

**DER EINFLUSS VON APOLIPOPROTEIN E AUF DIE
ZELLULÄREN MECHANISMEN DER
ALZHEIMERERKRANKUNG**

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaft“

Am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität
In Mainz

MARTINA STEFANIE KRAUTH
geboren in Darmstadt

Mainz 2006

Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan: _____

1. Berichterstatter: _____

2. Berichterstatter: _____

Datum der mündlichen Prüfung: _____

*In der Wissenschaft gleichen wir nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt*

Isaac Newton

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	- 1 -
1.1	Die Alzheimer'sche Krankheit	1
1.2	Zelluläre und biochemische Charakteristika	1
1.3	Risikofaktoren der Alzheimer'schen Krankheit	3
1.3.1	Mutationen in den Risikogenen	3
1.3.2	Das Alter	3
1.3.3	Apolipoprotein E	4
1.3.4	Sonstige Risikofaktoren	6
1.4	Prozessierung des Amyloidvorläufer Proteins (APP)	6
1.4.1	Zusammenhang Cholesterin und Morbus Alzheimer	10
1.5	Cholesterin	12
1.6	Vorkommen von Apolipoprotein E	13
1.7	Zielsetzung der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Chemikalien und Geräte	20
2.2	Häufig verwendete Puffer	25
2.3	Kulturmedien	27
2.4	Materialien für die Molekularbiologie	29
2.5	Molekularbiologische Methoden	30
2.5.1	Restriktionshydrolyse	30
2.5.2	Agarosegelelektrophorese	30
2.5.3	Modifizierung von DNA-Enden durch T4-DNA-Polymerase-Behandlung	31
2.5.4	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus einem Agarosegel	31
2.5.5	Kovalente Verknüpfung von DNA-Molekülen (Ligation)	32
2.5.6	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	32
2.5.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	33
2.5.8	Dauerkultur von <i>E.coli</i>	33
2.5.9	Plasmidminipräparation aus <i>E.coli</i> -Zellen	33
2.5.10	RNA-Isolierung aus eukaryontischen-Zellen	34
2.6	Zellkultur	35
2.6.1	Zelllinien	35
2.6.2	Umsetzen der Zellen	36
2.6.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	37
2.6.4	Transfektion mit Lipofectamin TM 2000	38
2.6.5	Herstellung stabiler Zelllinien	38

2.7	Immunologische und biochemische Methoden	39
2.7.1	Nachweis von C-terminalen APP-Spaltfragmenten	39
2.7.2	ApoE-Sekretionsanalyse	39
2.7.3	Herstellung eines Cholesterin/Methyl- β -Cyclodextrin-Komplexes (10 mM)	40
2.7.4	Alkalische Hydrolyse von Lovastatin und Simvastatin zur Aktivierung des Laktonrings	41
2.7.5	Gewinnung von Zellextrakten	41
2.7.6	Herstellung von Zelllysaten	42
2.7.7	Proteinbestimmung	42
2.7.8	Aufkonzentrierung der Proteine durch Ultrafiltration	43
2.7.9	Aufkonzentrierung der Proteine durch Lyophilisierung	43
2.7.10	Proteinfällung mittels PHM-L LIPOSORB TM	43
2.7.11	Proteinfällung nach Wessel (Methanol-Chloroform-Fällung)	44
2.7.12	Proteinfällung von APP α und APP β mittels Trichloressigsäure (TCA)	45
2.7.13	Bestimmung des Cholesteringehaltes einer Probe (Cholesterinbestimmung)	46
2.7.14	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.7.15	Western Blot	48
2.7.16	Immunoblot	49
2.8	Quantifizierung von mRNA durch Real time RT-PCR	50
2.8.1	RT-PCR, Schmelzkurvenanalyse und analytisches Agarosegel	51
2.8.2	Auswertung der RT-PCR	52
2.9	Bioinformatik	55
2.9.1	Software zur Bilder-Auswertung	55
2.9.2	Statistische und graphische Auswertungen	55
3.	ERGEBNISSE	56
3.1	Einfluss der Metalloproteinase ADAM10 auf die ApoE-Prozessierung	56
3.1.1	Klonierung eines Vektors für ApoE und ADAM10 oder ApoE und ADAM10dn	56
3.1.2	Untersuchung der ApoE-Prozessierung an ADAM10-ApoE oder ADAM10dn-ApoE doppeltransfizierten, embryonalen Nierenzellen	58
3.1.3	Untersuchung der Beeinflussung von hydroxamsäurebasierten Inhibitoren auf die ApoE-Spaltung in humanen Leberzellen (HepG2)	59
3.2	Untersuchung des Einflusses von ApoE auf die APP-Prozessierung in der Astrogliazelllinie hU373APP	61
3.2.1	Beeinflussung der C-terminalen Spaltfragmente von APP durch ApoE	62
3.2.2	Einfluss von ApoE auf die APP α - und APP β -Freisetzung	63
3.3	Die Rolle des Cholesteringehaltes auf die ApoE-Sekretion- und Expression	64
3.3.1	Auswirkung einer Cholesterinanreicherung auf die ApoE-Sekretion- und Expression	64
3.3.2	Einfluss einer Cholesterinentfernung mit M β CD auf die ApoE-Sekretion- und Expression	65
3.3.3	Einfluss von Statinen auf die ApoE-Sekretion- und Expression	67
3.4	Untersuchung der Beteiligung des Isoprenylierungsweges an der statinbedingten Hemmung der Apolipoprotein E-Sekretion	73
3.4.1	Einfluss von Mevalonat auf die ApoE-Sekretion- und Expression	74
3.4.2	Einfluss der Isoprenylierungssubstrate GGPP und FPP auf die ApoE-Sekretion	77
3.4.3	Einfluss von Isoprenylierungsinhibitoren auf die ApoE-Sekretion	78
3.5	Einfluss von Saragossasäure auf die ApoE-Sekretion- und Expression	79
3.6	Einfluss von 24(S)-Hydroxycholesterin auf die ApoE-Sekretion- und Expression	81

4. DISKUSSION	84
4.1 ApoE als Substrat von Metalloproteinasen der ADAM-Familie	85
4.1.1 Im <i>in vitro</i> Zellkultursystem erfolgt keine Spaltung von ApoE durch Metalloproteinasen	85
4.2 Proteolytische Prozessierung von APP durch Apolipoprotein E	86
4.2.1 <i>In vitro</i> erfolgt keine Spaltung von APP durch das Lipoprotein ApoE	87
4.3 Die Rolle des Cholesteringehaltes auf die Apolipoprotein E- Sekretion- und Expression	88
4.3.1 Die ApoE-Sekretion wird durch Variation des Cholesteringehaltes durch Methyl- β -Cyclodextrin beeinflusst	89
4.3.2 Im <i>in vitro</i> Zellkultursystem inhibieren Statine die ApoE-Freisetzung	91
4.4 Im Zellkultursystem hat der Isoprenylierungsweg keinen Einfluss auf die statinvermittelte ApoE-Sekretionssenkung	94
4.5 Die Hemmung der Squalensynthese führt zur Reduktion der ApoE-Freisetzung	96
4.6 24(S)-Hydroxycholesterin führt <i>in vitro</i> zur gesteigerten ApoE-Sekretion- und Expression	97
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	101
6. LITERATURVERZEICHNIS	102

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
A β	Amyloid β Peptid
ABCA1	ATP-Bindungs-Kassetten-Transporter A1
ABCG1	ATP-Bindungs-Kassetten-Transporter G1
ACAT	Acyl-CoA: Cholesterin-Acyltransferase
ADAM	“A disintegrin and metalloproteinase”
AK	Antikörper
amp	Ampicillin-Resistenzgen
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Alzheimer Vorläufer Protein
APPs α	α -Sekretase gespaltenes lösliches APP
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BACE	“Beta-site-APP-cleaving enzyme”
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>complementary</i> DNA (komplementäre DNA)
CMV	Cytomegalovirus
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin- N, N, N', N',-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N, N, N', N',-Tetraessigsäure
FAD	Familiäre Form der Alzheimer'schen Krankheit
FCS	Fötale Kälberserum

FPP	Farnesyl-Pyrophosphat
FXR	Farnesyl-X-Rezeptor
g	Gramm
GGPP	Gernaylgeranylpyrophosphat
GGTI	Geranylgeranyltransferase-I Inhibitor
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEK	<i>Human Embryonic Kitney</i>
HMGCoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoenzymA
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
L744,832	Farnesyl-Transferase Inhibitor
LDL	“Low density lipoprotein”
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LPDS	Lipid defizientes Serum
LXR	Leber-X-Rezeptor
m	milli
μ	mikro
M	mol/l
mA	Milliamper
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> -RNA (Boten-RNA)
n	nano
NFT	“ <i>neurofibrilläre tangles</i> ” (neurofibrilläre Bündel)
OH-Chol	Hydroxycholesterin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat

Abkürzungsverzeichnis

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TACE	“Tumor Nekrose Faktor- α converting enzyme”
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
T _m	Schmelztemperatur
U	units (Enzymeinheiten)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
VHDL	“very high-density lipoprotein”
VLDL	“very low-density lipoprotein”
w/v	Gewicht pro Volumen

ABBILDUNGS-UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung	1.1:	Einfluss der einzelnen ApoE-Isoformen auf extrazelluläre A β -Ablagerungen nach Inhibierung von Neprilysin.	5
Abbildung	1.2:	APP-Prozessierung.	8
Abbildung	1.3:	Darstellung von HDL.	13
Abbildung	1.4:	Darstellung der einzelnen ApoE-Isoformen.	14
Abbildung	1.5:	Modell von Apolipoprotein E.	15
Abbildung	1.6:	Bindung von 24(S)-Hydroxycholesterin an den nukleären Leber-X-Rezeptor und dem Retinoid-X-Rezeptor.	18
Abbildung	2.1:	Cyclodextrin-Struktur und Konformation	40
Abbildung	2.2:	Schematische Darstellung einer PCR-Amplifikationskurve	52
Abbildung	2.3:	Standardkurve der Ct-Werte einer Verdünnungsreihe von zellulärer mRNA.	53
Abbildung	3.1:	Exemplarisches Klonierungsschema für die Umklonierung von ApoE2- und ApoE4 in pcDNA3-Vektor in einen pIRES1hyg-Vektor.	57
Abbildung	3.2:	Einfluss von ADAM10 und dessen dominant negative Variante auf die ApoE Prozessierung in ApoE stabil überexprimierenden HEKADAM10 und HEKADAM10dn-Zellen.	58
Abbildung	3.3:	Einfluss des hydroxamsäurebasierten Inhibitors BB3103 auf die ApoE-Sekretion und APPs α -Sekretion in HepG2-Zellen.	59
Abbildung	3.4:	Einfluss des hydroxamsäurebasierten Inhibitors Ro31-9790 auf die ApoE-Sekretion und APPs α -Sekretion in HepG2-Zellen	60
Abbildung	3.5:	Einfluss von ApoE2 und ApoE4 auf die Bildung von C-terminalen Spaltfragmenten von APP in hU373APP-Zellen, die mit ApoE2, ApoE4 oder pIRES1hyg stabil transfiziert wurden.	62
Abbildung	3.6:	Einfluss von ApoE2 und ApoE4 auf die APPs α - und APPs β -Sekretion in hU373APP -Zellen, die mit ApoE2, ApoE4 oder pIRES1hyg stabil transfiziert wurden.	63
Abbildung	3.7:	Einfluss einer Cholesterinanreicherung durch einen Methyl- β -Cyclodextrin/Cholesterin-Komplex auf die ApoE-Sekretion- und Expression in CCFSTTGI-Zellen	64
Abbildung	3.8:	Einfluss einer Cholesterinextraktion mittels Methyl- β -Cyclodextrin auf die ApoE-Sekretion- und Expression in CCFSTTGI-Zellen	66
Tabelle	3.1:	Einfluss der Reaktionsdauer von M β CD auf den freien Cholesteringehalt	67
Abbildung	3.9:	Einfluss verschiedener Lovostatinkonzentrationen auf die Zellviabilität in hU373APP-Zellen	68

Abbildung	3.10:	Einfluss verschiedener Lovastatinkonzentrationen auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI-Zellen	69
Tabelle	3.2:	Einfluss unterschiedlicher Lovastatinkonzentrationen auf die ApoE-Sekretion und das freie Cholesterin in CCFSTTGI-Zellen.	69
Abbildung	3.11:	Einfluss verschiedener Lovastatinkonzentrationen auf die ApoE-Expression in CCFSTTGI-Zellen	70
Abbildung	3.12:	Real time RT-PCR der ApoE-mRNA aus der Astrozytomazelllinie CCFSTTGI nach Behandlung mit 5 μ M Lovastatin.	71
Abbildung	3.13:	Einfluss unterschiedlicher Statine auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI, hU373APP-ApoE2 und hU373APP-ApoE4-Zellen	72
Tabelle	3.3:	Einfluss der einzelnen Statine auf die ApoE-Sekretion in unterschiedlichen Zelllinien.	72
Abbildung	3.14:	Einfluss einer vierundzwanzigstündigen Inkubation mit 200 μ M Mevalonat beziehungsweise Mevalonat und Lovastatin auf die ApoE-Sekretion- und Expression in CCFSTTGI-Zellen	74
Abbildung	3.15:	Real time RT-PCR der ApoE-mRNA aus der Astrozytomazelllinie CCFSTTGI nach einer vierundzwanzigstündigen Behandlung mit 200 μ M Mevalonat beziehungsweise in Kombination mit Lovastatin	75
Abbildung	3.16:	Einfluss einer vierundzwanzigstündigen Inkubation von 200 μ M Mevalonat im serumreichen und serumarmen Kulturmedium auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI-Zellen	76
Abbildung	3.17:	Einfluss von Substraten des Isoprenylierungsweges auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI-Zellen	77
Abbildung	3.18:	Einfluss von Inhibitoren des Isoprenylierungsweges auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI-Zellen	78
Abbildung	3.19:	Einfluss von 50 μ M Saragossasäure auf die ApoE-Sekretion- und Expression in CCFSTTGI-Zellen	79
Tabelle	3.4:	Einfluss von 50 μ M ZA auf die ApoE-Sekretion und das freie Cholesterin in CCFSTTGI-Zellen.	80
Abbildung	3.20:	Einfluss einer vierundzwanzigstündigen Inkubation mit 500 nM 24(S)-Hydroxycholesterin auf die ApoE-Sekretion- und Expression in CCFSTTGI-Zellen	81
Abbildung	3.21:	Real time RT-PCR der ApoE-mRNA aus der Astrozytomazelllinie CCFSTTGI nach Behandlung mit 24(S)-Hydroxycholesterin beziehungsweise 24(S)-Hydroxycholesterin plus Lovastatin	82
Abbildung	4.1:	Cholesterinbiosynthese.	94

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer'sche Krankheit

Bereits in der Mitte des neunzehnten Jahrhunderts fasste der Franzose Esquirol (1845) zerebrale Erkrankungen, die das Urteilsvermögen, die Gedächtnisleistung und den Verstand der betroffenen Personen beeinflussen, unter dem Begriff Demenz zusammen. Ende des neunzehnten Jahrhunderts wurde diese klinische Diagnose durch neuropathologische Befunde präzisiert. Als Assistenzarzt der städtischen Irrenanstalt Frankfurt/Main untersuchte Alois Alzheimer nach dem Tod einer stark verwirrten und orientierungslosen Frau mit dem Namen Auguste D., deren Gehirnschnitte und entdeckte dabei Proteinablagerungen, Faserbündel und abgestorbene Nervenzellen. Durch die Entdeckung dieser Veränderungen, nach heutigem Stand der Forschung charakteristisch für Morbus Alzheimer, wurde deutlich, dass es sich um eine eigenständige Form von Demenz handelt. Morbus Alzheimer ist eine Zentrale-Nervensystem-Erkrankung des letzten Lebensdrittels und damit vorrangig eine alterstypische Erscheinung. Mit weltweit über zwanzig Millionen betroffener Personen, stellt sie heute die häufigste Form der primären, zerebralen Demenz dar (Haass und De Strooper, 1999). Eine Therapie mit Medikamenten ist zurzeit nur im geringen Umfang möglich, da die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der Erkrankung führen, noch nicht hinreichend geklärt sind. Aus diesem Grund sind molekulare und zellbiologische Untersuchungen unabdingbar, um die pathologischen Mechanismen zu entschlüsseln.

1.2 Zelluläre und biochemische Charakteristika

Morbus Alzheimer ist neuropathologisch und pathophysiologisch neben den bereits beschriebenen Merkmalen durch den Verlust von Synapsen, verminderte Neurotransmitter-Ausschüttung, zerebralen Entzündungsprozessen und durch neuronalen Zelltod gekennzeichnet. Dies äußert sich bei den betroffenen Personen anfänglich in der Beeinträchtigung der Merkfähigkeit und des Denkvermögens, geht über in Konfusion und verminderte kognitive Leistungen und resultiert schließlich in der absoluten Hilfsbedürftigkeit.

Molekular ist die Alzheimer'sche Krankheit charakterisiert durch das Vorhandensein von extrazellulären Eiweißablagerungen in Form von Plaques die über die gesamte Hirnrinde verteilt sind sowie fibrillären Bündeln („*neurofibrilläre tangles*“; NFT) innerhalb der

Nervenzellen. Die Plaques bestehen im Wesentlichen aus unlöslichen, 39-43 Aminosäuren langen Amyloid Beta-Peptiden ($A\beta_{39-43}$), die durch Prozessierung des Amyloid-Vorläufer Proteins APP entstehen. Dahingegen sind neurofibrilläre Bündel aus zytoplasmatischen Fibrillen aufgebaut, die sich aus hyperphosphoryliertem Tauprotein zusammensetzen (Goedert, 1996, Lee, 1995).

Unter normalen physiologischen Bedingungen wird Tau hauptsächlich in Neuronen des Zentralen Nervensystems (ZNS) exprimiert, wo es durch Bindung an Mikrotubuli für deren Stabilisierung sorgt. Demnach ist Tau für die strukturelle Integrität der Neuronen verantwortlich. Dabei bestimmt der Grad der Phosphorylierung die Stärke der Interaktion des Proteins Tau mit den Mikrotubuli. Eine vermehrte Phosphorylierung führt zur Schwächung, eine Dephosphorylierung zur Stärkung der Interaktion.

Bei einem pathologischen Prozess, wie Morbus Alzheimer, kommt es bereits im frühen Stadium zu einer vermehrten Phosphorylierung von Tau. Dies resultiert in einer Ablösung des Tau-Proteins von den Mikrotubuli, wodurch eine Destabilisierung zustande kommt. Als Konsequenz kommt es zu einem Zusammenbruch der strukturellen Integrität der Neuriten- was unter anderem zum Tod der Neuronen führt- sowie des Vesikel- und Organellen-Transportes. Das freigewordene hyperphosphorylierte Tau beginnt zu aggregieren, so dass es zur Bildung von unlöslichen, intrazellulären, neurofibrillären Bündeln kommt.

Das extrazellulär vorkommende Amyloid-Beta Protein ($A\beta$) existiert in zwei Formen, der löslichen, nicht aggregierten und der löslichen, oligomeren Form. Besonders die lösliche, oligomere Form von $A\beta$ hat eine neurotoxische Wirkung, was bei hoher Konzentration direkt zum Absterben von Neuronen führen kann. Eine andere Ursache für das Sterben der Neuronen ist eine indirekte Wirkung des Amyloid-Beta Proteins. Sie wird vermittelt durch aktivierte Mikroglia- und Astrozytenzellen, die amyloide Plaques umgeben. Diese setzen Sauerstoff- und Stickstoffradikale, proteolytische Enzyme und entzündungsverursachende Cytokine frei (Griffin *et al.*, 1998; Akiyama *et al.*, 2000).

1.3 Risikofaktoren der Alzheimer'schen Krankheit

1.3.1 Mutationen in den Risikogenen

Die Fälle der Alzheimer'schen Krankheit werden eingeteilt nach frühem (< 60 Jahre) oder spätem (> 60 Jahre) Krankheitsbeginn und nach sporadischem (late-onset) oder genetisch bedingtem (early-onset) Auftreten. Weltweit kann nur fünf bis zehn Prozent der Alzheimer'schen Erkrankungen eine genetisch, autosomal dominant vererbten Prädisposition zugeordnet werden (Haass, 1996). Die meisten Fälle von Morbus Alzheimer treten sporadisch auf. Die erbliche Form der Erkrankung (Familiar-Alzheimer-Disease; FAD) korreliert häufig mit Mutationen in Genen, die an der Entstehung der Krankheit beteiligt sind. Hier spielen besonders Mutationen des Gens für das Amyloid-Vorläufer Protein (APP) auf Chromosom einundzwanzig, des Presenilin-1-Gens (PS1) auf Chromosom vierzehn sowie des Presenilin-2 Gens (PS2) auf Chromosom eins eine Rolle (Tandon *et al.*, 2000). Mutationen des PS-1 Gens sind bei vierzig bis sechzig Prozent aller früh auftretenden Krankheitsfälle (zwischen dreißigstem und sechzigstem Lebensjahr) zu finden, während Mutationen der anderen Gene nur bei weniger als einem Prozent der Fälle auftreten (Hardy *et al.*, 1997, Mattson *et al.*, 1998). Die Mutationen gehen mit einer stark forcierten Bildung löslicher Protofibrillen beziehungsweise einem erhöhten Verhältnis von A β ₄₂ zu A β ₄₀ – Peptiden und einem sehr frühem Krankheitsbeginn einher (Selkoe, 2001b; Sambamurti *et al.*, 2002).

Die genannten genetischen Faktoren sind aber nur für einen kleinen Teil der auftretenden Fälle der Alzheimer'schen Krankheit verantwortlich. Neben bisher noch unbekanntem Risikofaktoren begünstigen nachfolgend beschriebene Faktoren die Ausbildung von Morbus Alzheimer.

1.3.2 Das Alter

Der bedeutendste soziodemographische Risikofaktor der sporadischen Alzheimer Demenz ist das Alter (Gao *et al.*, 1998; Jorm und Jolley, 1998), wenngleich die zugrunde liegenden Mechanismen noch ungeklärt sind. Im Zuge der Hirnalterung verändert sich, bedingt durch eine Cholesterin-Anreicherung, die Membranfluidität (Eckert *et al.*, 2001), es kommt zur Abnahme der antioxidativen Kapazität (Vohra *et al.*, 2001; Sandhu und Kaur, 2002) sowie zu einer Änderung der Dichte, Verteilung und Aktivität synaptischer Funktionsproteine wie Neurotransmitter, Enzyme oder Rezeptoren (Grange-Midroit *et al.*, 2002; Clayton *et al.*, 2002). Der jeweilige Einfluss dieser Prozesse auf die Krankheitspathogenese ist im

Einzelnen nicht genau abzuschätzen, eine Verknüpfung mehrerer Phänomene wäre aber denkbar. Ein Risikofaktor für das späte Auftreten der Alzheimer'schen Krankheit ist neben dem Alter das Vorhandensein des $\epsilon 4$ - Allels von Apolipoproteins E (ApoE $\epsilon 4$; *Apo-* von griechisch *ἀπό*: Ab-, Weg-) (siehe Punkt 1.3.3). Jede Kopie des $\epsilon 4$ - Allels senkt das Alter für das Auftreten der Krankheit um etwa sieben bis neun Jahre. Im Vergleich zur Gesamtpopulation ist das $\epsilon 4$ -Allel bei Morbus Alzheimer erkrankten Personen überrepräsentiert (Strittmatter *et al.*, 1993).

1.3.3 Apolipoprotein E

Einen gesicherten Risikofaktor für die Ausbildung der Alzheimer Demenz stellt das Vorliegen des $\epsilon 4$ -Allels des Apolipoprotein E-Proteins auf Chromosom neunzehn dar (Poirier *et al.*, 1993; Corder *et al.*, 1993). Es unterscheidet sich von den beiden anderen Allel-Varianten $\epsilon 2$ und $\epsilon 3$ nur in zwei Aminosäure-Punktmutationen, die jedoch bedeutsame konformative Veränderungen bewirken (Cedazo-Minguez und Cowburn, 2001). Träger des $\epsilon 4$ -Allels, das unter den drei Allel-Varianten mit einer Häufigkeit von etwa vierzehn bis sechzehn Prozent vorkommt, weisen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf (Czech *et al.*, 1994). In diesem Zusammenhang haben Untersuchungen an doppeltransgenen Mäusen, die mit humanem APP- und ApoE transfiziert wurden, gezeigt, dass ApoE die A β -Ablagerungen in der Hirnrinde der Mäuse steigern kann und entscheidend zur Fibrillenbildung beiträgt (Holtzman *et al.*, 2000). Die Stärke des Einflusses von ApoE ist dabei isoformenabhängig. Transgene Mäuse, die das $\epsilon 4$ -Allel tragen, haben stärkere A β -Ablagerungen als diejenigen, die ApoE3 exprimieren. ApoE-defiziente Mäuse weisen ebenfalls A β -Ablagerungen auf. Allerdings kann in diesem Fall keine Aggregation der A β -Peptide mit β -Faltblattstruktur durch eine Anfärbung mit Thioflavin-S nachgewiesen werden (Dolev *et al.*, 2004; siehe Abbildung 1.1).

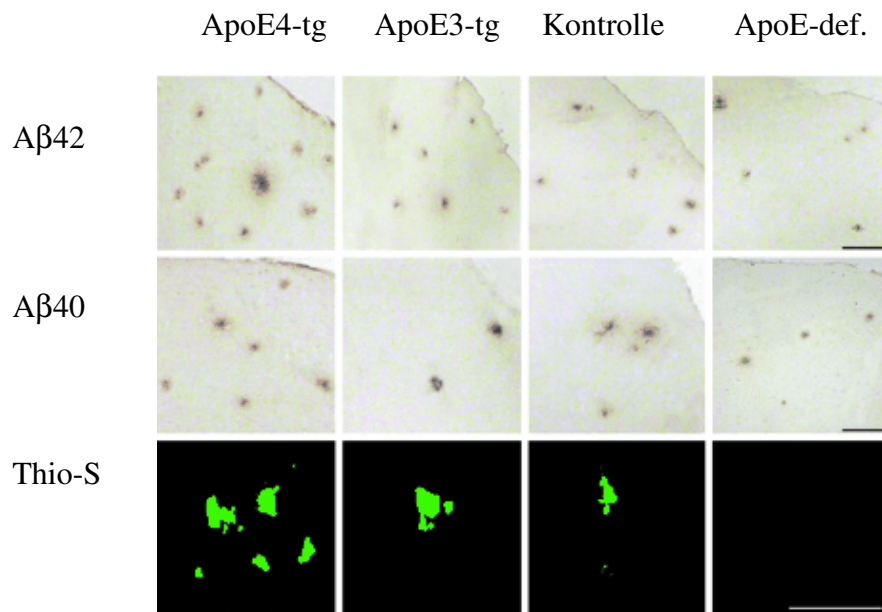


Abbildung 1.1: Einfluss der einzelnen ApoE-Isoformen auf extrazelluläre A β -Ablagerungen nach Inhibierung von Neprilysin. Es wurden koronare Gehirnschnitte von mit menschlichem ApoE4- (ApoE4-tg) und ApoE3- (ApoE3-tg.) transfizierten, ApoE-defizienten (ApoE-def.) und Kontroll Mäusen untersucht, denen einen Monat lang der Neprilysin-Inhibitor Thiorphan verabreicht wurde. Fibrilläre A β -Ablagerungen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin-S nachgewiesen. (Skalierung = $50\mu\text{M}$)

Trotz des Zusammenhangs zwischen dem ϵ 4-Allel und der Ausbildung von Morbus Alzheimer ist das ϵ 4-Allel weder notwendig noch hinreichend, um der alleinige Auslöser von Morbus Alzheimer zu sein, erhöht aber das Risiko für die Ausbildung der Krankheit. So wird die Apolipoprotein E4-Genvariante bei jeder zweiten Person gefunden, die an Morbus Alzheimer erkrankt ist. Das Erkrankungsalter wird dabei durch den Besitz des ϵ 4-Allels bis um zwanzig Jahre vorverlegt (Corder *et al.*, 1993), wobei der Mechanismus des zunehmenden Risikos bisher noch unklar ist. Die genetische Assoziation weist zudem einen Gendosis-Effekt auf, so dass sich das Vorhandensein von zwei Kopien des ϵ 4-Allels additiv auswirkt (Saunders *et al.*, 1993). Bei homozygoten Trägern des ϵ 4-Allels (ungefähr zwei Prozent der Menschen) verdoppelt sich die Wahrscheinlichkeit nach Erreichen des achtzigsten Lebensjahres an Morbus Alzheimer zu erkranken (Corder *et al.*, 1993). Dahingegen ist das ϵ 2-Allel negativ mit der Ausbildung von Morbus Alzheimer korreliert (Corder *et al.*, 1994; Royston *et al.*, 1994). Der ApoE-Genotyp modifiziert demnach in erster Linie das relative Erkrankungsrisiko und damit das Ersterkrankungsalter (Meyer *et al.*, 1998).

1.3.4 Sonstige Risikofaktoren

Befunde von Kölsch *et al.* (2002) und Papassotiropoulos *et al.* (2003) belegen eine genetische Assoziation zwischen einem Polymorphismus im CYP46-Gen, das für die 24(S)-Cholesterin-Hydroxylase kodiert, und der Ausbildung der Alzheimer Demenz. Dabei ist CYP46 maßgeblich an der Regulation der zentralen Cholesterinhomöostase beteiligt. Der CYP-Polymorphismus determiniert anscheinend ein Funktions-Defizit der Cholesterin-Hydroxylase (Wolozin, 2003).

Kausale Zusammenhänge zwischen Ernährungsgewohnheiten und der Ausbildung von Morbus Alzheimer sind nicht eindeutig belegt, obgleich einige Studien protektive Effekte von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Nahrung dokumentieren (Kalmijn *et al.*, 1997; Friedland, 2002). Gleichfalls ist die Prävalenz für die Alzheimer Demenz bei Menschen mit einem erhöhten Serum-LDL-Cholesterinspiegel und Bluthochdruck begünstigt (Kivipelto *et al.*, 2002). Insgesamt ist die Datenlage jedoch nicht einheitlich und es ist letztendlich unklar, welche die primären Auslöser der Alzheimer Demenz sind.

1.4 Prozessierung des Amyloidvorläufer Proteins (APP)

Wie zuvor bereits erwähnt, treten als neuropathologische Charakteristika der Alzheimer Demenz A β -Plaques und Tau-Ablagerungen auf. Hauptbestandteil der senilen Plaques bildet das so genannte Amyloid Beta-Protein das durch proteolytische Spaltung aus dem Vorläuferprotein APP hervorgeht, in dessen Sequenz die Amyloid-Domäne konserviert vorliegt (siehe Abbildung 1.2). Grundsätzlich kann das APP-Protein über zwei alternative Prozessierungswege geschnitten werden. Der nicht-amyloidogene Weg führt zu einem löslichen, nicht β -Amyloid bildenden Protein das nicht toxisch ist, während der amyloidogene Weg zur Bildung von Amyloid-Beta-Protein führt und somit pathologisch relevanter ist.

Abbildung 1.2 zeigt schematisch die Prozessierung von APP. Bei der β -sekretorischen Prozessierung wird das APP durch eine β -Sekretase innerhalb der Transmembranregion prozessiert, wodurch ein lösliches APPs β und ein membrangebundenes, zwölf Kilodalton großes Fragment (neunundneunzig Aminosäuren = C99) entsteht. Das C99-Fragment wird anschließend innerhalb der Transmembranregion durch die γ -Sekretase am Valin 711 oder am Isoleucin 713 gespalten, welches zur Bildung des amyloidogenen A β -Peptids mit vierzig oder zweiundvierzig Aminosäuren (A β ₄₀ und A β ₄₂) führt. In der Membran verbleibt das sieben Kilodalton große p7 Fragment. Das A β -Peptid wird extrazellulär

sezerniert und kann sich durch Umlagerung von einer α -Helix zu einer β -Faltblatt-Konformation zunächst zu Oligomeren zusammen lagern. Diese bilden Protofibrillen aus denen am Ende der Kette neuritische Plaques entstehen (Jarrett *et al.*, 1993). Neben der extrazellulären A β -Sekretion kann es auch zu einer intrazellulären A β_{42} -Aggregatbildung kommen, die sich in fibrillären, diffusen Plaques äußern (Selkoe, 1999, Selkoe, 2001b). Die bei diesem amyloiden Stoffwechselweg entstehenden A β - und p7-Peptide, werden von humanen Zellen konstitutiv sezerniert. Sie sind im pico bis nanomolaren Bereich sowohl im Plasma als auch in der Cerebrospinalflüssigkeit von gesunden Menschen nachzuweisen (Seubert *et al.*, 1992). Daher stellt diese Proteolyse kein ausschließliches pathologisches Phänomen dar sondern ist Bestandteil eines normalen, physiologischen Prozesses. Im zweiten nicht-amyloiden Stoffwechselweg schneidet eine α -Sekretase am C-terminalen Teil zwischen Lysin 16 und Leucin 17 innerhalb der A β -Sequenz und liberiert somit ein lösliches APPs α -Fragment, das sezerniert wird, sowie ein C-terminales, membranassoziertes, zehn Kilodalton großes Fragment (83 Aminosäuren = C83; CTF α) (Esch *et al.*, 1990). Das C83 Fragment kann in einem zweiten enzymatischen Schritt durch eine γ -Sekretase weiter in ein drei Kilodalton großes, lösliches p3 Fragment und in ein sieben Kilodalton großes, membrangebundenes p7 Fragment gespalten werden.

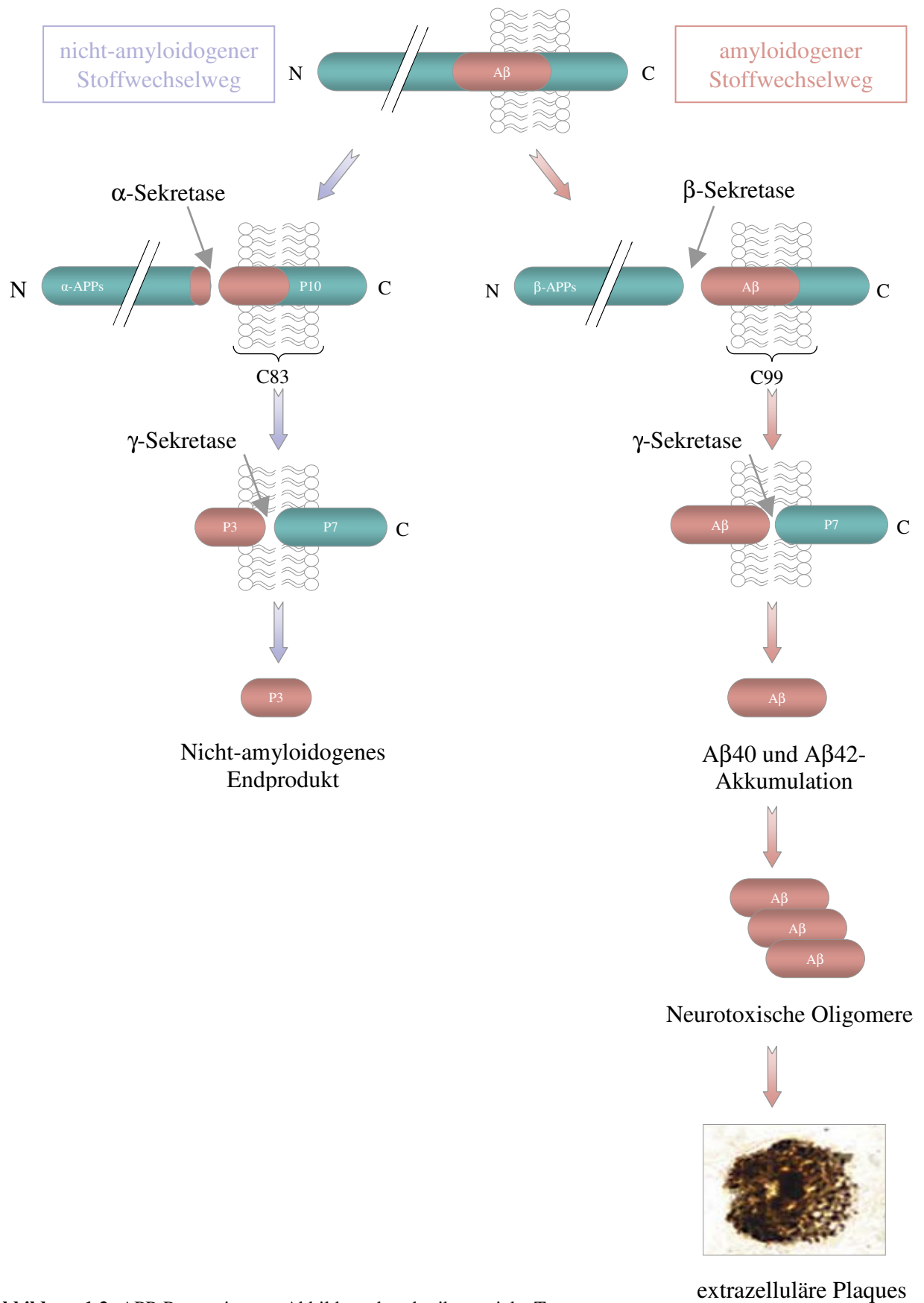


Abbildung 1.2: APP-Prozessierung. Abbildungsbeschreibung siehe Text.

Ein entscheidender Schritt für eine mögliche Therapie von Morbus Alzheimer war die Identifizierung einiger an der Prozessierung von APP beteiligten Sekretasen beziehungsweise möglicher Kandidaten.

Bei der α -Sekretase handelt es sich um eine Zink-abhängige Metalloprotease (Parvathy *et al.*, 1998), deren Aktivität durch die Stimulierung der Proteinkinase C mit dem Phorbol ester PMA (Buxbaum *et al.*, 1990) und Agonisten des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor (Nitsch *et al.*, 1992) stimuliert werden kann. Bisher wurden drei α -Sekretasen identifiziert, ADAM9 (Roghani *et al.*, 1999), ADAM10 (Lammich *et al.*, 1999) und ADAM17. Letzteres trägt auch das Synonym TACE für „tumor Nekrosis Factor (TNF)- α converting enzyme“, da es dieses auch zu spalten vermag. Alle drei Sekretasen gehören zu der Familie der Adamalysin-Protease/Disintegrin-Metalloproteinase-Familie (*a disintegrin and metalloproteinase*, ADAM) (Wolfsberg *et al.*, 1995), wobei noch unklar ist, ob nur eine oder alle drei zusammen die physiologisch relevante α -Sekretase bilden (Lichtenthaler und Haass, 2004).

Eine Überexpression von ADAM9 in COS-7-Zellen führte zu einer gesteigerten APPs α -Sekretion. Allerdings konnte gereinigtes ADAM9 ein synthetische APP-Peptid *in vitro* nicht an der spezifischen α -Sekretase Spaltstelle prozessieren (Roghani *et al.*, 1999). Hinweise für eine α -Sekretase-Aktivität von ADAM10 lieferte Lammich *et al.* 1999. Durch N-terminale Sequenzierung von gereinigtem ADAM10 aus Rindernieren konnte er belegen, dass eine Proprotein-Konvertase-Erkennungssequenz als Spaltstelle dient, um die reife, katalytisch aktive Form von ADAM10 zu sezernieren (Lammich *et al.*, 1999). Eine Überexpression von ADAM10 in HEK-Zellen führte zu einer Erhöhung der α -sekretorischen Spaltung von APP, wohingegen die Expression einer dominant negativen Mutante, bei der die katalytische Domäne fehlte, die konstitutive und die Phorbol ester-induzierte α -Sekretase-Aktivität inhibierte. In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie an ADAM10-transgenen Mäusen, konnte eine erhöhte APPs α -Sekretion beobachtet werden, die auf eine verstärkte Aktivität der α -Sekretase zurückzuführen war und die in einer verminderten Plaque-Bildung resultierte (Postina *et al.*, 2004).

Für die dritte α -Sekretase ADAM17 konnte die Arbeitsgruppe von Buxbaum 1998 zeigen, dass die katalytische Domäne von ADAM17 in der Lage ist, ein synthetisches Peptid, das die α -Sekretase-Schnittstelle des APPs enthält, exakt an der α -sekretorischen Stelle zu schneiden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass sowohl ADAM17 als auch ADAM10 α -Sekretasen sind, die gleichzeitig exprimiert werden können.

Die β -Sekretase wurde in mehreren unabhängigen Untersuchungen als Mitglied der Pepsin-Familie der Aspartylproteasen identifiziert und als BACE für „*beta-site APP cleaving enzyme*“ bezeichnet. (Hussain *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999). Es wird wie ADAM10 als Vorläuferprotein mit einer Prodomäne und einer Proprotein-Konvertase-Erkennungssequenz an der Grenze zur katalytischen Domäne synthetisiert. Die Erkennungssequenz wird entfernt, nachdem BACE das Endoplasmatische Retikulum verlassen hat (Capell *et al.*, 2000). Die Bildung von amyloiden Plaques hängt nicht alleine von der β -sekretorischen, sondern auch von der Prozessierung durch die γ -Sekretase ab. Als mögliche Kandidaten für die γ -Sekretase werden Preseniline diskutiert, die durch Komplexierung mit Nicastrin, Aph-1 (anterior pharynx defective-1) und Pen-2 (presenilin enhancer-2) ihre Aktivität erlangen (Gandy, 2005). Sie fungieren wahrscheinlich als γ -Sekretase, indem ihre Transmembranregion eine Pore oder einen Kanal bildet bei dem die polaren Reste der Aminosäuren nach innen gerichtet sind, damit das katalytische Wasser interagieren kann (Wolfe & Haass, 2001).

1.4.1 Zusammenhang Cholesterin und Morbus Alzheimer

Aus einer Vielzahl von epidemiologischen Studien mehren sich seit den letzten Jahren die Hinweise auf eine Korrelation zwischen einem hohen Cholesterinspiegel, der APP-Prozessierung und der Ausbildung von Morbus Alzheimer. Individuen mit einem gesteigerten Plasmacholesteringehalt, der scheinbar von dem ApoE ϵ 4 Allel des Apolipoprotein E Gens beeinflusst wird (Notkola *et al.*, 1998), besitzen eine höhere Präferenz für die Ausbildung der Alzheimer'schen Krankheit. Bei der Produktion von β -Amyloid, welches eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie von AD einnimmt, spielt der Cholesteringehalt eine entscheidende Rolle, da die Aktivität der β - und γ -Sekretase-Komplexe vom Cholesterin-Stoffwechsel abhängig sind. Beide Komplexe befinden sich in cholesterinreichen Lipiddomänen innerhalb der Membran. Ihre Aktivität wird durch abnehmenden Cholesteringehalt inhibiert (Cordy *et al.*, 2003; Fassbender *et al.*, 2001; Wahrle *et al.*, 2002).

Der Zusammenhang zwischen A β -Produktion und Cholesteringehalt legt nahe, dass durch eine Absenkung des Cholesterinspiegels eine Reduzierung des Erkrankungsrisikos erreicht werden kann.

Auch die Aktivität der α -Sekretase ADAM10 wird durch den Cholesteringehalt der Zellmembran beeinflusst. So resultierte eine Cholesterinentfernung mit Methyl- β -

Cyclodextrin, eine etablierte Substanz zu *in vitro* Modulation des membranären und zellulären Cholesteringehalts, an verschiedenen neuronalen Zelllinien in einer deutlich erhöhten APP α -Freisetzung, die wahrscheinlich auf eine gesteigerte Membranfluidität und auf eine Hemmung der APP-Internalisierung zurückzuführen ist (Kojro *et al.*, 2001).

Weiterhin konnte durch die Arbeit von Kojro *et al.* gezeigt werden, dass Cholesterinsenkende Medikamente, die die Cholesterinsynthese inhibieren, die α -sekretorische Prozessierung des APP steigern können. Es handelt sich hierbei um die als Statine bezeichneten Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A (HMGCoA) Reduktase. So führte eine Behandlung von peripheren und neuronalen Zellen mit Lovastatin zu einer deutlich verstärkten α -Sekretaseaktivität, die wahrscheinlich aus einer ADAM10-Überexpression resultierte (Kojro *et al.*, 2001). Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Cholesteringabe aufgehoben werden. Dies lässt vermuten, dass der Effekt von Lovastatin auf die α -Sekretaseaktivität aus einer Reduzierung der Cholesterinsynthese resultiert (Kojro *et al.*, 2001).

Eine Studie an transgenen Alzheimer-Mäusen hat außerdem gezeigt, dass diese auf eine cholesterinreiche Diät mit einer erhöhten Produktion von A β reagierten, wohingegen die Gabe von Statinen die A β -Konzentration halbierte (Refolo *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang beobachtete Eckert, dass der Cholesteringehalt im Gehirn von ApoE-defizienten Mäusen durch Statine unbeeinflusst bleibt (Eckert *et al.*, 2001). Dies legt nahe, dass Statine über einen ApoE-abhängigen Mechanismus den Cholesterinspiegel zu regulieren vermögen.

Epidemiologische Studien haben weiterhin gezeigt, dass eine Reduktion der Häufigkeit für Morbus Alzheimer assoziiert ist mit der Einnahme von Statinen (Wolozin *et al.*, 2000). In einer Doppelblindstudie von Simons und Kollegen (Simons *et al.*, 2002), konnte der LDL-Cholesterinspiegel von Alzheimer-Patienten durch die Einnahme von Simvastatin um zweiundfünfzig Prozent gesenkt werden. Dabei blieb die Konzentration von Cholesterin in der Cerebrospinalflüssigkeit unverändert, wohingegen sich der Gehalt der Cholesterinorstufe Lathosterol und des Metaboliten 24(S)-Hydroxycholesterin verminderte.

Neue Befunde zeigen, dass der 24(S)-Hydroxycholesterinspiegel im frühem Stadium von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder der Niemann-Pick Typ C Krankheit sowohl im Serum als auch in der cerebrospinalen Flüssigkeit erhöht ist (Lütjohann *et al.*, 2000; Dietschy und Turley, 2001). Dies lässt sich durch eine

Umwandlung von überschüssigem Cholesterin zu dem Oxysterol erklären, welches aus beschädigten oder abgestorbenen Neuronen stammt (Ignatius *et al.*, 1987). Der Gehalt von 24(S)-Hydroxycholesterin im Plasma scheint dabei mit der Schwere der Alzheimer'schen Krankheit in Korrelation zu stehen (Lütjohann *et al.*, 2000). Da das 24(S)-Hydroxycholesterin hauptsächlich aus dem Gehirn stammt, spiegelt das zirkulierende Oxysterol im Plasma den Cholesterin-Abbau des Gehirns wider und könnte als Marker zur Früherkennung der Alzheimer Demenz dienen (Papassotiropoulos *et al.*, 2000).

1.5 Cholesterin

Das stark hydrophobe Cholesterin ist in Säugerzellen ein unverzichtbarer Bestandteil von Membranen, der Gallensäure, sowie Vorstufe von lebenswichtigen Steroidhormonen. Seitenwege des Cholesterinstoffwechsels führen zu weiteren Isoprenoiden mit wichtigen zellulären Funktionen, wie Dolichol, Ubichinon, Geranylgeranyl- und Farnesylpyrophosphat.

Cholesterin stellt den Hauptregulator der Membranfluidität dar und nimmt bei der Steuerung der Funktionalität von Rezeptorproteinen eine primäre Vermittlerrolle ein. Eine Vielzahl von Proteinen wie der Oxytocin-Rezeptor oder Enzyme der Cholesterin-Synthesekaskade verändern ihre Aktivität durch direkte Bindung von Cholesterin über eine Cholesterin-Sensing-Domäne (Gimpl *et al.*, 1997; Lange und Steck, 1998; Gimpl *et al.*, 2002). Im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses kommt es in neuronalen Membranen zu einer deutlichen Anreicherung von Cholesterin im Vergleich zu Phospholipiden, so dass die Membranfluidität deutlich abnimmt (Nagy *et al.*, 1983; Wood *et al.*, 1984; Eckert *et al.*, 2001). Aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit werden Lipidsubstanzen wie Cholesterin, Cholesterinester, Triglyceride oder Phospholipide nicht in freier Form, sondern gebunden an Apolipoproteine transportiert (Johnson *et al.*, 1997). Diese lassen sich in verschiedene Typen unterteilen (A, B, C, D, E, F, G, J), wobei im ZNS ausschließlich das Apolipoprotein E als Trägerprotein vorliegt.

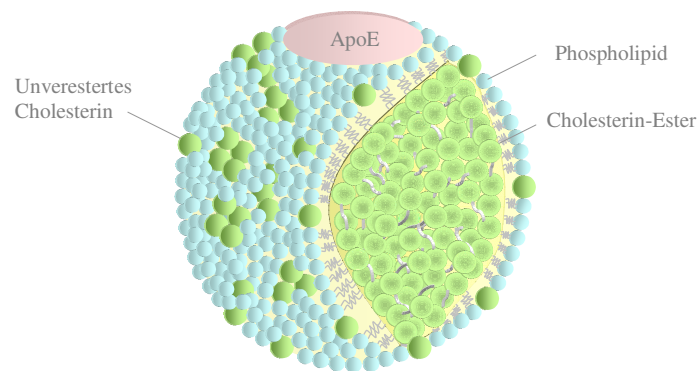


Abbildung 1.3: Darstellung von HDL. In der cerebrospinalen Flüssigkeit ist ApoE der Bestandteil von HDL, das hauptsächlich von Astrozyten sekretiert wird und ApoE als alleiniges Apoprotein trägt. ApoE () ermöglicht den Transport von Cholesterin (), Phospholipiden () und Cholesterinestern () in hydrophiler Umgebung.

1.6 Vorkommen von Apolipoprotein E

Wie bereits in Abschnitt 1.3.3 erwähnt, stellt das Vorliegen des $\epsilon 4$ -Allels einen gesicherten Risikofaktor für die Ausbildung der Alzheimer Demenz dar. Das Gen für ApoE liegt auf dem langen Arm von Chromosom neunzehn (19q13.2) in enger Nachbarschaft zu den Genen für ApoCI und ApoCII sowie dem Gen für den LDL-Rezeptor (Davignon *et al.*, 1988). Das Apolipoprotein E ist ein Glykoprotein und besteht aus einer Sequenz von 299 Aminosäuren (Rall *et al.*, 1982). Das aus der primären Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht beträgt vierunddreißig Kilodalton. Das tatsächliche Molekulargewicht hängt von der Glykosylierung ab und liegt zwischen vierunddreißig und neununddreißig Kilodalton. Auf dem Genlocus des ApoE sind drei Allele bekannt, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ (Zannis und Breslow, 1981; Utermann *et al.*, 1982). Vom Wildtyp E3 unterscheiden sich E2 und E4 durch den Austausch von jeweils einer Aminosäure an den Positionen 112 und 158 (E2: Cys¹¹², Cys¹⁵⁸, E3: Cys¹¹², Arg¹⁵⁸, E4: Arg¹¹², Arg¹⁵⁸ (Utermann *et al.*, 1984; Assmann *et al.*, 1984) (siehe Abbildung 1.4).

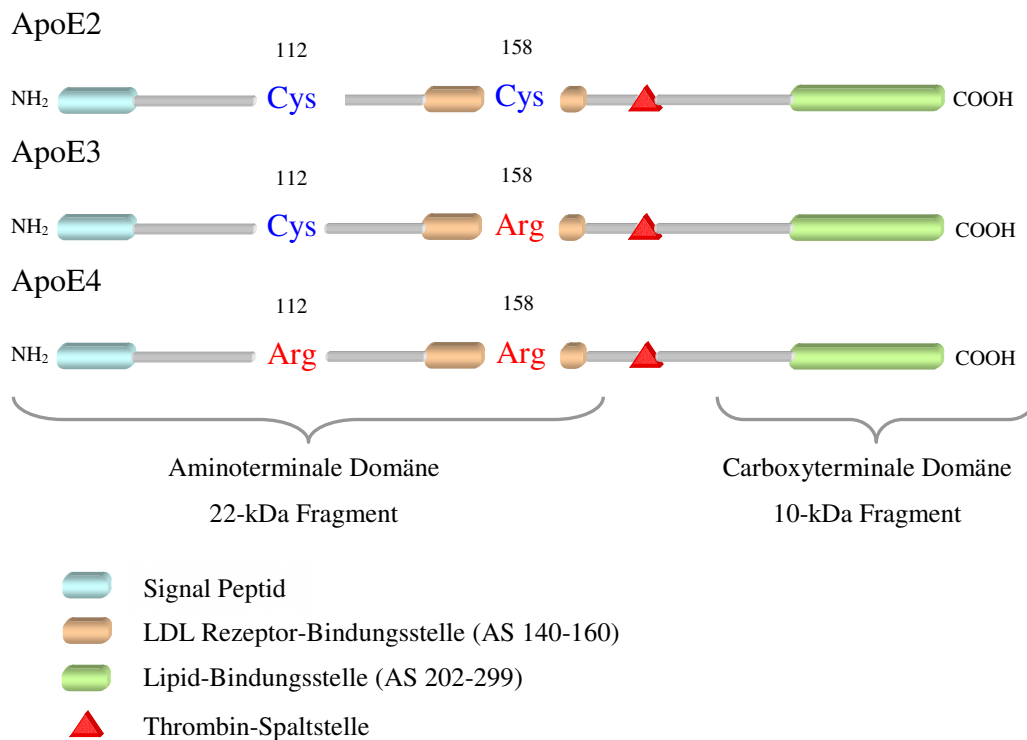


Abbildung 1.4: Darstellung der einzelnen ApoE-Isoformen. Abbildungsbeschreibung siehe Text.

Durch kodominante Vererbung existieren drei homozygote (E2/E2, E3/E3, E4/E4) und drei heterozygote Isoformen (E2/E3, E3/E4, E4/E2), wobei E3/E3 als die Normalvariante gilt, die in der kaukasischen Bevölkerungsgruppe etwa fünfzig bis siebzig Prozent ausmacht (Lee *et al.*, 2001). Die ϵ 4- und ϵ 2- Allele kommen in einer Häufigkeit von zehn bis fünfzehn Prozent beziehungsweise fünf bis zehn Prozent vor. Durch die freie Sulhydrylgruppe des Cysteins können ApoE2 und ApoE3 Homo- und Heterodimere mit sich und anderen Molekülen bilden, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Sekundärstruktur von Apolipoprotein E besteht zu zweiundsechzig Prozent aus α -Helix, zu neun Prozent aus β -Faltblatt, zu elf Prozent aus β -turns und zu achtzehn Prozent aus random coils. Dabei sind die α -helikalen Bereiche für die Bindung der Lipide verantwortlich.

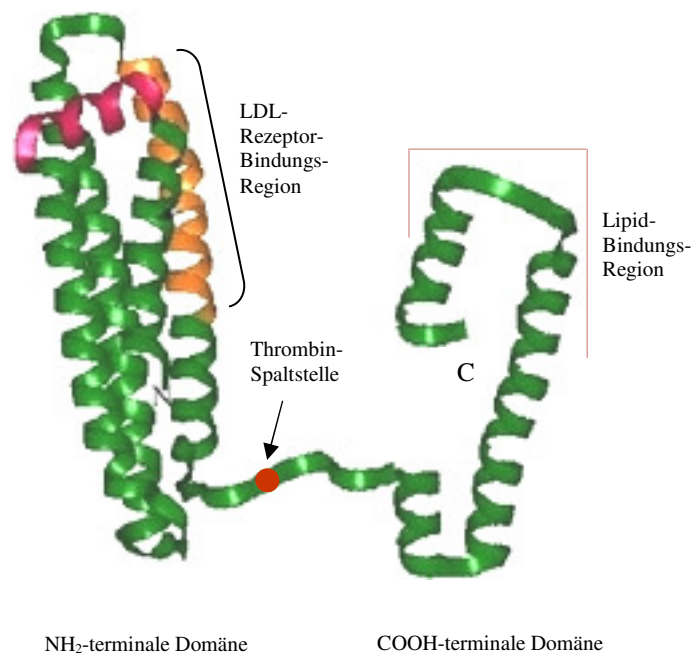


Abbildung 1.5: Modell von Apolipoprotein E. Die α -Helices sind durch die grüne Farbe hervorgehoben. Die LDL-Rezeptorbindungsdomäne auf Helix 4 ist in Gold, der kurze helikale Abschnitt, der Helix eins mit Helix zwei verbindet, wird durch den lilanen Bereich gekennzeichnet.,
(Verändert nach Huang et al., 2001; Narayanaswami et al., 2004)

ApoE hat zwei strukturelle Domänen, die über eine Thrombin-Spaltstelle miteinander verbunden sind und unterschiedliche Funktionen aufweisen (siehe Abbildung 1.4 und 1.5). Die aminoterminalen Region (Rest 1-191) enthält eine LDL-Rezeptorbindungsdomäne und umfaßt ein Molekulargewicht von 22 Kilodalton. Die hauptsächliche Bindung von Lipiden oder Lipoproteinen findet an der zehn Kilodalton großen, carboxyterminalen Region (Rest 216-299) von ApoE statt. Beide Domänen scheinen eine neurotoxische Rolle zu spielen. Das aminoterminalen Fragment kolokalisiert mit hyperphosphoryliertem Tau und neurofibrillären Bündeln (Huang *et al.*, 2001; Harris *et al.*, 2003), wohingegen das carboxyterminale Fragment A β -Peptide binden kann und in Plaques lokalisiert ist (Marques *et al.*, 2004).

ApoE wird in großen Mengen in der Leber (etwa siebenzig Prozent) und im Zentralen Nervensystem (etwa zwanzig Prozent) exprimiert und liegt dort gebunden an Lipoprotein-Partikeln vor. Das ApoE des Zentralen Nervensystems stammt nicht aus dem Blutplasma sondern wird innerhalb des ZNS gebildet (Elshourbagy *et al.*, 1985; Mahley, 1988). Die ApoE-tragenden Lipoproteine des ZNS unterscheiden sich von denen der Peripherie und

zwar sowohl in der Menge der posttranslational erfolgenden Sialisierung, als auch im Lipoprotein-Typ mit denen es assoziiert. Die Sialisierung ist eine Form der Glykosilierung bei der N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) an Kohlenhydratketten in Glykoproteinen oder Glykolipiden gehängt wird. Dabei ist das aus dem Liquor stammende ApoE im Vergleich zum ApoE aus dem Plasma immer stärker sialisiert. Für die Sekretion des Apolipoprotein E ist seine Sialform jedoch nicht entscheidend (Wernette-Hammond et al., 1989). Im Plasma ist ApoE sowohl ein Bestandteil von „very low density lipoproteins“ (VLDL) als auch von „high density lipoproteins“ (HDL) die zusätzlich noch andere Apoproteine tragen. Im Gegensatz dazu, ist das ApoE der cerebrospinalen Flüssigkeit mit HDL assoziiert, das hauptsächlich von Astrozyten und Mikroglia gebildet wird und ApoE als alleiniges Apoprotein trägt (Pitas *et al.*, 1987a und b). Neuronen hingegen synthetisieren eine vernachlässigbare Menge an ApoE (Pitas *et al.*, 1987b; Boyles *et al.*, 1985). Während der Astrozytose zeigt sich eine Erhöhung der astroglialen Expression von ApoE (Diedrich *et al.*, 1991). Dabei scheint ApoE an der Abgabe von Lipiden an andere Zellen des ZNS zur Membranbiosynthese beteiligt zu sein und die Entsorgung von Cholesterin in die Peripherie zu erleichtern. Cholesterin kann lokal sehr stark exprimiert werden, ist jedoch nicht in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Die Neuverteilung von Cholesterin durch ApoE stellt eine zentrale Rolle von ApoE dar.

Weiterhin vermittelt ApoE den Transport des für den Synapsenaufbau erforderlichen Cholesterins von der perisynaptischen Glia zu wachsenden und regenerierenden Neuronen (Mauch *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang wurde kürzlich von Mauch et al. (Mauch *et al.*, 2001) festgestellt, dass an ApoE gebundenes Cholesterin im Gehirn den limitierenden Faktor für die Neubildung von Synapsen darstellt. *In vitro* Untersuchungen an peripheren und zentralen Nervenzellen belegen, dass vorrangig ApoE-, aber auch ApoAI-Proteine im Rahmen von neuronalen Reparatur- und Umbauprozessen Cholesterin von degenerierendem Gewebe aufnehmen und unter Vermittlung von Rezeptoren der LDL-Familie an intakte Zellen wie Gliazellen oder Neuronen weiterleiten (Wood *et al.*, 1999; Dietschy und Turley, 2001). Dabei weisen ApoE-knockout-Mäuse einen deutlichen Verlust an Nervenendigungen im Vergleich zu Kontrolltieren auf (Masliah *et al.*, 1995), was auf eine wichtige Funktion dieses Proteins im Rahmen der neuronalen Lipidhomöostase hindeutet (Wood *et al.*, 1999).

Der größte Anteil des körpereigenen Cholesterins wird aus der Nahrung aufgenommen und durch Eigensynthese in der Leber bereitgestellt. Durch Elimination von überschüssigem Cholesterin über die Gallensäure, hält die Leber den Cholesterin-Plasmaspiegel

weitgehend konstant. Obgleich das adulte Gehirn nur zwei Prozent der totalen Körpermasse ausmacht enthält es doch nahezu $\frac{1}{4}$ des gesamten, körpereigenen, freien Cholesterins (Dietschy und Turley, 2001). Dieses Cholesterin ist im Wesentlichen auf zwei Pools verteilt. Der größte Anteil befindet sich in Myelinmembranen (Dietschy und Turley, 2001). Das restliche Cholesterin des ZNS findet man in Neuronen, Gliazellen und extrazellulären Lipoproteinen.

Allerdings nimmt das Cholesterin des ZNS praktisch nicht am Cholesterinstoffwechsel des restlichen Körpers teil, da es nur sehr langsam verstoffwechselt wird und nur zu verschwindend geringer Menge aus dem Blut aufgenommen wird. Nahezu der gesamte Bedarf an Cholesterin im ZNS wird durch *in situ* Synthese im Gehirn selbst gedeckt, wobei es zwei in Wechselbeziehung zueinander stehende Prozesse gibt. Fast alle Zellen des Menschen können Cholesterin aus aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA) bilden. Die Synthese umfaßt über zwanzig Reaktionsschritte, wobei die Aktivität primär durch die an das Endoplasmatische Retikulum gebundene 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase (HMGCoA) reguliert wird, welche die Bildung von Mevalonat katalysiert, das Schlüsselmolekül für die Synthese von Cholesterin.

In dem anderen Prozeß der Cholesterinbedarfsdeckung macht sich die Zelle Cholesterin nutzbar, welches an Lipoproteine gebunden ist. Über spezifische Rezeptoren werden diese ApoE-reichen Lipoproteine internalisiert und das Cholesterin in der Zelle freigesetzt.

Die Cholesterinhomöostase der Gehirnzellen stellt ein genau aufeinander abgestimmtes Gleichgewicht zwischen Cholesterineinstrom in die Zelle, vermittelt von einer ApoE-Rezeptor-Familie, und der Cholesterinbiosynthese über den HMGCoA-Reduktase-Weg dar. Dabei findet eine Neusynthese von Cholesterin nur statt, wenn der Cholesterin-Bedarf der Zelle nicht ausreichend über Internalisierung von lipoproteingebundenem Cholesterin gedeckt werden kann. Weiterhin existiert ein negativer Rückkopplungs-Mechanismus, der bei einem hohen intrazellulären Cholesterinspiegel sowohl die Aktivität als auch die Genexpression der HMGCoA-Reduktase herunter reguliert (Brown *et al.*, 1973).

Überschüssiges Cholesterin kann durch das Enzym Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) zur Speicherung in cytosolischen Lipidtröpfchen verestert werden. Alternativ kann überschüssiges Cholesterin durch die beiden mitochondrialen Enzyme Cholesterin 24-Hydroxylase (Cyp46) und Cholesterin 27-Hydroxylase (Cyp27) an Position vierundzwanzig und siebenundzwanzig oxidiert werden, wobei Oxysterole entstehen, die eine höhere Wasserlöslichkeit besitzen als Cholesterin. Oxysterole stellen dabei potentielle, endogene Liganden für den „nukleären Leber-X-Rezeptor“ (LXR) und den

„Farnesyl-X-Rezeptor“ (FXR) dar, welche mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) dimerisieren, der Retinolsäure gebunden hat (siehe Abbildung 1.6). Über die Bindung der Oxysterole an LXR/RXR werden zahlreiche Gene wie z.B. für den Cholesterin-Transporter ABCA1, Lipoproteine modifizierende Enzyme, Apolipoproteine, Transkriptionsfaktoren sowie zahlreiche in den Lipid- und Glukosestoffwechsel involvierte Enzyme aktiviert.

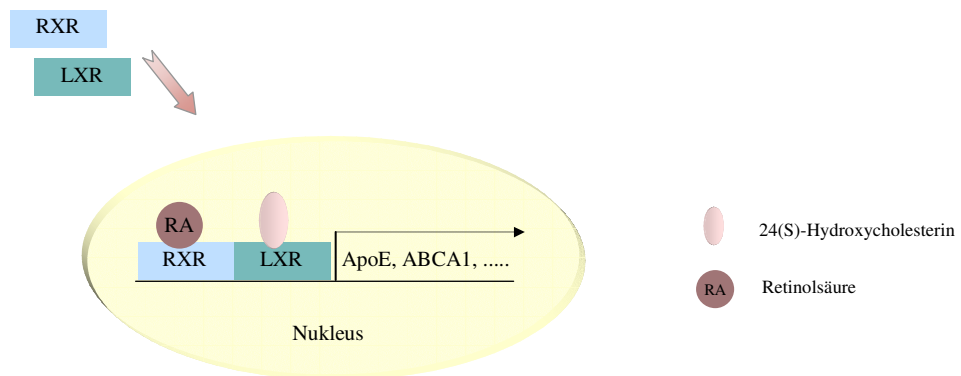






Abbildung 1.6: Bindung von 24(S)-Hydroxycholesterin () an den nukleären Leber-X-Rezeptor () und dem Retinoid-X-Rezeptor (). Durch die Bindung von Retinolsäure () an RXR, kommt es zu einer Dimerisierung der beiden Rezeptoren. Dadurch wird die Transkription von Proteinen stimuliert, die für den Cholesterin-Stoffwechsel verantwortlich sind wie z.B. ApoE und der ABCA1-Transporter

Das Protein ABCA1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Abgabe von überschüssigem Cholesterin. Es transportiert Cholesterin zur Zelloberfläche, an der Apolipoproteine gebunden sind. Über diese wird das Cholesterin im Blut transportiert und schließlich über die Leber ausgeschieden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die auslösenden Faktoren für die forcierte Bildung und Aggregation von Amyloid Beta-Protein im Rahmen der Alzheimer'schen Krankheit sind bis heute nicht bekannt. Aktuelle Befunde belegen ein vielfältiges Interaktionsspektrum zwischen zellulärem Cholesterin- und Amyloidstoffwechsel. Veränderungen in der Cholesterin- und Lipidhomöostase bei an Morbus Alzheimer erkrankten Personen sind nach diesen Befunden ein möglicher Auslöser für eine verstärkte amyloidogene Verstoffwechslung von APP im Laufe der Erkrankung. Als Trägerprotein von Cholesterin im ZNS fungiert das Apolipoprotein E, wobei das $\epsilon 4$ -Allel von ApoE als gesicherter Risikofaktor für die Ausbildung der Alzheimer Demenz eingestuft wird. Es gibt Hinweise dahin gehend, dass ApoE-Spaltfragmente mit amyloiden Plaques assoziiert sind und dadurch ursächlich für die Demenzerkrankung verantwortlich sind.

Durch die vielfältige Verknüpfung zwischen Apolipoprotein E und Morbus Alzheimer stand im Fokus des ersten Teils der Arbeit die Frage, inwieweit Proteine der ADAM-Familie Einfluss auf die ApoE-Prozessierung nehmen. Außerdem sollte geklärt werden, in welchem Maße ApoE selbst die APP-Prozessierung modulieren kann.

In Bezug auf die Verbindung zwischen Cholesterin und ApoE wurde zunächst der Membrancholesterinspiegel, mit M β CD und seine Cholesterineinschlussverbindungen, moduliert und die Auswirkung auf die ApoE-Sekretion- und Expression untersucht. Im Laufe dieser Dissertationsarbeit sollte an Astroglioma-Zellen getestet werden, inwieweit Hemmstoffe der HMGCoA-Reduktase (Statine) Veränderungen der ApoE-Sekretion- und Expression induzieren können und über welchen Wirkmechanismus die Veränderung stattfindet.

Im Rahmen der Cholesterinhomeostase wird überschüssiges Cholesterin hauptsächlich über seinen Metaboliten 24(S)-Hydroxycholesterin aus der Zelle ausgeschleust. Dabei zeigen aktuelle Befunde, dass der Ausstrom von 24(S)-Hydroxycholesterin in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer erhöht ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Einflusses von 24(S)-Hydroxycholesterin auf die ApoE-Sekretion- und Expression in Astrogliazellen waren Ausgangspunkt der hier dargestellten Experimente. Im Anschluss erfolgten Untersuchungen bezüglich der Auswirkung einer gleichzeitigen Inkubation von Lovastatin und 24(S)-OH-Chol auf die ApoE-Sekretion- und Expression die den Abschluss der hier vorliegenden Arbeit bildeten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Chemikalien

Aceton	Acros organics, USA
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Allgemeine Laborchemikalien	Merck, Darmstadt
	Roth, Karlsruhe
	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Ameisensäure	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
APS	BioRad, München
Bradford-Reagenz Roti-Quant	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Roth, Karlsruhe
Butanol	
Chloroform	Roth, Karlsruhe
CDPStar	Applied Biosystems, Bedford, MA (USA)
complete™ Protease-Inhibitoren	Boehringer, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs	Sigma, Deisenhofen
DTT	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Acros organics, USA
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Geneticin (G418)	PAA, Linz, Österreich
Glukose	AppliChem, Darmstadt

Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
HygromycinB	Callbiochem, San Diego, CA (USA)
I-Block	Tropix, Applied Biosystems, Weiterstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenposphat	AppliChem, Darmstadt
Lipofectamin2000	Invitrogen, Paisley (UK)
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumpyruvat-Lösung	PAA, Linz, Österreich
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
PHM-L Liposorb™	Callbiochem, San Diego, CA (USA)
PVDF-Membran	Serva, Heidelberg
RNaseA-Lösung	Sigma, Deisenhofen
SDS	BioRad, München
See-Blue Prestained Protein Standard	Invitrogen, UK
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
TCA	AppliChem, Darmstadt
TEMED	BioRad, München
TRIS	AppliChem, Darmstadt
Trypsin	PAA, Linz, Österreich
Tween20	Serva, Heidelberg

Inhibitoren, Enzyme, Kitsysteme und Substrate

Inhibitoren

Complete Mini Protease-Inhibitoren-Cocktail	Roche, Mannheim
Atorvastatin	Prof. Dr. März Universitäts-Klinikum Graz
BB3103	British Biotech Pharmaceuticals Oxford (UK)

Cerrivastatin	Prof. Dr. März Universitäts-Klinikum Graz
GGTI-286	Callbiochem, San Diego, CA (USA)
L744,832	Callbiochem, San Diego, CA (USA)
Lovastatin	Callbiochem, San Diego, CA (USA)
Methyl- β -Cyclodextrin Ro 31-9790	Sigma, Deisenhofen Hoffman-La Roche AG, Basel (Schweiz)
Simvastatin	Prof. Dr. März Universitäts-Klinikum Graz

Enzyme und Kitsysteme

Enzyme für molekulargenetisches Arbeiten	New England Biolabs, Bad Schwalbach Amersham, Braunschweig GIBCO BRL, Eggenstein MBI Fermentas, St. Leon-Rot Peqlab, Erlangen
E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II	Qiagen GmbH, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rneasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect-SYBR-Green	Qiagen GmbH, Hilden

Substrate

Farnesylpyrophosphat Ammonium	Sigma, Deisenhofen
Geranylgeranylpyrohoshat	Sigma, Deisenhofen
5-Cholesten-3 β , 24-(S)-Diol	Steraloids, London (UK)
Mevalonat	Sigma, Deisenhofen

Zellkultur

CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Hanau
DMEM	PAA, Linz, Österreich
DMSO	Merck, Darmstadt
FCS PAA clone	PAA, Linz (Österreich)
Geneticin (G418)	PAA, Linz, Österreich
Kulturschalen, 6 und 10 cm Durchmesser	Sarstedt, Nürnbrecht
L-Glutamin, 200 mM	PAA, Linz (Österreich)
Minimum Essentiel Medium (MEM)	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Pyruvat	PAA, Linz (Österreich)
Non-essentiell Aminoacids (NSAIDs)	PAA, Linz (Österreich)
Penicillin	Sigma, Deisenhofen
RPMI 1640 Hepes Modification	Sigma, Deisenhofen
Sterilbank Hera Safe HS 12	Heraeus, Hanau
Streptomycin	Sigma, Deisenhofe
Trypsin/EDTA in PBS	PAA, Linz (Österreich)

Zentrifugen

Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, München
Tischkühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge: Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Vakuumbzentrifuge	Savant

Sonstige Geräte

ABI PRISM [®] 7000	Applied Biosystem, Darmstadt
Acryl-Halbmikroküvetten	Sarstedt, Nürnbrecht
Amicon [®] Ultra-4	Millipore, Schwalbach
Analysenwaage	Mettler-Toledo GMBH, Gießen
Bio-Imaging Analyzer BAS-1800 (Fuji)	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
Blot-Apparatur	BioRad, München
Cryo.s, 2 Milliliter mit Innengewinde	Greiner bio-one, Frickenhausen
DNA Thermal Cycler (USA)	Perkin-Elmer, Norwalk, CT

Material und Methoden

Doppelstrahlphotometer Hitachi U-200	Colora Meßtechnik GmbH,
Lorch	
Filterpapier (3-MM)	Whatman, Springfield (GB)
Fluo Star Optima Chemiluminometer	BMG, Heidelberg
Fluoreszenzmessplatte Lumitrac (96-Loch-Platte)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nürnbergrecht
GF/C-Glasfaserfilter	Whatman, Bender & Hobein, Bruchsal
Heizblock Bioblock	Scientific, Illkirch Cedex (F)
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kunststoffzentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnbergrecht
MIDIGel-Long-Elektrophorese	Biometra, Göttingen
Mikrofilter (0,2 und 0,4 µm)	Sarstedt, Nürnbergrecht
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Nalgene® Mr.Frosty	Sigma, Deisenhofen
PCR-Reaktionsgefäße	PeqLab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbergrecht
Phasenkontrast-Mikroskop CK 2	Olympus, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetboy acu	Integra Bioscience GmbH, Fernwald
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Gilson, Middleton, WI (USA)
Polystyrolküvetten	Sarstedt, Nürnbergrecht
PVDF-Membran	Serva Fluorobind
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Scanner BAS-1800	Fujifilm, Düsseldorf
Schüttelmixer	Laborfachhandel
Semi-Dry-Blotapparatur	BioRad, München
Spannungsquelle Power-All	Serva, Heidelberg
Spannungsquelle	Biometra Pack P25
SpeedVac-Konzentrator	Bachhofer, Reutlingen
Spektralphotometer U2000	Hitachi, Japan
Sterilwerkbank Hera Safe HS 12	Heraeus, Hanau

Stromquelle 3000V/200mA	Serva Separation
Über-Kopf Rotierer	Fröbel Labortechnik, Lindau
Vortexer	Janke und Kunkel, Heitersheim
Wasserbad	BFL, Burgwedel
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Hanau
Zellkulturmaterialien	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenbecher (50 und 250 ml)	Beckmann, München
Zentrifugenrotoren JA14 und JA20	Beckmann, München

2.2 Häufig verwendete Puffer

Zur Zubereitung aller Puffer wurde gereinigtes Wasser aus einer Millipore Milli Q-Wasserreinigungsanlage verwendet.

DNA-Probenauftragspuffer:

50	%	Glyzerin (v/v)
0,2	%	SDS (v/v)
0,05	%	Bromphenolblau
0,05	%	Xylencyanol
10	mM	EDTA

I-Block-Puffer:

0,2	%	I-Block
0,1	%	Tween20 (v/v) in PBS

Lämmli-Puffer:

125	mM	TRIS pH 6,8
40	%	Glycerin
6	%	SDS
0,02	%	Bromphenolblau

Laufpuffer:

192	mM	Glycerin
25	mM	TRIS
0,1	%	SDS

Material und Methoden

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton
 5 g/l Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 in H₂O
 mit 2 M NaOH auf pH 7,4 einstellen
 autoklavieren (20 min, 121 °C)

PBS-Puffer: 8 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1,44 g/l Na₂HPO₄
 0,24 g/l KH₂PO₄
 pH 7,4 mit 2 M NaOH eingestellt

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris pH = 6,8

STEN-Puffer: 50 mM Tris pH 7,6
 150 mM NaCl
 2 mM EDTA
 0,2 % Nonident P-40

0,5 M STEN-Puffer: 50 mM Tris pH 7,6
 500 mM NaCl
 2 mM EDTA
 0,2 % Nonident P-40

SDS-STEN-Puffer: 50 mM Tris pH 7,6
 150 mM NaCl
 2 mM EDTA
 0,1 % SDS

50x TAE-Puffer: 2 M Tris
 1 M Essigsäure
 50 mM EDTA
 pH 8,4

Towbin-Puffer: 25 mM Tris; pH 8,3
 192 mM Glycin
 0,05 % SDS
 20 % Methanol

Trenngelpuffer: 3 M Tris pH = 8,9

Trypsin/EDTA: 0,05 % Trypsin
 0,54 mM EDTA
 in PBS

Fertig-Gelsysteme von Invitrogen, Paisley (UK)

NuPAGE 4-12 % BisTris 10 Taschen
 NuPAGE Mes SDS Laufpuffer
 NuPAGE Transfer Puffer
 NuPAGE LDS-Auftragspuffer
 XcellSureLock Mini-Cell

2.3 Kulturmedien

DMEM-Komplettmedium:

DMEM Flüssigmedium
 2 mM L-Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 100 mg/ml Streptomycin
 10 % FCS (fötales Kälberserum)

MEM-Komplettmedium:

MEM Flüssigmedium
 2 mM L-Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 100 mg/ml Streptomycin
 10 % FCS (fötales Kälberserum; PAA clone für U373-Zellen)

für U373-Zellen:

1 % Non-essentiell Aminoacids (NSAIDs)
 1 % Natrium-Pyruvat

RPMI-1640 Hepes modifiziertes Komplettmedium:

RPMI-1640 Hepes modifiziertes-Flüssigmedium			
2	mM	L-Glutamin	
100	U/ml	Penicillin	
100	mg/ml	Streptomycin	
10	%	FCS (fötales Kälberserum, PAA clone)	

Antikörper

Primärantikörper

Human	anti apoE aus Kaninchen	1:1000	Bio Trend
192wt	anti-APPs β aus Kaninchen	1:1000	S.Sinha, Elan Pharmaceuticals, SF (USA)
6687	anti-APP aus Kaninchen	1:500	Prof. C. Haass, LM-Universität München
6E10	anti-APP aus Maus	1:1000	Senetek, St. Louis (USA)
Anti-Aktin	Anti-Aktin aus Kaninchen	1:1000	Sigma, Deisenhofen

Sekundärantikörper

Alkalische Phosphatase gekoppelter anti Kaninchen			Tropix, Bedford, MA (USA)
Alkalische Phosphatase gekoppelter anti Maus			Tropix, Bedford, MA (USA)
S ³⁵ markierter anti-Kaninchen	1:1000		Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire (UK)
S ³⁵ markierter anti-Maus	1:1000		Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire (UK)

2.4 Materialien für die Molekularbiologie

Verwendete Bakterienstämme

E.coli DH5 α : ϕ 80 δ (*lacZ* Δ M15), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ($r_k^- m_k^+$), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argFV169*), F⁻, λ^- ; Clontech, Heidelberg.

Dieser *Escherichia coli* Stamm stellt ein Abkömmling des E.coli K12-Sicherheitsstamm dar, dem die für die Pathogenität verantwortliche Gene fehlen! Er wurde hier zur Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA verwendet.

Plasmide

pIRES1hyg, BD-Bioscience Clontech, Palo Alto, CA (USA).

Das Plasmid enthält die interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) des Encephalomyocarditis-Virus, durch die eine gemeinsame Translation zweier offener Leserahmen von einer mRNA ermöglicht wird. Nach Selektion mit Hygromycin B resultiert dies darin, dass fast alle überlebenden Klone das Zielgen enthalten. Der in der Expressionskassette enthaltene Cytomegalovirus-Promotor (CMV) trägt zur Stabilisierung der mRNA bei.

pcDNA3, Invitrogen, Leek (Niederlande)

eukaryontischer Expressionsvektor für Säugerzellen, trägt den CMV-Promotor, der eine hohe transiente und stabile Expression von Genen in zahlreichen eukaryontischen Zellen ermöglicht. Er trägt weiterhin ein Polyadenylierungssignal (SV40) und enthält ein Ampicillin- und ein Neomycin-Resistenzgen zur Selektion mit Geneticin (G418).

Oligonukleotide für die Real Time RT-PCR

Die Sequenzen der Primer für die Real Time PCR sind in 5`-3`-Orientierung dargestellt und wurden von ARK Scientific, Darmstadt oder Qiagen, Hilden bezogen.

Name	Sequenz	Länge	GC [%]	Tm [°C]
hApoE_Reti_for	5`-GGGTCGCTTTTGGGATTACC-3`	20mer	55	59
hApoE_Reti_rev	5`-ATCAGCGCCCTCAGTTCCT-3`	19mer	58	58
GAPDH-for	5`- GAAGGGCTCATGACCACAGTCCAT-3`	24mer	54	64
GAPDH_rev	5`- TCATTGTCGTACCAGGAAATGAGCTT -3`	26mer	42	62

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Restriktionshydrolyse

Zur späteren Transfektion von HEK-Zellen, die ADAM10 mit einem pIRES1hyg-Plasmid überexprimieren, musste die ApoE-cDNA in einen pIRES1hyg-Vektor eingebaut werden. Um bestimmte DNA-Bereiche aus einem bereits vorhandenen Plasmid zu entfernen beziehungsweise zu gewinnen, wurde das entsprechende Plasmid restringiert. Ebenso wurde eine Restriktion zur Analyse von DNA aus einer Plasmid-Minipräparation (siehe 2.1.9) durchgeführt. Die DNA wurde hierzu in einem Gesamtvolumen des Restriktionsansatzes von entweder 100 µl (~10 µg DNA; vor der Plasmid-Minipräparation) oder 15 µl (nach der Plasmid-Minipräparation) mit 10 µl oder 1,5 µl des für das Restriktionsenzym geeigneten Puffers und der geeigneten Menge des Restriktionsenzym versetzt (zwei bis fünf Einheiten). Damit eine vollständige Spaltung der DNA gewährleistet wurde, inkubierte der Reaktionsansatz für mindestens zwei Stunden bei 37 °C. Eine Hydrolyse mit unterschiedlichen Enzymen erfolgte nur dann gleichzeitig, wenn die Puffer- und Reaktionsoptima identisch waren. Andernfalls wurde zwischen den einzelnen Restriktionsschnitten die DNA mittels PCR-Purification-Kit gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt (Qiagen, Hilden).

2.5.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von Restriktionen und zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA auf einprozentigen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei ermöglichte eine Interkalation von Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren die Dokumentation von DNA unter UV-Durchlicht zwischen 253 nm und 366 nm.

Für eine Agarosegelelektrophorese wurde die Agarose in TAE-Puffer mit einer Endkonzentration von 0,8 % (w/v) unter Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung der flüssigen Agarose auf unter 50 °C wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung (Sigma, Deisenhofen) beigefügt und in eine horizontale Gelkammer gegossen, in die zuvor ein Kamm zur Ausbildung von Taschen eingesetzt wurde. Nach dem Erstarren wurde die Kammer in eine horizontale Gelelektrophorese-Apparatur gesetzt und mit Elektrolytlösung (TAE-Puffer) überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit einem Viertel Volumen DNA-Probenauftragspuffer versetzt, in die Taschen gegeben und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nachdem die erste Farbstoffbande den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde das Gel aus der Kammer herausgenommen und unter UV-Licht bei 312 nm mit

Hilfe einer Digitalkamera (Raytest Isotopenmeßgerät, Straubenhardt) dokumentiert. Durch den Vergleich des Bandenmusters mit denen eines DNA-Größenstandards, konnte der Erfolg der Hydrolyse überprüft werden.

Folgende DNA-Größenstandards kamen zum Einsatz:

Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas)

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 250

100 bp-Leiter (MBI Fermentas)

1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80

2.5.3 Modifizierung von DNA-Enden durch T4-DNA-Polymerase-Behandlung

Meist entstehen bei der Restriktionshydrolyse, durch ein versetztes Schneiden der Restriktionsendonukleasen, sogenannte „sticky ends“ mit 5'-Überhängen. Zum Auffüllen dieser Überhänge wurde eine T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Bad Schwalbach) verwendet. Hierfür wurde etwa 10 µg aufgereinigte DNA mit 10 µl 10 x Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (10 mM pro Nukleotid) und 1 µl T4-DNA-Polymerase (fünf Einheiten) versetzt und mit Wasser auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur (RT) wurde der Reaktionsansatz mit einem PCR-Purification-Kit nach Herstellerangaben gereinigt (Qiagen, Hilden).

2.5.4 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus einem Agarosegel

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Qiaex II-Kits der Firma Qiagen extrahiert. Dafür wurden die Nukleinsäuren in einem ethidiumbromidfreien, einprozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Isolierung der DNA-Fragmente, wurde eine Markerspur mit einer schmalen Probenspur aus dem Gel ausgeschnitten und für fünf Minuten in Ethidiumbromid-Lösung inkubiert. Durch anlegen der Markerspur an das Agarosegel, konnte das zu isolierende DNA-Fragment im UV-Licht mit Hilfe eines Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt werden. Durch Differenzwiegung des leeren beziehungsweise mit dem Agarosestück befüllten Reaktionsgefäßes, wurde die Masse des Stückes bestimmt. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Das trockene Pellet wurde zur Elution der DNA in 30-40 µl Elutionspuffer resuspendiert.

2.5.5 Kovalente Verknüpfung von DNA-Molekülen (Ligation)

Die Ligation einer cDNA in einen linearisierten Vektor wird durch die T4-DNA-Ligase bewerkstelligt, die in der Lage ist 5'-phosphorylierte und 3'-hydroxylierte DNA-Enden unter Bildung einer Phosphodiesterbindung miteinander zu verknüpfen. Zur Ligation wurden daher der Klonierungsvektore pIRES1hyg verwendet, der nach der Restriktionshydrolyse mit einer alkalischen Phosphatase aus dem Kälberdarm (*calf interstinale alkaline phosphatase*: CIAP, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) dephosphoryliert wurde. Hierfür wurden 100 µl DNA-Ansatz in Dephosphorylierungspuffer (CIAP-Puffer Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für fünfzehn Minuten bei 37 °C und anschließend für fünfzehn Minuten bei 56 °C mit zehn Einheiten CIAP inkubiert. Die Ausbeute an dephosphorylierten DNA-Enden ließ sich durch erneute Zugabe von zehn Einheiten alkalischer Phosphatase und einer wiederholten Inkubation des Ansatzes unter oben genannten Bedingungen erhöhen. Vor einer weiteren Verwendung wurde der Ansatz über ein PCR-Purification-Kit gemäß der Angaben des Herstellers gereinigt (Qiagen, Hilden).

Die Ligation erfolgte über Nacht bei etwa 16 °C im Ligasepuffer mit etwa 20 ng/µl dephosphorylierten pIRES1hyg-Vektor, etwa dreifachen molaren Überschuss des einzubauenden DNA-Fragments und 15 U/µl T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) in einem Gesamtvolumen von 16 µl. Mit der Hälfte der Ligationsansätze erfolgte die Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen (siehe 2.1.7).

2.5.6 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E.coli*)

Die Kultivierung des *E.coli*-Stamms DH5α erfolgte in autoklaviertem LB-Medium (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl). Zur Selektion transformierter Zellen wurde zudem eine Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml eingestellt. Für Plasmid-Minipräparationen (siehe 2.1.9) wurden LB-Agarplatten (LB-Medium mit 1,5 % Agar-Agar) verwendet, auf denen die Bakterienzellen über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Heraus, Hanau) inkubierten.

2.5.7 Transformation von *Escherichia coli* (*E.coli*)

Als Transformation wird die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterien beziehungsweise Bakterienzellen bezeichnet. Durch eingebrachte Antibiotikaresistenzgene können die Bakterien, durch Replikation und Expression der eingebrachten DNA, selektioniert werden. Zur Transformation von *E.coli* wurde ein Aliquot transformationskompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Von der aufgetauten Bakteriensuspension wurden 200 µl mit 8 µl des entsprechenden Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und für zwanzig Minuten auf Eis inkubiert. Bei dem nachfolgenden Hitzeschock wurde die Bakteriensuspension für neunzig Sekunden bei 42°C erhitzt und umgehend für drei Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Ausbildung der Resistenz wurden die transformierten Bakterien mit 600 µl glukosehaltigem LB-Medium (20 mM Glukose) für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (120 rpm, Bakterienschüttler, Infors) inkubiert und auf ampicillinhaltigen Agarplatten (LB/Amp-Platten) mit unterschiedlichen Volumina ausgestrichen. Die LB/Amp-Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.8 Dauerkultur von *E.coli*

Zur langfristigen Lagerung von *E.coli*-Transformanden wurden einige Zellen mit Hilfe einer Impföse von der LB/Amp-Platte in zwei Milliliter glukosehaltiges LB-Medium überführt, in dem 2 µl Ampicillin enthalten waren (Endkonzentration 400 µg/ml). Nach fünfständiger Inkubation bei 37 °C unter Schütteln (120 rpm, Bakterienschüttler, Infors), wurden nochmals einige Zellen zu der Flüssigkultur gegeben. Jeweils 1,5 ml Flüssigkultur wurden anschließend mit 500 µl sterilem Glycerin versetzt (Glycerin-Endkonzentration 20 % (v/v)), gut durchmischt und bei -80 °C gelagert.

2.5.9 Plasmidminipräparation aus *E.coli*-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Plasmidminipräparation mit Materialien und nach Protokollen der Firma Peqlab durchgeführt (E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit II). Dabei geht die Minipräparation von fünfzehn Milliliter einer Übernachtskultur mit bis zu 75 µg DNA-Ausbeute aus.

Die Plasmidpräparation basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dabei denaturiert innerhalb eines engen pH-Bereiches von 12,0-12,5 nur lineare, nicht aber kovalent geschlossene, zirkuläre DNA.

Die nach der Transformation erhaltenen Einzelklone wurden zur Vermehrung auf eine LB-Selektionsplatte ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Bakterienzellen wurden mit Hilfe einer sterilen Impföse von einer Agarplatte in 500 µl Puffer 1 überführt und durch Vortexten resuspendiert. Durch Zugabe von 500 µl NaOH-Natriumdodecylsulfat (Puffer 2) und vorsichtigem invertieren wurden die Zellen lysiert. Das Natriumdodecylsulfat löste dabei Phospholipid- und Proteinkomponenten der Zellmembran, wobei eine in Puffer 1 befindliche RNase die freigesetzte RNA verdaute. Das NaOH hingegen denaturierte cDNA sowie Zellproteine. Das geklärte Lysat wurde anschließend durch Zugabe von 700 µl sauren Kaliumazetat (Puffer 3) neutralisiert. Die Separation der Plasmid-DNA von der cDNA erfolgte durch eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 14.000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Dabei präzipitierte die zellwandgebundene cDNA mit unlöslichen Komplexen, die aus Salzen, Detergens und Proteinen bestand; die Plasmid-DNA hingegen verblieb im Überstand. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eventuell mitgeführter Zelldetritus wurde durch erneute Zentrifugation für fünf Minuten bei 14.000 rpm entfernt. Das geklärte Lysat wurde auf eine HiBind[®]-Miniprep-Säule geladen, die eine nukleinbindende Matrix enthielt. Durch eine einminütige Zentrifugation (14.000 rpm, Tischzentrifuge) und anschließenden Waschschritten, konnte die Plasmid-DNA von Kontaminationen und Enzyminhibitoren gereinigt werden. Im Anschluss an das Trocknen der Säule wurde die saubere Plasmid-DNA in zweimal 25 µl Elutionspuffer des Herstellers eluiert.

2.5.10 RNA-Isolierung aus eukaryontischen-Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus dem Zellsediment der Astrozytenzellen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy[®] Mini Kits* der Firma Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers. Die Menge und Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt. Der Quotient E_{260}/E_{280} gab Aufschluss über die Kontamination mit Proteinen. Für eine RNA-Analyse sollte der Wert zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Die Menge an isolierter RNA betrug etwa 10 µg. Die wässrige Lösung wurde bei – 80 °C gelagert.

2.6 Zellkultur

Die Arbeit mit Zellen erfolgte an einer Laminar-Flow-Box (Hera Safe HS 12, Heraeus, Hanau) unter sterilen Bedingungen. Zur Kultivierung wurden die Zellen auf zehn Zentimeter Platten (Sarstedt) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank kultiviert. Abhängig von ihrer Verdopplungszahl wurden die Zellen frühestens jeden zweiten Tag, spätestens nach sieben Tagen auf neue Platten umgesetzt.

2.6.1 Zelllinien

HepG2-Zellen

Bei der humanen Leberzelllinie HepG2 (ATCC, Manassas (USA) handelt es sich um Zellen, die von einem menschlichen Leberkarzinom abstammen.

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in zehn Zentimeter Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Als Nährstoffquelle diente Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM, PAA, Linz), welchem folgende Zusatzstoffe zugesetzt wurden: L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 mg/ml) und zehn Prozent fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS, PAA). Zur Subkultivierung wurden die Zellen zweimal in der Woche eins zu vier bis eins zu sechs auf neue Platten umgesetzt.

CCFSTTGI-Zellen

Bei der humanen Astrozytomazelllinie CCFSTTGI (Europäische Zellsammlung, Nr. ECACC 90021502 (J. Clarke, AVRI, Pirbright) handelt es sich um Gliazellen die aus einem Tumor der Astrozytenzellen einer achtundsechzig Jahre alten kaukasischen Frau isoliert wurden. Gliazellen werden in drei Kategorien eingeteilt: der epitheliale Typ, Neuroglia und periphere Glia. Astrozyten gehören dabei zum Typ der Neurogliazellen.

Die CCFSTTGI-Zellen wurden in zehn Zentimeter Zellkulturschalen kultiviert. Als Nährstoffquelle benötigten sie RPMI 1640 HEPES modiflicated Medium (PAA, Linz), dem 10 % (v/v) FCS (fötales Kälberserum, PAA Klon, Linz), L-Glutamin (2 mM), Streptomycin (100 mg/ml) und Penicillin (100 U/ml) zugegeben wurde. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraus, Hanau) bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Ein bis zweimal in der Woche wurden die Zellen in einer Verdünnung von eins zu zwei auf neue Platten umgesetzt.

hU373APP

Humane epitheliale Glioblastoma/Astrozytomazelllinie basierend auf der Zelllinie U373MG (Europäische Zellsammlung, Nr. ECACC 89081403 (J. Clarke, AVRI, Pirbright)), die stabil das humane Wildtyp-APP überexprimiert (K. Mendla und H. Romig, Boehringer Ingelheim).

Die Zellen wurden in Minimum Essentiell Medium (MEM, Sigma) mit 10 % (v/v) FCS PAA Klon, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 2 g/l NaHCO₃ und ein Prozent Non-essential-Amino acids bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Für die mit den verschiedenen ApoE-Isoformen transfizierten Zellen wurde dem supplementierten Medium das Selektionsantibiotikum Hygromycin B (Roche) zugesetzt. Die Zellen wurden ein- bis zweimal in der Woche eins zu drei passagiert.

HEKADAM10 beziehungsweise HEKADAM10dn

Bei HEKADAM10 beziehungsweise HEKADAM10dn-Zellen handelt es sich um menschliche, embryonale Nierenzellen (human-embr-yo-kidney-cells = HEK) die zuvor in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Rolf Postina mit der α -Sekretase ADAM10 oder dessen dominant negative Form stabil überexprimiert wurden.

Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in zehn Zentimeter Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Als Nährstoffquelle für die mit ApoE stabil transfizierten Zellen wurde Dulbeccos modified Eagle medium (DMEM, PAA, Linz) verwendet, welchem folgende Zusatzstoffe zugesetzt wurden: L-Glutamin (2 mM), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 mg/ml), Hygromycin B (0,1 mg/l) und zehn Prozent fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS, PAA). Zur Subkultivierung wurden die Zellen zweimal in der Woche eins zu vier bis eins zu sechs auf neue Platten umgesetzt.

2.6.2 Umsetzen der Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden einmal mit fünf Milliliter Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Danach wurden sie mit einem Milliliter einer 37 °C warmen Trypsin/EDTA-Lösung (PAA, Linz) und zwei Milliliter PBS für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert, was zur Trennung der kovalenten Bindungen zwischen den Zellen und dem Boden der Zellkulturplatte führte. Die sich schwer ablösenden Astrozytenzellen wurden zusätzlich fünf Minuten bei 37 °C (5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen durch leichtes Abklopfen des Plattenbodens von diesem ablösten,

wurde der Trypsinierungs-prozeß durch Zugabe der Suspension zu fünf bis zehn Milliliter Kultivierungsmedium abgestoppt. Das im Medium enthaltene FCS inaktivierte dabei die Enzymaktivität des Trypsins. Durch Zentrifugation (fünf Minuten bei 1000 rpm) in einer Heraeus Megafuge wurden die im Medium befindlichen, abgelösten Zellen pelletiert und im entsprechenden Mediumvolumen resuspendiert. Die Zellen wurden in 37 °C warmes Medium ausgesät und in den Brutschrank gestellt. Je nach Bedarf wurde zumeist alle zwei Tage ein Mediumwechsel und ein bis zweimal pro Woche eine Passage durchgeführt.

Um einer Veränderung der Zellen während der Kulturphase vorzubeugen, wurden die Astrozytomazellen maximal dreißig Passagen lang kultiviert, danach wurden kryokonservierte Zellen neu aufgetaut. Bei HEKADAM10- und HepG2-Zellen war keine Passagenzahl bekannt, daher wurden sie dauerhaft in Kultur gehalten.

2.6.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zelllinien in einer Stickstoff-Gasphase (Biosafe[®] 100 SC Messer Griesheim, Krefeld) aufbewahrt. Zum Einfrieren von HEKADAM10- und HepG2-Zellen wurde Kulturmedium mit zehn Prozent (v/v) DMSO, bei U373- und CCFSTTGI-Zellen fötales Kälberserum (PAA Klon) mit zehn Prozent (v/v) DMSO versetzt. Die Zellen wurden in ein Milliliter des jeweiligen Einfriermediums aufgenommen und in Kryoröhrchen mit Schraubverschluss (Cryo.s, 2 ml mit Innengewinde, Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt. Diese wurden, um ein kontrolliertes Einfrieren zu bewerkstelligen, in einen Gefriercontainer (Nalgene[®] Mr.Frosty, Sigma) gestellt und für vier Stunden bei – 80 °C gelagert. Dadurch konnte eine Kühlungsrate von 1 °C pro Minute gewährleistet werden, die für eine erfolgreiche Kryokonservierung von Zellen notwendig ist. Zur langfristigen Lagerung wurden die Röhrchen nach dem Einfrierprozess in einen mit der Gasphase von flüssigem Stickstoff gefüllten Zelltank überführt.

Um Zellen erneut zu kultivieren, wurde das entsprechende Kryo-Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in zwanzig Milliliter, 37 °C warmes Kulturmedium auf zehn Zentimeter Platten ausgesät. Um restliches DMSO zu entfernen wurde am nächsten Tag das Medium komplett gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden nun weiter subkultiviert.

2.6.4 Transfektion mit Lipofectamin™ 2000

Bei der lipidvermittelten Transfektion wird Fremd-DNA mit Hilfe von Liposomen beziehungsweise Vesikeln in die Zelle eingeschleust. Durch ihre Phospholipid-Doppelschicht fusionieren sie leicht mit der Zellmembran, so dass der DNA-Lipid-Komplex von den Zellen endozytiert werden kann. Die DNA gelangt in den Kern und führt nachfolgend zur Expression des gewünschten Proteins.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in Minimal Essential Medium (MEM, Sigma) ohne Penicillin und Streptomycin ausgesät und zwar so, dass sie am nächsten Tag ungefähr neunzig Prozent konfluent waren. Zur Transfektion wurden je Zellkulturschale 8 µg DNA in 500 µl und 20 µl Lipofectamin™ 2000-Lösung (Invitrogen, Paisley) in 500 µl MEM ohne Serum gelöst und für fünf bis maximal dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der darauf folgenden Vereinigung und Inkubation (zwanzig Minuten) der DNA-Lösung mit der Lipofectamin™ 2000-Lösung, bildete sich ein DNA-Lipofectamin-Komplex, der für sechs Stunden stabil blieb. Dieser Komplex wurde auf die antibiotikafrei wachsenden Zellen gegeben und über Nacht inkubiert.

2.6.5 Herstellung stabiler Zelllinien

Nach der Transfektion von Plasmid-DNA (2.2.4) in humane Zellen wurde für eine stabile Transfektion diejenigen Zellen nach vierundzwanzig Stunden durch Selektion auf die Plasmid kodierte Antibiotika Resistenz gegen Hygromycin B isoliert, die die Plasmid-DNA stabil ins Genom integriert hatten. Dafür wurden konfluent wachsende Zellen passagiert und in Hygromycin B haltigem Kompletmedium (Hyg B, 400 µg/ml) weiter kultiviert. Dies dient zur Selektion nicht transfizierter Zellen, die wegen des fehlenden pIRES1hyg-Plasmids keine Hygromycinresistenz ausbilden konnten. Zusätzlich wurde dem Medium 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin zugefügt. Nach zwei Tagen erfolgte eine vollständige Auswechslung des Mediums.

Die Hygromycin B-Konzentration wurde nach etwa fünf Tagen auf 100 µg/ml gesenkt, da zu diesem Zeitpunkt alle nicht transfizierten Zellen bereits gestorben sein sollten und eine Teilung der verbliebenen, transfizierten Zellen gewährleistet werden mußte. Es wurde weiterhin an jedem zweiten Tag das Medium gewechselt, bis zu dem Zeitpunkt an dem es zu keiner weiteren Mortalität der Zellen mehr kam. Die verbliebenen Zellen wurden unter dem Mikroskop auf dem Zellkulturplatten-Deckel markiert, damit sie beim Umsetzen auf sechs Zentimeter Platten nicht im ersten Schritt der Waschung mit PBS verloren gingen.

Die transfizierten Zellen wurden nach ausreichendem Wachstum auf die Expression des jeweiligen Proteins getestet, zur Sicherung eingefroren (siehe 2.2.3) oder für weitere Experimente verwendet.

2.7 Immunologische und biochemische Methoden

2.7.1 Nachweis von C-terminalen APP-Spaltfragmenten

Für den Nachweis von C-terminalen Spaltfragmenten wurde zunächst die Gesamtproteinmenge nach Bradford bestimmt (siehe 2.3.7). Anschließend wurde das eingefrorene Zellpellet in NU-PAGE Auftragspuffer (Invitrogen, Paisley (UK)) aufgenommen, so dass sich eine Proteinkonzentration von etwa 2 µg/µl ergab. Die Lysate wurde mit 10 % DTT (v/v, 1M) komplettiert und bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert. Vor dem Auftragen auf ein NU-PAGE-Gel wurden die Lysate für zehn Minuten bei 80 °C unter wiederholtem Mischen inkubiert. Der immunologische Nachweis erfolgte bei einer 1:500 Verdünnung mit dem spezifischen, polyklonalen Kaninchen Antikörper 6687, der gegen den C-Terminus von APP gerichtet war (Aminosäure 678-695). Als Zweitantikörper wurde der ³⁵S-markierte polyklonale anti-Kaninchen Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung in I-Block-Puffer verwendet.

2.7.2 ApoE-Sekretionsanalyse

Um aus dem Überstand von verschiedenen Zelllinien ApoE zu isolieren, mußten die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert werden. Serumrückstände störten bei der anschließenden Fällung, da sie in großen Mengen ausfallen würden und nicht resuspendiert werden könnten. Weiterhin übte Serum einen Einfluss auf die Auswirkungen der zu untersuchenden Stimulatoren beziehungsweise Inhibitoren aus.

Die Zellen sollten so kultiviert werden, dass HepG2-Zellen am Tag des Experiments eine maximale Konfluenz von siebzig Prozent, Astrozytenzellen von achtzig Prozent erreichten. HepG2 Zellen wurden dafür zwei Tage vor dem Experiment eins zu vier auf zehn Zentimeter Zellkulturplatten ausgesät. Für eine sechs Zentimeter Platte wurden CCFSTTGI –Zellen zwei Tage vor dem Experiment eins zu vier, für eine zehn Zentimeter Platte eins zu zwei ausgesät. Die menschliche Astrozytenzelllinie hU373APP wurde eins zu drei auf zehn Zentimeter-Zellkulturplatten ausgesät. Der mittlere Proteingehalt einer zehn Zentimeter Zellkulturplatte bei der Ernte lag bei HepG2-Zellen bei etwa 2 mg, bei Astrozytenzellen bei 1,4 mg. Um für die Experimente das Serum zu entfernen, wurden die

Zellen zweimal mit PBS vorsichtig gewaschen. Das stimulierende oder inhibierende Agens wurde in angegebener Konzentration für die jeweilige Inkubationszeit dem serumfreien, BSA-enhaltenden (5 µg/ml) Medium zugefügt. Der Überstand einer sechs Zentimeter Zellkulturplatte wurde zur Beendigung des Experiments über eine Speed Vac lyophilisiert (siehe 2.3.9), der einer zehn Zentimeterplatte über eine Ultrazentrifugation aufkonzentriert (siehe 2.3.8). Die Proteine wurden über eine Methanol-Chloroform-Fällung nach Wessel gefällt (siehe 2.3.11) und durch ein dreizehnprozentiges zehn Zentimeter Gel aufgetrennt (siehe 2.3.14). Für einen immunologischen Nachweis von ApoE, wurde ein monospezifischer, menschlicher ApoE-Erstantikörper verwendet, der alle drei ApoE-Isoformen erkannte (Biotrend, Köln). Als Zweitantikörper fungierte ein radioaktiver ³⁵S-markierter anti-Kaninchen Antikörper (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire (UK)). Die Quantitative Auswertung der radioaktiven Signale erfolgte nach fünf Tagen mit dem BAS-Imaging Analyser (Fuji).

2.7.3 Herstellung eines Cholesterin/Methyl-β-Cyclodextrin-Komplexes (10 mM)

Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide die sich durch ihre Anzahl an α-1,4-verknüpften Glukosebausteinen voneinander unterscheiden. α-Cyclodextrin besteht aus sechs, β-Cyclodextrin aus sieben und γ-Cyclodextrin aus acht Glukoseuntereinheiten.

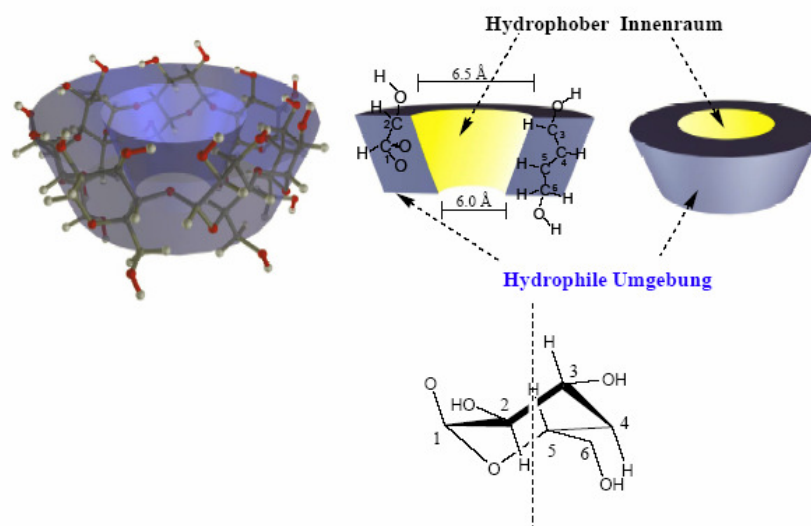


Abbildung 2.1: Cyclodextrin-Struktur und Konformation

Das in dieser Arbeit verwendete Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD) und seine Cholesterin-Einschlussverbindungen sind etablierte Substanzen zur *in vitro* Modulation des

membranären und zellulären Cholesteringehalts. Während M β CD der Membran Cholesterin entzieht, wirken seine Cholesterinchlratrate Cholesterin anreichernd (Bodovitz und Klein, 1996; Christian et al., 1997; Simons et al., 1998).

Zur Herstellung eines Cholesterin/Methyl- β -Cyclodextrinkomplexes wurden zehn Gramm M β CD in fünfzig Milliliter Milliporewasser (MPH₂O) gelöst und auf 60 °C erwärmt. Dreihundert Milligramm Cholesterin wurden bei 60 °C in sechs Milliliter 2-Propanol gelöst und unter Rühren langsam zur M β CD-Lösung gegeben. Die Komplexbildung fand unter fünf-stündigem Rühren statt. Anschließend wurde die Lösung auf achtundsiebzig Milliliter mit MPH₂O aufgefüllt, durch einen 0,2 μ m-Filter sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

2.7.4 Alkalische Hydrolyse von Lovastatin und Simvastatin zur Aktivierung des Laktorrings

Für 1,36 ml einer 10 mM Lovastatin- oder Simvastatinlösung wurden 5,63 mg Lovastatin (Callbiochem, San Diego, CA (USA) beziehungsweise 5,7 mg Simvastatin (Sigma, Deisenhofen) in 112,5 μ l Ethanol bei 55 °C gelöst und mit 56,25 μ l 0,6 M NaOH versetzt. Nach Zusatz von 1,125 ml MPH₂O und kräftigem Mischen wurde die Lösung dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Lösung mit Hilfe von Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 eingestellt und mit MPH₂O auf ein Endvolumen von 1,36 ml aufgefüllt.

2.7.5 Gewinnung von Zellextrakten

Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Zellkulturschälchen, nach Abnahme der Kulturüberstände, unmittelbar auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit einem ein Milliliter Zellschaber (Sarstedt) in PBS aus den Schälchen gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für fünf Minuten bei 1500 rpm in einer Heraeus Megafuge zentrifugiert, um PBS zu entfernen. Zellen von einer sechs Zentimeter Zellkulturplatte wurden in 200 μ l, von einer zehn Zentimeter Platte in 500 μ l PBS resuspendiert. Davon wurden 30 μ l Aliquots mit 120 μ l Ameisensäure versetzt und für eine spätere Proteinbestimmung bei - 20 °C gelagert (siehe 2.3.7). Für eine langfristige Lagerung der Zellen wurde das PBS durch erneut Zentrifugation für fünf Minuten bei 1000 rpm und 4 °C entfernt. Die Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

2.7.6 Herstellung von Zelllysaten

Das eingefrorene Zellpellet wurde in 500 μ l Lysepuffer des Amplex[®]Red Enzymtests (100 mM PBS, pH 7,4; 0,1 % Triton X[®]-100, 50 mM NaCl, 5 ml Cholsäure; Invitrogen, Paisley (UK)) resuspendiert. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurde das Rohlysat zur Entfernung von Zelldebris für dreißig Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Das geklärte Lysat wurde für weitere Verwendungen in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Für eine Proteinbestimmung wurde ein Aliquot abgenommen und dessen Proteingehalt bestimmt. Für Cholesterinbestimmungen wurde ein 50 μ l Aliquot abgenommen und bis zur späteren Verwendung bei -20°C gelagert. Bei zu niedrigem Proteingehalt und zu hohem Lysatvolumen für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wurde eine Methanol-Chloroform-Fällung nach Wessel (siehe 2.3.11) angeschlossen.

2.7.7 Proteinbestimmung

Um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen für die weitere Verarbeitung der Überstände und der Lysate verwendet wurden, wurde ihre Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) liegt die recht unspezifische Reaktion von Coomassie-Brillantblau G250 mit kationischen und unpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine zugrunde. Bei dieser Reaktion verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brillantblau G250 von 465 nm zu 595 nm. Dies beruht wahrscheinlich auf einer Stabilisierung des Farbstoffes in seiner unprotonierten, anionischen Sulfat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums kann bei 595 nm gemessen werden. Dabei ist die Extinktionszunahme einem Anstieg der Proteinkonzentration proportional, welche anhand einer Eichkurve abgelesen werden kann. Als Standardprotein wurde BSA eingesetzt.

Zunächst wurden die Proteinproben mit hundertprozentiger (v/v) Ameisensäure so gemischt, dass bei einem Endvolumen von 100 μ l eine fünfzigprozentige Ameisensäure-Konzentration entstand. Nach einer zwanzigminütigen Reaktionszeit, wurde das kommerziell erhältliche Bradfordreagenz (Roth, Karlsruhe) eins zu fünf mit Milliporewasser verdünnt, zu dem Reaktionsansatz gegeben (Endvolumen ein Milliliter) und gut gemischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von dreißig Minuten bei Raumtemperatur, wurde die Extinktion bei 595 nm gegen den Nullwert der Eichgerade im Spektralphotometer (Hitachi U-1100) gemessen. Für die Eichkurve wurde eine BSA-

Standardlösung (0 µg/µl-10 µg/µl BSA) verwendet. Entsprechende Volumina der BSA-Stammlösung wurden mit 50 µl hundertprozentiger Ameisensäure auf 100 µl gebracht und mit Bradfordreagenz inkubiert.

2.7.8 Aufkonzentrierung der Proteine durch Ultrafiltration

Zur Aufkonzentrierung von Kulturmediumüberständen von zehn Zentimeter Zellkultur-Platten wurde die Methode der Ultrafiltration eingesetzt. Zur Konzentrierung von jeweils vier Milliliter Kulturmedium wurden diese in Ultrafiltrationseinheiten überführt, welche ein Zellulose-Filter mit einer Ausschlussgröße von zehn Kilodalton besaßen (Porenweite 0,22 µl, Amicon® Ultra-4 Millipore, Schwalbach). Die Ultrafiltration wurde durch dreißig bis fünfunddreißig minütige Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C Kühlzentrifuge J2-21, Beckmann, München, Rotor JA14) erreicht. Die Rückstände der Filtereinheiten (jeweils 200 µl) wurden in ein zwei Milliliter Reaktionsgefäß überführt und einer Proteinfällung nach Wessel unterzogen (siehe 2.3.11). Für weitere Anwendungen der Ultrafiltrationsgefäße wurden diese zweimal mit je drei Milliliter MPH₂O befüllt und für zehn Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Lagerung der Filtrationseinheiten erfolgte mit jeweils vier Milliliter MPH₂O bei 4 °C.

2.7.9 Aufkonzentrierung der Proteine durch Lyophilisierung

Eine Lyophilisierung von Proteinen aus einem Kulturüberstand konnte bei einem Volumen von 1,5 ml durchgeführt werden. Dafür wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren und im gefrorenen Zustand für etwa vier Stunden vollständig in einer Vakuum-Zentrifuge lyophilisiert (Speed Vac-Konzentrator, Bachhofer, Reutlingen). Nach vollständiger Sublimation der Flüssigkeit wurde das Lyophilisat einer Methanol-Chloroform Fällung nach Wessel unterzogen (siehe 2.3.11).

2.7.10 Proteinfällung mittels PHM-L LIPOSORB™

Lipoproteine können mit einer Bindungskapazität von über fünfzig Milligramm Lipoprotein pro Gramm PHM-L Liposorb™ durch das Absorptionsmittel PHM-L Liposorb™ (Calbiochem, San Diego, CA (USA)) im Kulturmedium gebunden und durch Zentrifugation pelletiert werden.

Für die Proteinfällung mittels PHM-L Liposorb™ wurde der Überstand von zwei zehn Zentimeter Zellkulturplatten vereinigt und für zehn Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Mögliche Proteasen wurden durch Zugabe eines Proteaseinhibitor Cocktails ohne EDTA

(Boehringer, Mannheim) inhibiert. Durch Inkubation der sekretierten Lipoproteine mit 50 µl PHM-L-LiposorbTM-Lösung (Stammlösung 66,7 mg/ml) bei 4 °C über Nacht auf einem Über-Kopf Schüttler (Fröbel Labortechnik, Lindau) wurden die sekretierten Lipoproteine gebunden. Durch anschließende Zentrifugation für zehn Minuten bei 3000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge, konnte der Komplex pelletiert und einer nachfolgenden Waschung unterzogen werden. Das Pellet wurde mit ein Milliliter 0,5 M STEN-Puffer in ein zwei Milliliter Reaktionsgefäß überführt, vorsichtig mehrmals invertiert und für fünf Minuten bei 5000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und weiteren Waschschrritten mit STEN-Puffer und SDS-STEN-Puffer wie oben beschrieben unterzogen. Die adsorbierten Proteine wurden in 100 µl SDS-Auftragspuffer mit 10 % (w/v) DTT (1 M) gelöst und für eine anschließende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei -20 °C gelagert (siehe 2.3.14). Es wurden jeweils 30 µl auf ein Gel aufgetragen.

2.7.11 Proteinfällung nach Wessel (Methanol-Chloroform-Fällung)

Wessel und Flugge, 1984

Da Lipoproteine Methanol-unlöslich sind, kann Apolipoprotein E mittels Wesselfällung aus einem Proteingemisch getrennt werden. Es ist bei der Fällung im Pellet zu finden, während alle Methanol-löslichen Proteine, wie Proteoglykane und Glykoproteine, in der organischen Phase erscheinen.

Die Proteine der Ultrafiltration (siehe 2.3.8) beziehungsweise aus der Lyophilisierung (siehe 2.3.9) wurden mit sechs Volumen Methanol, drei Volumen Chloroform und sechs Volumen MPH₂O gemischt. Nach einer zwanzigminütigen Zentrifugation mit 14.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge wurde die obere organische Phase, in der sich Methanol-lösliche Komponenten befanden, abgenommen und verworfen. Die Interphase und die darunterliegende wäßrige Phase wurde mit vier Volumen Methanol gemischt und zur Präzipitation der Methanol-unlöslichen Proteine nochmals zwanzig Minuten mit 14.000 rpm zentrifugiert. Im Sediment war das Apolipoprotein E zu finden.

2.7.12 Proteinfällung von APP α und APP β mittels Trichloressigsäure (TCA)

Sowohl die Analyse der Auswirkung von ADAM10-Inhibitoren auf die ApoE-Spaltung, als auch für die Auswirkung von ApoE auf die APP α - und APP β -Freisetzung, wurden die Proteine mittels Trichloressigsäure aus dem Zellkulturüberstand gefällt.

Zwei Tage vor dem Experiment wurden die jeweiligen Zellen auf zehn Zentimeter Zellkulturschalen so ausgesät, dass sie am Tag des Experiments ihre maximale Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden zweimal mit fünf Milliliter Kulturmedium ohne Zusätze vorsichtig gewaschen und mit 4,5 ml Kulturmedium ohne Zusätze, jedoch mit 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 10 μ g/ml fettsäurefreiem BSA als Zusätze überschichtet. Gegebenenfalls wurden dem Medium zusätzliche Inhibitoren beigefügt, welche die metalloproteinasevermittelte APP α -Freisetzung unterbanden. Die APP α - oder APP β -Sekretion in das Zellkulturmedium erfolgte während einer vierstündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Zum Entfernen von eventuell vorhandenen Zellen im Überstand wurde dieser vor der Proteinfällung für zehn Minuten bei 1500 rpm in einer Heraeus Megafuge zentrifugiert und bis zur nachfolgenden Proteinfällung auf Eis oder bei – 20 °C gelagert.

Zur Fällung von APP α oder APP β wurde vier Milliliter Zellkulturüberstand mit 453 μ l eiskalter 6,1 M Trichloressigsäure (TCA) versetzt, mehrmals invertiert und für dreißig Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1,5 ml in ein zwei Milliliter Reaktionsgefäß überführt und vier Minuten bei 13.200 rpm und 4 °C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang im gleichen Reaktionsgefäß mit dem restlichen Zellkulturüberstand zweimal wiederholt. Zum Entfernen der Säure erfolgte eine anschließende zweimalige Waschung des Proteinpellets mit jeweils 500 μ l eiskaltem Aceton (- 20 °C). Dafür wurde das Aceton auf das Proteinpellet gegeben und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Proteinpräzipitats an der Luft, wurde es in 72 μ l einmal Laemmli-Probenpuffer und 8 μ l 1 M DTT unter Vortexen gelöst. Der pH-Wert wurde gegebenenfalls mit 1 μ l 3 M Tris-HCL, pH 8,8 neutralisiert, das Pellet für zehn Minuten bei 95 °C erhitzt und bis zum Auftragen auf ein zwanzig Zentimeter Polyacrylamidgel (siehe 2.3.14) bei – 20 °C gelagert.

Der immunologische Nachweis von APP α erfolgte bei einer 1:1000 Verdünnung des α -Sekretase spezifischen monoklonalen Maus Antikörpers 6E10 (Senetek). Für APP β wurde der polyklonale Kaninchen Antikörper 192wt mit einer 1:1000 Verdünnung verwendet.

Beide Erstantikörper wurden jeweils in I-Block gelöst und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Erstantikörper-Reaktion am nächsten Tag nach einer Stunde bei Raumtemperatur beendet war, wurde die Membran einmal fünf, einmal zehn und einmal fünf Minuten mit I-Block gewaschen. Im Falle von APPs α wurde ein ³⁵S-markierter polyklonaler anti-Maus Antikörper verwendet. Der Nachweis von APPs β erfolgte mit dem ³⁵S-markierten polyklonalen anti-Kaninchen Antikörper. Die Verdünnung des Zweitantikörpers wurde an die jeweils vorliegende Radioaktivität des Antikörpers angepaßt und variierte zwischen 1:1000 und 1:500. Nach einer einstündigen Reaktionszeit wurde die Membran wie oben beschrieben mit I-Block gewaschen und für mindestens drei Stunden auf einem 3 MM-Whatman-Filterpapier getrocknet. Je nach zu erwartender Signalintensität wurde ein Film für mindestens fünf Tage auf ein FujiFilm 2035 Screen gelegt. Nach der jeweiligen Exponierung wurde der Screen über ein BAS-1800 Bio-Imaging Analyser von Fuji in Verbindung mit AIDA 2.0 von Raytest Isotopen GmbH ausgewertet (siehe 2.5.1.2)

2.7.13 Bestimmung des Cholesteringehaltes einer Probe (Cholesterinbestimmung)

Der Cholesteringehalt einer Probe wurde mit Hilfe eines Amplex[®]Red Enzymtests der Firma Invitrogen bestimmt. Hierbei wird Cholesterin durch eine Cholesterinoxidase zu 4-Cholesten-3-on und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Im nächsten Reaktionsschritt wird, in Gegenwart einer Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase; HRP), 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex[®]Red-Reagenz) durch das Wasserstoffperoxid oxidiert und es entsteht das fluoreszierende Resorufin. Das Amplex[®]Red-Reagenz reagiert dabei mit einer eins zu eins Stöchiometrie mit Wasserstoffperoxid, so dass die Menge der Resorufin-Bildung äquivalent ist zu der Cholesterinmenge der Probe.

Für eine Cholesterin-Bestimmung von CCFSTTGI-Zellen, wurde das Aliquot der unter Punkt 2.3.6 lysierten Zellen auf Eis aufgetaut, eins zu zwei mit Lysepuffer des Amplex[®]Red Enzymtests (Invitrogen, Paisley (UK)) verdünnt und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (siehe 2.3.7). Bei einer Proteinkonzentration von etwa 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, wurden 10 μl für die Cholesterin-Bestimmung verwendet. Das Probenvolumen wurde mit Lysepuffer auf 50 μl aufgefüllt. Die Durchführung des Nachweises erfolgte nach Herstellerangaben. Die Berechnung der Cholesterin-Konzentration wurde auf ein Milligramm lysiertes Zellpellet normiert.

2.7.14 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli, 1970

Mit dieser Methode werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Hierbei besteht über einen bestimmten Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Wanderungstrecke (s) und dem Logarithmus der Molekülmasse (M). Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird dem eigentlichen Trenngel noch ein Sammelgel von etwa einzehntel Länge der Trenngelstrecke vorgeschaltet, dessen pH-Wert um zwei Einheiten tiefer liegt als der des Trenngels. Dies führt zu einer Verdichtung der Proteinproben vor dem Eintritt in das Trenngel und somit zu einer schärferen Trennung der jeweiligen Proteinbanden.

Zur Untersuchung von ApoE- und C-terminalen APP-Spaltfragmenten, wurde ein fertiges, vier bis zwölfprozentiges NuPAGE-Gel der Firma Invitrogen nach Vorschrift durchgeführt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden vor dem Auftrag eins zu vier mit viermal NuPAGE-Probenpuffer, welcher als stabilisierendes Detergens Lithiumdodecylsulfat enthält, versetzt und für zehn Minuten bei 80 °C im Heizblock denaturiert.

Für die Untersuchungen des Einflusses verschiedener Stimulatoren beziehungsweise Inhibitoren der Apolipoprotein E-Sekretion im Überstand wurden Multigel Long Gele in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer der Firma BIORAD verwendet. Hierbei betrug die Laufstrecke im Sammelgel etwa anderthalb bis zwei Zentimeter und die des Trenngels zehn Zentimeter. Zum Nachweis von ApoE im Zelllysate, von APPs α - und APPs β wurden große Gele in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (BIORAD) verwendet, deren Laufstrecke im Sammelgel etwa vier bis viereinhalb Zentimeter und im Trenngel etwa zwanzig Zentimeter betrug.

Für die Herstellung von jeweils einem zehn Zentimeter Gel wurden folgende Lösungen verwendet:

<u>Trenngel</u>	13 % (w/v)	<u>Sammelgel</u>	5 % (w/v)
4,3 ml	ddH ₂ O	6,8 ml	ddH ₂ O
1,25 ml	3 M Tris-HCL, pH 8,8	1,25 ml	0,5 M Tris-HCL, pH 6,8
4,3 ml	30 % Acrylamid	1,9 ml	30 % Acrylamid
100 µl	10 % SDS	100 µl	10 % SDS
5 µl	TEMED	5 µl	TEMED
50 µl	APS	100 µl	APS

Für die Herstellung von zwanzig Zentimeter Gelen wurde die vierfache Menge an Gellösung angesetzt.

Nach Herstellung der Lösungen wurden diese zwischen die Platten gegossen und mit Butanol überschichtet. Das Sammelgel wurde nach Entfernung des Butanols und vollständiger Polymerisation auf das Trenngel gegossen. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt.

Die zu analysierenden Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit zehnpromtiger 1 M DTT-Lösung und einmal Laemmli-Probenauftragspuffer versetzt und für zehn Minuten bei 100 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde bei zehn Zentimeter Gelen einviertel des Probevolumens, bei zwanzig Zentimeter Gelen das gesamte Probevolumen in die Taschen des Gels pipetiert und die Elektrophorese bei zehn Zentimeter Gelen konstant bei 20 mA durchgeführt. Bei zwanzig Zentimeter Gelen wurde die Elektrophorese mit 8 mA über Nacht durchgeführt. Die Molekulargewichts-Bestimmung der Proteine erfolgte durch den Vergleich der Laufstrecke mit bekannten Markerproteinen (*Prestained Protein Marker*, Invitrogen).

2.7.15 Western Blot

Zum Nachweis der aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel wurden diese zunächst auf eine hydrophobe PVDF-Membran mit 0,2 µm Porendurchmesser (SERVA Fluorobind, Heidelberg) für eine Stunde bei 10 V im *semidry*-Verfahren (Transfer-Blot Kammer SD, Biorad) transferiert. Da die Proteine auf dieser Membran dann immobilisiert vorliegen, sind sie für weitere Analysen ohne den störenden Einfluss der Gelmatrix zugänglich.

Hierzu wurde die Membran zwischen puffergetränktes 3 MM-Whatman-Filterpapier gelegt und in einer Blotapparatur so geschichtet, dass die Proteine aus dem Gel zur Anode wandern, und dabei auf der Membran haften bleiben. Als Transferpuffer diente Towbin beziehungsweise NU-PAGE Transferpuffer. Die Wanderung zur Anode wird bedingt durch SDS, das nach der Gelelektrophorese noch an die Proteine gebunden ist und ihnen so eine negative Ladung verleiht. Der Proteintransfer erfolgte bei maximal 3 mA/cm^2 und 10 V für eine Stunde bei Raumtemperatur.

2.7.16 Immunoblot

Mit diesem Nachweisverfahren können einzelne Proteine eines Proteingemisches mittels spezifischer Antikörper auf der Membran nachgewiesen werden.

Nach dem Proteintransfer auf die Membran (siehe 2.3.15), wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in einer 0,2 % I-Block/PBS-Lösung (I-Block/PBS) bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde der jeweilige Antikörper in einer geeigneten Verdünnung in I-Block/PBS angesetzt und die Membran damit über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Folgende Erstantikörper wurden bei einer 1:1000 Verdünnung für den Nachweis verwendet:

APP α :	monoklonaler Maus Antikörper 6E10 (Senetek, St. Louis (USA))
APP β :	polyklonaler Kaninchen Antikörper 192 Wild Typ (S.Sinha, Elan Pharmaceuticals, SF (USA))
C-terminale Spaltfragmente:	polyklonaler Kaninchen Antikörper 6687, gerichtet gegen den Carboxyterminus von APP (AS 678-695) (Prof. C. Haass, LM-Universität München)
ApoE:	monospezifischer, polyklonaler Kaninchen Antikörper der alle drei ApoE-Isoformen erkennt. (BioTrend, Köln)

Bevor der Zweitantikörper zugegeben werden konnte, mußte unspezifisch gebundener Erstantikörper durch mehrmaliges Waschen mit I-Block/PBS (fünf Minuten, zehn Minuten, fünf Minuten) entfernt werden. Der geeignete Zweitantikörper wurde in I-Block/PBS verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Der Proteinnachweis auf der Membran richtete sich nach dem verwendeten Zweitantikörper:

Verwendung eines alkalischen phosphatasegekoppelten Zweitantikörpers:

Der alkalische phosphatasegekoppelte Kaninchen-Antikörper wurde in einer 1:10000 Verdünnung verwendet. Nach der einstündigen Inkubationszeit wurden die Protein-Banden mit einem CDP-Star Western-Blotting System nach Angaben des Herstellers (Tropix, Belford, MA (USA)) entwickelt. Die daraus resultierende Chemilumineszenz wurde mit dem Programm QuantityOne unter Verwendung des VersaDoc Imaging Systems (Model 3000, Biorad, München) detektiert.

Verwendung eines ³⁵S-markierten Zweitantikörper:

Wurde ein radioaktiver Zweitantikörper verwendet, so wurde die Verdünnung des Antikörpers an die momentan vorherrschende Radioaktivität angepaßt, wobei die Halbwertszeit drei Monate betrug. Nach dieser Inkubation wurde erneut dreimal nach obigem Schema gewaschen und die Membran für mindestens drei Stunden auf einem 3 MM-Whatman-Filterpapier getrocknet. Je nach zu erwartender Signalintensität wurde ein Film für mindestens fünf Tage auf ein FujiFilm 2035 Screen gelegt. Nach der jeweiligen Exponierung die Auswertung des Screens über ein BAS-1800 Bio-Imaging Analyser von Fuji in Verbindung mit AIDA 2.0 von Raytest Isotopen GmbH.

2.8 Quantifizierung von mRNA durch Real time RT-PCR

Der Nachweis der ApoE-Proteinexpression kann neben proteinbasierten Nachweismethoden auch auf mRNA-Ebene erfolgen. Dabei ist die quantitative *Real time* RT-PCR die Methode der Wahl, da bereits kleine Veränderungen der mRNA-Expression quantifiziert werden können.

Weiterhin handelt es sich um ein schnelles, vollautomatisiertes Verfahren, bei dem in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produktdetektion- und Quantifizierung miteinander kombiniert werden, ohne das weitere Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die quantitative RT-PCR zur Bestimmung der Menge der mRNA von CCFSTTGI-Zellen eingesetzt, die mit Stimulatoren oder Inhibitoren der ApoE-Sekretion behandelt wurden. Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe des QuantiTect-SYBR-Green One-Step-RT PCR-Kit (Qiagen, Hilden) und dem ABIPrism[®]7000 Sequenz Detection System (Applied Biosystems, Bedford, MA (USA)) quantifiziert.

Die mRNA wurde zunächst mittels spezifischer Oligonukleotide und unter Verwendung des QuantiTect-SYBR-Green One-Step-RT PCR-Kit (Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben, mittels PCR amplifiziert und nach jedem Elongationsschritt quantifiziert. Um den Verlauf der PCR-Amplifikation zu verfolgen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindet. Nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 530 nm fluoresziert der Farbstoff im gebundenen Zustand, abhängig von der Menge der DNA. Das Fluoreszenzsignal korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (real-time) dargestellt werden. Dadurch wird eine genaue Eingrenzung der exponentiellen Amplifizierungsphase ermöglicht

2.8.1 RT-PCR, Schmelzkurvenanalyse und analytisches Agarosegel

Die RT-PCR wurde mit einem Endvolumen von 25 µl in einer 96-well Platte angesetzt:

- RNase freies H₂O
- 12,5 µl 2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix
- 5 µM Forward Primer
- 5 µM Reverse Primer
- 0,25 µl QuantiTect RT Mix
- 200 ng RNA

Das RT-PCR-Programm wurde wie folgt gewählt:

- 30 min 50 °C (Reaktion der reversen Transkriptase)
- 15 min 95 °C (Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase)
- 40 Zyklen:
 - 15 s 94 °C (Denaturierung)
 - 30 s 55 °C (Oligonukleotidanlagerung)
 - 30 s 72 °C (Polymerisationsreaktion)

Die Messung der Fluoreszenzemission erfolgte während der Polymerisations-Reaktion. Daher war bei der Auswahl der Primer darauf zu achten, dass die Amplifikate eine Schmelztemperatur von deutlich mehr als 72 °C aufwiesen.

Zur Spezifikationskontrolle der PCR-Produkte wurde an die RT-PCR anknüpfend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei erfolgte eine langsame Temperatursteigerung von 60 °C auf 95 °C. Bei Entstehung eines einzelnen spezifischen Amplifikats war nur mit einem Fluoreszenzmissions-Maximum zu rechnen, das in der Regel bei ~ 85 °C auftrat. Mögliche Nebenprodukte denaturierten bei niedrigeren Temperaturen.

Als zusätzliche Qualitätskontrolle wurden exemplarische RT-PCR Proben über ein Agarosegel aufgetrennt.

2.8.2 Auswertung der RT-PCR

Das ABI PRISM[®]7000 Sequenz Detection System erzeugt aus den ermittelten Fluoreszenzemission eine Amplifikationsgrafik. Dabei wird die gemessene Fluoreszenz auf der Ordinate gegen die Zyklanzahl aufgetragen (Abbildung 2.2).

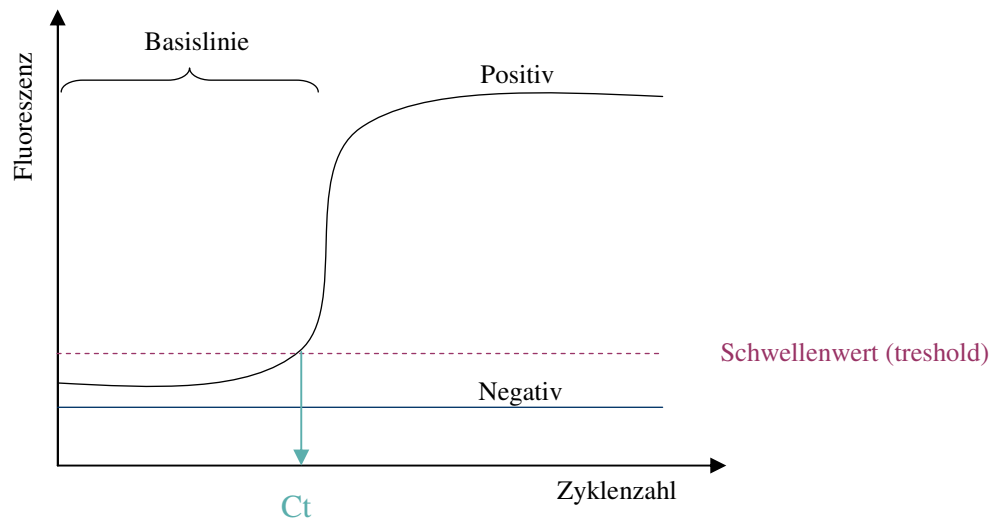


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einer PCR-Amplifikationskurve

Die Graphik zeigt die Zunahme der Fluoreszenzintensität eines PCR-Verlaufs für eine Probe mit Basislinie. Nach meist drei bis dreizehn PCR-Zyklen wird der Schwellenwert („threshold“; exponentielle Phase) manuell gesetzt anhand dessen der „threshold-cycle“ (Ct) abgelesen werden kann, der ein Maß für die in der Probe enthaltene spezifische mRNA darstellt. Je niedriger der Ct-Wert, desto höher ist die mRNA-Konzentration. Daneben ist der PCR-Verlauf einer Negativkontrolle dargestellt.

Das Prinzip der Quantifizierung beruht darauf, dass während der exponentiellen Phase der PCR die Fluoreszenzintensität bei gleichen Bedingungen ausschließlich von der eingesetzten mRNA-Menge („template“-Menge) abhängt, das heißt eine höhere Menge an eingesetzter mRNA spiegelt sich in einer stärkeren Fluoreszenzintensität wieder. Um die Probe zu quantifizieren, wird ein Schwellenwert festgesetzt („threshold“). Er stellt eine Trennlinie zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und der Hintergrundfluoreszenz dar. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe diesen Schwellenwert überschreitet, wird bestimmt und als „Cycle-threshold“ (Ct) festgelegt. Er steht in direkter Beziehung zur cDNA-Ausgangskonzentration. Proben mit hoher cDNA-Menge überschreiten den Schwellenwert früher, d.h. sie haben einen kleineren Ct-Wert als

Proben mit kleineren Mengen an „template“-cDNA. Der Ct-Wert ist daher die Grundlage für die Quantifizierung der RT-PCR.

Für einen quantitativen Vergleich der Proben müssen Störfaktoren wie Unterschiede in der Ausgangsmenge an RNA sowie Unterschiede in den PCR-Effizienzen berücksichtigt werden. Die derzeit am meisten akzeptierte Methode ist dabei die Normalisierung der Expression des Zielgens zur Expression eines Referenzgens. Dies bedeutet, dass die Expression des Referenzgens in einem zweiten Ansatz mit spezifischen Primern erfaßt wird. Anhand der erhaltenen Ct-Werte lassen sich Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge erkennen und für die einzelnen Werte korrigieren.

Zur Ermittlung der Reaktionseffizienz der eingesetzten Primer wurden Standardkurven aufgenommen. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor eins zu zehn aus einer RNA-Probe des zu untersuchenden Materials angefertigt und mit den spezifischen Primern analysiert. Zur Erstellung der Standardkurve (Regressionsgerade) wurden die ermittelten Ct-Werte der Standardverdünnung gegen die logarithmische Konzentration (Kopienzahl) aufgetragen. Bei einer optimalen Effizienz lag die Steigung der Kalibrierungsgeraden zwischen -3,2 bis -3,3. In diesem Fall konnte die RNA über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode quantifiziert werden. (Abbildung 2.3).

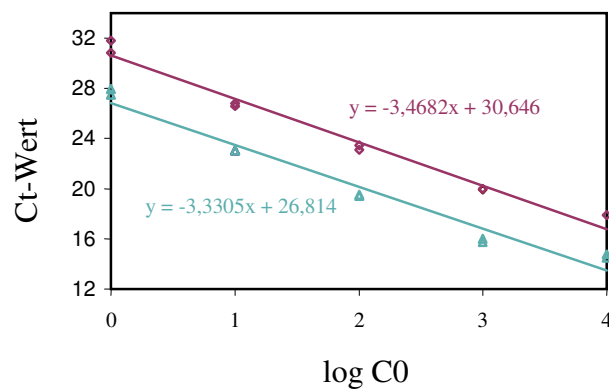


Abbildung 2.3: Standardkurve der Ct-Werte einer Verdünnungsreihe von zellulärer mRNA. Die Standardkurve wurde ausgehend von unverdünnter RNA aus CCFSTTGI-Zellen mit den Primerpaaren für humanes ApoE (\diamond) und GAPDH (\triangle) aufgenommen. Die Steigung der Geraden zeigt die Reaktionseffizienz und sollte im Idealfall zwischen -3,2 und -3,3 liegen.

Berechnung $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode

$$\begin{aligned}\Delta\text{ct} &= \text{ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen} && \text{(Normalisierter ct für die Probe)} \\ \Delta\Delta\text{ct} &= \Delta\text{ct Probe} - \Delta\text{ct Kalibrator} && \text{(Normalisierter ct für den Kalibrator)} \\ \text{Absoluter Wert} &= 2^{-\Delta\Delta\text{ct}}\end{aligned}$$

Eine starke Abweichung der Effizienz von dem geforderten Optimum spiegelt sich in einer Abweichung von der geforderten Steigung der Regressionsgeraden wider. Zur Berechnung des Faktors der Regulation wird hierbei eine Standardkurvenmethode herangezogen.

Zuerst wird die relative Menge an Zielgen-mRNA über die Geradengleichung der Standardkurve ermittelt. Aus dieser relativen Menge an mRNA werden Quotienten gebildet:

$$\begin{aligned}\text{Kalibrator} &= \frac{\text{relative Menge an Zielgen - mRNA der Kontrollprobe mit ApoE - Primer}}{\text{relative Menge an Zielgen - mRNA der Kontrollprobe mit GAPDH - Primer}} \\ \text{Probe} &= \frac{\text{relative Menge an Zielgen - mRNA der Probe mit ApoE - Primer}}{\text{relative Menge an Zielgen - mRNA der Probe mit GAPDH - Primer}} \\ \text{Regulationsfaktor} &= \frac{\text{Probe}}{\text{Kalibrator}}\end{aligned}$$

Sowohl bei der Berechnung über die $\Delta\Delta\text{ct}$ - als auch bei der Standardkurven-Methode, ergibt sich für den Kalibrator ein Wert von eins. Dieser wird in Relation zu den Werten der Proben gesetzt. Ein Wert > 2 bedeutet eine Erhöhung der Expressionsrate, ein Wert $< 0,5$ eine Verminderung der Expressionsrate.

2.9 Bioinformatik

2.9.1 Software zur Bilder-Auswertung

2.9.1.1 Photographische Darstellung von Nukleinsäuren in Agarosegelen

Agarosegele wurden unter UV-Licht bei 312 nm mit Hilfe einer Digitalkamera fotografiert und unter Zuhilfenahme des Software-Programms DianaV1.6 (Raytest, Isotopenmessgerät, Straubenhardt) bearbeitet.

2.9.1.2 Photographische Darstellung von Proteinen im Western-Blot

Die durch auflegen eines FujiFilm 2035 Screens entstehenden radioaktiven Signale der ³⁵S-markierten Western Blots, wurden über ein BAS-1800 Bio-Imaging Analyser von Fuji in Verbindung mit AIDA 2.0 von Raytest Isotopen GmbH ausgewertet.

Bei Verwendung eines enzymgekoppelten Zweitantikörpers wurde die daraus resultierende Chemilumineszenz mit dem Programm QuantityOne unter Verwendung des VersaDoc Imaging Systems (Model 3000, Biorad, München) detektiert.

2.9.2 Statistische und graphische Auswertungen

Mit dem Programm GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Inc. (USA)) erfolgte die graphische Auswertung der Daten. Für die statistische Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 5.0 (Microsoft (USA)) verwendet. Bei Mehrfachbestimmungen wurde der Mittelwert berechnet und der Fehler als einfache Standardabweichung von Stichproben dargestellt. Zur Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse wurden die Signifikanzniveaus mit dem Student's t-Test für abhängige Stichproben ermittelt (*paired student's t-Test*).

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der Metalloproteinase ADAM10 auf die ApoE-Prozessierung

3.1.1 Klonierung eines Vektors für ApoE und ADAM10 oder ApoE und ADAM10dn

Eine *in vitro* Studie von Frau Dr. Kojro, in der sie gereinigtes ADAM10 aus Rind mit rekombinantem, menschlichem ApoE3 und ApoE4 inkubierte, belegte eine vermehrte Spaltung von ApoE durch die α -Sekretase ADAM10 in ein 22 Kilodalton Fragment. Bei gleichzeitiger Inkubation mit einem hydroxamsäurebasierten Inhibitor von Metalloproteinasen (BB3103) konnte das Spaltereignis hingegen unterbunden werden. Um Aussagen über funktionelle Zusammenhänge proteolytischer Prozesse treffen zu können, müssen diese unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht werden. Eine solche physiologische Bedingung wird durch die Zellkultur gewährleistet. Um den Einfluss der α -Sekretase ADAM10 auf das Apolipoprotein E zu erhöhen und gemessene Effekte auf ADAM10 zurückführen zu können, sollte ApoE stabil in HEKADAM10- oder in HEKADAM10dn-Zellen zur Expression gebracht werden (siehe 3.1.2). Zuvor musste die cDNA von ApoE in dem Vektor pCDNA3 in einen pIRES1hyg-Vektor umkloniert werden. Weiterhin wurde ApoE im pIRES1hyg-Vektor für eine spätere Transfektion der menschlichen Glioblastoma/Astrozytomazelllinie hU373APP benötigt, die das humane Wildtyp-APP stabil überexprimiert (siehe 3.2). Die cDNA von ApoE2 oder ApoE4 in pcDNA3-Vektor wurde von Herrn Prof. Dr. März (Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik Univiversitäts-Klinikum Graz) zur Verfügung gestellt. Aus diesem Vektor sollte die cDNA der jeweiligen ApoE-Isoform herausgeschnitten und in ein pIRES1hyg-Plasmid, das von Herrn Dr. Rolf Postina (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt wurde, kloniert werden.

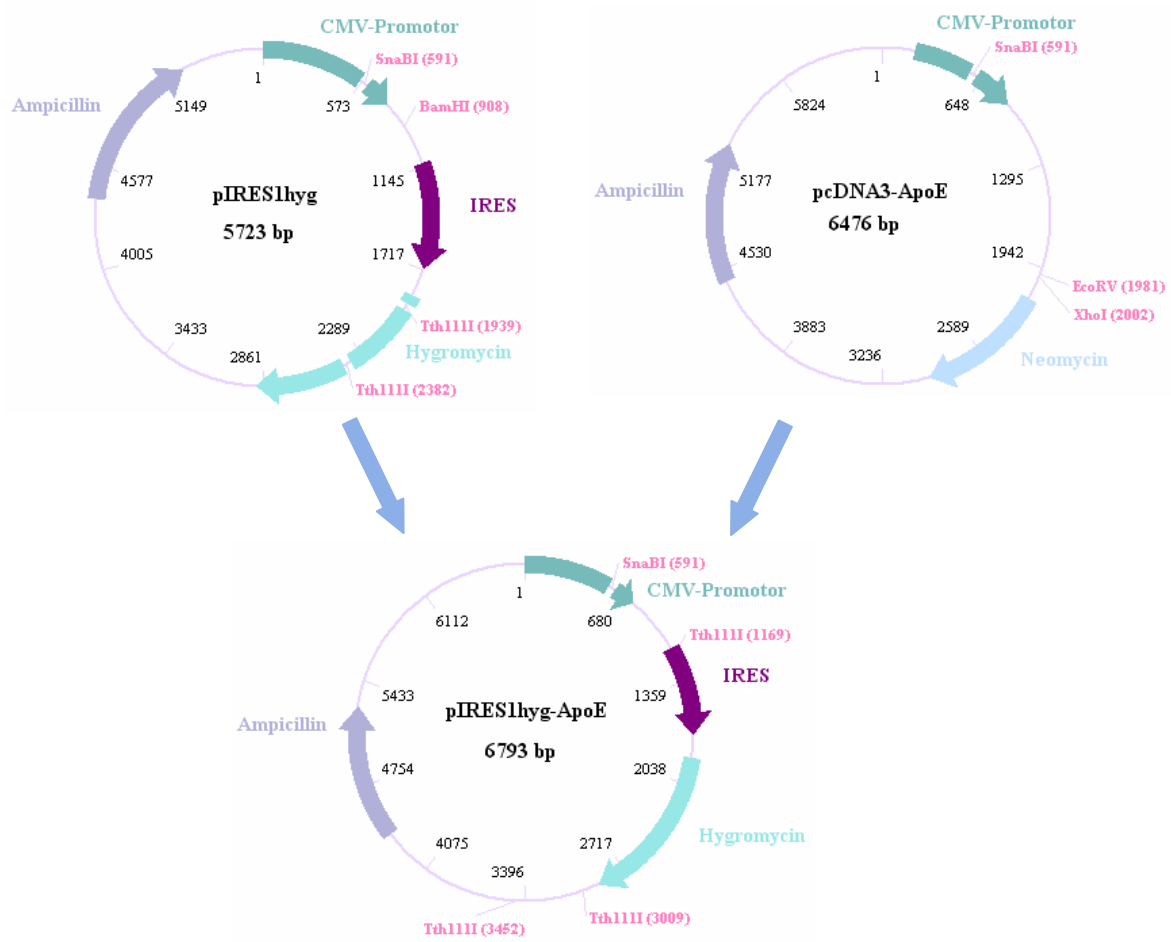


Abbildung 3.1: Exemplarisches Klonierungsschema für die Umklonierung von ApoE2- und ApoE4 in pcDNA3-Vektor in einen pIRES1hyg-Vektor.

Die cDNA von ApoE2 wurde mit den Restriktionsenzymen *SnaBI* und *EcoRV* aus dem pcDNA3-ApoE-Vektor geschnitten, die von ApoE4 mit *SnaBI* und *XhoI*. Die beiden entstehenden Fragmente wurden anschließend durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das 1310 Basenpaar (bp) große ApoE-Fragment aus dem präparativen Gel isoliert.

Nach einer Restriktion des pIRES1hyg-Vektors mit dem Enzym *BamHI* wurde die pIRES1hyg-cDNA mit einer T4-DNA-Polymerase behandelt, um glatte Enden zu erzeugen. Durch nachfolgende Restriktion mit *SnaBI*, Dephosphorylierung und gelelektrophoretischer Auftrennung der beiden Fragmente, konnte das 5409 bp-Fragment der cDNA aus dem präparativen Agarosegel isoliert werden. Anschließend erfolgte die Ligation der ApoE2- oder ApoE4-Fragmente mit dem pIRES1hyg-Vektor. Die ligierten Plasmide enthielten die cDNA einer der beiden ApoE-Isoformen und wurden als pIRES1hyg-ApoE2 und pIRES1hyg-ApoE4 bezeichnet.

Zur Amplifizierung der bei der Ligation entstandenen Plasmide wurden diese in *E.coli* vermehrt und durch eine Plasmidminipräparation isoliert (siehe 2.1.9). Die korrekte Insertion der ApoE-cDNA wurde durch eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen *SnaBI* und *Tth1111* bestätigt.

3.1.2 Untersuchung der ApoE-Prozessierung an ADAM10-ApoE oder ADAM10dn-ApoE doppelt-transfizierten, embryonalen Nierenzellen

Da das endogene Expressionsniveau von ADAM10 möglicherweise zu schwach ist, um einen Einfluss auf die ApoE-Prozessierung auszuüben, wurden für funktionelle Prozessierungsanalysen embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) verwendet, die ADAM10 (HEKADAM10) oder eine dominant negative Form von ADAM10 (HEKADAM10dn) stabil überexprimierten. Da ApoE durch Nierenzellen endogen nicht gebildet wird, mußte dieses weiterhin stabil in die Zellen zur Expression gebracht werden. Zur Charakterisierung möglicher ApoE isoformenabhängiger Prozessierungsunterschiede, wurden die Zellen mit ApoE2 oder ApoE4 stabil transfiziert. Dafür wurde das humane ApoE aus einem pcDNA3-Plasmid in einen pIRES1hyg-Vektor umgesetzt (siehe 3.1.1) und mit Lipofectamin 2000 in die Zelle eingeschleust. Nach Selektion nicht transfizierter Zellen durch Hygromycin B, exprimierte die daraus resultierende Zelllinie sowohl ADAM10 beziehungsweise ADAM10dn als auch eine der beiden ApoE Isoformen. Als Kontrollzelllinie diente ein Mischklon, der lediglich mit dem leeren pIRES1hyg-Vektor transfiziert worden war.

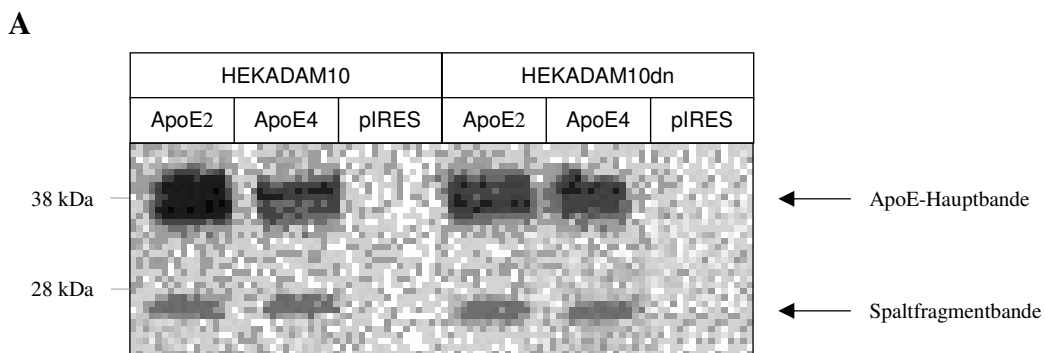


Abbildung 3.2: Einfluss von ADAM10 und dessen dominant negative Variante auf die ApoE-Prozessierung in ApoE stabil überexprimierenden HEKADAM10 und HEKADAM10dn-Zellen.

A) Der Überstand von jeweils zwei zehn Zentimeter Zellkulturplatten wurde nach einer vierstündigen Inkubation in serumfreiem Medium vereinigt und über eine Zentrifugation in einem Amicon® Ultra-4 Gefäß eingengt. Nach einer anschließenden Methanol-Chloroform-Fällung wurden die Proteine über ein 4-12 %iges NUPAGE-Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der

Nachweis erfolgte mit einem spezifischen ApoE-Erstantikörper und einen alkalischen phosphatasegekoppelten Zweitantikörper

Eine Veränderung der ApoE Spaltung durch ADAM10 war bei einem Vergleich von HEKADAM10-ApoE2 mit HEKADAM10-ApoE4-Zellen nicht nachweisbar. Bei einer Gegenüberstellung des Bandenmusters von HEKADAM10-ApoE mit dem von HEKADAM10dn-ApoE lies sich keine schwächere Ausprägung der 22 Kilodalton Spaltfragmentbande in HEK-ADAM10dn-ApoE-Zellen nachweisen. Durch Berechnung des Verhältnisses der ApoE-Hauptbande zur ApoE Spaltfragmentbande bestätigte sich die Beobachtung. ADAM10 scheint in diesem *in vitro* Zellkultursystem keinen Einfluss auf die ApoE-Prozessierung auszuüben.

3.1.3 Untersuchung der Beeinflussung von hydroxamsäurebasierten Inhibitoren auf die ApoE-Spaltung in humanen Leberzellen (HepG2)

Ziel weiterer Untersuchungen war die Klärung der Frage, inwieweit andere Proteine der ADAM-Familie an der Spaltung von ApoE involviert sind. Aufbauend auf der von Frau Dr. Kojro zuvor durchgeführten *in vitro* Analyse, sollte die Auswirkung von Inhibitoren der ADAM-Familie auf die ApoE-Spaltung an einem *in vitro* Zellkultursystem untersucht werden. Dafür wurde die humane Leberzelllinie HepG2 ausgewählt, da diese ApoE auf einem hohen, endogenen Expressionsniveau exprimieren. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Inhibitoren wurde parallel die APPs α -Sekretion bestimmt.

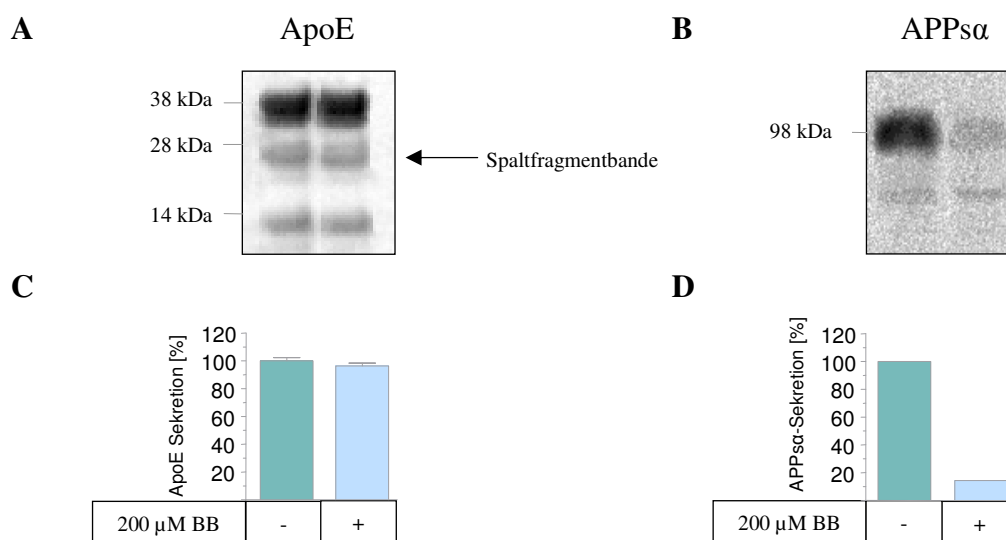


Abbildung 3.3: Einfluss des hydroxamsäurebasierten Inhibitors BB3103 auf die ApoE-Sekretion (A, C) und APPs α -Sekretion (B, D) in HepG2-Zellen.

Ergebnisse

A) HepG2-Zellen wurden entweder mit 200 μM BB3103 oder ohne Zusätze über Nacht kultiviert. Nach vierundzwanzig Stunden wurden die Proteine aus dem Zellkulturüberstand mittels PHML-LiposorbTM gefällt, über ein 4-12 %iges NUPAGE-Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen ApoE-Erstantikörper und einen alkalischen phosphatasegekoppelten Zweitantikörper **B)** Die TCA-gefällten Proteine der Zellkultur-Überstände wurden über ein 7,5 %iges vier Zentimeter Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen APPs α -Antikörper und einen alkalischen phosphatasegekoppelten Zweitantikörper. **C und D)** Quantifizierung der apoE- und APPs α -Sekretion. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar ($n = 2$).

Es ist bekannt, das BB3103 eine Substanz mit breitem Inhibitionsspektrum ist. Durch seine Verwendung wird die Zuordnung eines Spaltereignisses zu den Metalloproteinasen der ADAM-Familie ermöglicht. In HepG2-Zellen blieb die ApoE-Prozessierung durch den Inhibitor unbeeinflusst, wohingegen die konstitutive Sekretion von APPs α um etwa sechsundachtzig Prozent im Vergleich zur Kontrolle durch den Inhibitor BB3103 gesenkt wurde (siehe Abbildung 3.3).

Zur Verifizierung der Ergebnisse kam Ro31-9790, ein weiterer Inhibitor von Proteinen der ADAM-Familie zum Einsatz.

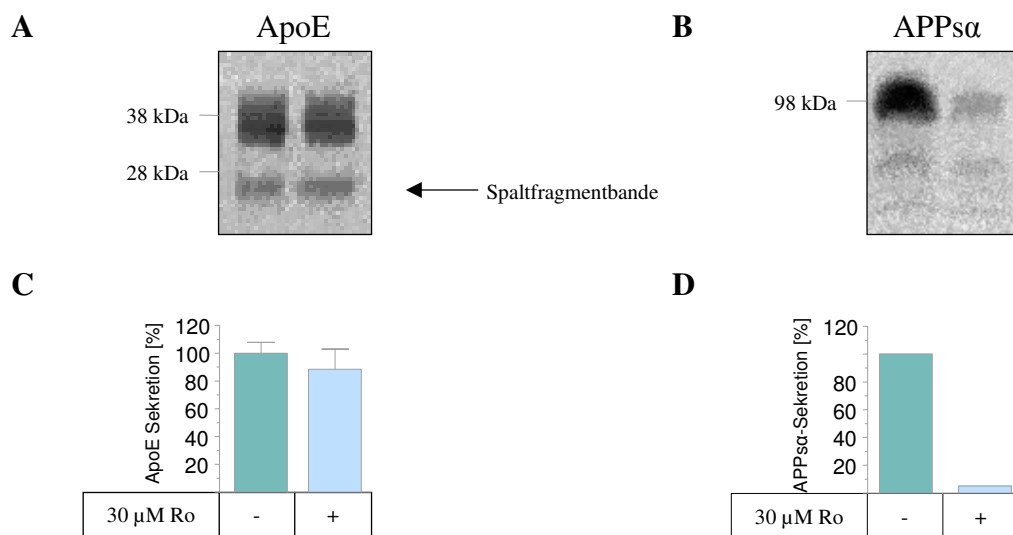


Abbildung 3.4: Einfluss des hydroxamsäurebasierten Inhibitors Ro31-9790 auf die ApoE-Sekretion (A, C) und APPs α -Sekretion (B, D) in HepG2-Zellen.

A) HepG2-Zellen wurden entweder mit 30 μM Ro31-9790 oder ohne Zusätze über Nacht kultiviert. Nach vierundzwanzig Stunden wurden die Proteine aus dem Zellkulturüberstand mittels PHML-LiposorbTM gefällt, über ein 4-12 %iges NUPAGE-Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran

transferiert. Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen ApoE-Erstantikörper und einen alkalischen phosphatasegekoppelten Zweitantikörper **B**) Die TCA-gefällten Proteine der Zellkultur-Überstände wurden über ein 7,5 %iges vier Zentimeter Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen APPs α -Antikörper und einen alkalischen phosphatase-gekoppelten Zweitantikörper. **C und D**) Quantifizierung der apoE- und APPs α -Sekretion. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 2).

Die starke Reduktion der APPs α -Freisetzung um etwa fünfundneunzig Prozent im Vergleich zur Kontrolle durch den Inhibitor Ro31-9790 weist darauf hin, dass die Substanz aktiv ist und als Inhibitor von Metalloproteinasen wirken kann. Für die ApoE-Prozessierung ergab sich, bei der densitometrischen Auswertung der Western Blots, keine Veränderung der ApoE-Spaltung durch Ro31-9790.

Die Befunde zum Einfluss von hydroxamsäurebasierten Inhibitoren auf die ApoE-Spaltung, deuten darauf hin, dass auch andere Proteine der ADAM-Familie in diesem endogenen *in vitro* Zellkultursystem keinen Einfluss auf die ApoE-Spaltung ausüben. Zusammenfassend mit bisherigen Befunden aus der Doppeltransfektion von ApoE und ADAM10 in embryonale Nierenzellen, ist weder ADAM10 noch sind andere Metalloproteinasen an einer ApoE-Prozessierung beteiligt.

3.2 Untersuchung des Einflusses von ApoE auf die APP-Prozessierung in der Astrogliazelllinie hU373APP

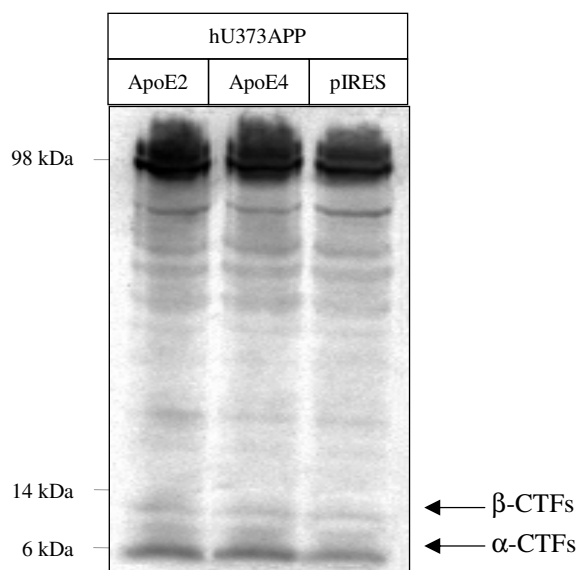
Es gibt Hinweise aus Untersuchungen mit APP überexprimierenden, neuronalen Primärkulturen aus Mäusen, die mit primären Astrozytenzellen kokultiviert wurden, dass ApoE isoformenabhängig die APP Prozessierung beeinflusst (Vincent *et al.*, 2001). Unter dieser Annahme sollte hier an humanen Glioblastomazellen U373, die humanes Wildtyp-APP überexprimieren, die Auswirkung von ApoE2 und ApoE4 auf die APP Prozessierung untersucht werden. Dazu wurde die cDNA der ApoE-Isoformen aus einem pcDNA3-Vektor in einen pIRES1hyg-Vektor umgesetzt (siehe 3.1.1) und durch Lipofectamin 2000 stabil in U373-Zellen eingeschleust. Nach Selektion nichttransfizierter Zellen mit Hygromycin B und ausreichender Vermehrung, wurde sowohl die Bildung von C-terminalen Spaltfragmenten im Zelllysats als auch die Freisetzung von APPs α und APPs β im Kulturüberstand analysiert.

3.2.1 Beeinflussung der C-terminalen Spaltfragmente von APP durch ApoE

Untersuchungen an Ovarienzellen aus Hamstern (CHO-Zellen), die APP stabil überexprimierten, haben gezeigt, dass exogen zugegebenes ApoE dosisabhängig die Bildung von C-terminalen Spaltfragmenten begünstigt.

Dies sollte in diesem Versuchsabschnitt an der physiologisch relevanteren Astrogliazelllinie hU373APP untersucht werden, der ApoE nicht von außen zugeführt wurde sondern die ApoE2 oder ApoE4 stabil überexprimierten. Der quantitative Vergleich der entstehenden Spaltfragmente sollte eine Beurteilung über die Beteiligung von ApoE an der APP-Prozessierung gewähren.

A



B

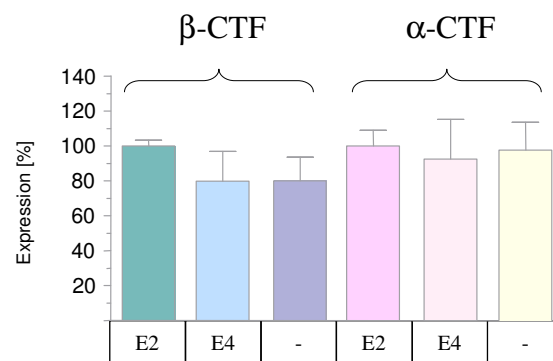


Abbildung 3.5: Einfluss von ApoE2 und ApoE4 auf die Bildung von C-terminalen Spaltfragmenten von APP in hU373APP-Zellen, die mit ApoE2, ApoE4 oder pIRES1hyg stabil transfiziert wurden.

A) Exemplarischer Western-Blot zum Nachweis C-terminaler Spaltfragmente von APP: Die Zellen wurden nach einer vierstündigen Inkubation in serumfreiem Medium einmal mit PBS gewaschen und entsprechend ihres Proteingehaltes in NU-PAGE Auftragspuffer lysiert. Die Proteine wurden über ein 4 - 12 %iges NUPAGE-Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen Antikörper gegen APP und einem ³⁵S-markierten Zweitantikörper. **B)** Quantifizierung der C-terminalen Spaltfragmente von APP. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung (SD) dar (n=4).

In diesen Untersuchungen wurden für ApoE- und mit Leervektor transfizierten hU373APP-Zellen C-terminale APP Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen sechs und vierzehn Kilodalton nachgewiesen. Diese Spaltfragmente könnten als Substrate für

eine nachfolgende Spaltung durch die γ -Sekretase dienen und sowohl durch die Aktivität der α - als auch der β -Sekretase entstanden sein. Dabei zeigte sich keine deutliche Zunahme der beiden C-terminalen Spaltfragmente bei ApoE-transfizierten hU373APP-Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie, die mit dem Leervektor pIRES1hyg transfiziert wurde. Außerdem trat kein quantitativer Unterschied zwischen den beiden Isoformen auf.

3.2.2 Einfluss von ApoE auf die APP α - und APP β -Freisetzung

Neben in der Membran verankerten C-terminalen Fragmenten, entstehen auch lösliche, in das Medium freigesetzte, proteolytische Produkte von APP. Um zu überprüfen ob ApoE die Freisetzung von APP α oder APP β beeinflusst, wurde deren Sekretion in den Zellkulturüberstand untersucht. Eine eventuell auftretende isoformenabhängige Beeinflussung der APP α - oder APP β -Freisetzung erfolgte durch eine Transfektion mit anschließender Sekretionsanalyse von ApoE2- oder ApoE4-transfizierten hU373APP-Zellen.

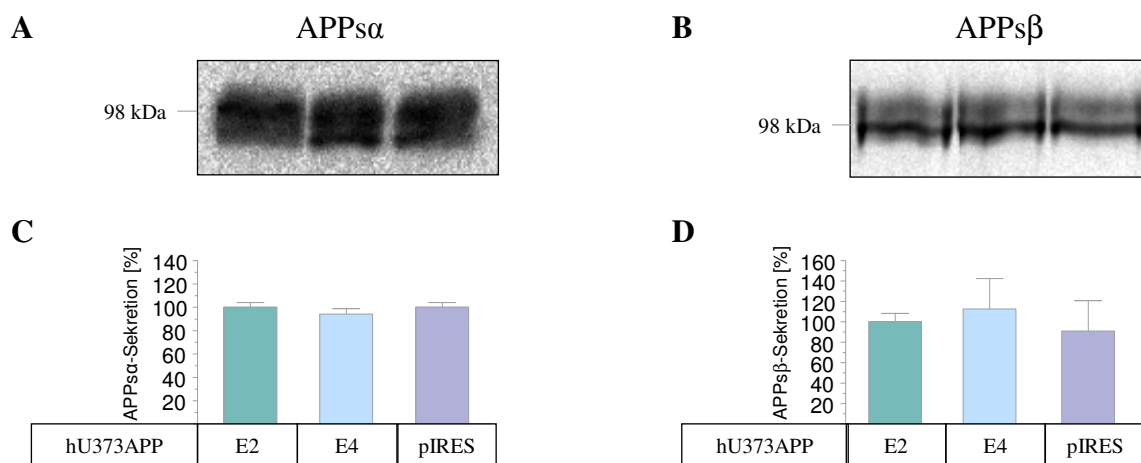


Abbildung 3.6: Einfluss von ApoE2 und ApoE4 auf die APP α - (A, C) und APP β -Sekretion (B, D) in hU373APP -Zellen, die mit ApoE2, ApoE4 oder pIRES1hyg stabil transfiziert wurden.

A und B) Die Proteine einer zehn Zentimeter Zellkulturplatte wurden nach vier Stunden über TCA gefällt, über ein 7,5 %iges vier Zentimeter Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch spezifische Erstantikörper gegen APP α und APP β und ^{35}S -markierten Zweitantikörpern. **C und D)** Quantifizierung der APP α - und APP β -Sekretion. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 2).

Sowohl zwischen den ApoE Isoformen als auch bei einem Vergleich der mit Leervektor transfizierten Zellen fand keine Änderung der APPs α -Freisetzung statt (siehe Abbildung 3.6 A und C). Die α -Sekretasen scheinen daher durch Apolipoprotein E nicht beeinflusst zu werden. Die densitometrische Quantifizierung der APPs β -Sekretion ergab für ApoE-transfizierte hU373APP-Zellen eine quantitativ ähnliche Sekretion von APPs β gegenüber Leervektor transfizierten Kontrollzellen. Dieser Befund weist darauf hin, dass ApoE keinen Einfluss auf die β -Sekretase BACE ausübt.

3.3 Die Rolle des Cholesteringehaltes auf die ApoE-Sekretion- und Expression

Das stark hydrophobe Cholesterin ist in Säugerzellen ein unverzichtbarer Bestandteil von Membranen und Vorstufe von lebensnotwendigen Steroidhormonen. Dabei ist das adulte Gehirn eines der cholesterinreichsten Organe des Säugerkörpers. Cholesterin liegt hauptsächlich in Myelinmembranen vor, findet sich aber auch in Neuronen, Gliazellen und extrazellulären Lipoproteinen wider. Bei der Neuverteilung von Cholesterin im Gehirn scheint ApoE eine besondere Rolle zu spielen. Daher sollte hier der Einfluss einer Cholesterinanreicherung- und Entfernung aus der Membran untersucht werden.

3.3.1 Auswirkung einer Cholesterinanreicherung auf die ApoE-Sekretion- und Expression

Als Reagenz, welches spezifisch Cholesterin komplexieren kann, wurde Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) beschrieben (Kilsdomk *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1995). Durch Behandlung der humanen Astrogliazelllinie CCFSTTGI mit cholesteringesättigtem M β CD ist es möglich, den Cholesteringehalt in der Zellmembran zu erhöhen.

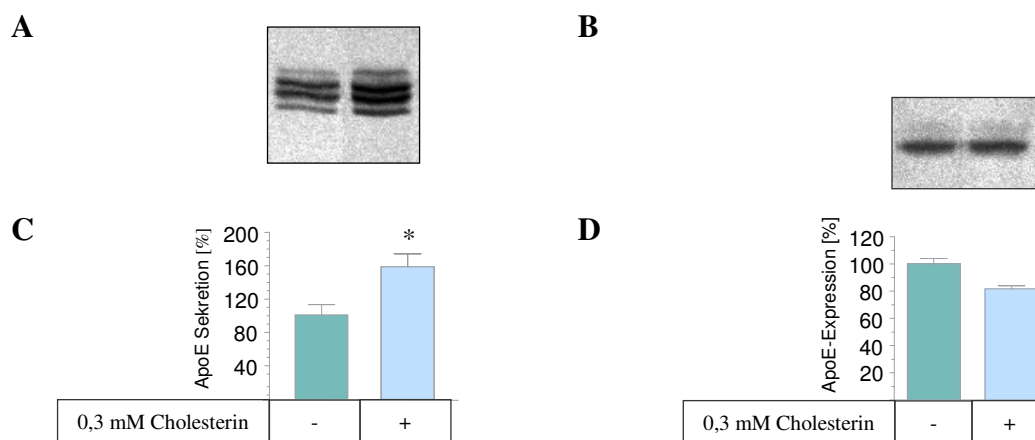


Abbildung 3.7: Einfluss einer Cholesterinanreicherung durch einen Methyl- β -Cyclodextrin/Cholesterin-Komplex auf die ApoE-Sekretion-(A, C) und Expression (B, D) in CCFSTTGI-Zellen

A) Der Überstand jeweils einer zehn Zentimeter Zellkulturplatte wurde nach vierundzwanzigstündiger Inkubation mit Cholesterin über eine Zentrifugation in einem Amicon®Ultra-4 Gefäß eingengt. Nach einer anschließenden Methanol-Chloroform-Fällung wurden die Proteine über ein 13 %iges zehn Zentimeter Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen ApoE-Erstantikörper und einem ³⁵S-markierten Zweitantikörper. B) Zum Nachweis der ApoE-Expression wurden die Zellen nach einer vierundzwanzigstündigen Inkubation in serumfreiem Medium einmal mit PBS gewaschen und entsprechend ihres Proteingehaltes in SDS-Auftragspuffer lysiert. Die Proteine wurden über ein 13 %iges zehn Zentimeter Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen ApoE-Erstantikörper und einem ³⁵S-markierten Zweitantikörper. C und D) Quantifizierung der ApoE-Sekretion- und Expression. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (Sekretion n = 4; Expression n = 1). *, p<0,05 (paired student's t-Test))

Die Abbildung 3.7 zeigt, dass in den Zellkulturüberstand sezerniertes ApoE verschieden stark glykosiliert vorliegen kann. Für eine Quantifizierung wurden alle Glykosilierungsformen zu einer Bande zusammengefaßt. Die Inkubation von CCFSTTGI-Zellen mit einem Methyl- β -Cyclodextrin/Cholesterinkomplex, führte zu einer signifikanten Induktion der ApoE-Sekretion um ungefähr neunundfünfzig Prozent im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.7 A und C). Eine Zunahme des intrazellulären ApoE-Gehaltes konnte hingegen nicht verzeichnet werden (B und D). Eine Cholesterinanreicherung scheint demnach die Freisetzung nicht aber die Proteinexpression von ApoE zu beeinflussen.

3.3.2 Einfluss einer Cholesterinentfernung mit M β CD auf die ApoE-Sekretion- und Expression

Durch den Einsatz von Cyclodextrinen, die selektiv bestimmte Lipidspezies aus der Membran zu extrahieren vermögen, kann die Lipidzusammensetzung der Membran verändert werden. Durch Behandlung von CCFSTTGI-Zellen mit M β CD einem spezifischen Cholesterinkomplexbildner, sollte zunächst eine Cholesterinextraktion durchgeführt werden. Eine ApoE-Sekretions- und Expressionsanalyse sollte einen Hinweis über die Auswirkung einer Cholesterinextraktion liefern.

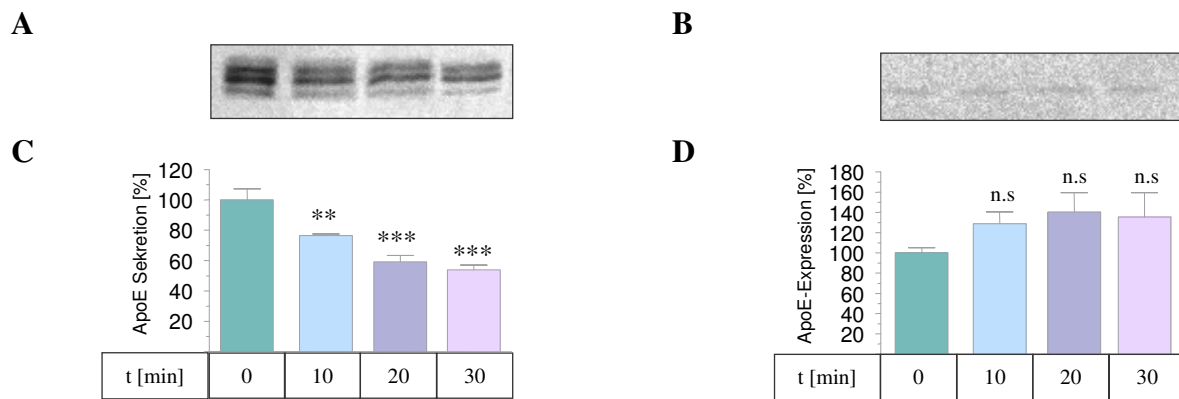


Abbildung 3.8: Einfluss einer Cholesterinextraktion mittels Methyl- β -Cyclodextrin auf die ApoE-Sekretion- (A, C) und Expression (B, D) in CCFSTTGI-Zellen

A) CCFSTTGI-Zellen einer zehn Zentimeter Zellkulturplatte wurden nach einer zweimaligen Waschung mit PBS für die jeweilige Inkubationszeit in serumfreiem Medium mit 10 mM M β CD kultiviert. Der Überstand jeweils einer Zellkulturplatte wurde über eine Ultrafiltration eingengt. Die Proteinfällung, die Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgten wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. **B)** Zum Nachweis der ApoE-Expression wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in Lysepuffer des Amplex[®]Red Enzymtest lysiert, einer Methanol-Chloroform-Fällung unterzogen und in SDS-Auftragspuffer aufgenommen. Die Proteine wurden über ein 13 %iges zwanzig Zentimeter Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen ApoE-Erstantikörper und einem ³⁵S-markierten Zweitantikörper. **C und D)** Quantifizierung der ApoE-Sekretion- und Expression. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (Sekretion n = 4; Expression n = 2). **, p<0,01; ***, p<0,001 (paired student's t-Test)

Die Freisetzung von ApoE verhielt sich adäquat zum Gehalt an freiem Cholesterin. Mit zunehmender Inkubationszeit von M β CD reduzierte sich die ApoE-Sekretion um dreiundzwanzig Prozent bei zehnminütiger, um einundvierzig Prozent bei zwanzigminütiger und sechsundvierzig Prozent bei dreißigminütiger Cholesterinextraktion mit M β CD im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.8 A und C). Es konnte gezeigt werden, dass durch Reduktion des Cholesteringehaltes die ApoE-Sekretion signifikant gehemmt werden konnte. Das intrazelluläre ApoE blieb hingegen von einer Cholesterinentfernung unbeeinflusst (B und D).

Unter Zuhilfenahme eines Amplex[®]Red Enzymtests sollte, parallel zur ApoE-Sekretions- und Expressionsanalyse, die Reduktion des Cholesteringehaltes durch M β CD belegt werden. Eine Cholesterinbestimmung ermöglichte dabei eine tatsächliche Korrelation zwischen auftretendem Effekt und veränderte Cholesterinmenge zu belegen.

A	10 min	20 min	30 min
Cholesterinentfernung [%]	18,1 ± 2,2	29,9 ± 5,1	45,6 ± 6,3

Tabelle 3.1: Einfluss der Reaktionsdauer von M β CD auf den freien Cholesteringehalt

A) CCFSTTGI-Zellen einer zehn Zentimeter Zellkulturplatte wurden nach einer zweimaligen Waschung mit PBS für die jeweilige Inkubationszeit in serumfreiem Medium mit 10 mM M β CD kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für vier Stunden in serumfreiem Medium mit fettsäurefreiem BSA kultiviert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in Lysepuffer des Amplex[®]Red Enzymtests lysiert. Nach einer Zentrifugation wurde der freie Cholesteringehalt des geklärten Lysats mit einem Amplex[®]Red Enzymtest bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, der Mittelwert der unbehandelten CCFSTTGI-Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

Der Gehalt an freiem Cholesterin konnte durch Inkubation mit M β CD deutlich gesenkt werden. Wurde die Dauer der Extraktion verlängert, so ließ sich eine deutliche Zunahme der Cholesterinentfernung detektieren. Diese Beobachtung korreliert mit Angaben aus der Literatur, denen zufolge innerhalb dieses Zeitfensters eine siebzigprozentige Cholesterinextraktion aus der Membran stattfindet (Kojro *et al.*, 2001).

Durch den Einsatz von M β CD konnte die ApoE-Freisetzung in das Zellkulturmedium signifikant beeinflusst werden wodurch ein Zusammenhang zwischen Apolipoprotein E Sekretion und Cholesterinmenge bewiesen werden konnte. Die ApoE-Expression hingegen änderte sich in diesem *in vitro* Zellkulturmodell weder durch eine Cholesterinanreicherung noch durch eine Cholesterinreduktion.

3.3.3 Einfluss von Statinen auf die ApoE-Sekretion- und Expression

Eine deutlich physiologischere Anwendung zur Untersuchung des Einflusses von Cholesterin auf Apolipoprotein E bietet die Hemmung der Cholesterinbiosynthese. Anhand von Inhibitoren und Substraten kann hierbei nicht nur der Einfluss der Cholesterinbiosynthese alleine sondern auch der des Isoprenylierungsweges untersucht werden.

Ein Schlüsselenzym für die endogene Synthese von Cholesterin stellt die Aktivität der an das Endoplasmatische Retikulum gebundene 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A Reduktase (HMGCoA) dar, welche die Bildung von Mevalonat katalysiert, das Schlüsselmolekül für die Synthese von Cholesterin. Durch Hemmung der HMGCoA-Reduktase durch Statine, die am Enzym als so genannte Übergangszustandanaloga wirken

und einen Teil der HMGCoA-Bindungstasche im aktiven Zentrum besetzen (Istvan, 2002), wird die Umwandlung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A in Mevalonat und damit der initiale Schritt in der Cholesterinbiosynthese gehemmt. Der aus Pilzkulturen von *Aspergillus terreus* isolierte Naturstoff Lovastatin (Mevacor[®]) sowie die durch biotechnologische Herstellung gewonnenen Wirkstoffe Simvastatin, Cerrivastatin (Lipobay[®]) und Atorvastatin stellen dabei selektive Inhibitoren der HMGCoA-Reduktase dar. Durch Inhibierung der de-novo-Synthese des Cholesterins sollte sich der Gehalt an Cholesterin in der Zelle erniedrigen, so dass mit einem ähnlichen Effekt auf Apolipoprotein E gerechnet wird wie unter einer M β CD-Gabe.

Da bekannt ist das Statine bei höheren Konzentrationen neurotoxisch wirken können, sollte zuerst die Zellviabilität von Astrogliazellen bei verschiedenen Lovastatinkonzentrationen bestimmt werden.

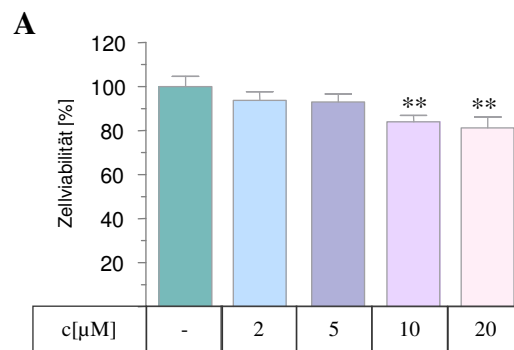


Abbildung 3.9: Einfluss verschiedener Lovastatinkonzentrationen auf die Zellviabilität in hU373APP-Zellen

A) Der Versuch wurde in der Diplomarbeit von Frau Sandra Ahlers durchgeführt. Dafür inkubierten hU373APP-Zellen in serumfreiem Medium mit LPDS und der jeweiligen Lovastatinkonzentration auf einer eineinhalb Zentimeter Zellkulturplatte. Nach vierundzwanzig Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen erneut für vier Stunden in serumfreiem Medium mit der jeweiligen Lovastatinkonzentration kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit serum- und farbstofffreiem Medium gewaschen und einem Zellviabilitätstest mit 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl tetrazolium bromid (MTT) unterzogen. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 3). **, p<0,01 (paired student's t-Test)

Anhand des Zellviabilitätstest in Abbildung 3.9 ist zu erkennen, dass eine vierundzwanzigstündige Inkubation von hU373APP-Zellen mit zwei und fünf Mikromolar Lovastatin keine Beeinträchtigung der Zellviabilität zur Folge hat. Bei höheren Konzentrationen von zehn und zwanzig Mikromolar hingegen kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität.

An den Zellviabilitätstest anschließend sollte die Lovostatinkonzentration bestimmt werden, bei der eine maximale Reduktion des freien Cholesterins einhergeht mit einer optimalen Inhibition der ApoE-Freisetzung.

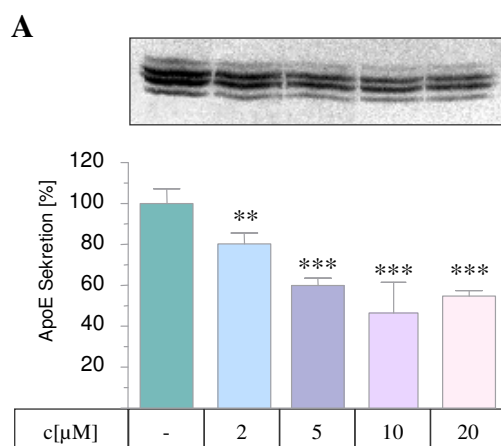


Abbildung 3.10: Einfluss verschiedener Lovostatinkonzentrationen auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI-Zellen

A) Exemplarischer Western-Blot: CCFSTTGI-Zellen einer zehn Zentimeter Zellkulturplatte wurden für vierundzwanzig Stunden mit der jeweiligen Lovostatinkonzentration in serumfreiem Medium inkubiert. Die Aufbereitung der Überstände, die Proteinfällung und Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgte wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. Quantifizierung der ApoE-Sekretion. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 2). **, p<0,01; ***, p<0,001 (paired student's t-Test)

A	2 μ M Lova	5 μ M Lova	10 μ M Lova	20 μ M Lova
Sekretion [%]	19,8 \pm 5,4**	40,1 \pm 3,6***	53,5 \pm 15,0***	45,2 \pm 5,1***
Cholesterinentfernung [%]	21,1 \pm 0,3	21,7 \pm 5,5	19,9 \pm 0,3	23,0 \pm 2,7

Tabelle 3.2: Einfluss unterschiedlicher Lovostatinkonzentrationen auf die ApoE-Sekretion und das freie Cholesterin in CCFSTTGI-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Inhibition mit Standardabweichung.

A) CCFSTTGI-Zellen wurden für vierundzwanzig Stunden in serumfreiem Medium mit fettsäurefreiem BSA und der jeweiligen Statinkonzentration kultiviert (Lova = Lovastatin). Die Aufbereitung der Überstände, die Proteinfällung und Aufbereitung und der immunologische Nachweis erfolgte wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. Für eine Cholesterinbestimmung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in Lysepuffer lysiert und nach einer Zentrifugation unter Zuhilfenahme eines Amplex[®]Red Enzymtests bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, der Mittelwert der unbehandelten CCFSTTGI-Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

Bei einem Vergleich des Effektes von Lovastatin auf die ApoE-Sekretion mit dem auf das freie Cholesterin, konnte bei einer Konzentration von 5 μM eine maximale Inhibition der ApoE-Freisetzung um etwa vierzig Prozent bei gleichzeitiger optimaler Absenkung des freien Cholesterinspiegels durch Lovastatin erreicht werden. Aufgrund dieser Daten und den Ergebnissen aus dem Zellviabilitätstest, wurden nachfolgende Untersuchungen bei einer Lovastatinkonzentration von fünf Mikromolar durchgeführt.

Neben der Untersuchung des Einflusses des HMGCoA-Reduktase-Inhibitors Lovastatin auf die ApoE-Freisetzung, sollte auch dessen Auswirkung auf die ApoE-Expression bei verschiedenen Konzentrationen untersucht werden.

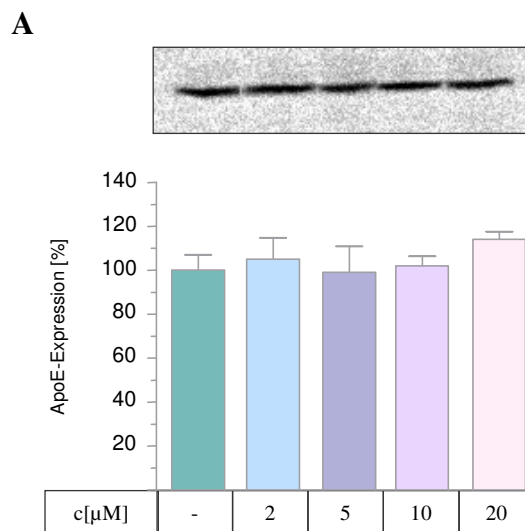


Abbildung 3.11: Einfluss verschiedener Lovastatinkonzentrationen auf die ApoE-Expression in CCFSTTGI-Zellen

A) Zum Nachweis der ApoE-Expression wurden die Zellen wie unter Tabelle 3.2 beschrieben lysiert, entsprechend ihres Proteingehaltes einer Methanol-Chloroform-Fällung unterzogen und in SDS-Auftragungspuffer aufgenommen. Die Proteine wurden über ein dreizehnprozentiges zwanzig Zentimeter Gel aufgetrennt und über *semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis erfolgte durch einen spezifischen ApoE-Erstantikörper und einem ^{35}S -markierten Zweitantikörper. Quantifizierung der ApoE-Expression. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen fand keine intrazelluläre Antwort durch den Einsatz von Lovastatin statt. Im Gegensatz zur ApoE-Sekretion scheint die ApoE-Expressionsrate von einer Hemmung der HMGCoA-Reduktase unbeeinflusst zu bleiben. Um dies zu

untermauern, wurde zusätzlich die mRNA von ApoE durch *Real time* RT-PCR Experimente bei Verwendung von 5 μ M Lovastatin quantifiziert.

A

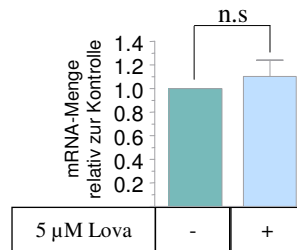


Abbildung 3.12: *Real time* RT-PCR der ApoE-mRNA aus der Astrozytomazelllinie CCFSTTGI nach Behandlung mit 5 μ M Lovastatin.

A) Nach einer vierundzwanzigstündigen Inkubation der Zellen mit 5 μ M Lovastatin wurde die RNA isoliert und mittels *Real time* RT-PCR analysiert. Für die mRNA von ApoE wurde das Primerpaar hApoE_Reti_for und hApoE_Reti_rev verwendet, in Triplikaten bestimmt und auf die mRNA von GAPDH normiert. Die Quantifizierung von fünf unabhängigen Experimenten erfolgte mit der Software ABIPrism und Excel.

Die durch Lovastatin hervorgerufene Reduktion des Cholesteringehaltes der Zellen bewirkte keine Veränderung der mRNA-Menge von ApoE. Dies geht konform mit den Befunden zur Auswirkung von Lovastatin auf die Expressionsrate (siehe Abbildung 3.11). Eine Veränderung durch Lovastatin konnte weder auf Proteinebene noch auf mRNA-Ebene in diesem *in vitro* Zellkultursystem gezeigt werden. Die ApoE-Freisetzung hingegen wurde, durch Reduktion des freien Cholesterins mit Hilfe von Statinen, signifikant gesenkt (siehe Tabelle 3.2).

Aufgrund einer Korrelation zwischen einem gesteigerten Plasmacholesterinspiegel und Träger des ApoE ϵ 4 Allels wurde hier außerdem die Auswirkung von Statinen auf die verschiedenen ApoE-Isoformen in der menschlichen Glioblastoma/Astrozytomazelllinie hU373 untersucht, die das humane Wildtyp-APP und eine der ApoE-Isoformen überexprimiert. Der Einsatz von unterschiedlichen Statinpräparaten sollte weiterhin dazu beitragen herauszufinden, ob die lovastatinbedingte Hemmung der ApoE-Sekretion auch durch andere Statine hervorgerufen werden kann.

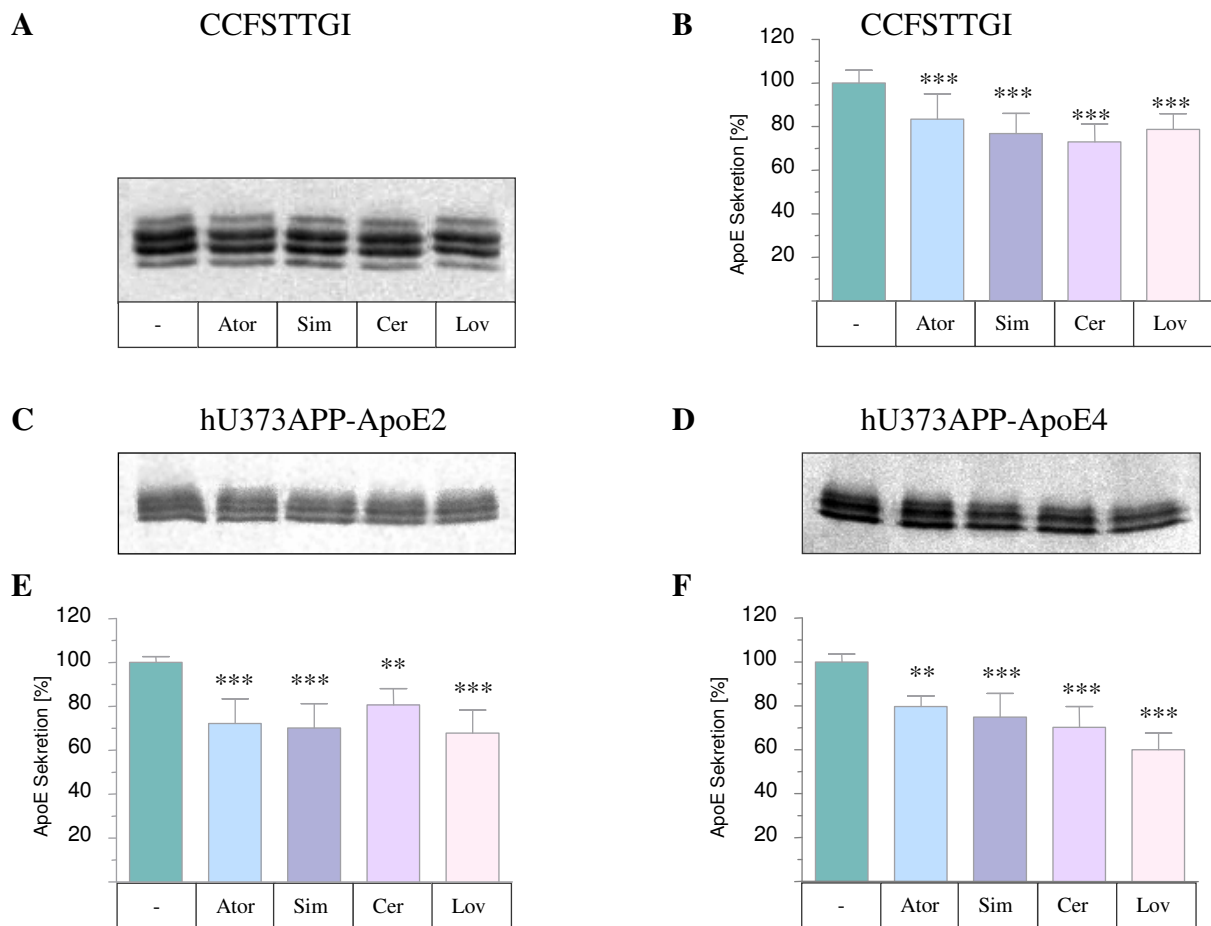


Abbildung 3.13: Einfluss unterschiedlicher Statine auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI (A, B), hU373APP-ApoE2 (C, E) und hU373APP-ApoE4-Zellen (D, F)

A, C und D) Der Überstand jeweils einer zehn Zentimeter Zellkulturplatte wurde nach vierundzwanzigstündiger Inkubation mit 5 μ M des jeweiligen Statins (Ator = Atorvastatin; Sim = Simvastatin; Cer = Cerrivastatin, Lov = Lovastatin) über eine Zentrifugation in einem Amicon®Ultra-4 Gefäß eingengt. Die Proteinfällung, die Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgten wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. **B, E und F)** Quantifizierung der ApoE-Sekretion. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 7). **, p<0,01; ***, p<0,001 (paired student's t-Test)

A	Atorvastatin	Simvastatin	Cerrivastatin	Lovastatin
CCFSTTGI	16,6 \pm 11,6***	23,1 \pm 9,2***	26,9 \pm 8,2***	21,3 \pm 7,2***
hU373APP-ApoE2	27,8 \pm 11,2***	29,8 \pm 11,2***	19,3 \pm 7,5**	32,2 \pm 10,5***
hU373APP-ApoE4	20,2 \pm 4,8**	25,1 \pm 10,7***	29,7 \pm 9,5***	39,9 \pm 7,4***

Tabelle 3.3: Einfluss der einzelnen Statine auf die ApoE-Sekretion in unterschiedlichen Zelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte der Inhibition mit Standardabweichung

Für alle hier angewandten Statine ergab sich eine signifikante Inhibition der ApoE-Freisetzung um durchschnittlich $26 \% \pm 9 \%$ zur Kontrolle (siehe Tabelle 3.3). Je nach Vitalität und Kulturdauer der Zellen wurde durch eine Lovastatingabe eine ApoE-Senkung zwischen einundzwanzig und vierzig Prozent erreicht. Einen Unterschied in der Stärke der Inhibition zwischen den einzelnen ApoE-Isoformen beziehungsweise zwischen ApoE-transfizierten und endogenen Astrozytomazellen konnte hierbei nicht festgestellt werden. Bei einer Beurteilung des Einflusses von Statinen auf die ApoE-Freisetzung fällt auf, dass im Durchschnitt mit dem vollsynthetisch hergestellten Atorvastatin die geringste, mit dem Naturstoff Lovastatin die stärkste Inhibition erreicht werden konnte ($21,5 \% \pm 9,2 \%$ im Vergleich zu $31,5 \% \pm 8,4 \%$). Bei einer Gesamtbeurteilung der hier dargestellten Ergebnisse, trat jedoch kein signifikanter Unterschied in der Wirkpotenz der unterschiedlichen Statinen auf. Durch ihren Einsatz konnte die ApoE-Sekretion in allen drei Astrozytomazelllinien signifikant reduziert werden.

3.4 Untersuchung der Beteiligung des Isoprenylierungsweges an der statinbedingten Hemmung der Apolipoprotein E-Sekretion

Wie oben bereits erwähnt sind Statine kompetitive Inhibitoren des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese. Durch ihre Verwendung wird jedoch nicht nur die Cholesterinbiosynthese, sondern auch nachgeschaltete Synthesewege des Isoprenylierungsweges blockiert, die vornehmlich über die Intermediate Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) ablaufen (Goldstein und Brown, 1980). Zahlreiche zelluläre Signalproteine erlangen ihre physiologische Funktionalität erst durch eine Isoprenylierung an spezifischen Aminosäureresten. Durch den Einsatz von Statinen kann es demnach zu einer Beeinträchtigung von posttranslationalen Modifikationen und Lokalisationen von Signalproteinen kommen. Um herauszufinden ob Apolipoprotein E durch Intermediate der Cholesterinbiosynthese beziehungsweise der Isoprenylierung beeinflusst wird, wurden CCFSTTGI-Zellen mit Substraten und Inhibitoren des Isoprenylierungsweges behandelt.

3.4.1 Einfluss von Mevalonat auf die ApoE-Sekretion- und Expression

Ein wichtiger Hinweis für die Beteiligung des Isoprenylierungsweges an der statinvermittelten Apolipoprotein E-Senkung wäre eine Aufhebung der durch Lovastatin hervorgerufenen ApoE-Sekretionsinhibierung durch die Gabe von Mevalonat. Bei einer Konzentration von 200 μM Mevalonat kann- im Gegensatz zum Isoprenylierungsweg- der Cholesterinbiosyntheseweg nicht rekonstituiert werden. Ein Effekt würde dementsprechend der Isoprenylierung zugeordnet werden können. Die hier durchgeführten Versuche sollten zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Lovastatin auf die ApoE-Sekretion beitragen.

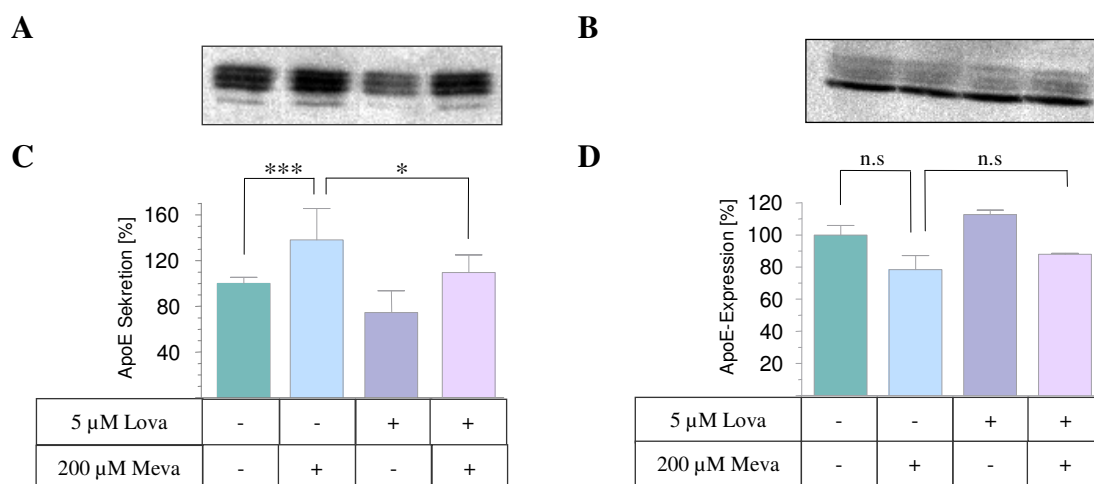


Abbildung 3.14: Einfluss einer vierundzwanzigstündigen Inkubation mit 200 μM Mevalonat beziehungsweise Mevalonat und Lovastatin auf die ApoE-Sekretion- (A, C) und Expression (B, D) in CCFSTTGI-Zellen

A) Exemplarische Western-Blots: Die Zellen wurden für vierundzwanzig Stunden mit den jeweiligen Substanzen in serumfreiem Medium inkubiert (Meva = Mevalonat; Lova = Lovastatin). Die Aufbereitung der Überstände, die Proteinfällung und Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgte wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. **B)** Der Nachweis der ApoE-Expression erfolgte wie unter Abbildung 3.8 beschrieben. **C und D)** Quantifizierung der ApoE-Sekretion- und Expression. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (Sekretion $n = 6$; Expression $n = 2$). *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$ (paired student's t-Test)

Die Abbildung 3.14 zeigt, dass überraschenderweise die alleinige Gabe von Mevalonat bereits zu einer signifikanten Sekretionssteigerung von ApoE führte. Das Ausmaß der Steigerung betrug etwa achtunddreißig Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Über welchen Mechanismus die alleinige Verabreichung von Mevalonat zur ApoE-Sekretionssteigerung

führt ist dabei unbekannt. Parallel zur Sekretionsanalyse wurde der Cholesteringehalt bestimmt, der durch eine Mevalonatgabe unbeeinflusst blieb (Daten nicht dargestellt). Die ApoE-Sekretion konnte signifikant um etwa sechsundzwanzig Prozent mit Lovastatin gesenkt werden. Bei einer Beteiligung des Isoprenylierungsweges an der ApoE-Sekretion sollte der inhibierende Effekt von Lovastatin durch gleichzeitige Mevalonatgabe aufgehoben werden können. Aufgrund der Tatsache, dass an diesem *in vitro* Zellkultursystem bereits eine alleinige Verabreichung von Mevalonat zur Sekretionssteigerung führte, konnte diese Vorgehensweise zu keinem klaren Ergebnis führen. Die Expression von ApoE blieb dahingegen von Mevalonat unbeeinflusst. Dies sollte zusätzlich durch Ermittlung der mRNA über *Real time* RT-PCR verifiziert werden.

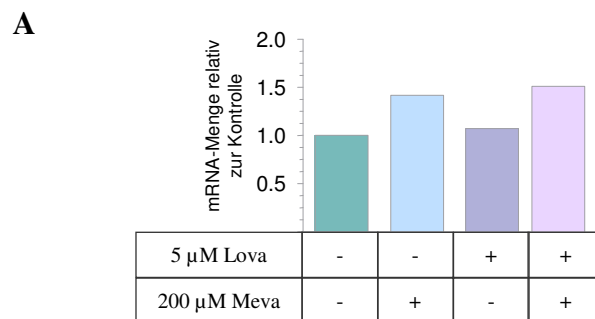


Abbildung 3.15: *Real time* RT-PCR der ApoE-mRNA aus der Astrozytomazelllinie CCFSTTGI nach einer vierundzwanzigstündigen Behandlung mit 200 µM Mevalonat beziehungsweise in Kombination mit Lovastatin

A) Nach einer vierundzwanzigstündigen Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Substanzen, wurde die RNA isoliert und mittels *Real time* RT-PCR analysiert. Für die mRNA von ApoE wurde das Primerpaar hApoE_Reti_for und hApoE_Reti_rev verwendet, in Triplikaten bestimmt und auf die mRNA von GAPDH normiert. Die Quantifizierung von einem Experiment erfolgte mit der Software ABIPrism und Excel.

Die ct-Werte von ApoE, die ein Maß für die mRNA-Konzentration in einer Probe darstellen, waren durch Mevalonat nur minimal erhöht. Da laut Definition ein ct-Wert größer zwei erst eine Expressionssteigerung und ein Wert kleiner einhalb erst eine Verminderung der Expressionsrate dokumentiert, konnte für keine der hier eingesetzten Substanzen eine signifikante Veränderung der mRNA-ApoE-Kopienzahl detektiert werden.

Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse zur Wirkung einer gleichzeitigen Mevalonat- und Lovastatingabe, konnte eine Beteiligung des Isoprenylierungsweges bei einer Lovastatinbehandlung nicht ausgeschlossen werden. Um sicherzustellen, dass die Stimulation der ApoE-Freisetzung nicht durch Mangelbedingungen während der Versuchsdauer hervorgerufen wurde, sollte die Auswirkung von Mevalonat bei Inkubation in serumreichen Medium ermittelt werden.

A

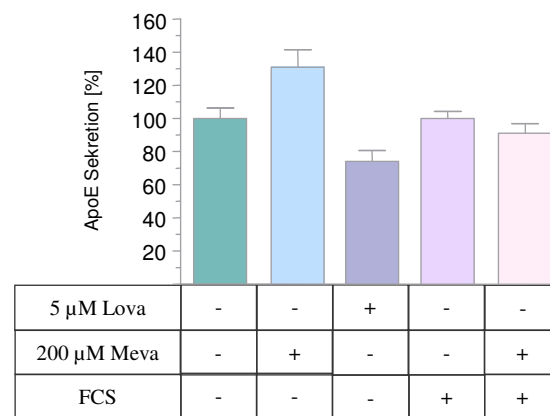


Abbildung 3.16: Einfluss einer vierundzwanzigstündigen Inkubation von 200 μ M Mevalonat im serumreichen und serumarmen Kulturmedium auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI-Zellen

A) Nachdem die Zellen vierundzwanzig Stunden in serumfreiem oder serumreichen Medium (FCS = fötales Kälberserum) mit oder ohne Zusätze inkubierten, wurde der Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für vier Stunden in serumfreiem Medium mit den jeweiligen Zusätzen inkubiert. Die Aufbereitung der Überstände, die Proteinfällung und Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgte wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. Quantifizierung der ApoE-Sekretion. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar ($n = 2$).

Durch Inkubation der Zellen im serumreichen Kulturmedium während der Untersuchung konnte kein stimulierender Effekt von Mevalonat auf die ApoE-Freisetzung nachgewiesen werden. Die bisher beobachteten Stimulationseffekte einer vierundzwanzigstündigen Inkubation mit Mevalonat konnten daher rückwirkend Mangelbedingungen während der Versuchsdurchführung zugeschrieben werden. Mevalonat scheint demnach nicht an der ApoE-Sekretion- und Expression beteiligt zu sein.

3.4.2 Einfluss der Isoprenylierungssubstrate GGPP und FPP auf die ApoE-Sekretion

Der Mevalonatstoffwechselweg wird als universeller Biosyntheseweg für Isoprenoide angesehen. Dabei werden wichtige Zwischenprodukte synthetisiert die für weitere Untersuchungen des Einflusses der Isoprenylierung auf Apolipoprotein E herangezogen werden können.

A

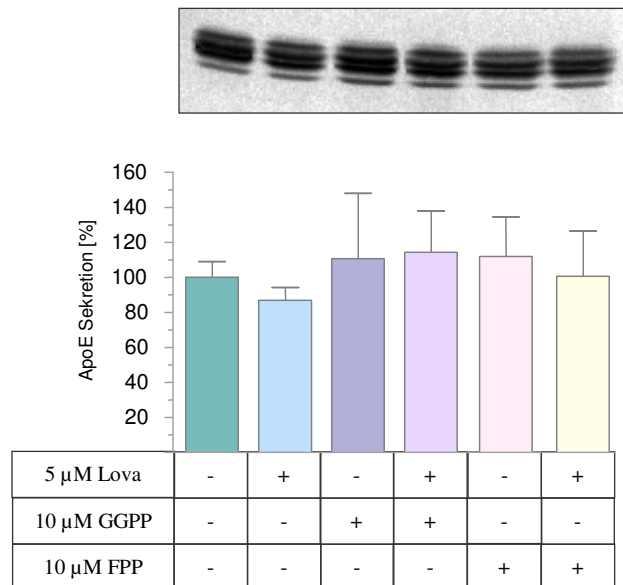


Abbildung 3.17: Einfluss von Substraten des Isoprenylierungsweges auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI-Zellen

A) Exemplarischer Western-Blot: Die Zellen wurden für vierundzwanzig Stunden mit den jeweiligen Substanzen inkubiert (GGPP = Geranylgeranylpyrophosphat; FPP = Farnesylpyrophosphat). Die Aufbereitung der Überstände, die Proteinfällung und Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgte wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. Quantifizierung der ApoE-Sekretion. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 5).

Wird der Isoprenylierungsweg durch Lovastatin beeinflusst, so sollten Substrate der Isoprenylierung die lovastatinbedingte Hemmung der ApoE-Sekretion aufheben. In dieser Arbeit konnten, aufgrund einer großen Quantifizierungsstreuung, keine Tendenz und keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. Dies bestätigt die Annahme, dass der Isoprenylierungsweg durch Statine unbeeinflusst bleibt und untermauert die bisherigen Befunde.

3.4.3 Einfluss von Isoprenylierungsinhibitoren auf die ApoE-Sekretion

Die Aufklärung des Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretion, sollte abschließend durch den Einsatz von Isoprenylierungsinhibitoren erreicht werden. Bei einer Beteiligung des Isoprenylierungsweges sollten die Inhibitoren ähnlich wie Statine wirken und zu einer deutlichen Absenkung der ApoE-Sekretion führen.

A

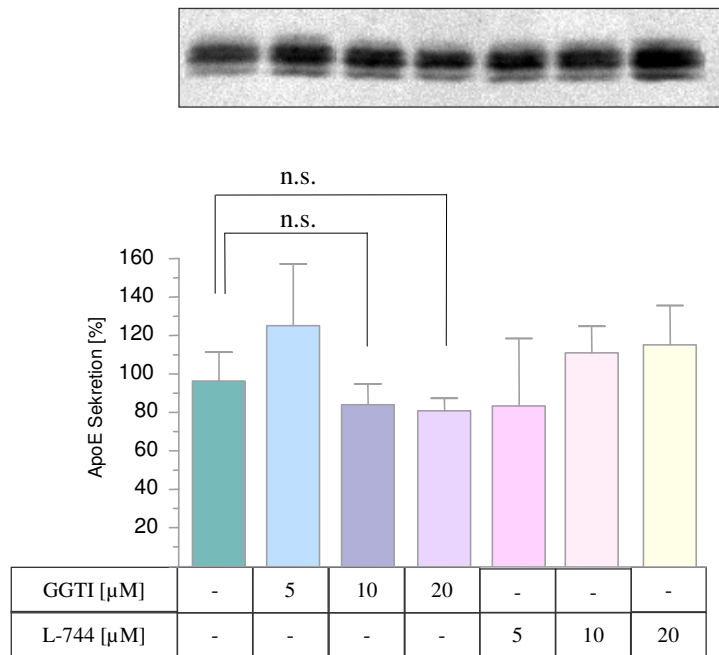


Abbildung 3.18: Einfluss von Inhibitoren des Isoprenylierungsweges auf die ApoE-Sekretion in CCFSTTGI-Zellen

A) CCFSTTGI-Zellen wurden für vierundzwanzig Stunden mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Die Aufbereitung der Überstände, die Proteinfällung und Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgte wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. Quantifizierung der ApoE-Sekretion. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 5).

Aus Abbildung 3.18 geht hervor, dass sowohl die Inhibition der Farnesyltransferase durch L-744,832, als auch der Geranyltransferase durch GGTI-286 zu keinem signifikanten Unterschied in der ApoE-Freisetzung führte. Zusammenfassend konnte durch die Ergebnisse mit Mevalonat, den Isoprenylierungssubstraten sowie der Isoprenylierungsinhibitoren, eine Beteiligung des Isoprenylierungsweges an der statinvermittelten ApoE-Sekretionssenkung abschließend ausgeschlossen werden.

3.5 Einfluss von Saragossasäure auf die ApoE-Sekretion- und Expression

Um eine Involvierung des Isoprenylierungsweges an der statinvermittelten ApoE-Sekretionssenkung endgültig ausschließen zu können und Cholesterin als alleinigen Modulator der ApoE-Sekretion zu bestätigen, sollte hier die Auswirkung von Saragossasäure (ZA) auf die ApoE-Sekretion- und Expression analysiert werden. Saragossasäure stellt dabei ein Inhibitor der Squalensynthese im Cholesterinbiosyntheseweg dar. Die Squalensynthese ist ein Enzym das sehr viel später als die HMGCoA-Reduktase aktiv wird (siehe Abbildung 4.1). Eine Inhibierung der Cholesterinbiosynthese am fast allerletzten Syntheseschritt erlaubt eine abschließende Beurteilung des Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretion. Analog zu den Untersuchungen mit Lovastatin wurde auch hier das freie Cholesterin bestimmt.

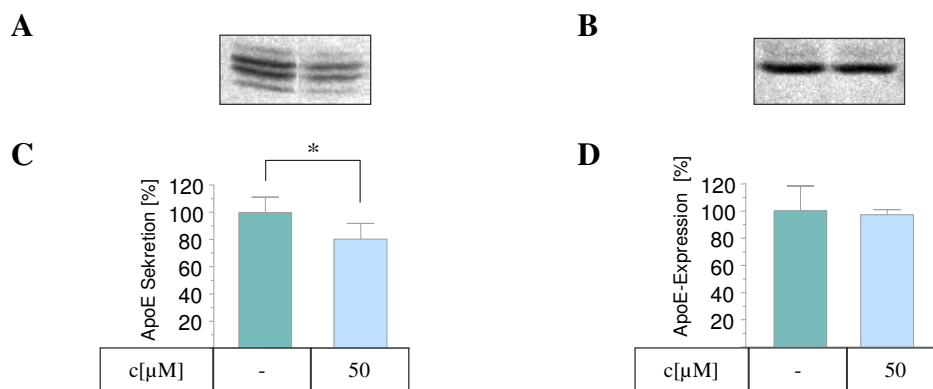


Abbildung 3.19: Einfluss von 50 µM Saragossasäure auf die ApoE-Sekretion- (A, C) und Expression (B, D) in CCFSTTGI-Zellen

A) CCFSTTGI-Zellen wurden für vierundzwanzig Stunden mit 50 µM ZA inkubiert. Die Aufbereitung der Überstände, die Proteinfällung und Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgte wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. **B)** Zum Nachweis der ApoE-Expression wurden die Zellen wie unter Abbildung 3.8 beschrieben behandelt. **C und D)** Quantifizierung der ApoE-Sekretion- und Expression. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (Sekretion n = 5; Expression n = 2). *, p<0,05 (paired student's t-Test)

A	50 μ M ZA
Sekretion [%]	24 \pm 8,9*
Cholesterinentfernung [%]	20 \pm 3,3

Tabelle 3.4: Einfluss von 50 μ M ZA auf die ApoE-Sekretion und das freie Cholesterin in CCFSTTGI-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwerte der Inhibition mit Standardabweichung

A) CCFSTTGI-Zellen wurden für vierundzwanzig Stunden mit 50 μ M ZA inkubiert. Für eine Cholesterinbestimmung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in Lysepuffer lysiert und nach einer Zentrifugation unter Zuhilfenahme eines Amplex[®]Red Enzymtests bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung, der Mittelwert der unbehandelten CCFSTTGI-Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

Ein inhibitorischer Effekt auf die ApoE-Freisetzung bei Hemmung der Cholesterinbiosynthese konnte auch hier nachgewiesen werden. Eine Behandlung der CCFSTTGI-Zellen mit Saragossasäure führte zu einer signifikanten Reduzierung der ApoE-Freisetzung um etwa 24 % \pm 8,9 % der Kontrolle (siehe Abbildung 3.19 und Tabelle 3.4) bei gleichzeitiger Senkung des freien Cholesterins um etwa zwanzig Prozent. Das Ausmaß des inhibitorischen Einflusses von Saragossasäure war dabei adäquat zu der durchschnittlichen Inhibierung, die durch Verwendung von Lovastatin in CCFSTTGI-Zellen erreicht werden konnte. Die ApoE-Expression blieb unbeeinflusst.

Durch die abschließende Untersuchung der ApoE-Freisetzung mit Saragossasäure und im Hinblick auf die Befunde aus den Untersuchungen mit Lovastatin und der Beteiligung des Isoprenylierungsweges konnte gezeigt werden, dass Statine ihre inhibierende Wirkung auf die ApoE-Sekretion alleine über die Hemmung der Cholesterinbiosynthese bewirken. Dahingegen veränderte sich die ApoE-Expression weder durch Lovastatin noch durch Saragossasäure.

3.6 Einfluss von 24(S)-Hydroxycholesterin auf die ApoE-Sekretion- und Expression

Das Cholesterinabbauprodukt 24(S)-Hydroxycholesterin (24(S)-OH-Chol) entsteht überwiegend im Zentralen Nervensystem (ZNS) wo es für die Eliminierung von überschüssigem Cholesterin zuständig ist. Lütjohann und Kollegen stellten dabei fest, das 24(S)-Hydroxycholesterin im Plasma von Alzheimer Patienten im Vergleich zu nicht erkrankten Personen deutlich erhöht ist (Lütjohann *et al.*, 2000). Die Konzentration von 24(S)-Hydroxycholesterin im Serum gilt daher als Indikator einer neuronalen Degeneration und ist bereits im frühen Stadium von Morbus Alzheimer erhöht. Durch den in dieser Arbeit bereits erbrachten Beweis des Zusammenhangs zwischen dem Cholesteringehalt und der Apolipoprotein E-Freisetzung, sollte hier weiterhin der Einfluss des Cholesterinabbauproduktes 24(S)-Hydroxycholesterin auf die ApoE-Sekretion- und Expression untersucht werden.

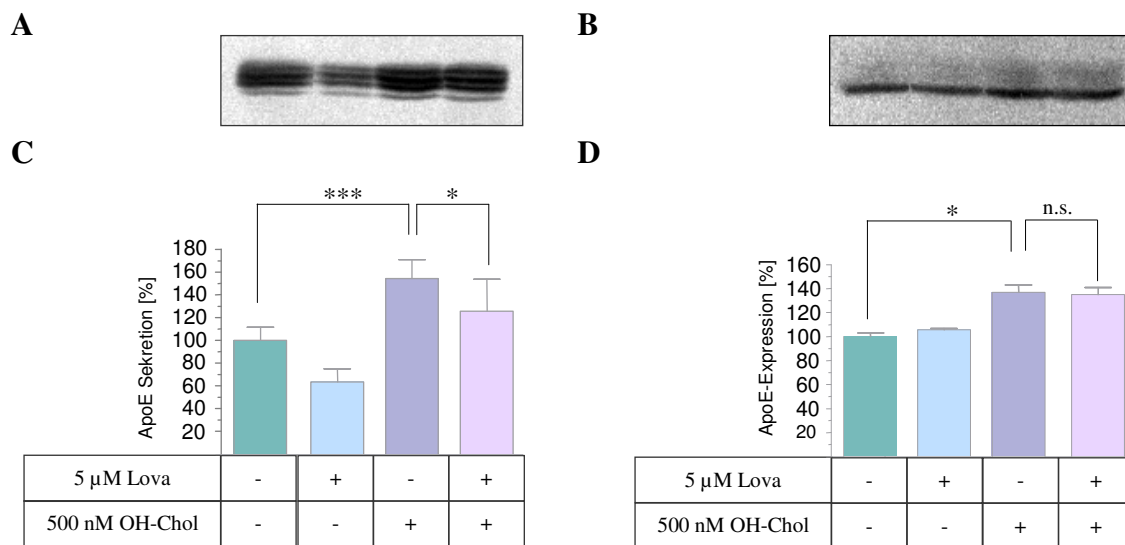


Abbildung 3.20: Einfluss einer vierundzwanzigstündigen Inkubation mit 500 nM 24(S)-Hydroxycholesterin auf die ApoE-Sekretion- (A, C) und Expression (B, D) in CCFSTTGI-Zellen

A) Exemplarischer Western-Blot: Die Zellen wurden für vierundzwanzig Stunden mit den jeweiligen Substanzen inkubiert (OH-Chol = 24(S)-Hydroxycholesterin). Die Aufbereitung der Überstände, die Proteinfällung und Auftrennung sowie der immunologische Nachweis erfolgte wie unter Abbildung 3.7 beschrieben. **B)** Der Nachweis der ApoE-Expression erfolgte wie unter Abbildung 3.8 beschrieben. **C und D)** Quantifizierung der ApoE-Sekretion- und Expression. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (Sekretion $n = 4$; Expression $n = 2$). *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$ (paired student's t-Test).

Eine Inkubation der Astrozytomazellen mit 24(S)-Hydroxycholesterin führte zu einer signifikanten Steigerung der ApoE-Freisetzung um etwa vierundfünfzig Prozent im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.20 A und C). Eine gleichzeitige Inkubation mit Lovastatin resultierte in einer signifikanten Reduktion der oxysterolbedingten ApoE-Freisetzung um etwa achtundzwanzig Prozent im Vergleich zur 24(S)-Hydroxycholesterinprobe. Dies entspricht dem durchschnittlichen Inhibitionseffekt von Lovastatin. Die ApoE-Expressionsrate wurde ebenfalls durch 24(S)-Hydroxycholesterin moduliert und erhöhte sich signifikant um etwa achtunddreißig Prozent im Vergleich zur Kontrolle (B und D). Die intrazelluläre Antwort auf das Oxysterol schien jedoch durch Lovastatin unbeeinflusst zu bleiben.

Als optimale Ergänzung des intrazellulären Ergebnisses bietet sich die sensitive Verifikation der Expressionsdaten mittels quantitativer *Real time* RT-PCR an. Dabei ist bekannt, dass Oxysterole potentielle, endogene Liganden für den „nukleären Leber X Rezeptor“ (LXR) und den „Farnesyl X Rezeptor“ (FXR) darstellen, welche mit Retinoid-X-Rezeptor dimerisieren (siehe Abbildung 1.6). Über die Bindung der Oxysterole an LXR/RXR werden zahlreiche Gene wie zum Beispiel für den Cholesterintransporter ABCA1, lipoproteinmodifizierende Enzyme, Apolipoproteine, Transkriptionsfaktoren sowie zahlreiche Enzyme, die in den Lipid- und Glukosestoffwechsel involviert sind, aktiviert (Liang *et al.*, 2004). Um zu überprüfen, ob 24(S)-Hydroxycholesterin die Apolipoprotein E-Expression regulieren kann, wurde die mRNA von ApoE durch *Real time* RT-PCR quantifiziert.

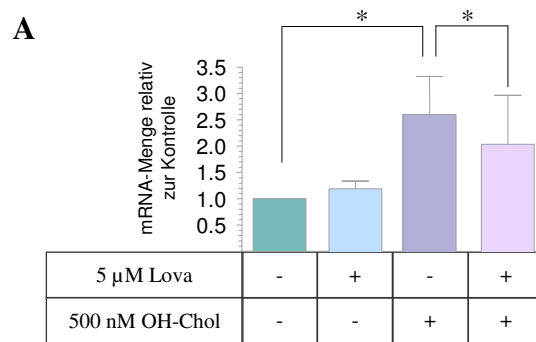


Abbildung 3.21: *Real time* RT-PCR der ApoE-mRNA aus der Astrozytomazelllinie CCFSTTGI nach Behandlung mit 24(S)-Hydroxycholesterin beziehungsweise 24(S)-Hydroxycholesterin plus Lovastatin

A) Nach einer vierundzwanzigstündigen Inkubation von CCFSTTGI-Zellen mit den jeweiligen Substanzen, wurde die RNA isoliert und mittels *Real time* RT-PCR analysiert. Für die mRNA von ApoE wurde das Primerpaar hApoE_Reti_for und hApoE_Reti_rev verwendet, in Triplikaten bestimmt und auf die mRNA von GAPDH normiert. Quantifizierung der ApoE-mRNA. Die Balken stellen den Mittelwert mit Standardabweichung dar (n = 2). *, p<0,05 (paired student's t-Test).

Für die ct-Werte von ApoE ergab sich eine 2,6-fache Steigerung durch die Behandlung mit 24(S)-Hydroxycholesterin, das heißt die ApoE-mRNA lag in einer signifikant höheren Kopienzahl vor. Analog zu den Sekretions-Ergebnissen konnte die erhöhte mRNA-Menge durch gleichzeitige Inkubation mit Lovastatin signifikant um vierunddreißig Prozent im Vergleich zur OH-Chol-Probe reduziert werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Proteinexpression, bei der kein hemmender Effekt der 24(S)-OH-Chol-bedingten ApoE-Proteinexpression durch Lovastatin hervorgerufen werden konnte.

4. Diskussion

Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigen wesentliche Interaktionspunkte zwischen Apolipoprotein E und dem zellulären Amyloidstoffwechsel auf. So konnte eine ApoE-Immunoreaktivität in zerebralen Amyloid-Plaques und neurofibrillären Bündeln (NFT) von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden (Namba *et al.*, 1991, Wisniewski und Frangione, 1992). Als pathologisches Chaperon konserviert ApoE wahrscheinlich die β -Faltblattstruktur des Amyloid Beta-Peptids, wodurch eine Peptidaggregation begünstigt wird (Wisniewski *et al.*, 1994). Eine mögliche pathologische Relevanz einer ApoE/A β -Interaktion wird durch die Tatsache untermauert, dass das ϵ 4-Allel ein Risikofaktor für Morbus Alzheimer darstellt. Auf der anderen Seite konnte in einer *in vitro* Zellkulturstudie von Beffert und Kollegen (Beffert *et al.*, 1999) an neuronalen Zellen gezeigt werden, dass ApoE in seiner lipoproteinkomplexierten Form auch isoformenspezifischen Einfluss auf den zentralen Abtransport von löslichem, extrazellulärem A β nimmt (ApoE2 > ApoE3 > ApoE4). ApoE scheint daher im Gehirn eine duale Rolle einzunehmen, die eventuell die Funktion von ApoE unter physiologischen und krankheitsassoziierten Bedingungen widerspiegelt.

In der hier vorliegenden Arbeit sollten zunächst zellbiologische Experimente Information über die Spaltung von ApoE durch α -Sekretasen liefern. Im Rahmen der Untersuchungen des Zusammenspiels zwischen ApoE und APP, wurde außerdem der Einfluss von ApoE auf die APP-Prozessierung analysiert. Durch weitere molekulare und zellbiologische Studien zur Einflussnahme und zum Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretion- und Expression konnte ein Beitrag zur Aufklärung eines weiteren pleiotropen Effekts (gr. *pleros* - viel; *trope* - seitig) von Statinen geleistet werden.

4.1 ApoE als Substrat von Metalloproteinasen der ADAM-Familie

4.1.1 Im *in vitro* Zellkultursystem erfolgt keine Spaltung von ApoE durch Metalloproteinasen

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit sollten zunächst zellbiologische Untersuchungen zur ApoE-Spaltung Informationen über die Bedeutung von ADAM10 an der ApoE-Prozessierung liefern. Wie aus einer *in vivo* Studie von Tolar hervorgeht, findet eine proteolytische Prozessierung von ApoE an der Thrombinspaltstelle statt, so dass ein neurotoxisches, aminoterminales 22 Kilodalton großes Fragment entsteht (Tolar *et al.*, 1997; Tolar *et al.*, 1999). Dieses Fragment könnte analog zu einem ähnlichen Fragment sein, welches im Gehirn und der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer Patienten gefunden wurde (Marques *et al.*, 1996). Zahlreiche andere *in vivo* Studien fanden ApoE-Fragmente die mit amyloiden Plaques assoziiert sind (Wisniewski *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2001). Die Bildung von ApoE-Fragmenten könnte daher den initialen Schritt der Demenzerkrankung darstellen, indem sie eine A β -Aggregation auslösen beziehungsweise fördern. Durch *in vitro* Experimente am Institut für Biochemie konnte von Frau Dr. Kojro erstmals gezeigt werden, dass es bei einer Inkubation von gereinigtem ADAM10 aus Rind mit rekombinantem, humanem ApoE3 oder ApoE4 zur vermehrten Bildung einer 22 Kilodalton Spaltfragmentbande kommt. Gleichzeitig nahm die etwa 38 Kilodalton große Hauptbande ab. Bei einer gleichzeitigen Inkubation mit dem Hydroxamat-inhibitor von Metalloproteinasen BB 3103 konnte das Spaltereignis hingegen unterbunden werden. Basierend auf dem von Frau Dr. Kojro beschriebenen Ergebnis, wurden die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit an einem *in vitro* Zellkultursystem durchgeführt. Während *in vitro* der α -Sekretase ADAM10 eine Beteiligung an der ApoE-Prozessierung zugeschrieben werden konnte, zeigte eine in dieser Arbeit durchgeführte stabile Transfektion von HEKADAM10- beziehungsweise HEKADAM10dn-Zellen mit den verschiedenen ApoE-Isoformen (siehe Abbildung 3.2) keine Beeinflussung der ApoE-Spaltung durch ADAM10. Die Diskrepanz zwischen den hier dargestellten *in vitro* Zellkulturergebnissen im Vergleich zu der von Frau Dr. Kojro ermittelten *in vitro* Spaltung von rekombinantem ApoE durch gereinigtes ADAM 10, könnte in der Lokalisation von ApoE in der Zelle begründet liegen. ApoE stellt ein Sekretionsprotein dar, so dass ein Kontakt mit dem Membranprotein ADAM10 unter Umständen nicht zu stande kommt.

Eine unterschiedliche Konformation von ApoE *in vitro* und in Zellen, könnte eine weitere Erklärung für die nicht übereinstimmenden Ergebnisse darstellen.

Durch Zellkulturanalysen mit Metalloproteinaseinhibitoren an menschlichen Leberzellen, die ApoE endogen produzieren (HepG2, siehe 3.1.3), konnten weiterhin andere Proteine der ADAM-Familie als Verursacher einer ApoE-Prozessierung ausgeschlossen werden. Da die Untersuchungen jedoch an peripheren Zellen und nicht an physiologisch relevanteren Zelllinien des Gehirns durchgeführt wurden, kann eine Beteiligung von Proteinen der ADAM-Familie an der ApoE-Prozessierung nicht ganz ausgeschlossen werden. Untermauert werden die Befunde dieser Dissertation allerdings durch eine *in vitro* Untersuchung von Harris *et al.* Der Autor führte Untersuchungen an Gehirnllysaten von ApoE-defizienten Mäusen durch. Bei einer Inkubation der Gehirnlysate mit rekombinantem, humanem ApoE4, einem partiell gereinigten, chymotrypsinähnlichen ApoE-spaltenden Enzyms und EDTA oder EGTA, konnte keine Reduktion des ApoE-Spaltereignisses nachgewiesen werden. Da Metalloproteinasen, zu denen die Proteine der ADAM-Familie gehören, durch Metallchelatoren wie EDTA oder EGTA inhibiert werden, konnten diese als ApoE-prozessierende Proteasen ausgeschlossen werden (Harris *et al.*, 2003). Die Studie deutet vielmehr darauf hin, dass die ApoE-Spaltung durch eine chymotrypsinähnliche Serinprotease bewerkstelligt wird.

4.2 Proteolytische Prozessierung von APP durch Apolipoprotein E

Bei der Pathogenese von Morbus Alzheimer spielt die Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins APP eine bedeutende Rolle. Nach der Amyloidkaskadenhypothese stellt eine Verschiebung der Prozessierung dieses Proteins zugunsten des amyloiden Stoffwechselweges den initialen Schritt der Erkrankung dar. Wodurch das Ungleichgewicht ausgelöst wird ist bis heute jedoch noch nicht eindeutig aufgeklärt. Durch *in vitro* Zellkulturanalysen an humanen Astrogliazellen, die sowohl APP als auch ApoE2 oder ApoE4 überexprimierten (hU373APP-ApoE2 und hU373APP-ApoE4), sollte eine Beteiligung von ApoE an der APP-Prozessierung untersucht werden und eventuell auftretende, isoformenabhängige Unterschiede aufgeklärt werden. Astrogliazellen stellen dabei ein geeignetes Zellkulturmodell dar, so dass die gewonnenen Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit auch für *in vivo* Vorgänge relevant sind.

4.2.1 *In vitro* erfolgt keine Spaltung von APP durch das Lipoprotein ApoE

Im Vordergrund der Untersuchungen stand die Frage, inwieweit die γ -Sekretase durch ApoE beeinflusst wird. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Tatsache nutzbar gemacht, dass im Zuge der nicht-amyloidogenen Kaskade neben APPs α ein zehn Kilodalton großes, membranassoziertes Fragment (CTF α) und im Verlauf der amyloidogenen Prozessierungskaskade neben APPs β ein zwölf Kilodalton A β -Vorläuferpeptid (CTF β) liberiert wird. Beide C-terminale Fragmente können in einem zweiten enzymatischen Schritt durch die γ -Sekretase abgebaut werden. Eine Abnahme oder Zunahme der beiden C-terminalen Fragmente spiegelt demnach die Aktivität der γ -Sekretase wider. Untersuchungen an CHOAPP751-Zellen, die mit rekombinanten, humanen ApoE-Isoformen kultiviert wurden, weisen darauf hin, dass ApoE eine Rolle bei der Regulation der γ -Sekretase einnimmt und damit einen direkten Effekt auf die Bildung von A β -Peptiden ausübt (Irizarry *et al.*, 2004). Dabei bewirkt ApoE eine Reduktion von A β 40 und A β 42 bei gleichzeitiger Akkumulation von C-terminalen Fragmenten. Vor diesem Hintergrund wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit an der physiologisch relevanteren Astrogliomazelllinie hU373APP durchgeführt. Die Daten der Arbeitsgruppe von Irizarry konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine Untersuchung des Zelllysats der Astrogliomazelllinie U373, die humanes APP und eine der beiden ApoE-Isoformen, ApoE2 oder ApoE4, stabil überexprimierten, ergab keine Veränderung im zellulärem Gehalt an C-terminalen Fragmenten. Bei einem Vergleich und einer Bewertung der Daten muß berücksichtigt werden, dass die Untersuchung von Irizarry und Kollegen an Ovarienzellen aus Hamstern durchgeführt wurde, die deutlich unphysiologischer sind als eine in dieser Arbeit angewandte humane Astrozytenzelllinie. Des Weiteren erfolgte in der Studie von Irizarry eine ApoE-Gabe als freies Protein ohne Lipidkomplex. Unter normalen, physiologischen Bedingungen liegt ApoE jedoch lipoproteingebunden vor, so dass die Relevanz des Ergebnisses im Vergleich zu überexprimiertem ApoE deutlich reduziert wird.

Die hier gefundenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass ApoE weder einen Einfluss auf die γ -Sekretase, noch auf die α - oder β -Sekretase ausübt, da es zu keinem quantitativen Unterschied in der Menge der C-terminalen Fragmente kam. In diesem Zusammenhang sollte die Frage geklärt werden, inwieweit ApoE einen Einfluss auf die APPs α - und APPs β -Sekretion ausübt.

In keinem der Versuche konnte eine Veränderung der APPs α - oder APPs β -Menge detektiert werden (siehe Abbildung 3.6). Dies korreliert mit Untersuchungen von Biere *et al.*, in der durch eine Kotransfektion von humanem APP und ApoE in menschlichen Gliomazellen gezeigt werden konnte, dass es zu keiner Veränderung in der APP-, APPs α - oder A β -Menge kommt (Biere *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu stehen Ergebnisse aus einer weiteren Studie, in der eine Kokultivierung von ApoE-transfizierten Astrozyten mit Neuronen die APP695 überexprimierten zu einer isoformenabhängigen Steigerung der A β -Produktion und zu einem Absenken der APPs α -Sekretion führte. Astrozyten die ApoE2 exprimierten hingegen übten einen gegenteiligen Effekt aus und führten zu einer Reduktion der A β -Produktion und zu einer APPs α -Sekretionssteigerung (Vincent und Smith, 2001). Eine Modulierung der APPs α - oder APPs β -Freisetzung durch ApoE kann für das in dieser Arbeit angewandte Zellsystem ausgeschlossen werden. Eine allgemeingültige Übertragung der Befunde auf die Vorgänge unter physiologischen Bedingungen ist jedoch nicht möglich, da im Gehirn Neuronen und Astrozyten nebeneinander vorkommen, was in diesem Modellsystem nicht berücksichtigt wurde.

Aus der Gesamtbeurteilung der hier dargestellten eigenen Ergebnisse sowie der Einbeziehung von Literaturangaben, findet mit großer Wahrscheinlichkeit keine Modulation der APP-Prozessierung durch ApoE statt.

4.3 Die Rolle des Cholesteringehaltes auf die Apolipoprotein E-Sekretion- und Expression

Eine kausale Erklärung, über welchen Mechanismus der ApoE4-Genotyp die Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit fördert, ist bis heute noch nicht gefunden worden. Nahe liegend ist eine Verknüpfung mit der physiologischen Funktion von ApoE im Lipidstoffwechsel des Gehirns. So bewirken Konformationsunterschiede der einzelnen ApoE-Isoformen veränderte Lipidbindungseigenschaften gegenüber dem LDL-Rezeptor (Weisgraber *et al.*, 1982). Dies resultiert in einer unterschiedlichen Funktionalität und Effektivität der einzelnen ApoE-Isoformen im extrazellulären Lipidtransport. In diesem Zusammenhang belegt eine *in vitro* Zellsystemstudie an Astrozyten und Neuronen, dass der ApoE-vermittelte Phospholipid- und Cholesterinausstrom streng isoformenabhängig ist. Die geringste Effizienz konnte dabei für ApoE4 verzeichnet werden (Michikawa *et al.*, 2000; Gong *et al.*, 2002). Dies lässt auf eine Dysfunktionalität des ϵ 4-Allels im Rahmen des zellulären Lipidstoffwechsels schließen. Die Studie von Gong *et al.* legt nahe, dass

ApoE3 im Vergleich zu ApoE4 die Bildung von ApoE-ärmeren Lipidpartikeln vergleichbarer Größe induziert, die in der Lage sind eine wesentlich größere Menge an Cholesterin zu transportieren als ApoE4-Lipoproteine (Gong *et al.*, 2002). Im Rahmen der Pathogenität der Alzheimer'schen Krankheit könnte bei Regenerationsprozessen eine regionale Unterversorgung von Neuronen mit Cholesterin stattfinden, so dass sich langfristige krankheitsassoziierte Defizite in der neuronalen Plastizität manifestieren (Poirier, 1996). Als ein weiteres Resultat des gestörten zellulären Cholesterinausstroms könnte das Cholesterin in ApoE4-Trägern vermehrt in membranären Zellkompartimenten verbleiben. Dort bildet Cholesterin sphingolipidreiche Membrandomänen (Rafts), die den Ort der zellulären APP-Prozessierung beziehungsweise Amyloidbildung darstellen. Cholesterin scheint demnach eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung von Morbus Alzheimer zu spielen. Zahlreiche *in vitro* Studien belegen eine Reduktion der A β -Bildung unter Cholesterinentzug mit Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) oder Statinen (Simons *et al.*, 1998; Frears *et al.*, 1999; Fassbender *et al.*, 2001; Kojro *et al.*, 2001). Bei einer externen Cholesterinbeladung hingegen lässt sich umgekehrt der zelluläre Amyloidspiegel erhöhen (Bodovitz, Klein, 1996; Frears *et al.*, 1999). Allerdings lassen sich eine Vielzahl von *in vivo* Befunden zum Amyloidstoffwechsel nicht alleine durch eine Cholesterinsenkung erklären. Vielmehr scheinen weitere Faktoren durch eine Cholesterinanreicherung beziehungsweise Entfernung betroffen zu sein (Fassbender *et al.*, 2001; Refolo *et al.*, 2001; Petanceska *et al.*, 2002). Einer dieser Faktoren, der durch Cholesterin beeinflusst wird, könnte das Cholesterintransportprotein Apolipoprotein E darstellen, so dass im Vordergrund weiterer Untersuchungen der Frage nachgegangen wurde, inwieweit die ApoE-Sekretion- und Expression durch einer Cholesterinmodulation verändert wird.

4.3.1 Die ApoE-Sekretion wird durch Variation des Cholesteringehaltes durch Methyl- β -Cyclodextrin beeinflusst

Cholesterin beeinflusst die physikochemischen Eigenschaften von Membranen, so dass die Funktionalität von Proteinen durch veränderte Viskosität gesteuert wird (Wolozin, 2001). Einige Proteine wie zum Beispiel der Oxytoxin-Rezeptor verändern ihren Aktivitätszustand durch direkte Bindung an Cholesterin über eine Cholesterin-Sensing-Domäne (Gimpl *et al.*, 1997; Gimpl *et al.*, 2002). Der Organismus ist daher bestrebt die Cholesterinmenge konstant zu halten. Die Cholesterinhomöostase wird einerseits durch die Blockade der Cholesterinbiosynthese bei hohem Cholesterinangebot bewerkstelligt,

andererseits wird überschüssiges Cholesterin durch Bindung an Apolipoprotein E aus der Zelle ausgeschleust.

ApoE wird als Präprotein von zahlreichen Zellen wie Leberzellen, Makrophagen, Mikrogliazellen und Astrozyten exprimiert. Im Trans-Golgi-Netzwerk wird ApoE vermutlich sialisiert (Deng *et al.*, 1995), intrazellulär glykosiliert und proteolytisch in seine reife Form gespalten (Zannis *et al.*, 1984). Die konstitutive Sekretion von Apolipoprotein E scheint dabei unabhängig von seiner Sialform zu sein (Wernette-Hammond *et al.*, 1989). Über welchen Mechanismus die ApoE-Sekretion erfolgt ist bisher noch unklar.

Aufgrund der großen Bedeutung von ApoE am Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zunächst die Abhängigkeit zwischen ApoE und Cholesterin am *in vitro* Zellsystem zu analysieren. Dafür wurde sowohl die Auswirkung einer Cholesterinanreicherung als auch einer Cholesterinentfernung mit M β CD auf die ApoE-Sekretion- und Expression an der Astrozytomazelllinie CCFSTTGI untersucht.

Die vorliegende Arbeit am *in vitro* Zellsystem belegt eine Erhöhung der ApoE-Sekretion durch externe Cholesterinbeladung mit einem Methyl- β -Cyclodextrin/Cholesterin-Komplex um etwa sechzig Prozent im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.7). Umgekehrt findet eine effektive Reduktion der ApoE-Sekretion unter Cholesterinentzug um durchschnittlich siebenunddreißig Prozent mit M β CD statt (siehe Abbildung 3.8). Die hier dargestellten Befunde gehen konform mit Untersuchungen von Krul und Tang, in der eine Cholesterinanreicherung in Form von Phospholipidliposomen in CCFSTTGI-Zellen, die auch in dieser Arbeit verwendet wurden, ebenfalls zu einer Erhöhung der ApoE-Sekretion führte (Krul und Tang, 1992). Der beobachtete Effekt einer ApoE-Sekretionssteigerung unter Cholesteringabe, könnte eine physiologische Funktion darstellen, um die Cholesterinhomöostase aufrechtzuerhalten. Ein hoher externer Cholesteringehalt könnte im ZNS durch degenerierendes Gewebe hervorgerufen werden. So belegen *in vitro* Untersuchungen an peripheren und zentralen Nervenzellen, dass vorrangig ApoE-, aber auch ApoAI-Proteine im Rahmen von neuronalen Reparatur- und Umbauprozessen Cholesterin von degenerierendem Gewebe aufnehmen. Durch geregelte Exkretion und unter Vermittlung von Rezeptoren der LDL-Familie, wird das an ApoE gebundene Cholesterin an intakte Zellen wie Gliazellen oder Neuronen weitergegeben (Wood *et al.*, 1999; Dietschy und Turley, 2001).

Eine Cholesterinentfernung durch M β CD hingegen hat zur Folge, dass das in der Zelle verbliebene Cholesterin für die Aufrechterhaltung zellulärer Prozesse benötigt wird. Eine Unterdrückung der ApoE-Sekretion wäre demnach eine physiologische Reaktion auf ein niedriges Cholesterinangebot. Die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der ApoE-Freisetzung durch M β CD wäre durch diese Überlegung erklärbar.

4.3.2 Im *in vitro* Zellkultursystem inhibieren Statine die ApoE-Freisetzung

Eine Beteiligung von außen zugeführtem Cholesterin und einer Cholesterinentfernung auf die ApoE-Sekretion in Astrogliazellen konnte bewiesen werden. Der tatsächliche Einfluss von Cholesterin oder dessen Vorstufen auf das Apolipoprotein E ist unter physiologischen Bedingungen jedoch noch nicht geklärt.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass eine Reduktion der Häufigkeit für die Ausbildung der Alzheimer'schen Krankheit assoziiert ist mit der Einnahme von Statinen. Diese inhibieren über reversible, kompetitive Hemmung der HMGCoA-Reduktase die Cholesterinsynthese.

Eine Studie an transgenen Alzheimer-Mäusen hat gezeigt, dass diese auf eine cholesterinreiche Diät mit einer erhöhten Produktion von A β reagierten, wohingegen die Gabe von Statinen die A β -Konzentration halbierte (Refolo *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang beobachtete Eckert, dass der Cholesteringehalt im Gehirn von ApoE-defizienten Mäusen durch Statine unbeeinflusst bleibt (Eckert *et al.*, 2001). Dies legt nahe, dass Statine über einen ApoE-abhängigen Mechanismus den Cholesterinspiegel zu regulieren vermögen. Daher war das Ziel weiterer Untersuchungen die Klärung des Wirkmechanismus von Statinen auf das Apolipoprotein E.

Da für Untersuchungen eines isoformenabhängigen Unterschiedes die Glioblastoma/Astrozytomazelllinie hU373APP-ApoE benötigt wurde, sollte zunächst überprüft werden, ob vergleichbare Befunde zwischen der ApoE endogen produzierenden Astrozytomazelllinie CCFSTTGI und der ApoE-überexprimierenden Zelllinie hU373APP-ApoE erzielt werden können. Mit zellbiologischen und biochemischen Nachweismethoden wurde gezeigt werden, dass die ApoE-Sekretion in beiden humanen Astrozytomazelllinien gleichermaßen durch Statine um durchschnittlich sechszwanzig Prozent gesenkt wird (siehe 3.3.3). Die Transfektion von hU373APP-Zellen mit ApoE übte demnach keinen negativen Effekt auf die Sekretionseigenschaften aus. Zur Klärung eines möglichen ApoE isoformenabhängigen Unterschiedes der Statineinflussnahme konnten daher die mit ApoE2- oder ApoE4 transfizierten hU373APP-Zellen für Untersuchungen herangezogen

werden. Da die Zellen endogen kein ApoE produzieren, stammt eine statinbedingte Reaktion der Zellen ausschließlich von den einzelnen ApoE-Isoformen ab. Ein Vergleich der Wirkung von Statinen auf die ApoE-Isoformen resultierte in einer prozentual ähnlichen Sekretionsverminderung. Ein isoformenabhängiger Unterschied der ApoE-Sekretion war demnach nicht nachzuweisen.

Die statinbedingte Reduktion der ApoE-Freisetzung gliedert sich in die Befunde zur cyclodextrininduzierten Verschiebung der ApoE-Sekretion in dieser Arbeit ein und wird durch Befunde anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Im *in vitro* Zellkultursystem führte die Gabe von Lovastatin sowohl in primären Gliazellen aus Mäusen (Naidu *et al.*, 2002) als auch in menschlichen Makrophagenzellen (Cignarella *et al.*, 1998) zu einer Reduktion der ApoE-Sekretion. Die Tatsache, dass der extrazelluläre ApoE-Spiegel nur zum gewissen Grad reduziert wird, bietet trotzdem eine günstige Perspektive für einen therapeutischen Ansatz. Die Reduktion könnte effektiv genug sein, um die Aggregation mit A β -Peptiden zu vermindern. So führte am *in vivo* Tiermodell das Vorhandensein von nur einem ApoE-Allel in β APP^{V717F}-transgenen Mäusen zu einer achtzigprozentigen Reduktion der Plaque-Häufigkeit im Vergleich zu transgenen Mäusen die zwei Allele trugen (Bales *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang berichteten zwei retrospektive, nicht indikationsbasierte Humanstudien an Patientenkollektiven mit Hyperlipidämie beziehungsweise kardiovaskulärem Erkrankungsbild von einer bis zu siebenzigprozentigen reduzierten Alzheimerprävalenz unter Statintherapie (Wolozin *et al.*, 2000; Jick *et al.*, 2000). Der Mechanismus, über den Statine das Risiko zu senken vermag, kann nicht alleine in der Reduktion des Lipidgehaltes begründet sein, da Lipidsenker anderer Substanzklassen keine Effekte zeigen. Der in dieser Arbeit vorgestellten statininduzierten Modulation des extrazellulären ApoE-Spiegels kommt womöglich bei der Aufklärung eines zusätzlichen Effektes von Statinen eine zentrale Bedeutung zu. Inwieweit Veränderungen des extrazellulären ApoE-Gehaltes jedoch im *in vivo* Modell durch Statine induziert werden, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden.

Um zu klären, ob die verminderte ApoE-Sekretion während der Statinbehandlung auf eine veränderte Proteinexpressionsrate zurückzuführen ist, wurde sowohl die ApoE-mRNA als auch die Proteinexpression analysiert. Es wurde weder eine Veränderung der mRNA über *Real time* RT-PCR noch auf Proteinebene verzeichnet. Die Ergebnisse gliedern sich in die Befunde anderer Arbeiten ein. Eine Verabreichung eines Statinpräparates bei gleicher Konzentration, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, führte in humanen Makrophagen (Cignarella *et al.*, 1998), in BV-2 Mikrogliazellen aus Mäusen (Naidu *et al.*, 2002) und in

primären Gliazellen aus PSAPP transgenen Mäusen (Petanceska *et al.*, 2003) zu keiner Veränderung des intrazellulären ApoE-Gehaltes. Statine scheinen daher ausschließlich den extrazellulären ApoE-Gehalt zu beeinflussen, die Protein-Expression ändert sich durch eine Statingabe hingegen nicht.

Diese Befunde gliedern sich in die veröffentlichte Daten einer *in vivo* Studie des zerebralen Kortex von Mäusen ein (Johnson-Anuna *et al.*, 2005). Eine Behandlung mit Lovastatin, Pravastatin oder Simvastatin resultierte in einer veränderten Expression von zahlreichen Genen des Gehirns. Davon betroffen waren hauptsächlich Gene, die am Zellwachstum, der Signalübertragung oder des Transportes beteiligt sind. Außerdem wurde durch eine Statinbehandlung die Expression von antiapoptotischen Genen gefördert. Eine Veränderung von Genen des Lipoproteinstoffwechsels oder von Apolipoprotein E konnte in diesem Zusammenhang hingegen nicht detektiert werden. Statine könnten daher ihre pleiotropen Eigenschaften nicht nur über die Absenkung der ApoE-Sekretion, sondern auch über die Aktivierung von Genen des Zellwachstums, der Signalübertragung und des Transportes entfalten. Außerdem fördern Statine die Genexpression von antiapoptotischen Genen.

4.4 Im Zellkultursystem hat der Isoprenylierungsweg keinen Einfluss auf die statinvermittelte ApoE-Sekretionssenkung

Bei einer Betrachtung der Cholesterinbiosynthese, ausgehend vom Acetyl-CoA, fällt auf, dass die HMGCoA-Reduktase zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Synthesekaskade aktiv wird.

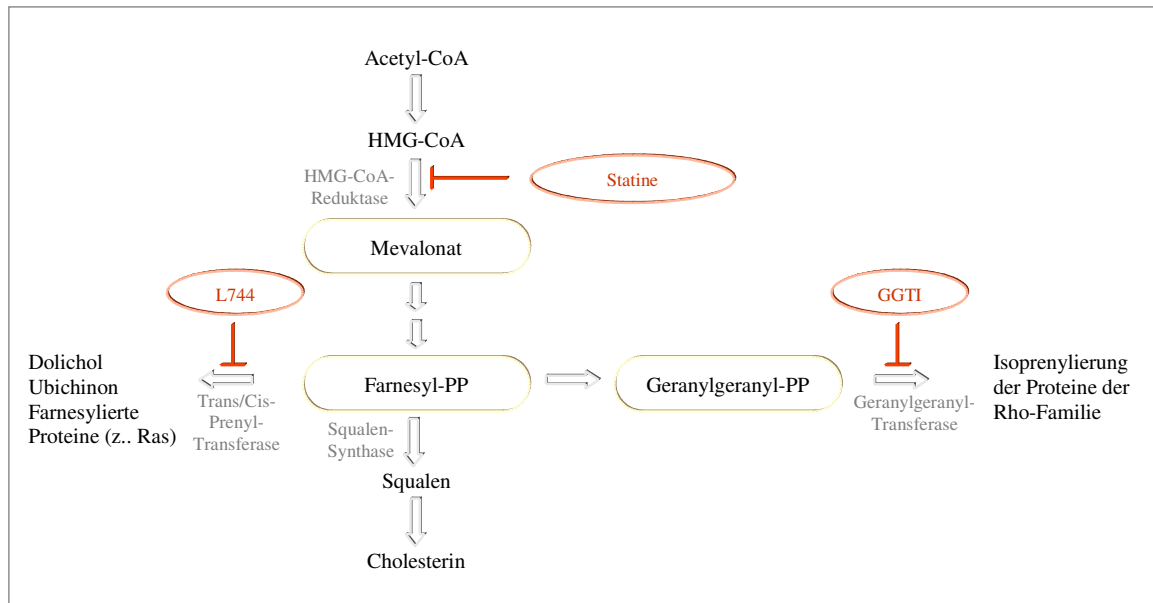


Abbildung 4.1: Cholesterinbiosynthese. Die HMGCoA-Reduktase liegt upstream des Isoprenylierungsweges. Durch gezielte Zugabe von Substraten (◻) und Inhibitoren (⊥) kann der Einfluss der Isoprenylierung auf die ApoE-Sekretion- und Expression untersucht werden.

Durch ihre Hemmung werden auch nachgeschaltete Synthesewege im Isoprenoidstoffwechsel blockiert, die vornehmlich über die Intermediate Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat ablaufen (Goldstein und Brown, 1990; Grunler *et al.*, 1994). Isoprenylierte Proteinassoziate spielen bei Zellproliferations- und Wachstumsvorgängen sowie bei zellulären Signaltransduktionsmechanismen eine wichtige Rolle. Eine aktuelle Studie an neuronalen Zellen zeigt unter Statinbehandlung eine isoprenoidabhängige Tau-Phosphorylierung und Mikrotubulidestabilisierung auf (Meske *et al.*, 2003). Dabei inhibiert Lovastatin die Geranylgeranylphosphat-Lipidmodifikation der für die Stabilität des Mikrofilaments mitverantwortlichen Rho-GTPase, die ohne Prenylierung in einem dysfunktionalen Zustand verbleibt (Meske *et al.*, 2003). Dieser Befund steht dabei nicht zwangsläufig im Widerspruch zu den berichteten neuroprotektiven Statinwirkungen in Humanstudien (Jick *et al.*, 2000; Wolozin *et al.*, 2000). Bei einer milden Inhibierung der

Cholesterinbiosynthesekaskade wird zuerst die Sterolsynthese inhibiert. Die Bildung von Isoprenoiden wird erst unter Bedingungen starker Hemmung beeinträchtigt (Brown, Goldstein, 1980).

Ziel weiterer Untersuchungen war die Klärung der Frage, inwieweit der Isoprenylierungsweg eine Rolle bei der Modulation der ApoE-Sekretionssenkung spielt. Im Rahmen der Untersuchungen des Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretion sollten die hier gewonnenen Ergebnisse dazu beitragen, den Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretion aufzuklären.

Bei einer Beteiligung des Isoprenylierungsweges an der ApoE-Sekretion war zu erwarten, dass die statinvermittelte ApoE-Sekretionshemmung durch gleichzeitige Gabe von Mevalonat aufgehoben wird. Zwar konnte eine Aufhebung der lovastatinbedingten ApoE-Sekretionsverminderung nach einer Mevalonatverabreichung in der vorliegenden Arbeit detektiert werden (siehe Abbildung 3.14). Überraschenderweise führte aber bereits eine alleinige Gabe von Mevalonat zu einer signifikanten ApoE-Sekretionssteigerung um achtunddreißig Prozent im Vergleich zur Kontrolle. Eine durch Mevalonat hervorgerufene Sekretionssteigerung wurde bisher in der Literatur für keine Sekretionsproteine beobachtet. Der Mechanismus ist unbekannt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gehen nicht konform mit Befunden von Naidu *et al.* Durch Inhibitionsstudien belegt der Autor, dass die ApoE-Sekretion in Mikrogliazellen einem Mechanismus unterliegt, der die Isoprenylierung von Proteinen benötigt (Naidu *et al.*, 2002). Inwieweit eine alleinige Gabe von Mevalonat in Mikrogliazellen zu einer Stimulation der ApoE-Sekretion führt, wurde in der Arbeit von Naidu *et al.* nicht bestimmt und kann daher für einen Vergleich nicht herangezogen werden.

Aufgrund der schwierig zu beurteilenden Ergebnisse der Mevalonatversuche, anhand derer keine Klärung des Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretion möglich war, wurde dieser anhand von Isoprenylierungssubstraten- und Inhibitoren untersucht. Die daraus in dieser Arbeit erlangten Befunde schließen eine Beteiligung der Isoprenylierung an der ApoE-Sekretion aus, da die Astrozytenzellen auf keine der Substanzen reagierten. Die konträren Ergebnisse zu den bereits erwähnten Befunden von Naidu könnten im Zellkulturmodell begründet liegen. Die hauptsächliche, inhibitorische Kapazität des Inhibitors GGTI-286, der die Isoprenylierung von Geranylgeranylpyrophosphat unterbindet, wurde in der Arbeit von Naidu an Mikrogliazellen aus Mäusen beobachtet. Aufgrund der Tatsache, dass Mikrogliazellen lipidarme ApoE-Proteinaggregate freisetzen (Xu *et al.*,

2000), werden sie vom Verhalten eher zu den peripheren Makrophagenzellen gezählt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen an Astrozyten durchgeführt anhand derer die Vorgänge im Gehirn eher widerspiegelt werden können. Die gewonnenen Befunde an Astrozytenzellen besitzen daher größere Relevanz und schließen eine Hemmung der ApoE-Sekretion durch Isoprenylierungsinhibitoren mit großer Wahrscheinlichkeit aus. Unterstützt wird die Beurteilung durch Inhibitionsstudien an primären Gliazellen aus Mäusen, die hauptsächlich aus Astrozytenzellen bestehen. Die ApoE-Sekretion wurde hier nur teilweise durch GGTI-286 reduziert (Naidu *et al.*, 2002). Vermutlich verwenden Astrozyten einen sekretorischen Mechanismus, der unabhängig von einer Proteinprenylierung ist. Die Schlussfolgerung gliedert sich gut in die Gesamtbewertung der Befunde zur Beteiligung des Isoprenylierungsweges an der ApoE-Sekretion ein, wonach die Isoprenylierung als Regulator der ApoE-Freisetzung in diesem Zellkulturmodell ausgeschlossen werden kann. Dies führte zu einer Untermauerung der Befunde aus den Untersuchungen mit Methyl- β -Cyclodextrin und Lovastatin. In einer Gesamtbeurteilung der am *in vitro* Zellkultursystem gefundenen Ergebnisse erhärten die Hypothese nachhaltig, dass Statine die ApoE-Sekretion unabhängig vom Isoprenylierungsweg und vielmehr durch Hemmung der Cholesterinbiosynthese beeinflussen. Eine abschließende Beurteilung des Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretion sollte durch den Einsatz von Saragossasäure im nächsten Abschnitt der Arbeit ermöglicht werden.

4.5 Die Hemmung der Squalensynthese führt zur Reduktion der ApoE-Freisetzung

Eine zu Statinen vergleichbare Wirkung auf die Cholesterinbiosynthese zeigt Saragossasäure (ZA), ein kompetitiver Inhibitor der Squalensynthese. Die Squalensynthese ist ein Enzym der Cholesterinbiosynthese, das sehr viel später („down-stream“) als die HMG-CoA-Reduktase aktiv wird (siehe Abbildung 4.1). Durch Hemmung der Squalensynthese können Derivate des Isoprenylierungsweges und verschiedene Cholesterinintermediate gebildet werden, die Synthese von Cholesterin hingegen wird unterbunden. Der Einsatz von Saragossasäure sollte durch seine erhöhte Wirkstoffselektivität eine detailliertere Analyse des Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretion gewährleisten und zu einer abschließenden Beurteilung führen.

Es konnte mittels zellbiologischer und biochemischer Nachweismethoden gezeigt werden, dass die ApoE-Sekretion durch ZA um etwa vierundzwanzig Prozent inhibiert wird (siehe

Abbildung 3.19). Durch die Verwendung eines Amplex[®]Red Cholesterinassays konnte weiterhin belegt werden, dass die ApoE-Sekretionshemmung mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Reduktion des Cholesteringehaltes durch ZA hervorgerufen wird (siehe Tabelle 3.4). Dieser Befund verifiziert die bisher im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse, die für eine Cholesterinanreicherung (siehe 3.3.1), einer Cholesterindepletion (siehe 3.3.2) als auch für die Hemmung der Cholesterinbiosynthese durch Statine (siehe 3.3.3) gefunden wurden. Dabei ist die Inhibierung der Cholesterinbiosynthese- und damit im Zusammenhang stehend der ApoE-Sekretion- durch Statine und Saragossasäure gleichermaßen evident. In der Gesamtheit belegen diese Befunde, dass Veränderungen der ApoE-Freisetzung am Zellkulturmodell auf eine alleinige Modulation der Gesamtcholesterinmenge zurückzuführen sind. Der Isoprenylierungsweg hingegen ist an der statinvermittelten ApoE-Sekretionsverminderung in Astrozyten nicht beteiligt. Statine scheinen die ApoE-Sekretion alleine über Hemmung der Cholesterinbiosynthese zu inhibieren.

4.6 24(S)-Hydroxycholesterin führt in vitro zur gesteigerten ApoE-Sekretion- und Expression

Im Zuge der Cholesterinhomöostase verlässt überschüssiges Cholesterin das zentrale Nervensystem primär durch geregelte Exkretion des Cholesterinmetaboliten 24(S)-Hydroxycholesterin (24(S)-OH-Chol), der im Gegensatz zu Cholesterin die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Lütjohann *et al.*, 1996, 2001; Bjorkhem *et al.*, 1997). Das mitochondriale, neuronale Sterolhydroxylase Enzym Cholesterin-24-Hydroxylase (Cyp46) katalysiert diese Sterolderivatisierung (Lund *et al.*, 1999). Neue Befunde zeigen, dass der Efflux von 24(S)-OH-Chol in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder der Niemann-Pick TypC Krankheit erhöht ist (Lütjohann *et al.*, 2000; Dietschy, Turley 2001). Der 24(S)-Hydroxycholesterinspiegel im Plasma scheint dabei mit der Schwere der Demenz von Morbus Alzheimer erkrankten Menschen korreliert zu sein (Lütjohann *et al.*, 2000). Befunde von Kölsch *et al.* sowie von Papassotiropoulos *et al.* machen in diesem Zusammenhang eine genetische Assoziation zwischen einem Polymorphismus im Cyp46-Gen und Morbus Alzheimer wahrscheinlich (Kölsch *et al.*, 2002; Papassotiropoulos *et al.*, 2003). Da sowohl Cyp46 als auch ApoE4 maßgeblich an der Regulation der Cholesterinhomöostase beteiligt sind, verursachen womöglich beide Polymorphismen ein und denselben pathogenen Mechanismus.

Im Rahmen einer Humanstudie stellte Fassbender *et al.* fest, dass unter Statintherapie der 24(S)-OH-Chol-Spiegel von nichtdementen Patienten mit Hypercholesterinämie gegenüber Kontrollpatienten mit normalen Plasmacholesterinspiegel erniedrigt war (Fassbender *et al.*, 2002). Über welchen Mechanismus die Absenkung hervorgerufen wird, ist bislang jedoch unklar.

Die durch die Hydroxylasen gebildete Oxysterole stellen potentielle, endogene Liganden für den „nukleären Leber-X-Rezeptor (LXR)“ dar, welcher mit dem Retinoid-X-Rezeptor dimerisieren kann. Über die Bindung der Oxysterole an den LXR/RXR-Komplex werden zahlreiche Gene aktiviert darunter auch das Gen für ApoE (siehe Abbildung 1.5).

Der letzte Teil der Arbeit befasste sich daher mit der Untersuchung zur Beeinflussung der ApoE-Sekretion- und Expression durch das Cholesterinabbauprodukt 24(S)-Hydroxycholesterin am *in vitro* Zellkultursystem.

Durch Inkubation von Astrozytenzellen mit 24(S)-Hydroxycholesterin konnte die ApoE-Sekretion signifikant um vierundfünfzig Prozent gesteigert werden. Dies geht konform mit einer *in vitro* Zellkulturstudie, in der eine Inkubation von Astrozytomazellen mit 25-Hydroxycholesterin zu einer signifikanten ApoE-Sekretionssteigerung im Vergleich zur Kontrolle führte (Gueguen *et al.*, 2001).

Im Rahmen der Untersuchungen zur Beeinflussung der ApoE-Sekretion durch 24(S)-OH-Chol wurde außerdem erstmals in dieser Arbeit gezeigt, dass der 24(S)-OH-Chol-bedingte ApoE-Sekretionseffekt durch gleichzeitige Gabe von Lovastatin signifikant um achtundzwanzig Prozent gesenkt werden kann (siehe Abbildung 3.20).

Analog zu den Befunden aus den Sekretionsuntersuchungen bewirkte die Inkubation mit 24(S)-OH-Chol einen zwei- bis dreifachen Anstieg der ApoE-mRNA und eine signifikante Verstärkung des intrazellulären ApoE-Spiegels um etwa achtunddreißig Prozent (siehe Abbildung 3.20). Weiterhin wurde erstmals gezeigt werden, dass die 24(S)-OH-Chol-bedingte Erhöhung der ApoE-mRNA-Menge durch gleichzeitige Lovastatingabe signifikant um durchschnittlich vierunddreißig Prozent reduziert wird. Dahingegen bleibt die durch das Oxysterol verursachte Steigerung des intrazellulären ApoE-Gehaltes durch eine Lovastatingabe unbeeinflusst (siehe Abbildung 3.20). Dies könnte in einer langen Halbwertszeit des Proteins begründet liegen, so dass es zu einer deutlichen zeitlichen Verschiebung auf der Regulationsebene kommt. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz zwischen den Befunden aus der *Real time* RT-PCR und der Proteinexpression könnte in einer instabilen mRNA zu finden sein. Durch eine schnelle Degradation der mRNA wäre ein schwacher Effekt auf Proteinebene nur schwer oder gar nicht nachweisbar.

Die hier gefundenen Ergebnisse zur Steigerung der ApoE-mRNA durch 24(S)-Hydroxycholesterin gliedern sich gut *in vitro* Zellkulturdaten anderer Arbeiten ein. So belegen kürzlich veröffentlichte Studien von Liang *et al.* und Abildayeva *et al.* eine Steigerung der ApoE-mRNA-Expressionsrate durch 25- und 22(R)-Hydroxycholesterin (Liang *et al.*, 2004) sowie 24(S)-Hydroxycholesterin (Abildayeva *et al.*, 2006) in der Astrozytomazelllinie CCFSTTGI. Gleichartige Effekte berichtet Laffitte *et al.* für Makrohagen, bei denen 20(S)- und 22(R)-Hydroxycholesterin zu einer Expressionssteigerung der mRNA führt (Laffitte *et al.*, 2001). Im Vergleich zu der Arbeit von Abildayeva konnte die Zunahme der ApoE-mRNA in CCFSTTGI-Zellen in der vorliegenden Arbeit bei niedrigerer 24(S)-Hydroxycholesterinkonzentration nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.21). Analog zu den Befunden aus dieser Arbeit beobachtete Abildayeva und Kollegen auch einen gesteigerten intrazellulären ApoE-Spiegel nach einer 24(S)-OH-Chol-Behandlung. So wurde der zelluläre Proteingehalt von ApoE, abhängig von der 24(S)-Hydroxycholesterinkonzentration, in einer Zeitspanne von zweiundsiebzig Stunden hoch reguliert (Abildayeva *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die ApoE-Genexpression über 24(S)-Hydroxycholesterin reguliert wird. Neben ApoE werden weitere Gene wie ABCA1 (ATP-Bindungs-Kassetten-Transporter A1) und ABCG1 (ATP-Bindungs-Kassetten-Transporter G1) durch Aktivierung des Leber-X-Rezeptors durch 24(S)-OH-Chol reguliert, was einen vermehrten Cholesterinausstrom zur Folge hat (Abildayeva *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang könnte das neuronale Oxysterol im gesunden Gehirn als Signalstoff für Astrozyten fungieren, die zur vermehrten Produktion von ApoE veranlasst werden. In Konsequenz stünde mehr Cholesterin für neuronale Umverteilungen und der Bildung von Synapsen zu Verfügung. Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer könnte es durch absterbende oder beschädigte Neuronen zu einem Überangebot an 24(S)-OH-Chol kommen, was letzten Endes eine vermehrte Bildung von ApoE zur Folge hätte. ApoE hingegen kann wiederum mit A β -Peptid aggregieren (Wisniewski *et al.*, 1994). Untermuert wird diese Überlegung durch eine Studie an Neuroblastomazellen, bei denen eine ABCA1-Induktion mit spezifischen LXR-Agonisten eine vermehrte Sekretion von A β ₄₀ und A β ₄₂-Peptid bewirkte (Fukumoto *et al.*, 2002).

Der in dieser Arbeit vorgestellten statininduzierten Reduktion der 24(S)-Hydroxycholesterin bedingten ApoE-Expression- und Sekretion kommt somit womöglich bei der Aufrechterhaltung von Normalbedingungen eine zentrale Bedeutung zu. Im Hinblick auf eine Korrelation zwischen einem erhöhten 24(S)-Hydroxycholesterinspiegel

und der Ausbildung von Morbus Alzheimer, gab dieser Befund einen Hinweis auf einen möglicherweise positiven Effekt einer Statineinnahme. In diesem Zusammenhang berichtet eine *in vivo* Humanstudie an Patienten mit Hypercholesterinämie, dass Simvastatin bei einer hohen Tagesdosis (achtzig Milligramm pro Tag) sowohl zu einer signifikanten Reduktion des 24(S)-Hydroxycholesterin-Plasmaspiegels, als auch zu einer Abnahme der Cholesterinumsatzrate führt (Locatelli *et al.*, 2002). Der berichtete positive Einfluss von Statinen auf die Expression von antiapoptotischen Genen, die insbesondere bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer protektiv wirken könnten, sowie die in dieser Arbeit dargestellten Befunde zur vergleichbaren ApoE-Sekretionssenkung von ApoE2 und ApoE4 durch Statine, stellen überdies eine positive Perspektive für einen möglichen therapeutischen Ansatz dar. Zum jetzigen Zeitpunkt rechtfertigt die duale Rolle, die ApoE einnimmt, indem es einerseits den Abtransport von A β fördern kann und Cholesterin zu regenerierenden Zellen transportiert, andererseits aber auch die A β -Aggregation fördert, allerdings keine pharmakologische Intervention mit Statinen an Morbus Alzheimer erkrankten Personen. Sollte sich in weiteren Studien allerdings klären, unter welchen Bedingungen ApoE neuroprotektiv oder neurotoxisch wirkt, so könnte die ApoE-Sekretion unter pathologischen Bedingungen durch Statine effektiv gesenkt werden. Statine bieten demnach eine positive Perspektive zur Therapie der Alzheimer Demenz.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die massive Bildung und Ablagerung von aggregiertem Amyloid Beta-Peptid im Gehirn wird allgemein als zentrales Ereignis im Rahmen des Neurodegenerationsprozesses der Alzheimer Demenz betrachtet. Als einer der ursächlichen Risikofaktoren gilt das Vorliegen des $\epsilon 4$ -Allels des Apolipoprotein E. Die Alzheimer'sche Krankheit ist dabei in sehr vielfältige Weise mit Apolipoprotein E verknüpft. ApoE begünstigt isoformenabhängig A β -Ablagerungen, ApoE-Fragmente kommen im Gehirn und der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer Patienten vor und ApoE ist darüber hinaus als Cholesterintransportprotein über den zellulären Cholesterinstoffwechsel mit der Amyloidbildung verknüpft.

Mit Hilfe einer Doppeltransfektion von ApoE und ADAM10 in HEK-Zellen und durch Studien mit Inhibitoren der ADAM-Familie an HepG-2-Zellen wurde *in vitro* gezeigt, dass ApoE nicht durch α -Sekretasen der ADAM-Familie gespalten wird. Weiterhin konnte bewiesen werden, dass ApoE in Astrogliazellen keinen Einfluss auf die APP-Prozessierung ausübt. Durch *in vitro* Modulation des Cholesteringehaltes an Astrogliazellen mit M β CD und seine Cholesterin-Komplexverbindungen ist gezeigt worden, dass die ApoE-Sekretion durch abnehmenden Cholesteringehalt gesenkt wird. Indem Statine alleine oder in Kombination mit Isoprenylierungs substraten eingesetzt wurden ist der Beweis erbracht worden, dass Statine *in vitro* die ApoE-Sekretionsinhibition alleine durch Hemmung der Cholesterinbiosynthese bewirken. Bestätigt wurde dies weiterhin durch Experimente mit Isoprenylierungsinhibitoren. Aus dem Wirkmechanismus von Statinen auf die ApoE-Sekretions senkung leitet sich womöglich der für bestimmte Statine berichtete neuroprotektive Effekt bei Morbus Alzheimer in retrospektiven Humanstudien ab, der sich durch reine Cholesterinsenkung nicht erklären lässt. Im Zusammenhang mit der Cholesterin homöostase und dem gesteigerten 24(S)-Hydroxycholesterin Spiegel bei Morbus Alzheimer, haben die Ergebnisse gezeigt, dass 24(S)-Hydroxycholesterin zur ApoE-Sekretions- und Expressionssteigerung führt. In dieser Arbeit konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass der stimulatorische Effekt von 24(S)-OH-Chol durch gleichzeitige Lovastatingabe reduziert werden kann. Dies stellt einen möglichen Ansatz im Kampf gegen die Alzheimer Demenz dar. Weiterführend müssen diese Ergebnisse noch *in vivo* beispielsweise durch Versuche an ApoE-transgenen Mäusen bestätigt werden. Darüber hinaus könnte nach einer Statintherapie der ApoE-Gehalt in humaner, cerebrospinaler Flüssigkeit ermittelt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Abildayeva K, Jansen PJ, Hirsch-Reinshagen V, Bloks VW, Bakker AH, Ramaekers FC, De Vente J, Groen AK, Wellington CL, Kuipers F, Mulder M (2006): 24(S)-Hydroxycholesterol participates in a Liver X Receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates Apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 281 (18): 12799-808
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T (2000): Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 21 (3): 383-421
- Assmann G, Schmitz G, Menzel HJ, Schulte H (1984): Apolipoprotein E polymorphism and hyperlipidemia. *Clin. Chem.* 30 (5): 641-3
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM (1999): Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP (V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (26): 15233-8
- Beffert U, Aumont N, Dea D, Lussier-Cacan S, Davignon J, Poirier J. (1999): Apolipoprotein E isoform-specific reduction of extracellular amyloid in neuronal cultures. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 68 (1-2): 181-5
- Biere AL, Ostaszewski B, Zhao H, Gillespie S, Younkin SG, Selkoe DJ (1995): Co-expression of beta-amyloid precursor protein (betaAPP) and apolipoprotein E in cell culture: analysis of betaAPP processing. *Neurobiol. Dis.* 2 (3): 177-87
- Bjorkhem I, Lutjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A (1997): Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}O_2$ techniques in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 272 (48): 30178-84
- Bodovitz S, Klein WL (1996): Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 271 (8): 4436-40
- Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM.(1985): Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 76 (4): 1501-13
- Brown MS, Goldstein JL, Siperstein MD (1973): Regulation of cholesterol synthesis in normal and malignant tissue. *Fed. Proc.* 32 (12): 2168-73
- Brown MS, Goldstein JL (1980): Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid. Res.* 21 (5): 505-17
- Buxbaum JD, Gandy SE, Cicchetti P, Ehrlich ME, Czernik AJ, Fracasso RP, Ramabhadran TV, Unterbeck AJ, Greengard P(1990): Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (15): 6003-6

- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA. (1998): Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273 (43): 27765-7
- Capell A, Grunberg J, Pesold B, Diehlmann A, Citron M, Nixon R, Beyreuther K, Selkoe DJ, Haass C (1998): The proteolytic fragments of the Alzheimer's disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150-kDa molecular mass complex. *J. Biol. Chem.* 273 (6): 3205-11
- Cedazo-Minguez A, Cowburn RF (2001): Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J. Cell. Mol. Med.* 5 (3): 254-66
- Cho HS, Hyman BT, Greenberg SM, Rebeck GW. (2001): Quantitation of apoE domains in Alzheimer disease brain suggests a role for apoE in Abeta aggregation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60 (4): 342-9
- Cignarella A, Brennhausen B, von Eckardstein A, Assmann G, Cullen P (1998): Differential effects of lovastatin on the trafficking of endogenous and lipoprotein-derived cholesterol in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18 (8): 1322-9
- Clayton DA, Grosshans DR, Browning MD (2002): Aging and surface expression of hippocampal NMDA receptors. *J. Biol. Chem.* 277 (17): 14367-9
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. (1993): Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261 (5123): 921-3
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE, et al. (1994): Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7 (2): 180-4
- Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ. (2003): Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (20): 11735-40
- Czech C, Forstl H, Hentschel F, Monning U, Besthorn C, Geiger-Kabisch C, Sattel H, Masters C, Beyreuther K. (1994): Apolipoprotein E-4 gene dose in clinically diagnosed Alzheimer's disease: prevalence, plasma cholesterol levels and cerebrovascular change. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* 243(5): 291-2
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF (1988): Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8(1): 1-21
- Deng J, Rudick V, Dory L (1995): Lysosomal degradation and sorting of apolipoprotein E in macrophages. *J. Lipid. Res.* 36 (10): 2129-40
- Diedrich JF, Minnigan H, Carp RI, Whitaker JN, Race R, Frey W 2nd, Haase AT (1991): Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J. Virol.* 65 (9): 4759-68
- Dietschy JM, Turley SD (2001): Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 12 (2): 105-12

Literaturverzeichnis

- Dolev I, Michaelson DM (2004): A nontransgenic mouse model shows inducible amyloid-beta (Abeta) peptide deposition and elucidates the role of apolipoprotein E in the amyloid cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101 (38): 13909-14
- Eckert GP, Wood WG, Muller WE. (2001): Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes. *J. Neural. Transm.* 108(8-9): 1051-64
- Eckert GP, Kirsch C, Mueller WE. (2001): Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-deficient mice. *Neuroreport* 12 (5): 883-7
- Elshourbagy NA, Liao WS, Mahley RW, Taylor JM (1985): Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1): 203-7
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990): Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248 (4959): 1122-4
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. (2001): Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (10): 5856-61
- Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, Ragoschke A, Kuehl S, Walter S, Walter J, Brechtel K, Muehlhauser F, Von Bergmann K, Lutjohann D (2002): Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology* 59 (8): 1257-8
- Frears ER, Stephens DJ, Walters CE, Davies H, Austen BM (1999): The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 10 (8): 1699-705
- Friedland RP (2002): Lipid metabolism, epidemiology, and the mechanisms of Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 977: 387-90
- Fukumoto H, Deng A, Irizarry MC, Fitzgerald ML, Rebeck GW (2002): Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J. Biol. Chem.* 277 (50): 48508-13
- Gandy S (2005): The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* 115 (5): 1121-9
- Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S (1998): The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch. Gen. Psychiatry.* 55 (9): 809-15
- Gimpl G, Burger K, Fahrenholz F (1997): Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36 (36): 10959-74
- Gimpl G, Fahrenholz F (2002): Cholesterol as stabilizer of the oxytocin receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1564 (2): 384-92
- Goldstein JL, Brown MS (1990): Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343 (6257): 425-30

- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA (1996): Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383 (6600): 550-3
- Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K, Michikawa M (2002): Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice. *J. Biol. Chem.* 277 (33): 29919-26
- Grange-Midroit M, Garcia-Sevilla JA, Ferrer-Alcon M, La Harpe R, Walzer C, Guimon J (2002): G protein-coupled receptor kinases, beta-arrestin-2 and associated regulatory proteins in the human brain: postmortem changes, effect of age and subcellular distribution. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 101 (1-2): 39-51
- Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE (1998): Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain. Pathol.* 8 (1): 65-72
- Grunler J, Ericsson J, Dallner G (1994): Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1212 (3): 259-77
- Gueguen Y, Bertrand P, Ferrari L, Batt AM, Siest G. (2001): Control of apolipoprotein E secretion by 25-hydroxycholesterol and proinflammatory cytokines in the human astrocytoma cell line CCF-STTG1. *Cell. Biol. Toxicol.* 17 (3): 191-9
- Haass C (1996): Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 9 (4): 254-9
- Haass C, De Strooper B (1999): The presenilins in Alzheimer's disease--proteolysis holds the key. *Science* 286 (5441): 916-9
- Hardy J (1997): Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends. Neurosci.* 20 (4): 154-9
- Harris FM, Brecht WJ, Xu Q, Tesseur I, Kekoni L, Wyss-Coray T, Fish JD, Masliah E, Hopkins PC, Scearce-Levie K, Weisgraber KH, Mucke L, Mahley RW, Huang Y (2003): Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (19): 10966-71
- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000): Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (6): 2892-7
- Huang Y, Liu XQ, Wyss-Coray T, Brecht WJ, Sanan DA, Mahley RW (2001): Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (15): 8838-43
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.* 14 (6): 419-27
- Ignatius MJ, Shooter EM, Pitas RE, Mahley RW (1987): Lipoprotein uptake by neuronal growth cones in vitro. *Science* 236 (4804): 959-62

- Irizarry MC, Deng A, Lleo A, Berezovska O, Von Arnim CA, Martin-Rehrmann M, Manelli A, LaDu MJ, Hyman BT, Rebeck GW (2004): Apolipoprotein E modulates gamma-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 90 (5): 1132-43.
- Istvan ES (2002): Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am. Heart. J.* 144 (6): S27-32
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr (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
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356 (9242): 1627-31
- Johnson-Anuna LN, Eckert GP, Keller JH, Igbavboa U, Franke C, Fechner T, Schubert-Zsilavecz M, Karas M, Muller WE, Wood WG (2005): Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312 (2): 786-93
- Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH (1997): Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. *Subcell. Biochem.* 28: 235-76
- Jorm AF, Jolley D (1998): The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology* 51 (3): 728-33
- Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM (1997): Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* 42 (5): 776-82
- Kilsdonk EP, Yancey PG, Stoudt GW, Bangerter FW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. (1995): Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* 270 (29): 17250-6
- Kivipelto M, Laakso MP, Tuomilehto J, Nissinen A, Soininen H (2002): Hypertension and hypercholesterolaemia as risk factors for Alzheimer's disease: potential for pharmacological intervention. *CNS Drugs* 16 (7): 435-44
- Klein U, Gimpl G, Fahrenholz F (1995): Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34 (42): 13784-93
- Kölsch H, Lutjohann D, Ludwig M, Schulte A, Ptok U, Jessen F, von Bergmann K, Rao ML, Maier W, Heun R (2002): Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 7 (8): 899-902
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F (2001): Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (10): 5815-20
- Krul ES, Tang J (1992): Secretion of apolipoprotein E by an astrocytoma cell line. *J. Neurosci. Res.* 32 (2): 227-38
- Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2001): LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2): 507-12
- Lange Y, Steck TL (1998): Four cholesterol-sensing proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8 (4): 435-9

- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999): Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (7): 3922-7
- Lee VM (1995): Disruption of the cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5 (5): 663-8
- Liang Y, Lin S, Beyer TP, Zhang Y, Wu X, Bales KR, DeMattos RB, May PC, Li SD, Jiang XC, Eacho PI, Cao G, Paul SM (2004): A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. *J. Neurochem.* 88 (3): 623-34
- Lichtenthaler SF, Haass C (2004): Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113 (10): 1384-7
- Locatelli S, Lutjohann D, Schmidt HH, Otto C, Beisiegel U, von Bergmann K (2002): Reduction of plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) levels using high-dosage simvastatin in patients with hypercholesterolemia: evidence that simvastatin affects cholesterol metabolism in the human brain. *Arch. Neurol.* 59 (2): 213-6
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW (1999): cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (13): 7238-43
- Lutjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Siden A, Diczfalusy U, Bjorkhem I (1996): Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (18): 9799-804
- Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R (2000): Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid. Res.* 41 (2): 195-8
- Lutjohann D, Bjorkhem I, Locatelli S, Dame C, Schmolling J, von Bergmann K, Fahnenstich H. (2001) Cholesterol dynamics in the foetal and neonatal brain as reflected by circulatory levels of 24S-hydroxycholesterol. *Acta. Paediatr.* 90 (6): 652-7
- Mahley RW (1988): Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240 (4852): 622-30
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001): CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294 (5545): 1354-7
- Marques MA, Tolar M, Harmony JA, Crutcher KA (1996). A thrombin cleavage fragment of apolipoprotein E exhibits isoform-specific neurotoxicity. *Neuroreport* 7 (15-17): 2529-32
- Marques MA, Owens PA, Crutcher KA (2004): Progress toward identification of protease activity involved in proteolysis of apolipoprotein e in human brain. *J. Mol. Neurosci.* 24(1): 73-80
- Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD (1995): Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp. Neurol.* 136 (2): 107-22
- Mattson MP, Guo Q, Furukawa K, Pedersen WA (1998): Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 70 (1): 1-14

- Meske V, Albert F, Richter D, Schwarze J, Ohm TG (2003): Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 17 (1): 93-102
- Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JC (1998): APOE genotype predicts when--not whether--one is predisposed to develop Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 19 (4): 321-2.
- Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K (2000): Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* 74 (3): 1008-16
- Naidu A, Xu Q, Catalano R, Cordell B (2002): Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. *Brain. Res.* 958 (1): 100-11
- Nagy K, Nagy V, Bertoni-Freddari C, Nagy I (1983): Alterations of the synaptosomal membrane 'microviscosity' in the brain cortex of rats during aging and centrophenoxine treatment. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 2 (1-2): 23-39
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991): Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain. Res.* 541 (1): 163-6
- Narayanaswami V, Maiorano JN, Dhanasekaran P, Ryan RO, Phillips MC, Lund-Katz S, Davidson WS (2004): Helix orientation of the functional domains in apolipoprotein e in discoidal high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 279 (14): 14273-9
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH (1992): Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 258 (5080): 304-7
- Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A (1998): Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17 (1): 14-20
- Papassotiropoulos A, Lutjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Rao ML, Maier W, Bjorkhem I, von Bergmann K, Heun R (2000): Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 11 (9): 1959-62
- Papassotiropoulos A, Streffer JR, Tsolaki M, Schmid S, Thal D, Nicosia F, Iakovidou V, Maddalena A, Lutjohann D, Ghebremedhin E, Hegi T, Pasch T, Traxler M, Bruhl A, Benussi L, Binetti G, Braak H, Nitsch RM, Hock C (2003): Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Arch. Neurol.* 60 (1): 29-35
- Parvathy S, Hussain I, Karran EH, Turner AJ, Hooper NM (1998): The amyloid precursor protein (APP) and the angiotensin converting enzyme (ACE) secretase are inhibited by hydroxamic acid-based inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* 26 (3): S242.
- Petanceska SS, DeRosa S, Olm V, Diaz N, Sharma A, Thomas-Bryant T, Duff K, Pappolla M, Refolo LM (2002): Statin therapy for Alzheimer's disease: will it work? *J. Mol. Neurosci.* 19 (1-2): 155-61
- Petanceska SS, DeRosa S, Sharma A, Diaz N, Duff K, Tint SG, Refolo LM, Pappolla M (2003): Changes in apolipoprotein E expression in response to dietary and pharmacological modulation of cholesterol. *J. Mol. Neurosci.* 20 (3): 395-406

- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987): Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 917 (1): 148-61
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH (1987): Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.* 262 (29): 14352-60 (a)
- Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S (1993): Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342 (8873): 697-9
- Poirier J (1996): Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer's disease. *J. Psychiatry. Neurosci.* 21 (2): 128-34
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004): A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* 113 (10): 1456-64
- Rall SC Jr, Weisgraber KH, Mahley RW (1982): Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 257 (8): 4171-8
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA (2000): Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol. Dis.* 7 (4): 321-31
- Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE (2001): A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 8 (5): 890-9
- Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P, Blobel CP (1999): Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274 (6): 3531-40
- Royston MC, Mann D, Pickering-Brown S, Owen F, Perry R, Raghavan R, Khin-Nu C, Tyrer S, Day K, Crook R, et al.(1994): Apolipoprotein E epsilon 2 allele promotes longevity and protects patients with Down's syndrome from dementia. *Neuroreport* 5 (18): 2583-5
- Sambamurti K, Greig NH, Lahiri DK (2002): Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular. Med.* 1 (1): 1-31
- Sandhu SK, Kaur G (2002): Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology* 3 (3): 161-73
- Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al (1993): Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43 (8): 1467-72
- Selkoe DJ (1999): Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399 (6738): A23-31
- Selkoe DJ (2001a): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81 (2): 741-66
- Selkoe DJ (2001b): Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J. Alzheimers. Dis.* 3 (1): 75-80

- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, et al (1992): Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359 (6393): 325-7
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998): Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (11): 6460-4
- Simons M, Schwarzler F, Lutjohann D, von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, Wormstall H, Hartmann T, Schulz JB (2002): Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann. Neurol.* 52 (3): 346-50
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993): Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (5): 1977-81
- Tandon A, Rogaeva E, Mullan M, St George-Hyslop PH (2000): Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta-amyloid and the presenilins. *Curr. Opin. Neurol.* 13 (4): 377-84
- Tolar M, Marques MA, Harmony JA, Crutcher KA (1997): Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein E and related synthetic peptides is receptor-mediated. *J. Neurosci.* 17 (15): 5678-86
- Tolar M, Keller JN, Chan S, Mattson MP, Marques MA, Crutcher KA (1999): Truncated apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate ApoE neurotoxicity. *J. Neurosci.* 19 (16): 7100-10.
- Utermann G, Steinmetz A, Weber W (1982): Genetic control of human apolipoprotein E polymorphism: comparison of one- and two-dimensional techniques of isoprotein analysis. *Hum. Genet.* 60 (4): 344-51
- Utermann G, Kindermann I, Kaffarnik H, Steinmetz A (1984): Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia. *Hum. Genet.* 65 (3): 232-6
- Utermann G, Weisgraber KH, Weber W, Mahley RW (1984): Genetic polymorphism of apolipoprotein E: a variant form of apolipoprotein E2 distinguished by sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Lipid. Res.* 25 (4): 378-82
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286 (5440): 735-41
- Vincent B, Smith JD (2001): Astrocytes down-regulate neuronal beta-amyloid precursor protein expression and modify its processing in an apolipoprotein E isoform-specific manner. *Eur. J. Neurosci.* 14 (2): 256-66
- Vohra BP, Sharma SP, Kansal VK (2001): Age-dependent variations in mitochondrial and cytosolic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different regions of central nervous system of guinea pigs. *Indian. J. Biochem. Biophys.* 38 (5): 321-6
- Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE (2002): Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis.* 9 (1): 11-23

- Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW (1982): Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J. Biol. Chem.* 257 (5): 2518-21
- Wernette-Hammond ME, Lauer SJ, Corsini A, Walker D, Taylor JM, Rall SC Jr (1989): Glycosylation of human apolipoprotein E. The carbohydrate attachment site is threonine 194. *J. Biol. Chem.* 264 (15): 9094-101
- Wisniewski T, Frangione B (1992): Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci. Lett.* 135 (2): 235-8
- Wisniewski T, Castano EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B (1994): Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am. J. Pathol.* 145 (5): 1030-5
- Wisniewski T, Lalowski M, Golabek A, Vogel T, Frangione B (1995): Is Alzheimer's disease an apolipoprotein E amyloidosis? *Lancet* 345 (8955): 956-8
- Wolfe MS, Haass C (2001): The Role of presenilins in gamma-secretase activity. *J. Biol. Chem.* 276 (8): 5413-6
- Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM (1995): ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell. Biol.* 131 (2): 275-8
- Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, Celesia GG, Siegel G (2000): Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57 (10): 1439-43
- Wolozin B (2001): A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (10): 5371-3
- Wolozin B (2003): Cyp46 (24S-cholesterol hydroxylase): a genetic risk factor for Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 60 (1): 16-8
- Wood WG, Strong R, Williamson LS, Wise RW (1984): Changes in lipid composition of cortical synaptosomes from different age groups of mice. *Life Sci.* 35 (19): 1947-52
- Wood WG, Schroeder F, Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U (1999): Recent advances in brain cholesterol dynamics: transport, domains, and Alzheimer's disease. *Lipids* 34 (3): 225-34
- Xu Q, Li Y, Cyras C, Sanan DA, Cordell B (2000): Isolation and characterization of apolipoproteins from murine microglia. Identification of a low density lipoprotein-like apolipoprotein J-rich but E-poor spherical particle. *J. Biol. Chem.* 275 (41): 31770-7
- Zannis VI, Breslow JL (1981): Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 20 (4): 1033-41
- Zannis VI, McPherson J, Goldberger G, Karathanasis SK, Breslow JL (1984): Synthesis, intracellular processing, and signal peptide of human apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 259 (9): 5495-9

