natürlich kann aus den bisher erhobenen Daten noch nicht belegt werden, wann die Assoziationen entstanden und ob vorangegangene intrazelluläre Prozesse daran beteiligt waren. Auch ob es nach der extrazellulären Ablagerung zur weiteren, zellunabhängigen Anlagerung durch A $\beta$ -Peptide kommt ist noch unklar. Diese Frage könnte durch die Verwendung radioaktiv- oder fluoreszenzmarkiertem A $\beta$ -Peptid geklärt werden, indem es nach dem Zelltod in das Zellkulturmedium gegeben und die entstandenen Plaques einige Tag später auf die Anwesenheit des markierten A $\beta$ -Peptids analysiert würde. Mit einem ähnlichen Experiment, bei dem die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten kurz nach der Aufnahme von A $\beta$ (1-40) getötet würden, könnte man untersuchen, ob die Internalisierung der einzig aktive Beitrag der Makrophagen an der Amyloid-Bildung ist.

Die Anwesenheit bestimmter Lipide in den Amyloid-Plaques könnte ebenfalls auf einer intrazellulären Interaktion des A $\beta$ -Peptids mit den Mikrodomänen der MVK beruhen. Wie die Aufreinigung von Lipid-Rafts aus amyloid-bildenden Zellen zeigte (Bild 6.17),

war eine Interaktion zwischen den Mikrodomänen und A $\beta$ (1-40) auch unter nicht-physiologischen Bedingungen möglich. Eine aktive Rolle der Lipid-Rafts in der Amyloid-Bildung, wie sie in zwei Amyloid-Zellkultur-Modellen beschrieben wurde (van der Hilst *et al.*, 2008; Gellermann *et al.*, 2006), konnte in dieser Arbeit allerdings nicht belegt werden. Die Rolle der Lipid-Rafts an der Entstehung amyloider Plaques muss daher kein allgemein gültiger Mechanismus sein.

Für Proteoglykane konnte eine Rolle in der Stabilisierung amyloider Plaques durch Inhibierung der A $\beta$ -Proteolyse nachgewiesen werden {Gupta-Bansal *et al.*, 1995}. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern die Anwesenheit von mit dem Amyloid assoziierten Lipiden eine protektive Wirkung gegen Proteolyse darstellen könnte (Bild 6.21). Die assoziierten Lipide amyloider Plaques aus den THP-1-Zellen boten in dieser Hinsicht keinen Schutz und beeinflussten den enzymatischen Verdau des Amyloids nicht. Die Assoziation des amyloiden Materials mit Glykosaminoglykanen und Lipiden könnte aber eine Maskierung der Fibrillen darstellen, welche die Eigenschaften des THP-1-Amyloids als Nukleationskeim gegenüber den *in vitro* gebildeten A $\beta$ (1-40)-Fibrillen deutlich verschlechtert (Bild 6.24), obwohl beide Nukleationskeime die gleiche Aminosäure-Sequenz besitzen.

### 7.2.6 Die Rolle der Makrophagen in der A $\beta$ -Plaque-Bildung

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bildung von A $\beta$ -amyloiden Plaques in humanen Makrophagen möglich ist. In der Literatur werden weitere Zellen diskutiert, welche eine Rolle in der Entstehung amyloider Plaques einnehmen könnten. Neuronen, Astrozyten, glatte Muskelzellen und Mikroglia bzw. mononukleären Phagozyten {Wisniewski und Wegiel, 1994; Wegiel und Wisniewski, 1990; Pappolla *et al.*, 1991; Nagele *et al.*, 2004} sind mit der Amyloid-Entstehung in Alzheimer Patienten oder entsprechenden Modellen beschrieben worden. Für COS-Zellen, HEK-293-Zellen, HEp-2-Zellen, J-774A.1-Zellen und bis zu einem gewissen Grad auch für humane Neuroblastomazellen (SH-SY5Y) konnte diese Fähigkeit zur Amyloid-Bildung ebenfalls nachgewiesen werden {Friedrich, Tepper *et al.*, 2010}.

Aber weder kann die morphologische Assoziation eines Zelltypus mit amyloiden Ablagerungen dessen Beteiligung am Entstehungsprozess belegen, noch beweist die Fähigkeit zur Plaque-Bildung deren pathophysiologische Bedeutung. Die Frage nach der Beteiligung der Makrophagen kann daher nur im Kontext mit anderen Zellen oder *in vivo* untersucht werden. Unser Zellkultur-Modell könnte zu diesem Zweck modifiziert werden. Mit einer Misch-Kultur von primären neuronalen Zellen und Makrophagen könnte untersucht werden, ob die neuronale Wiederaufnahme {Harris-White *et al.*, 2004} des sekretierten A $\beta$ -Peptids eine Plaque-Bildung durch Makrophagen vermindern würde. Eine Misch-Kultur von THP-1-Zellen und Mikrogliazellen oder primären

mononukleären Phagozyten, die durch eine Migrationsbarriere (Filter) separiert sind, könnte die Phagozytose-Leistung und die resultierende Plaque-Menge miteinander verglichen. Die Fähigkeiten von Mikrogliazellen, Amyloid-Fibrillen abzubauen, wurde von Frackowiak und Mitarbeitern als gering beschrieben {Frackowiak *et al.*, 1992}. Ebenso zeigten aus dem Blut von Alzheimer-Patienten stammende Monozyten Defizite in der Aufnahme von A $\beta$ -Peptid {Fiala *et al.*, 2005}. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Alzheimer-Maus-Studien, die zeigten, dass aus dem Blut stammende Makrophagen den ursprünglichen Mikrogliazellen in der Phagozytose amyloider Ablagerungen überlegen waren {Simard *et al.*, 2006}.

### 7.2.7 Abschließende Einordnung und Ausblick

Obwohl die Bedeutung der amyloiden Plaques für die Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit eher gering zu sein scheint {Duyckaerts *et al.*, 2008}, kann die Erforschung der Prozesse, die zu Amyloid-Ablagerungen führen, dennoch viel zum Verständnis der Alzheimer-Krankheit und möglicherweise auch von anderen Amyloidosen beitragen. Ausgehend von den hier gemachten Beobachtungen sollte die Rolle der Makrophagen als Plaque-Bildner oder Plaque-Zerstörer genauer analysiert werden. Dazu wird eine detailliertere Aufklärung der Phagozytose-Mechanismen nötig sein, denn möglicherweise erklären verschiedene Internalisierungs-Prozesse die beschriebenen Unterschiede zwischen Makrophagen unterschiedlicher Herkunft und erhellen die duale Rolle dieser Zellen in der Amyloid-Bildung. Das hier etablierte Zellkultur-Modell kann zum Verständnis dieser Prozesse beitragen, aber *in vivo* Modelle werden unabdingbar sein, wenn es um Fragen des Migrationsverhaltens der Makrophagen oder die Bedeutung interzellulärer Kommunikation (z.B. über Zytokine) geht.

## 8 Anhang

### 8.1.1 Abkürzungen

A $\beta$	Abeta-Peptid
acLDL	<i>acetylated low density lipoprotein</i>
ApoE	Apolipoprotein E
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CE	Cholesterolester (Lipid)
CH	Cholesterol (Lipid)
Cyt	Cytochalasin B
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DG	Deckglas (Histologie)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>dots per inch</i> (Auflösung)
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fötale bovines Serum
FS	Fettsäuren (Lipid)
GA	Glykosaminoglykane (Lipid)
GC	Glycerin (Lipid)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HSPG	Heperan-Sulfat-Proteoglycan
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot
KR	Kongorot
Lat	Latrunculin B
LDH	Laktat-Dehydrogenase (Enzym)
MG	Monoglycerid (Lipid)
MVK	Multivesikuläre Körperchen
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)

---

NaPhos	Natriumphosphat-Puffer
NFT	Neurofibrilläre Bündel, <i>neuro fibrillar tangles</i>
OFS	Oberflächenspannung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	Phosphatidylcholin (Lipid)
PE	Phosphatidylethanolamin (Lipid)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHF	<i>paired helical filaments</i>
PK	Proteinase K (Enzym)
PMA	Phorbol-12-myristate-13-azetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin (Lipid)
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
SAP	Serum Amyloid P-Komponente
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SM	Sphingomyelin (Lipid)
SU	Sulfatide (Lipid)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TLC	Dünnschichtchromatographie ( <i>thin layer chromatography</i> )
UV	Ultraviolettes Licht
WST	Wasserlösliches Tetrazoliumsalz ( <i>water-soluble tetrazolium salt</i> )

## 8.1.2 Übersicht zu den Puffereigenschaften

Tabelle 8.1: Tabelle der Eigenschaften der Puffersubstanzen (Hersteller-Angaben)

Puffer	Synonyme Bezeichnung	Molekulargewicht der Puffersubstanz	pK <sub>s</sub> -Wert	Hersteller
Bis-Tris-Propan	1,3 Bis[tris(hydroxymethyl) methylamino] propan	282,34	6,80	Biomol
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N-2- ethansulfonsäure	238,30	7,30	Sigma-Aldrich
HEPSO	N-(2-Hydroxyethyl)piper azin-N-(2-hydroxypropan sulfonsäure)	568,34	7,70	Carl Roth AG
Imidazol	1,3-Diaza-2,4- cyclopentadien	68,08	7,00	Applichem
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure	209,26	7,20	Biomol
Natriumphosphat	Biphosphat	138,00/ 268,10	7,20	Sigma-Aldrich
PIPES	Piperazin-1,4- bis(2-ethansulfonsäure)	302,37	6,80	Carl Roth AG
POPSO	Piperazin-1,4- bis(2-hydroxypropan sulfonsäure)- dihydrat	398,5	7,60	Carl Roth AG
TEA	Tris (2-hydroxyethyl)- amin	149,19	7,80	Serva
TES	N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2- aminoethansulfonsäure	229,25	7,40	Serva
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)- methyl- glycin	179,17	7,80	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	1,3 Bis[tris(hydroxymethyl) methylamino] propan	121,14	8,10	Carl Roth AG

Tabelle 8.2: Experimentell bestimmte Eigenschaften der Puffersubstanzen

Puffersystem	Lag-Zeit (h)*	Oberflächenspannung (mN/m)**	A $\beta$ -Fibrillendicke (nm)***
Bis-Tris-Propan	19,60 $\pm$ 4,63	73,10 $\pm$ 0,20	20,79 $\pm$ 6,20
HEPES	25,61 $\pm$ 3,38	72,96 $\pm$ 0,04	28,70 $\pm$ 6,26
HEPSO	28,71 $\pm$ 6,75	63,72 $\pm$ 0,75	20,49 $\pm$ 6,06
Imidazol	19,57 $\pm$ 5,94	64,37 $\pm$ 0,20	22,44 $\pm$ 6,08
MOPS	23,62 $\pm$ 5,15	67,36 $\pm$ 0,56	21,89 $\pm$ 6,32
Natriumphosphat	14,21 $\pm$ 3,36	70,98 $\pm$ 0,76	28,05 $\pm$ 7,52
PIPES	18,06 $\pm$ 3,51	51,76 $\pm$ 0,30	25,18 $\pm$ 7,31
POPSO	22,64 $\pm$ 7,07	Keine Daten	18,80 $\pm$ 5,90
TEA	22,37 $\pm$ 5,14	67,77 $\pm$ 0,59	25,16 $\pm$ 8,94
TES	22,84 $\pm$ 5,71	55,77 $\pm$ 0,44	25,44 $\pm$ 8,43
Tricin	22,76 $\pm$ 6,60	71,83 $\pm$ 0,79	20,30 $\pm$ 5,35
Tris-HCl	22,67 $\pm$ 7,71	72,46 $\pm$ 0,48	31,84 $\pm$ 14,59

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  die Standardabweichungen, die in den Diagrammen als Fehlerbalken eingezeichnet sind.

\*Lag-Zeit (h) der A $\beta$ -Aggregation in 50 mM Puffer (Bild 6.1)

\*\*Oberflächenspannung (mN/m) in 1M Puffer bei 22 °C (Bild 6.5)

\*\*\*A $\beta$ -Fibrillendicke (nm), in 50 mM Puffer gewachsen (Bild 6.3)

### 8.1.3 Verzeichnis der Bilder

Bild 3.1: Amyloid-Nachweis durch KR-Färbung.....	10
Bild 3.2: Gehirn eines Alzheimer-Patienten und eines gesunden Menschen im Vergleich .....	13
Bild 3.3: Strukturformel von Thioflavin T.....	17
Bild 3.4: Schematische Darstellung der Amyloid-Fibrille und ihrer Vorstufen. ....	18
Bild 5.1: Schematischer Aufbau der Blot-Apparatur .....	42
Bild 5.2: Schematische Darstellung der Oberflächenspannungs-Messung.....	47
Bild 6.1: A $\beta$ -Aggregations-Kinetik in verschiedenen Puffersystemen.....	54
Bild 6.2: Morphologie der A $\beta$ -Fibrillen in verschiedenen Puffern. ....	56
Bild 6.3: Dicke von A $\beta$ -Fibrillen in verschiedenen Puffersystemen. ....	57
Bild 6.4: Vergleich der Lag-Zeit mit Eigenschaften der Puffersubstanzen .....	59
Bild 6.5: Oberflächenspannung der verwendeten Puffersysteme. ....	60
Bild 6.6: Abhängigkeit der Lag-Zeit von der A $\beta$ -Konzentration in zwei Puffersystemen .....	61
Bild 6.7: Einfluss von Nukleationskeimen auf die Lag-Zeit der A $\beta$ -Aggregation .....	63
Bild 6.8: Schema des Zellkultur-Modells zur Plaque-Bildung .....	66
Bild 6.9: KR-Nachweis von Amyloid in THP-1-Zellen.....	67
Bild 6.10: Nachweis amyloider Plaques mittels Filter-Retentions-Assay .....	68
Bild 6.11: Glykosaminoglykan-Färbung .....	70
Bild 6.12: Amyloid-Bildung mit A $\beta$ (1-40)V18P-Mutante. ....	71
Bild 6.13: Zell-Kumulus-Bildung während der Amyloid-Bildung. ....	72
Bild 6.14: Ultrastruktur amyloider Plaques aus der Zellkultur. ....	73
Bild 6.15: Charakterisierung von A $\beta$ -Amyloid aus THP-1-Zellen. ....	74
Bild 6.16: Charakterisierung der Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigung.....	76
Bild 6.17: A $\beta$ -Verteilung in Fraktionen der Lipid-Raft-Aufreinigung.....	78
Bild 6.18: Ko-Lokalisations-Studie von A $\beta$ (1-40) und Lipid-Raft-Markern in THP-1-Zellen ...	80
Bild 6.19: Einfluss von Raft-Lipid-Inhibitoren auf die Amyloid-Bildung .....	82
Bild 6.20: Einfluss intrazellulärer Lipid-Ansammlungen auf die Amyloid-Bildung. ....	83
Bild 6.21: Enzymatischer Verdau verschiedener A $\beta$ -Spezies durch Proteinase K.....	85
Bild 6.22: Bedeutung der Phagozytose für die Amyloid-Bildung .....	88
Bild 6.23: Einfluss der Phagozytose-Inhibitoren auf die A $\beta$ -Aggregation.....	89
Bild 6.24: Sequenzspezifität der Nukleation in Zellkultur und <i>in vitro</i> .....	91
Bild 6.25: Sequenzspezifität der Nukleation in der Zellkultur und <i>in vitro</i> .....	92
Bild 6.26: Einfluss der Amyloid-Bildung auf die Zellvitalität.....	93

### 8.1.4 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 3.1: Amyloid-Fibrillen-Proteine und ihre Vorläufer .....	9
Tabelle 4.1: Verwendete Substanzen .....	25
Tabelle 4.2: Verwendete Geräte .....	26
Tabelle 4.3: Assays und Größenstandards .....	27
Tabelle 4.4: Verwendete Materialien .....	28
Tabelle 4.5: Puffer und Lösungen .....	29
Tabelle 4.6: Primärantikörper .....	31
Tabelle 4.7: Sekundärantikörper .....	31
Tabelle 4.8: Konjugate und Farbstoffe .....	31
Tabelle 5.1: Verwendete Zellen .....	32
Tabelle 5.2: Bedingungen für die Herstellung amyloider Fibrillen .....	46
Tabelle 6.1: Verwendete Puffersubstanzen (mit Strukturformeln) .....	51
Tabelle 6.2: Signifikante Unterschiede zwischen den Lag-Zeiten der A $\beta$ -Aggregation.....	55
Tabelle 6.3: Signifikante Unterschiede in der Dicke von A $\beta$ -Fibrillen. ....	58
Tabelle 6.4: Inhibitoren des Lipidmetabolismus .....	81
Tabelle 8.1: Tabelle der Eigenschaften der Puffersubstanzen (Hersteller-Angaben) .....	107
Tabelle 8.2: Experimentell bestimmte Eigenschaften der Puffersubstanzen .....	108

### 8.1.5 Verzeichnis der Literatur

- Almeida, C. G., R. H. Takahashi, et al. (2006). "Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system." *J Neurosci* **26**(16): 4277-88.
- Alzheimer, A. (1906). "Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirnrinde." *Neurologisches Centralblatt* **23**: 1129-1136.
- Alzheimer, A. (1907). "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Allgemeine Z. Psychiatrie Psychisch-Gerichtliche Med.* **64**: 146-148.
- Armstrong, R. A., P. L. Lantos, et al. (2008). "What determines the molecular composition of abnormal protein aggregates in neurodegenerative disease?" *Neuropathology* **28**(4): 351-65.
- Aufenanger, J., J. Pill, et al. (1985). "Inhibition of cholesterol biosynthesis by BM 15.766." *Horm Metab Res* **17**(11): 612-3.
- Ben-Zvi, A. P. and P. Goloubinoff (2001). "Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones." *J Struct Biol* **135**(2): 84-93.
- Bickel, P. E., P. E. Scherer, et al. (1997). "Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins." *J Biol Chem* **272**(21): 13793-802.
- Bolard, J. (1986). "How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?" *Biochim Biophys Acta* **864**(3-4): 257-304.
- Braun, H. J. (1972). "[Properties of the amyloid and views on the pathogenesis of amyloidosis]." *Med Klin* **67**(40): 1267-70.
- Brookmeyer, R., E. Johnson, et al. (2007). "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease." *Alzheimers Dement* **3**(3): 186-91.
- Broome, B. M. and M. H. Hecht (2000). "Nature disfavors sequences of alternating polar and non-polar amino acids: implications for amyloidogenesis." *J Mol Biol* **296**(4): 961-8.
- Bruinsma, I. B., M. M. Wilhelmus, et al. (2009). "Apolipoprotein E protects cultured pericytes and astrocytes from D-Abeta(1-40)-mediated cell death." *Brain Res.*
- Cameron, B. and G. E. Landreth (2009). "Inflammation, microglia, and alzheimer's disease." *Neurobiol Dis.*
- Cataldo, A. M., J. L. Barnett, et al. (1996). "Colocalization of lysosomal hydrolase and beta-amyloid in diffuse plaques of the cerebellum and striatum in Alzheimer's disease and Down's syndrome." *J Neuropathol Exp Neurol* **55**(6): 704-15.
- Caughey, B. and P. T. Lansbury (2003). "Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders." *Annu Rev Neurosci* **26**: 267-98.

- Chimon, S., M. A. Shaibat, et al. (2007). "Evidence of fibril-like beta-sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's beta-amyloid." Nat Struct Mol Biol.
- Chiti, F., N. Taddei, et al. (2002). "Kinetic partitioning of protein folding and aggregation." Nat Struct Biol **9**(2): 137-43.
- Chiti, F., N. Taddei, et al. (2000). "Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein." Embo J **19**(7): 1441-9.
- Christopeit, T., P. Hortschansky, et al. (2005). "Mutagenic analysis of the nucleation propensity of oxidized Alzheimer's beta-amyloid peptide." Protein Sci **14**(8): 2125-31.
- Chung, H., M. I. Brazil, et al. (1999). "Uptake, degradation, and release of fibrillar and soluble forms of Alzheimer's amyloid beta-peptide by microglial cells." J Biol Chem **274**(45): 32301-8.
- Cinek, T. and V. Horejsi (1992). "The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases." J Immunol **149**(7): 2262-70.
- Crowther, R. A. and M. Goedert (2000). "Abnormal tau-containing filaments in neurodegenerative diseases." J Struct Biol **130**(2-3): 271-9.
- De Strooper, B., W. Annaert, et al. (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." Nature **398**(6727): 518-22.
- Dickson, D. W. (1997). "Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies." Neurobiol Aging **18**(4 Suppl): S21-6.
- Dobson, C. M. (1999). "Protein misfolding, evolution and disease." Trends Biochem Sci **24**(9): 329-32.
- DuBay, K. F., A. P. Pawar, et al. (2004). "Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains." J Mol Biol **341**(5): 1317-26.
- Duyckaerts, C., M. C. Potier, et al. (2008). "Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences." Acta Neuropathol **115**(1): 5-38.
- Eanes, E. D. and G. G. Glenner (1968). "X-ray diffraction studies on amyloid filaments." J Histochem Cytochem **16**(11): 673-7.
- Eghdamian, B. and K. Ghose (1998). "Mode of action and adverse effects of lipid lowering drugs." Drugs Today (Barc) **34**(11): 943-56.
- Eisenhauer, P. B., R. J. Johnson, et al. (2000). "Toxicity of various amyloid beta peptide species in cultured human blood-brain barrier endothelial cells: increased toxicity of dutch-type mutant." J Neurosci Res **60**(6): 804-10.
- Familian, A., P. Eikelenboom, et al. (2007). "Minocycline does not affect amyloid beta phagocytosis by human microglial cells." Neurosci Lett **416**(1): 87-91.
- Fandrich, M. (2007). "On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates." Cell Mol Life Sci **64**(16): 2066-78.
- Fernandez-Escamilla, A. M., F. Rousseau, et al. (2004). "Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins." Nat Biotechnol **22**(10): 1302-6.

- Fezoui, Y. and D. B. Teplow (2002). "Kinetic studies of amyloid beta-protein fibril assembly. Differential effects of alpha-helix stabilization." J Biol Chem **277**(40): 36948-54.
- Fiala, M., J. Lin, et al. (2005). "Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients." J Alzheimers Dis **7**(3): 221-32; discussion 255-62.
- Finder, V. H. and R. Glockshuber (2007). "Amyloid-beta aggregation." Neurodegener Dis **4**(1): 13-27.
- Fink, A. L. (1998). "Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid." Fold Des **3**(1): R9-23.
- Frackowiak, J., H. M. Wisniewski, et al. (1992). "Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce beta-amyloid fibrils." Acta Neuropathol (Berl) **84**(3): 225-33.
- Friedreich, N. and A. Kekulé (1859). "Zur Amyloidfrage." Virchows Archiv **16**: 50-65.
- Friedrich, R., K. Tepper, et al. (2010). "Mechanism of Amyloid Plaque Formation Suggests an Intracellular Basis of A $\beta$  Pathogenicity." Proc Natl Acad Sci U S A doi/10.1073/pnas.0904532106.
- Fukuchi, K., M. Hart, et al. (1998). "Alzheimer's disease and heparan sulfate proteoglycan." Front Biosci **3**: d327-37.
- Gellermann, G. P., T. R. Appel, et al. (2005). "Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6297-302.
- Gellermann, G. P., K. Ullrich, et al. (2006). "Alzheimer-like plaque formation by human macrophages is reduced by fibrillation inhibitors and lovastatin." J Mol Biol **360**(2): 251-7.
- Gill, S. C. and P. H. von Hippel (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Anal Biochem **182**(2): 319-26.
- Glenner, G. G., H. R. Keiser, et al. (1968). "Amyloid. VI. A comparison of two morphologic components of human amyloid deposits." J Histochem Cytochem **16**(10): 633-44.
- Goldsbury, C. S., S. Wirtz, et al. (2000). "Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors." J Struct Biol **130**(2-3): 217-31.
- Gomez-Isla, T., R. Hollister, et al. (1997). "Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Ann Neurol **41**(1): 17-24.
- Good, N. E., G. D. Winget, et al. (1966). "Hydrogen ion buffers for biological research." Biochemistry **5**(2): 467-77.
- Gorman, P. M., C. M. Yip, et al. (2003). "Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide: Abeta association kinetics at endosomal pH." J Mol Biol **325**(4): 743-57.
- Gotz, J., A. Schild, et al. (2004). "Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models." Int J Dev Neurosci **22**(7): 453-65.

- Green, R. C., L. S. Schneider, et al. (2009). "Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial." *Jama* **302**(23): 2557-64.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, et al. (1986). "Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments." *J Biol Chem* **261**(13): 6084-9.
- Gupta-Bansal, R., R. C. Frederickson, et al. (1995). "Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation." *J Biol Chem* **270**(31): 18666-71.
- Haass, C., M. G. Schlossmacher, et al. (1992). "Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism." *Nature* **359**(6393): 322-5.
- Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2): 101-12.
- Hardy, J. (2009). "The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal." *J Neurochem* **110**(4): 1129-34.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* **297**(5580): 353-6.
- Harper, J. D. and P. T. Lansbury, Jr. (1997). "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins." *Annu Rev Biochem* **66**: 385-407.
- Harper, J. D., C. M. Lieber, et al. (1997). "Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein." *Chem Biol* **4**(12): 951-9.
- Harris-White, M. E., Z. Balverde, et al. (2004). "Role of LRP in TGFbeta2-mediated neuronal uptake of Abeta and effects on memory." *J Neurosci Res* **77**(2): 217-28.
- Hartsel, S. C. and T. R. Weiland (2003). "Amphotericin B binds to amyloid fibrils and delays their formation: a therapeutic mechanism?" *Biochemistry* **42**(20): 6228-33.
- Holtzman, D. M., A. M. Fagan, et al. (2000). "Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model." *Ann Neurol* **47**(6): 739-47.
- Hortschansky, P., V. Schroeckh, et al. (2005). "The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation." *Protein Sci* **14**(7): 1753-9.
- Hou, L., I. Kang, et al. (2002). "Methionine 35 oxidation reduces fibril assembly of the amyloid abeta-(1-42) peptide of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* **277**(43): 40173-6.
- Irie, K., K. Murakami, et al. (2005). "Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." *J Biosci Bioeng* **99**(5): 437-47.
- iVitrenko, Y. A., E. O. Gracheva, et al. (2007). "Visualization of aggregation of the Rnq1 prion domain and cross-seeding interactions with Sup35NM." *J Biol Chem* **282**(3): 1779-87.

- Jansen, R., W. Dzwolak, et al. (2005). "Amyloidogenic self-assembly of insulin aggregates probed by high resolution atomic force microscopy." Bioophys J **88**(2): 1344-53.
- Jarrett, J. T., E. P. Berger, et al. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Biochemistry **32**(18): 4693-7.
- Jucker, M. and F. L. Heppner (2008). "Cerebral and peripheral amyloid phagocytes--an old liaison with a new twist." Neuron **59**(1): 8-10.
- Jung, S. S., J. Nalbantoglu, et al. (1996). "Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study." J Neurosci Res **46**(3): 336-48.
- Kaether, C., S. Schmitt, et al. (2006). "Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface." Traffic **7**(4): 408-15.
- Kandimalla, K. K., O. G. Scott, et al. (2009). "Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein." PLoS One **4**(2): e4627.
- Kang, J., H. G. Lemaire, et al. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-6.
- Katzman, R., R. Terry, et al. (1988). "Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques." Ann Neurol **23**(2): 138-44.
- Kawarabayashi, T., M. Shoji, et al. (2004). "Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." J Neurosci **24**(15): 3801-9.
- Kayed, R., E. Head, et al. (2003). "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis." Science **300**(5618): 486-9.
- Kheterpal, I., A. Williams, et al. (2001). "Structural features of the Abeta amyloid fibril elucidated by limited proteolysis." Biochemistry **40**(39): 11757-67.
- Kheterpal, I., S. Zhou, et al. (2000). "Abeta amyloid fibrils possess a core structure highly resistant to hydrogen exchange." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13597-601.
- Kimura, N. and K. Yanagisawa (2007). "Endosomal accumulation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein in neurons of aged monkey brains." Neuroreport **18**(16): 1669-73.
- Kirkitadze, M. D., G. Bitan, et al. (2002). "Paradigm shifts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: the emerging role of oligomeric assemblies." J Neurosci Res **69**(5): 567-77.
- Kisilevsky, R. (2000). "Review: amyloidogenesis-unquestioned answers and unanswered questions." J Struct Biol **130**(2-3): 99-108.
- Klein, W. L. (2002). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets." Neurochem Int **41**(5): 345-52.

- Klement, K., K. Wieligmann, et al. (2007). "Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's abeta(1-40) amyloid fibrils." J Mol Biol **373**(5): 1321-33.
- Klunk, W. E., J. W. Pettegrew, et al. (1989). "Two simple methods for quantifying low-affinity dye-substrate binding." J Histochem Cytochem **37**(8): 1293-7.
- Kluve-Beckerman, B., J. J. Liepnieks, et al. (1999). "A cell culture system for the study of amyloid pathogenesis. Amyloid formation by peritoneal macrophages cultured with recombinant serum amyloid A." Am J Pathol **155**(1): 123-33.
- Koenigs-knecht, J. and G. Landreth (2004). "Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism." J Neurosci **24**(44): 9838-46.
- Krebs, M. R., L. A. Morozova-Roche, et al. (2004). "Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils." Protein Sci **13**(7): 1933-8.
- Langui, D., N. Girardot, et al. (2004). "Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice." Am J Pathol **165**(5): 1465-77.
- Lashuel, H. A., D. Hartley, et al. (2002). "Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations." Nature **418**(6895): 291.
- Lavie, G., D. Zucker-Franklin, et al. (1978). "Degradation of serum amyloid A protein by surface-associated enzymes of human blood monocytes." J Exp Med **148**(4): 1020-31.
- Lemere, C. A., J. K. Blusztajn, et al. (1996). "Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation." Neurobiol Dis **3**(1): 16-32.
- LeVine, H., 3rd (1993). "Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution." Protein Sci **2**(3): 404-10.
- Ling, D., H. J. Song, et al. (2009). "Abeta42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in Drosophila." PLoS One **4**(1): e4201.
- Lodderstedt, G., R. Sachs, et al. (2008). "Hofmeister salts and potential therapeutic compounds accelerate in vitro fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 containing a disease-causing alanine extension." Biochemistry **47**(7): 2181-9.
- Lomakin, A., D. B. Teplow, et al. (1997). "Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid beta-protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 7942-7.
- Lopez De La Paz, M., K. Goldie, et al. (2002). "De novo designed peptide-based amyloid fibrils." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16052-7.
- Majumdar, A., D. Cruz, et al. (2007). "Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils." Mol Biol Cell **18**(4): 1490-6.
- Mandrekar, S., Q. Jiang, et al. (2009). "Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis." J Neurosci **29**(13): 4252-62.

- Marlow, L., M. Cain, et al. (2003). "Beta-secretase processing of the Alzheimer's amyloid protein precursor (APP)." *J Mol Neurosci* **20**(3): 233-9.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." *Nature* **430**(7000): 631-9.
- Maynard, C. J., A. I. Bush, et al. (2005). "Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Int J Exp Pathol* **86**(3): 147-59.
- McDermott, J. R. and A. M. Gibson (1996). "Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human cathepsin D." *Neuroreport* **7**(13): 2163-6.
- Meyer-Luehmann, M., T. L. Spires-Jones, et al. (2008). "Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease." *Nature* **451**(7179): 720-4.
- Miyake, Y., Y. Kozutsumi, et al. (1995). "Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, ISP-1/myriocin." *Biochem Biophys Res Commun* **211**(2): 396-403.
- Mobius, W., V. Herzog, et al. (1999). "Intracellular distribution of a biotin-labeled ganglioside, GM1, by immunoelectron microscopy after endocytosis in fibroblasts." *J Histochem Cytochem* **47**(8): 1005-14.
- Molina-Holgado, F., R. C. Hider, et al. (2007). "Metals ions and neurodegeneration." *Biometals* **20**(3-4): 639-54.
- Mori, H., K. Takio, et al. (1992). "Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease." *J Biol Chem* **267**(24): 17082-6.
- Mori, M., H. Itabe, et al. (2001). "Foam cell formation containing lipid droplets enriched with free cholesterol by hyperlipidemic serum." *J Lipid Res* **42**(11): 1771-81.
- Mudher, A. and S. Lovestone (2002). "Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands?" *Trends Neurosci* **25**(1): 22-6.
- Muller, D. J. and A. Engel (1997). "The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions." *Biophys J* **73**(3): 1633-44.
- Munishkina, L. A., E. M. Cooper, et al. (2004). "The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation." *J Mol Recognit* **17**(5): 456-64.
- Nagele, R. G., J. Wegiel, et al. (2004). "Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **25**(5): 663-74.
- Nielsen, L., R. Khurana, et al. (2001). "Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism." *Biochemistry* **40**(20): 6036-46.
- Nixon, R. A. (2007). "Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease." *J Cell Sci* **120**(Pt 23): 4081-91.
- Ono, K., K. Hasegawa, et al. (2004). "Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro." *J Neurosci Res* **75**(6): 742-50.
- Ono, K., Y. Yoshiike, et al. (2003). "Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease." *J Neurochem* **87**(1): 172-81.

- O'Nuallain, B., S. Shivaprasad, et al. (2005). "Thermodynamics of A beta(1-40) amyloid fibril elongation." Biochemistry **44**(38): 12709-18.
- Pappolla, M. A., R. A. Omar, et al. (1991). "Image analysis microspectroscopy shows that neurons participate in the genesis of a subset of early primitive (diffuse) senile plaques." Am J Pathol **139**(3): 599-607.
- Park, Y. H., Y. J. Kim, et al. (2009). "Inhibition of beta-amyloid(1-40) Peptide Aggregation and Neurotoxicity by Citrate." Korean J Physiol Pharmacol **13**(4): 273-9.
- Patton, R. L., W. M. Kalback, et al. (2006). "Amyloid-beta peptide remnants in AN-1792-immunized Alzheimer's disease patients: a biochemical analysis." Am J Pathol **169**(3): 1048-63.
- Peim, A., P. Hortschansky, et al. (2006). "Mutagenic exploration of the cross-seeding and fibrillation propensity of Alzheimer's beta-amyloid peptide variants." Protein Sci **15**(7): 1801-5.
- Pepys, M. B. and M. L. Baltz (1983). "Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein." Adv Immunol **34**: 141-212.
- Petkova, A. T., R. D. Leapman, et al. (2005). "Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils." Science **307**(5707): 262-5.
- Piper, R. C. and D. J. Katzmann (2007). "Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies." Annu Rev Cell Dev Biol.
- Priller, C., T. Bauer, et al. (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." J Neurosci **26**(27): 7212-21.
- Puchtler, H., F. Sweat, et al. (1962). "On the binding of Congo red by amyloid." J Histochem Cytochem **10**: 355-364.
- Puglielli, L., R. E. Tanzi, et al. (2003). "Alzheimer's disease: the cholesterol connection." Nat Neurosci **6**(4): 345-51.
- Raman, B., T. Ban, et al. (2005). "AlphaB-crystallin, a small heat-shock protein, prevents the amyloid fibril growth of an amyloid beta-peptide and beta2-microglobulin." Biochem J **392**(Pt 3): 573-81.
- Ramirez-Alvarado, M., J. S. Merkel, et al. (2000). "A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8979-84.
- Rapoport, M., H. N. Dawson, et al. (2002). "Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6364-9.
- Roberson, E. D. and L. Mucke (2006). "100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease." Science **314**(5800): 781-4.
- Rodal, S. K., G. Skretting, et al. (1999). "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." Mol Biol Cell **10**(4): 961-74.
- Roher, A. E., K. C. Palmer, et al. (1993). "Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from Alzheimer disease brain tissue." J Neurochem **61**(5): 1916-26.
- Roses, A. D. (1996). "The Alzheimer diseases." Curr Opin Neurobiol **6**(5): 644-50.

- Saavedra, L., A. Mohamed, et al. (2007). "Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E." J Biol Chem **282**(49): 35722-32.
- Sachse, C., M. Fandrich, et al. (2008). "Paired beta-sheet structure of an Abeta(1-40) amyloid fibril revealed by electron microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(21): 7462-6.
- Sattarahmady, N., A. A. Moosavi-Movahedi, et al. (2008). "Detergency effects of nanofibrillar amyloid formation on glycation of human serum albumin." Carbohydr Res **343**(13): 2229-34.
- Sawaya, M. R., S. Sambashivan, et al. (2007). "Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers." Nature **447**(7143): 453-7.
- Schenk, D., R. Barbour, et al. (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." Nature **400**(6740): 173-7.
- Schnitzer, J. E., P. Oh, et al. (1994). "Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules." J Cell Biol **127**(5): 1217-32.
- Selkoe, D. J. (1991). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." Neuron **6**(4): 487-98.
- Shie, F. S., R. C. LeBoeuf, et al. (2003). "Early intraneuronal Abeta deposition in the hippocampus of APP transgenic mice." Neuroreport **14**(1): 123-9.
- Sikkink, L. A. and M. Ramirez-Alvarado (2008). "Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain." Biophys Chem **135**(1-3): 25-31.
- Simard, A. R., D. Soulet, et al. (2006). "Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease." Neuron **49**(4): 489-502.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Sipe, J. D. and A. S. Cohen (2000). "Review: history of the amyloid fibril." J Struct Biol **130**(2-3): 88-98.
- Snow, A. D., R. T. Sekiguchi, et al. (1994). "Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in Alzheimer's disease brain." Am J Pathol **144**(2): 337-47.
- Snow, A. D., J. Willmer, et al. (1987). "A close ultrastructural relationship between sulfated proteoglycans and AA amyloid fibrils." Lab Invest **57**(6): 687-98.
- Snyder, S. W., U. S. Lador, et al. (1994). "Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths." Biophys J **67**(3): 1216-28.
- Soto, C. (1999). "Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease." Mol Med Today **5**(8): 343-50.
- Sunde, M. and C. C. Blake (1998). "From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation." Q Rev Biophys **31**(1): 1-39.
- Sunde, M., L. C. Serpell, et al. (1997). "Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction." J Mol Biol **273**(3): 729-39.

- Takahashi, R. H., T. A. Milner, et al. (2002). "Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology." Am J Pathol **161**(5): 1869-79.
- Tashima, Y., R. Oe, et al. (2004). "The effect of cholesterol and monosialoganglioside (GM1) on the release and aggregation of amyloid beta-peptide from liposomes prepared from brain membrane-like lipids." J Biol Chem **279**(17): 17587-95.
- Town, T., Y. Laouar, et al. (2008). "Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology." Nat Med **14**(6): 681-7.
- Townsend, L. E., J. Gilroy, et al. (1987). "Comparison of methods for analysis of CSF proteins in patients with Alzheimer's disease." Neurochem Pathol **6**(3): 213-29.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, et al. (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." Int J Cancer **26**(2): 171-6.
- van der Hilst, J. C., B. Kluge-Beckerman, et al. (2008). "Lovastatin inhibits formation of AA amyloid." J Leukoc Biol **83**(5): 1295-9.
- Vetrivel, K. S., H. Cheng, et al. (2004). "Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes." J Biol Chem **279**(43): 44945-54.
- Virchow, R. (1854). "Über eine im Gehirn und Rückenmark aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose." Virchows Arch. **6**: 135 - 38.
- Wanker, E. E., E. Scherzinger, et al. (1999). "Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates." Methods Enzymol **309**: 375-86.
- Wegiel, J. and H. M. Wisniewski (1990). "The complex of microglial cells and amyloid star in three-dimensional reconstruction." Acta Neuropathol (Berl) **81**(2): 116-24.
- West, M. J., P. D. Coleman, et al. (1994). "Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease." Lancet **344**(8925): 769-72.
- Westermarck, P., M. D. Benson, et al. (2005). "Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis." Amyloid **12**(1): 1-4.
- Westermarck, P., M. D. Benson, et al. (2007). "A primer of amyloid nomenclature." Amyloid **14**(3): 179-83.
- Wetzel, R. (2006). "Kinetics and thermodynamics of amyloid fibril assembly." Acc Chem Res **39**(9): 671-9.
- Wilcock, G. K., S. E. Black, et al. (2008). "Efficacy and safety of tarenflurbil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomised phase II trial." Lancet Neurol **7**(6): 483-93.
- Wilhelmus, M. M., R. M. de Waal, et al. (2007). "Heat shock proteins and amateur chaperones in amyloid-Beta accumulation and clearance in Alzheimer's disease." Mol Neurobiol **35**(3): 203-16.
- Wisniewski, H. M. and J. Wegiel (1994). "Beta-amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels." Acta Neuropathol (Berl) **87**(3): 233-41.

- Wolfe, M. S. (2002). "Therapeutic strategies for Alzheimer's disease." Nat Rev Drug Discov **1**(11): 859-66.
- Wolfe, M. S. (2006). "Alzheimer protease hitches a ride." Nat Med **12**(12): 1352-4.
- Wu, C., Z. Wang, et al. (2007). "Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations." J Am Chem Soc **129**(5): 1225-32.
- Xu, J., S. Chen, et al. (2001). "Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes." J Neurosci **21**(1): RC118.
- Xue, W. F., S. W. Homans, et al. (2008). "Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 8926-31.
- Yamada, T., B. Kluge-Beckerman, et al. (1995). "In vitro degradation of serum amyloid A by cathepsin D and other acid proteases: possible protection against amyloid fibril formation." Scand J Immunol **41**(6): 570-4.
- Yamamoto, N., Y. Fukata, et al. (2007). "GM1-ganglioside-induced Abeta assembly on synaptic membranes of cultured neurons." Biochim Biophys Acta **1768**(5): 1128-37.
- Yang, A. J., D. Chandswangbhuvana, et al. (1998). "Loss of endosomal/lysosomal membrane impermeability is an early event in amyloid Abeta1-42 pathogenesis." J Neurosci Res **52**(6): 691-8.
- Zaghi, J., B. Goldenson, et al. (2009). "Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy." Acta Neuropathol **117**(2): 111-24.
- Zandomenighi, G., M. R. Krebs, et al. (2004). "FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils." Protein Sci **13**(12): 3314-21.
- Zheng, H. and E. H. Koo (2006). "The amyloid precursor protein: beyond amyloid." Mol Neurodegener **1**: 5.

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Ich habe keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen.

Ich versichere, dass ich weder diese Arbeit noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe. Ebenso habe ich die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen.

Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen. Mir ist die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt.

### 8.1.6 Danksagung

Ich möchte meinem Betreuer Dr. Marcus Fändrich und Herrn Prof. Diekmann für die Möglichkeit dieser Promotion danken. Marcus danke ich besonders für eine kontinuierliche, gute Betreuung, für kritische Diskussion und wohlüberlegte Projektleitung.

Bei Ralf Friedrich möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Etablierung des Zellkultur-Modells bedanken. Auch für seine ständige Hilfsbereitschaft und wohlmeinende Diskussionen sage ich danke.

Nicole und Karolin bin ich dankbar für technische Assistenz und für *vielen, vielen* mg A $\beta$ -Peptid, die in diese Arbeit geflossen sind!

Für die Einführung in die Messtechnik zur Oberflächenspannung und die hilfreichen Tipps zur Arbeit mit Lipiden danke ich Kirsten Dahse. Dankeschön an dieser Stelle auch an Herrn Prof. Fahr und seiner Arbeitsgruppe für die Nutzung des Tensiometers am Institut für Pharmazie in Jena.

Ich danke allen in der Arbeitsgruppe für eine herzliche und unterstützende Atmosphäre! Vielen Dank für Anregungen, Diskussion und Kuchen... in Jena und Halle.

Für das Korrektur-Lesen meiner Arbeit möchte ich mich bei Henrike, Anne und Johanna bedanken.

Meinen Eltern und Geschwistern, sowie Annette und Jens möchte ich herzlich für die liebevolle Unterstützung und den guten Zuspruch in allen Phasen meiner Doktorarbeit danken!