



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Der Einfluss der löslichen Spaltprodukte
des Amyloid-beta-Vorläuferproteins auf die
Proteinhomöostase

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Jana Renziehausen

Mainz, 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Alzheimer'sche Erkrankung	1
1.1.1. Histopathologie von Alzheimer	2
1.1.2. Das Amyloid-beta-Vorläuferprotein (APP)	5
1.1.2.1. Proteolytische Prozessierung von APP	6
1.1.2.2. Die Funktionen von APP und seinen Spaltprodukten	8
1.2. Der Einfluss der Alterung auf neurodegenerative Erkrankungen	12
1.3. Die Proteinhomöostase	13
1.3.1. Der proteasomale Abbauweg	14
1.3.2. Die Autophagie	15
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	18
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. Geräte	21
2.1.2. Chemikalien und Kits	22
2.1.3. Lösungen und Puffer	22
2.1.3.1. Zellkultur	22
2.1.3.2. Proteinbiochemie	23
2.1.3.3. Mikrobiologie	25
2.1.4. Modelle	26
2.1.4.1. Zellkulturmodelle	26
2.1.4.2. Tiermodelle	26
2.1.5. Statistische Auswertung	27
2.2. Methoden	27
2.2.1. Zellkulturtechniken	27
2.2.1.1. Kultivierung der Zelllinien	27
2.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl	28
2.2.1.3. Bestimmung von Populationsverdopplungen	28
2.2.1.4. Zelluläre Dauerkulturen	28
2.2.1.5. Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung	29
2.2.1.6. Präparation und Kultivierung neuronaler primärer Zellen	29
2.2.1.7. Transiente Transfektion	29
2.2.1.8. Behandlung der in vitro Kulturen	30
2.2.1.9. Zellüberleben mittels MTT-Assay	31
2.2.2. Proteinbiochemie	31

2.2.2.1.	Gesamtproteinisolierung aus Zellen	31
2.2.2.2.	Gesamtproteinisolierung aus Gewebe.....	31
2.2.2.3.	Proteinquantifizierung	32
2.2.2.4.	Western Blot Analyse.....	32
2.2.2.5.	Aufreinigung von sAPP α und APP E1	34
2.2.2.6.	Coomassie Färbung.....	35
2.2.2.7.	Immunocytochemie	35
2.2.2.8.	Proteasomaler Aktivitätsassay	36
2.2.3.	Molekularbiologie.....	36
2.2.3.1.	Isolierung gesamt RNA.....	36
2.2.3.2.	Reverse Transkription/Synthese cDNA	36
2.2.3.3.	Quantitative Realtime-PCR	37
2.2.4.	Mikrobiologie.....	38
2.2.4.1.	Hefezucht	38
2.2.4.2.	Herstellen von Dauerkulturen.....	38
3.	Ergebnisse.....	39
3.1.	Analyse von sAPPα und APP E1	39
3.2.	Das Alterungsmodel IMR90	39
3.3.	Der Einfluss von sAPPα und APP E1 auf die Zellviabilität und Proteinhomöostase	41
3.3.1.	Keine Veränderung der Zellviabilität und Lebensspanne durch sAPP α und APP E1.....	41
3.3.2.	sAPP α und APP E1 beeinflussen die Protein- und mRNA-Level wichtiger Marker der Proteinhomöostase in jungen und alten IMR90 Zellen nicht.....	43
3.4.	Einfluss von sAPPα und APP E1 auf die Zellviabilität unter proteasomalen Stress	44
3.4.1.	Ermittlung einer subtoxischen Stressdosis	44
3.4.2.	Analyse der Zellviabilität unter proteasomalen Stress nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 in IMR90 Zellen	45
3.5.	Der Einfluss von sAPPα und APP E1 auf die Autophagie bei proteasomalen Stress.....	46
3.5.1.	Regulierung der Proteinexpression von Autophagie-relevanten Genen	46
3.5.2.	Der Einfluss von sAPP α auf Autophagie-relevante Gene unter proteasomalen Stress durch Epoxomicin.....	52
3.5.3.	sAPP α verhindert die durch MG-132 induzierte perinukleare Aggresomenformation ...	52
3.5.4.	sAPP α verändert die Lokalisation von mutanter SOD1 unter proteasomalen Stressbedingungen.....	55
3.6.	Der Einfluss von sAPPα und APP E1 auf das Proteasom	57
3.6.1.	sAPP α aktiviert den Abbau von d2-GFP unter proteotoxischen Stress	58

3.6.2.	Die Aktivität des Proteasoms kann durch sAPP α erhöht werden.....	58
3.6.3.	Der Einfluss von sAPP α auf die Expression proteasomal wichtiger Faktoren.....	60
3.7.	Der Einfluss von sAPPα auf die Proteinhomöostase in primären Neuronen.....	63
3.8.	Der Einfluss des löslichen sAPPβ auf die Proteinhomöostase.....	64
3.9.	Knockdown von APP und APLP2 und der Einfluss auf die Wirksamkeit von sAPPα.....	66
3.10.	Analyse wichtiger Protein-Qualitätskontroll-Gene in Mäusen	68
4.	Diskussion.....	73
4.1.	Der Einfluss von sAPPα und sAPPβ auf die Proteinhomöostase	73
4.1.1.	Der Einfluss von sAPP α und APP E1 auf die Zellviabilität und die Lebensspanne.....	74
4.1.2.	Der Effekt von sAPP α und APP E1 auf die Proteinhomöostase	74
4.1.3.	Die Wirkung von sAPP α auf die Proteinhomöostase unter proteasomalen Stressbedingungen.....	75
4.1.3.1.	Eine verbesserte Zellviabilität in jungen Zellen durch sAPP α unter proteotoxischen Stress..	76
4.1.3.2.	Der Einfluss von sAPP α auf die Autophagie	76
4.1.3.3.	Das Ubiquitin-Proteasom-System wird durch sAPP α aktiviert	79
4.1.3.4.	Regulatorische Effekte von sAPP α in primären neuronalen Zellen.....	81
4.1.3.5.	Der Einfluss von sAPP β auf die Proteinhomöostase	81
4.2.	Die Rolle von APP als Rezeptor für sAPPα.....	82
4.3.	Veränderung in der Proteinhomöostase in Mäusen.....	83
4.4.	Ausblick	85
5.	Zusammenfassung	87
6.	Literaturverzeichnis.....	89
7.	Anhang	105
7.1.	Weitere Abbildungen	105
7.2.	Abkürzungsverzeichnis	107
7.3.	Plasmidkarten	109
7.4.	Abbildungsverzeichnis.....	111
7.5.	Tabellenverzeichnis.....	113
7.6.	Lebenslauf.....	114
7.7.	Publikationen.....	115
7.8.	Erklärung.....	116
8.	Danksagung	117

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer'sche Erkrankung

Die Alzheimer'sche Erkrankung (*Alzheimer Disease, AD*) ist eine degenerative und fortschreitende Gehirnstörung, bei der Zellen bestimmter Gehirnregionen zunächst Fehlfunktionen aufweisen und anschließend absterben. Sie wurde bereits 1906 von dem Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer beschrieben. Die AD ist die häufigste Form der irreversiblen Demenz und endet immer letal. Zu den Symptomen der AD gehören neben Amnesie, Desorientierung und Verwirrtheit auch Veränderung des Wesens, Wechsel zwischen Depressionen und Euphorie und der Verlust der Sprachfähigkeit (Rabinowicz et al., 2000). Die genauen Ursachen der Erkrankungen sind aktuell noch unbekannt. Bisherige Untersuchungen deuten an, dass eine Reihe von miteinander verbundenen Störungen der zellulären Prozesse zur Krankheit führen.

Weltweit wird die Zahl der Demenzerkrankungen auf ca. 35 Millionen Menschen geschätzt, davon leiden ca. 80 % an der AD. In Deutschland geht man von 1,2 Millionen erkrankten Menschen aus, mit einem prognostizierten Anstieg auf 2,3 Millionen Patienten bis 2030 (Prince et al., 2013).

Im Allgemeinen verläuft die AD mit einer langsamen Verschlechterung des Gesundheitszustandes. In seltenen Fällen kann ein wechselhafter Verlauf mit Verschlechterungen und Verbesserungen beobachtet werden. Alzheimer ist nur bedingt therapier- und unheilbar, außerdem erfordern die Patienten eine kosten- und zeitintensive Pflege (Ferri et al., 2005). Dies und die relativ hohe Prävalenz im demografischen Wandel, einhergehend mit einem hohen Leidensdruck bei Betroffenen und Angehörigen, haben zu einer intensiven Erforschung dieser Krankheit geführt.

Symptome und Krankheitsverlauf

Die Krankheitssymptome von AD sind eine progressive Abnahme der Gedächtnisfunktion, einhergehend mit Persönlichkeitsveränderungen. Zu Beginn der Krankheit treten Störung des Kurzzeitgedächtnis zusammen mit Schwierigkeiten der zeitlichen und räumlichen Orientierung auf. Im weiteren Verlauf sind Sprachstörungen und psychosomatische Veränderungen wie Aggressionen, Depressionen, Ängste und Halluzinationen zu beobachten. Neben Störungen des Kurzzeitgedächtnisses sind Schwierigkeiten mit Sprache, Denkvermögen sowie der örtlichen und zeitlichen Orientierung zu beobachten. In einem späten Stadium der Krankheit treten zudem auch Störungen des Langzeitgedächtnisses auf, welche zur vollständigen Amnesie führen (Rabinowicz et al., 2000). Durchschnittlich sterben AD Patienten nach 6 bis 12 Jahren, oft durch sekundäre Erkrankungen.

Risikofaktoren der Alzheimer'schen Erkrankung

Mit zunehmenden Alter steigt das Risiko an AD zu erkranken. So sind ca. 1 % der 65-jährigen und 30 % der 85-jährigen Menschen von dieser Krankheit betroffen (Kern and Behl, 2009; Lobo et al., 2000). Durch den demographischen Wandel und die dadurch steigende Lebenserwartung in den Industrieländern ist eine steigende Zahl an AD-Patienten zu verzeichnen (Ferri et al., 2005). Die genauen molekularen Zusammenhänge zwischen dem Alterungsprozess und der Erkrankung sind noch nicht geklärt.

Bisher wurde eine Reihe von Faktoren identifiziert, die eine Rolle bei der Entstehung und Entwicklung der Krankheit spielen. Mögliche Ursachen und Risikofaktoren für AD sind neben genetischen und epigenetischen Faktoren (Lahiri and Maloney, 2010; Lahiri et al., 2009), Alter, Bildung (Sando et al., 2008), Schwermetallbelastung (Wu et al., 2008), Ernährung und physische Aktivität (Scarmeas et al., 2009). Auch Faktoren wie Bluthochdruck, hohe Cholesterinspiegel und Diabetes steigern das Risiko an AD zu erkranken (Ferri et al., 2005; Kalaria et al., 2008).

Bei der AD wird zwischen der früh auftretenden Form der familiären AD (*familial AD*, fAD), die genetisch bedingt ist und der sporadisch auftretenden spät beginnenden AD (*late onset AD*; loAD) differenziert. Auf die fAD, die meist vor dem 65. Lebensjahr auftritt, sind weniger als 5 % der Fälle zurückzuführen (Kern and Behl, 2009; Selkoe, 2001). Bei dieser treten Mutationen im Amyloid-beta-Vorläuferprotein (APP), Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) Gen auf (Selkoe, 2001).

Bei der loAD wurde bislang keine eindeutige genetische Ursache gefunden, aber einige genetische Risikofaktoren wurden analysiert. Ein Faktor ist eine Isoform des Apolipoprotein E, die dazu führt, dass Menschen mit einer 15-fach höheren Wahrscheinlichkeit an AD erkranken (Corder et al., 1993, 1994; Strittmatter et al., 1993). Durch Genom-Analysen seit 2009 konnten weitere genetische Risikofaktoren wie *clu*, *abca7* und *bin1* gefunden werden, deren genaue Funktion und Rolle in AD muss aber noch weiter untersucht werden (Bettens et al., 2013).

1.1.1. Histopathologie von Alzheimer

Bereits Alois Alzheimer beschrieb das Krankheitsbild der AD als Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS) mit geschädigten Nervenzellen und der Abnahme der Gehirnmasse. Außerdem beschrieb er mikroskopische Proteinablagerung in Form von extrazellulären amyloiden Plaques und neurofibrillären Bündeln (*neurofibrillary tangles*; NFT), die er im Gehirn seiner Patientin Auguste D. fand (Alzheimer, 1907; Maurer et al., 1997). Diese Proteinablagerungen sind noch heute

Hauptbestandteil der post-mortem Diagnose und treten vorwiegend in den Gehirnregionen Neokortex, Hippocampus und im limbischen System auf (Thal et al., 2005).



Abbildung 1.1.1. (A) Auguste D., die erste Patientin von A. Alzheimer (B) Neurofibrilläre Bündel von A. Alzheimer gezeichnet (Maurer et al., 1997)

Neurofibrilläre Bündel

NFT's bestehen aus hyperphosphoryliertem Tau, einem Protein, das in seiner physiologischen Rolle wichtig für den Transport von Proteinen durch die Axone in neuronalen Zellen ist. Tau stabilisiert das für den Transport verantwortliche Mikrotubuli-System. Durch Veränderungen von Kinasen und Phosphatasen kommt es zur Hyperphosphorylierung von Tau, wodurch dieses von den Mikrotubuli dissoziiert. Diese Dissoziation führt zu Störungen des Transportsystems (Mandelkow and Mandelkow, 1998), die wiederum den axonalen Transport und die Signalweiterleitung beeinflussen, wodurch der Zelltod ausgelöst wird.

Die AD wurde von Braak und Braak anhand des Auftretens von NFT's in den unterschiedlichen Gehirnregion in Stadien unterteilt. Zu Beginn der Krankheit (Braak Stadium I und II) treten die NFT's im transentorhinalen Kortex auf. Im weiteren Verlauf befinden sie sich auch im entorhinalen Kortex und im Hippocampus (Stadium III und IV) (Braak and Braak, 1997).

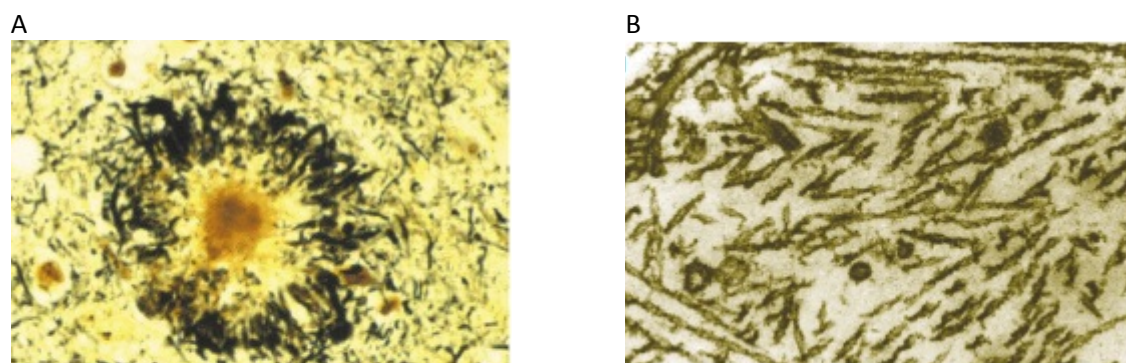


Abbildung 1.1.2. (A) Abbildung eines amyloiden Plaques (B) Elektronen Mikroskop Aufnahme von neurofibrillären Bündeln bestehend aus hyperphosphorylierten Tau (Sisodia and St George-Hyslop, 2002)

NFT's werden in den Gehirnen von AD Patienten in hoher Anzahl gefunden. Allerdings ist die Rolle von Tau in AD umstritten, da Mutation in Tau nicht mit AD assoziiert sind, sondern eine Klasse von Frontotemporaler Demenz beschreiben (Clark et al., 1998). Tau Aggregate spielen auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson eine Rolle (Riederer et al., 2011). Zudem konnten auch bei Menschen ohne Demenz NFT's gefunden werden, ab 85 Jahre hat nahezu jeder Mensch NFT's (Kern and Behl, 2009).

Amyloid Plaques

Die extrazellulären amyloiden Plaques bestehen zum Großteil aus aggregierendem Amyloid- β Protein ($A\beta$), einem Spaltprodukt des APP, das auf Chromosom 21 lokalisiert ist (siehe Kapitel 1.1.2.1). Bei der Prozessierung des APPs können verschieden lange $A\beta$ -Proteine entstehen. Die häufigsten Längen stellen das $A\beta_{40}$ mit 40 und das $A\beta_{42}$ mit 42 Aminosäuren dar. Im gesunden Gehirn treten diese Formen im Verhältnis 10:1 auf. In Alzheimer Patienten hingegen kann häufig eine Verschiebung zu $A\beta_{42}$ beobachtet werden (Murakami et al., 2003; Selkoe and Wolfe, 2007). Dieses ist stabiler gegenüber Degradation, hat eine höhere Aggregations-Tendenz und wirkt somit eher neurotoxisch (Iwatsubo et al., 1994).

Braak und Braak haben nicht nur die Krankheit anhand des Auftretens von NFT's charakterisiert, sondern auch anhand der amyloiden Plaques. Zu Beginn der Erkrankung (Braak Stadium A) sind vor allem die schwach myelinisierten Bereiche des basalen Neokortex betroffen. Während der Krankheitsentwicklung ergibt sich ein graduelles Fortschreiten der Verteilung von amyloiden Plaques über die angrenzenden Neokortikalen Bereiche und den Hippocampus (Braak Stadium B) bis der gesamte Kortex betroffen ist (Braak Stadium C) (Braak and Braak, 1997).

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese besagt, dass durch steigende Akkumulation von amyloiden Plaques Neuronen geschädigt werden und die Aktivität von Kinasen und Phosphatasen zur Hyperphosphorylierung von Tau führt. Dieses wiederum führt durch Zelltod zum Beginn der Demenz (Hardy and Selkoe, 2002). Die Hypothese ist nicht unumstritten, da die Bedeutung und Rolle von $A\beta$ ungeklärt bleibt. Unterstützung findet die Hypothese durch die Untersuchung der fAD. Durch die Mutationen in APP, PS1 und PS2, welche in der fAD auftreten, konnte eine erhöhte Produktion von $A\beta$ beobachtet werden (Selkoe, 2001). Weitere Studien haben eine Korrelation zwischen amyloiden Plaques und neuronalem Zelltod gezeigt (Crews and Masliah, 2010). Gegen die Hypothese spricht jedoch, dass auch bei gesunden Menschen gehäuft amyloide Plaques auftreten können (Josephs et al., 2008; Neve and Robakis, 1998) und bei einer Studie mit Personen, die in einer ähnlichen

Lebenssituation lebten, konnte kein Zusammenhang zwischen post-mortem analysierten amyloiden Plaques und den kognitiven Fähigkeiten festgestellt werden (Riley et al., 2005).

Neuere Studien konzentrieren sich auf die Analyse löslicher intrazellulärer A β Oligomere. Diese löslichen A β Oligomere verbleiben länger im Stoffwechsel der Zelle und stören verschiedene zelluläre Mechanismen, die zum Zelltod führen können (Crews and Masliah, 2010; Wirths et al., 2004).

1.1.2. Das Amyloid-beta-Vorläuferprotein (APP)

Das APP ist ein Vorläufer von A β , dem Hauptbestandteil der extrazellulären amyloiden Plaques in AD. Das Protein gehört zu einer Familie von konservierten Genen, zu denen unter anderem die in Säugetieren vorkommende Amyloid Vorläufer ähnlichen Proteine 1 (APLP1, *Amyloid precursor like protein 1*) und 2 (APLP2) zählen. Weitere Mitglieder der APP Genfamilie sind das APPL von *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) und APL-1 von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Thinakaran and Koo, 2008).

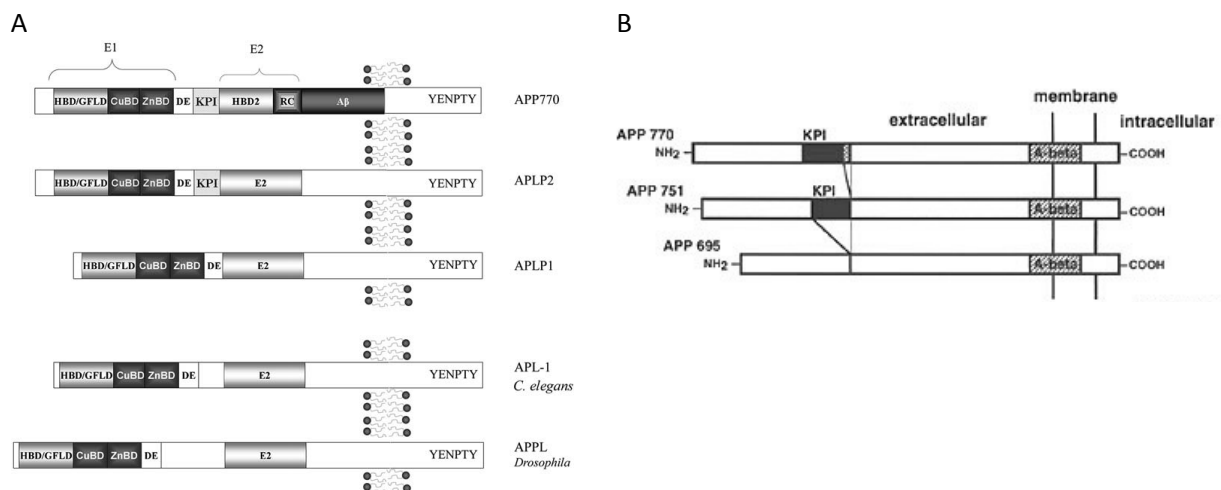


Abbildung 1.1.3. (A) Darstellung der Domänen-Struktur von APP₇₇₀, APLP1 und APLP2. Außerdem ist die Struktur von APL-1 aus *C. elegans* und APPL aus *D. melanogaster* gezeigt (Jacobsen and Iverfeldt, 2009). **(B)** Illustration der drei Splice-Varianten von APP (Fukuchi et al., 1998).

Der Aufbau von APP

Das humane *app* ist auf Chromosom 21 lokalisiert und besteht aus 19 Exons und besitzt drei Isoformen, diese entstehen durch alternatives Spleißen von Exon 7 (Kunitz Protease Inhibitor, KPI) und Exon 8 (ox-2-Antigen Homolog) (Sandbrink et al., 1996). APP und APLP2 werden ubiquitär im Körper exprimiert, wobei die kurze Form des APPs (APP₆₉₅) hauptsächlich in Neuronen und die langen Formen (APP₇₇₀ und APP₇₅₁) in peripheren Geweben und Astrozyten vorkommen (Rohan de Silva et al., 1997). APLP1 hingegen wird nur im ZNS exprimiert.

APP ist ein Typ 1 Integral Membran Protein, mit einer großen ektoplasmatischen amino (N)-terminalen Domäne, einer einzelnen Membran durchspannenden Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen carboxy (C)-terminalen Domäne (Dyrks et al., 1988; Kang et al., 1987). Posttranslational erfolgt eine Modifikation durch N- und O-Glykolisierung sowie eine Phosphorylierung der Ektodomäne und des zytoplasmatischen Teils (Jacobsen and Iverfeldt, 2009).

Die Ektodomäne wird unterteilt in die E1 Domäne am N-Terminus und die E2 Domäne. Die E1 Domäne besteht aus einer Heparan-Sulfat-Proteoglykan Domäne (HSPG), die auch als *Growth Factor like domain* (GFLD) bezeichnet wird und einer Kupfer- und Zink-Bindedomäne (Reinhard et al., 2005; Storey and Cappai, 1999). Zwischen der E1 und E2 Domäne liegt eine saure Region bestehend aus Aspartat und Glutamat. In den langen APP-Isoformen liegt zwischen den beiden Domänen außerdem die KPI (Hynes et al., 1990). Die E2-Domäne besteht aus einer konservierten HSPG und eine RERMS Pentapeptid Sequenz (Jacobsen and Iverfeldt, 2009). An die E2 Domäne schließt sich die A β -Region und die zytoplasmatische C-terminale Region.

1.1.2.1. Proteolytische Prozessierung von APP

Bei der proteolytischen Spaltung von APP unterscheidet man zwischen der amyloidogenen und der nicht-amyloidogenen Spaltung. Hauptunterschied zwischen den beiden Spaltungen ist, dass bei der amyloidogenen Spaltung A β entsteht, wohingegen bei der nicht-amyloidogenen Spaltung kein A β entsteht. Durch den proteolytischen Abbau von APP durch die nicht-amyloidogene Spaltung entsteht das lösliche und als neuroprotektiv beschriebene APP Fragment alpha (sAPP α) (siehe Kapitel 1.1.2.2). In gesunden jungen Zellen wird APP meist über den nicht-amyloidogenen-Weg gespalten. Im Laufe der Alterung wird APP zunehmend über den amyloidogenen-Weg gespalten (Kern et al., 2006). Hierdurch entsteht vermehrt A β , der Hauptbestandteil der amyloiden Plaques. Aus diesem Grund wurden in der Alzheimer Forschung auf der Suche nach Therapiewegen Schwerpunkte auf die Analyse der Prozessierungswege, der Regulierungsmöglichkeiten, der darin vorkommenden Proteasen und auch auf die genauen Funktionen des zytoprotektiven sAPP α gesetzt.

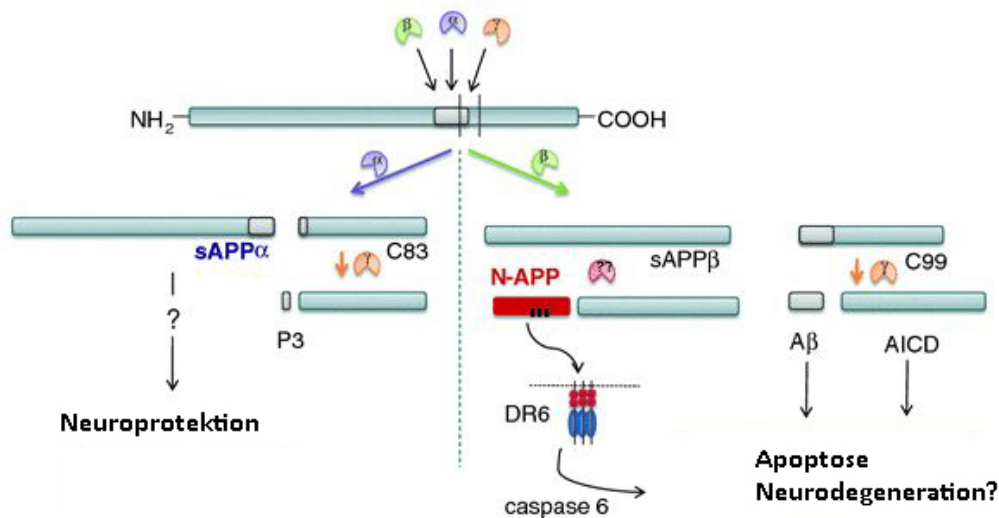


Abbildung 1.1.4. Proteolytische Prozessierung von APP. Auf der linken Seite ist der nicht amyloidogene Weg dargestellt und auf der rechten Seite der amyloidogene Weg. Modifiziert nach (Kögel et al., 2012).

Bei dem amyloidogenen Weg spaltet die β -Sekretase, auch BACE (β -site APP Cleaving Enzyme) genannt, APP am N-Terminus der $A\beta$ -Domäne. Bei dieser Spaltung entsteht lösliches APP beta (sAPP β), das in den extrazellulären Raum freigesetzt wird, und das membranständige C99-Fragment, auch beta C-terminales Fragment (β CTF) genannt (Vassar et al., 1999). Die β CTF wird durch die γ -Sekretase weiter in das 4 kDa große $A\beta$ und die APP intrazelluläre Domäne (AICD) gespalten. Die γ -Sekretase besteht aus einem Proteinkomplex, aufgebaut aus PS1, PS2, Nicastrin, Aph-1 (*anterior pharynx defective 1*) und pen-2 (*presenilin enhancer 2*) (Iwatsubo, 2004). Durch mehrere Spaltungsmöglichkeiten der γ -Sekretase kommt es zur Varianz der Länge von $A\beta$ zwischen 38 und 42 Aminosäuren (Selkoe and Wolfe, 2007). Das sAPP β kann weiter prozessiert werden, wobei das N-APP entsteht, das an den Rezeptor DR-6 (*Death Receptor 6*) binden kann (Nikolaev et al., 2009).

Die weitaus häufigere Prozessierung des APP ist der nicht-amyloidogene Weg. Dabei spaltet zunächst die α -Sekretase innerhalb der $A\beta$ -Domäne. Durch diese Spaltung entsteht sAPP α und das membranständige C83, das auch α CTF genannt wird. Bei der Spaltung der α CTF durch die γ -Sekretase entsteht danach das 3 kDa große p3 und die AICD (Allinson et al., 2003).

Die drei Proteine ADAM10 (*A Disintegrin And Metalloproteinase 10*), ADAM9 und ADAM17 besitzen α -Sekretase-Aktivität. Da die Prozessierung von APP durch die α -Sekretasen die Entstehung von amyloiden Plaques verhindert, sind diese ein wichtiges Ziel der AD-Forschung (Allinson et al., 2003).

1.1.2.2. Die Funktionen von APP und seinen Spaltprodukten

Die Funktionen von APP, APLP1 und APLP2

Die Eigenschaften von APP und seiner Familienmitglieder wurden zunächst anhand von Knockout (KO) Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl APP^{-/-} Mäuse als auch die einzelnen KOs von APLP1 und APLP2 nicht letal sind (Heber et al., 2000; Magara et al., 1999). In den Studien wurden sehr unterschiedliche Phänotypen für APP^{-/-} Mäuse beschrieben. Heber und Li zeigten, dass diese Mäuse keine erhöhte Sensitivität gegenüber Zelltod haben (Heber et al., 2000; Li et al., 1996), wohingegen andere ein reduziertes Gewicht, sinkendes Überleben, steigende Apoptose, gemindertes Neuritenwachstum und Defizite im spatialen Lernen zeigten (Anliker and Müller, 2006; Dawson et al., 1999). Die Doppel-KOs von APP + APLP2 und APLP1 + APLP2 sowie die Triple-KOs von allen drei Genen sind postnatal letal (Heber et al., 2000; Herms et al., 2004).

APP ist wichtig für die Gehirnentwicklung und ist die Hauptferroxidase in kortikalen Zellen (Duce et al., 2010; Salbaum and Ruddle, 1994). Sowohl APP als auch die beiden APLPs bilden Homo- und Heterodimere, die als Trans-Dimer die intrazelluläre Adhäsion fördern (Soba et al., 2005). Durch die Cis-Dimerisierung von APP wird der JNK-Kinase Weg aktiviert, welcher zur Apoptose führt (Bouron et al., 2004; Mbebi et al., 2002).

Umstritten ist, ob das Transmembranprotein APP selbst als Rezeptor fungieren kann. Die extrazelluläre Domäne kann Matrixproteine wie Heparin, Kollagen und Laminin binden und der C-Terminus besitzt eine G-Protein Bindedomäne, mit der APP als G-Protein gekoppelter Rezeptor fungieren könnte (Ho and Südhof, 2004).

APLP1 und APLP2 zeigen strukturell große Ähnlichkeit zu APP. Hauptunterschied ist das Fehlen der A β Domäne (Jacobsen and Iverfeldt, 2009). Die Eigenschaften von den beiden Proteinen sind nur wenig untersucht.

Die Funktionen der AICD

Durch die Bindung der AICD an Transkriptionsfaktoren (Cao and Südhof, 2001; Müller et al., 2008), kann diese als Transkriptionsregulator Einfluss auf die Zellmigration, die Zell-Zell-Kommunikation, apoptotische Signalwege und den axonalen Transport nehmen (Beckett et al., 2012; Zheng and Koo, 2006). AICD überexprimierende Mäuse zeigen eine AD-ähnliche Charakteristik mit hyperphosphorylierten Tau, A β Plaques, Neurodegeneration und Erinnerungsdefiziten (Ghosal et al., 2009).

Die Funktionen von A β

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben spielt A β als Hauptbestandteil der amyloidogenen Plaques eine wichtige Rolle bei den Prozessen, die zu AD führen. A β_{42} kann toxische Effekte induzieren, oxidativen Stress steigern und funktionelle Synapsen reduzieren (Catalano et al., 2006; Evans et al., 2008; Hayashi et al., 2004; Recuero et al., 2010). Die Aufnahme von A β Oligomeren in die Zelle führt zu einer gesteigerten Neurotoxizität (Chasseigneaux and Allinquant, 2012).

In der Literatur wird A β_{42} aber nicht nur als neurotoxisch beschrieben, sondern scheint in geringen Konzentrationen neurotrophisch zu sein. A β ist in der Gehirnentwicklung wichtig für die normale Gehirnentwicklung und kann außerdem das Überleben von sich entwickelnden Neuronen unter Mangel an neurotrophen Faktoren induzieren und reife Neuronen vor dem exzitotoxischen Zelltod schützen (Chasseigneaux and Allinquant, 2012).

Zusammengefasst ist A β als Monomer wichtig für die Gehirnentwicklung und für Neurone. Lediglich als Oligomer besitzt es negativen Einfluss auf die Zellen. Die AD Forschung sollte in Bezug auf A β einen Schwerpunkt auf die Oligomer Bildung und die Inhibition dieser bzw. auf den Abbau der Oligomere legen.

Die Funktionen von sAPP α und sAPP β

Bei der nicht-amyloidogenen Spaltung von APP entsteht das lösliche Prozessierungsprodukt sAPP α . Dieses ist neuroprotektiv und kann die synaptische Plastizität, das Neuronenwachstum und die Synaptogenese steigern (siehe Tabelle 1.1.1) (zur Übersicht Kögel et al., 2012). Außerdem kann sAPP α in neuronalen Stammzellen die Differenzierung in Astrozyten stimulieren (Kwak et al., 2006) und durch Störung der Dimerisierung des APP neuroprotektiv wirken (Gralle et al., 2009). In embryonalen kortikalen Neuronen konnte die Zelladhäsion und das Dendritenwachstum durch sAPP α gesenkt und gleichzeitig das axonale Wachstum gesteigert werden (Chasseigneaux et al., 2011).

Die zwei HSPGs des sAPP α sind für die Neuroprotektion wichtig, wobei es in der Literatur umstritten ist, welches der beiden HSPGs wirksamer ist (Corrigan et al., 2011, 2014; Furukawa et al., 1996; Small et al., 1994). Durch die Bindung von Zink kann die Affinität der HSPG um das 2- bis 5-fache erhöht werden (Multhaup et al., 1994).

Tabelle 1.1.1. Funktionen von sAPP α

Publikation	Funktion von sAPPα
Mattson et al., 1993	Protektive Wirkung gegen hypoglykämische Schäden und Glutamat-Toxizität in Neuronen
Schubert and Behl, 1993	Gesteigertes Neuritenwachstum und Neuroprotektion gegen A β und Glutamat-Toxizität
Goodman and Mattson, 1994	Protektion vor A β induzierten oxidativen Schäden
Roch et al., 1994	Gesteigerte synaptische Dichte und Retention durch sAPP α
Smith-Swintosky et al., 1994	Protektive Wirkung bei ischämischen Gehirnverletzungen
Mattson et al., 1999	Zunahme des basalen Glukose und Glutamat Transportes und Verhinderung oxidativer Schäden
Caillé et al., 2004	Erhöhte Proliferation von Vorläuferzellen der adulten Subventrikularzone
Kögel et al., 2005	sAPP α reduziert die Stress-induzierte Aktivierung des JNK Signalweges
Hornsten et al., 2007	Das <i>C. elegans</i> ortholog von sAPP α verhindert die larvale Letalität von Nematoden mit APL-1 Mutation
Ikin et al., 2007	Gesteigertes axonales Wachstum in frühen Stadien der Embryogenese
Ring et al., 2007	sAPP α reduziert die anatomischen, elektrophysiologischen und Verhaltens-Abnormalitäten von APP Knockout Mäusen
Gakhar-Koppole et al., 2008	Gesteigertes Neuritenwachstum durch Depolarisation ist abhängig von sAPP α
Gralle et al., 2009	Verhinderung der APP-Dimerbildung und Schutz vor Hunger-induzierten Zelltod in Neuroblastomzellen
Chasseigneaux et al., 2011	Verminderte Zelladhäsion und gesteigertes axonales Wachstum
Copanaki et al., 2010	Protektive Wirkung gegen Dendriten-Degeneration und neuronalen Zelltod durch proteasomalen Stress

In der Literatur werden verschiedene mögliche Rezeptoren für sAPP α diskutiert. Eine Möglichkeit ist, dass sAPP α über den IGF-1 Rezeptor und den Insulin-Rezeptor wirkt (Jimenez et al., 2011). Auch das nicht proteolytisch gespaltene APP wird als möglicher Rezeptor analysiert. Studien zeigten, dass eine verlängerte Lebensspanne durch sAPP α nur in Zellen mit nicht prozessierten APP beobachtet werden kann (Gralle et al., 2009). Indirekt konnte die Abhängigkeit auch in einem Mausmodell, das sAPP α überexprimiert, aber weder das komplette APP noch APLP2 hat, gezeigt werden. Diese sAPP α -Doppelmutanten Mäuse, weisen im Gegensatz zu Mäusen mit APP muskuläre Schwächen, eine reduzierte Vesikelfreisetzung und Defizite im Hippocampus abhängigen Lernen und dem Erinnerungsvermögen auf (Weyer et al., 2011).

Der genaue molekulare Mechanismus über den sAPP α wirkt, konnte noch nicht gezeigt werden (Kögel et al., 2012). Bislang ist bekannt, dass die PI3K, AKT und ERK involviert sind. So wird durch sAPP α der PI3K Weg aktiviert, welcher über AKT GSK3 β inhibiert, wodurch wiederum pro-apoptotische Gene gehemmt werden (Jimenez et al., 2011). Andererseits erfordert die Senkung der Zelladhäsion und Erhöhung des axonalen Wachstums den MAPK/ERK Weg.

Auf Grund der protektiven Eigenschaften von sAPP α wurde in der Alzheimer Forschung ein Schwerpunkt auf die Regulierung der α -Sekretase gesetzt, die APP innerhalb der A β -Sequenz prozessiert, sodass sAPP α entsteht. Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Aktivität der Haupt- α -Sekretase ADAM10 zu einer höheren Konzentration an sAPP α und verringerten A β -Spiegeln führt (Endres and Fahrenholz, 2012). Durch die Aktivitätssteigerung kommt es zu einer Induktion der kortikalen Synaptogenese und zu einer Reduzierung von Kainat-induzierten Krampfanfällen in APP Mäusen (Bell et al., 2008; Clement et al., 2008). In AD-Mausmodellen konnte beobachtet werden, dass eine moderate Überexpression von ADAM10 die kognitiven Defizite verringert (Postina et al., 2004). Studien haben gezeigt, dass die Promotorregion der α -Sekretase ADAM10 eine Retinoid-Rezeptor-Bindestelle besitzt und durch Retinoide wie Acitretin die Proteinexpression von ADAM10 gesteigert werden kann (Prinzen et al., 2005; Tippmann et al., 2009). Acitretin ist bereits als Medikament gegen Schuppenflechte zugelassen und gilt als ungefährlich in der Langzeittherapie. Auf Grund dieser Tatsachen wird Acitretin zur Zeit in einer klinischen Studie an der Universitätsmedizin in Mainz als mögliches Medikament gegen AD erforscht (Endres and Fahrenholz, 2012).

Im Gegensatz zu sAPP α wurden die Eigenschaften von sAPP β bislang nur wenig untersucht (Chasseigneaux and Allinquant, 2012). Obwohl sich die beiden löslichen Prozessierungsprodukte sAPP α und sAPP β nur in 16 Aminosäuren unterscheiden, wurde in der Studie von Furukawa et al. gezeigt, dass sAPP β im Vergleich zu sAPP α eine 100-fach niedrigere Protektion vor Exzitotoxizität aufweist (Furukawa et al., 1996) und keinen protektiven Effekt auf die durch den Proteasom-Inhibitor Epoxomicin ausgelöste Toxizität besitzt (Copanaki et al., 2010). Neuere Studien weisen darauf hin, dass sAPP α und sAPP β ähnliche Funktionen besitzen. Die beiden löslichen Prozessierungsprodukte von APP senken die Zelladhäsion und steigern das axonale Wachstum bei gleichen eingesetzten Konzentrationen (Chasseigneaux et al., 2011). Das sAPP β kann wie auch das sAPP α Mikroglia stimulieren und die neuronale Differenzierung wird durch sAPP β stärker stimuliert als durch sAPP α (Barger and Harmon, 1997; Freude et al., 2011). Brinkmalm et al. entdeckten in ihrer Studie mehrere Prozessierungsstellen für die α - und die β -Sekretase. Das sAPP α kann demnach bei Q686 oder bei K687 (bei APP₇₇₀) enden, sAPP β bei M671 und Y681 (Brinkmalm et al., 2013).

1.2. Der Einfluss der Alterung auf neurodegenerative Erkrankungen

Die Alterung spielt eine sehr große Rolle bei AD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Huntington und die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Kikis et al., 2010).

Alterung ist ein Prozess, der Organismen ein Leben lang begleitet, mit nicht umkehrbaren biologischen Veränderungen einhergeht und im Tod endet. Zu den Gründen der Alterung gibt es zahlreiche Theorien. Unter anderem werden die Inflammation, die replikative Seneszenz, die Telomer-Theorie und die freien Radikale als mögliche Gründe diskutiert (Behl, 2012; Behl and Ziegler, 2013). Die Inflammation spielt insbesondere eine Rolle bei der Alterung des Nervensystems. In jungen Jahren sind Entzündungen hilfreich und verbessern die Gegenwehr gegen Pathogene, im Gegensatz führt die Inflammation im Alter zu chronischen Erkrankungen (Cheney and Walford, 1974; Sergio, 2008).

Erstmals 1961 wurde von Hayflick die replikative Seneszenz beschrieben. Er stellte fest, dass Säugetierzellen in Kultur nur eine definierte Anzahl von Teilungen durchführen können, die durch die Aktivität bestimmter Genprodukte begrenzt wird (Hayflick and Moorhead, 1961). Weiterhin wird die Telomer-Theorie als einer der möglichen Gründe der Alterung diskutiert. Diese besagt, dass mit jeder Zellteilung sich die Länge der Telomere an den Chromosomen verkürzt. Ab einer bestimmten Länge der Telomere kann sich die Zelle nicht mehr teilen und wird seneszent (Allsopp and Harley, 1995). Die Theorie der freien Radikale wurde erstmals in den 60iger Jahren beschrieben. In den Zellen werden kontinuierlich reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies gebildet. Diese Spezies sind wichtig für die physiologische Funktion der Zellen, jedoch führt ein Ungleichgewicht zwischen Entstehung und Detoxifizierung zu einem Überschuss an freien Radikalen, die verschiedene Moleküle wie Fette oxidieren und zu Zellschäden führen (Harman, 1965).

In altersbedingten Krankheiten treten häufig Fehlfaltung, Aggregation und Akkumulation von Proteinen auf. Diese fehlgefalteten Oligomere und Aggregate haben zytotoxische Eigenschaften und führen zu Zelltod und Gewebeschäden (Cuanalo-Contreras et al., 2013). In gesunden Zellen werden die Proteine durch die Protein-Qualitätskontrolle (PQC) (siehe Kapitel 1.3) in die natürlich Konformation gefaltet oder abgebaut, wodurch eine Akkumulation oder Aggregation von fehlgefalteten Proteinen verhindert wird. Der Abbau von Proteinen kann über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) oder die Autophagie erfolgen (siehe Kapitel 1.3). Bei der Proteinhomeostase ist im Laufe der Alterung eine veränderte Aktivität zu beobachten. In jungen Organismen werden Proteine hauptsächlich über das UPS abgebaut. Im Alter nimmt die Kapazität der Proteinrückfaltung und die Aktivität des UPS ab, wohingegen die Aktivität der Autophagie zunimmt (Cuervo and Dice, 2000). Die Steigerung der Autophagie im Alter stellt einen adaptiven

Prozess der PQC auf die sinkende UPS Aktivität dar (Gamerding et al., 2009). Trotz dieses adaptiven Prozesses kommt es zu einer erhöhter Bildung von Proteinaggregaten, die zu altersbedingten Krankheit führen kann (Cuervo and Dice, 2000).

Eine stabilisierte Proteinhomöostase wirkt sich vorteilhaft auf altersabhängige Krankheiten wie AD und im Allgemeinen auch auf die Lebensspanne aus (Komatsu et al., 2006). Die Steigerung der Autophagie führt zu weniger Huntingtin Aggregaten in *D. melanogaster* und *Mus musculus* (*M. musculus*) und in einem AD-Mausmodell zu einer reduzierten Pathologie. Durch kalorische Restriktion konnte die Lebensspanne verschiedener Organismen verlängert werden. Die kalorische Restriktion aktiviert hierbei die Autophagie und bewirkt somit die Lebensverlängerung. Auch durch eine Erhöhung der UPS Aktivität kann eine Verlängerung der Lebensspanne erreicht werden. Beispielsweise hat der Nacktmul eine Lebensspanne von 30 Jahren, die auf die 3- bis 6-fach höhere UPS Aktivität zurückgeführt wird. Hingegen führte eine Inhibition des UPS in Ratten zu Parkinson ähnlichen Symptomen (Cuanalo-Contreras et al., 2013).

1.3. Die Proteinhomöostase

Für die korrekte Funktion und das Überleben einer Zelle ist eine permanente Überprüfung der korrekten Konformation und Faltung von Proteinen notwendig. Missgefaltete und irreversibel geschädigte Proteine müssen erkannt und entfernt werden (Broadley and Hartl, 2009). Im Fall von AD führt die Aggregation von A β und NFT's zu einer Fehlfunktion der Zelle, die zum Zelltod führt.

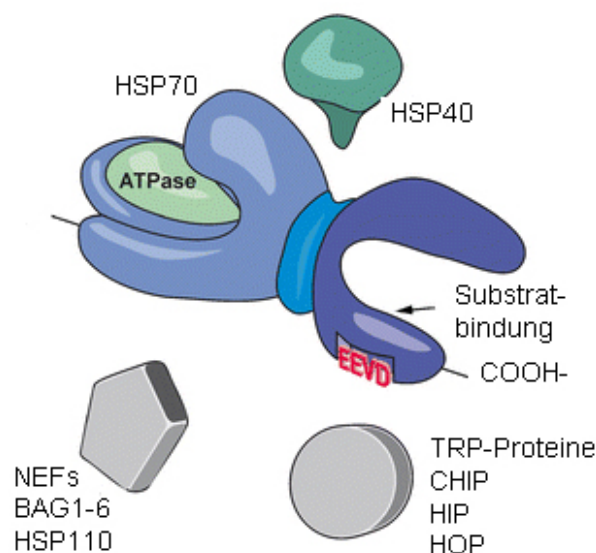


Abbildung 1.3.1. Abbildung des Hsp70-System und seine Co-Chaperone. Modifiziert nach (Gamerding et al., 2011a)

Die Kontrolle der korrekten Konformation wird auch als PQC bezeichnet, dabei spielen molekulare Chaperone eine wichtige Rolle (Balch et al., 2008). Chaperone sind Proteine, welche bei der

Proteinfaltung und Rückfaltung durch Interaktion für die korrekte physiologische Konformation sorgen (Ellis, 2007). Hitzeschockproteine (Hsp) sind molekulare Chaperone, die unter Stressbedingungen hochreguliert werden und bei der Proteinfaltung helfen (Balch et al., 2008). HSPs benötigen sogenannte Co-Chaperone, die ihre Aktivität beeinflussen. Das Chaperon Hsp70 ist ein sehr wichtiger Faktor bei der PQC, dessen erhöhte Spiegel eine Proteinaggregation verhindern. Für Hsp70 ist eine große Gruppe an Co-Chaperonen bekannt, die entweder die Proteinfaltung begünstigen oder die Chaperon Aktivität von Hsp70 inhibieren und das gebundene Substrat einem Proteinabbauweg zuführen (Chang et al., 2007; Tang et al., 2007). Beispielsweise sind die Bag Proteine als Co-Chaperone wichtige Mediatoren, diese verbinden Hsp70 durch Bag1 mit dem UPS und durch Bag3 mit der Autophagie (Gamerding et al., 2011a; Takayama and Reed, 2001).

1.3.1. Der proteasomale Abbauweg

Das UPS ist das vorrangige System in der Zelle für den Abbau von kurzlebigen, beschädigten und fehlgefalteten Proteinen. Für den Abbau muss das Substrat poly-ubiquitiniert werden, hierbei wird zunächst das C-terminale Ende des Ubiquitins durch ATP-abhängige Phosphorylierung aktiviert, an das aktivierende Enzym E1 gebunden und anschließend auf E2 übertragen. Die E3 Ligase transferiert das Ubiquitin dann von E2 auf das Substrat (Hershko et al., 1983; Meiners et al., 2008; Powell, 2006). Die weitere Ubiquitinierung erfolgt über die Lysine K48 oder K63 (Komander, 2009).

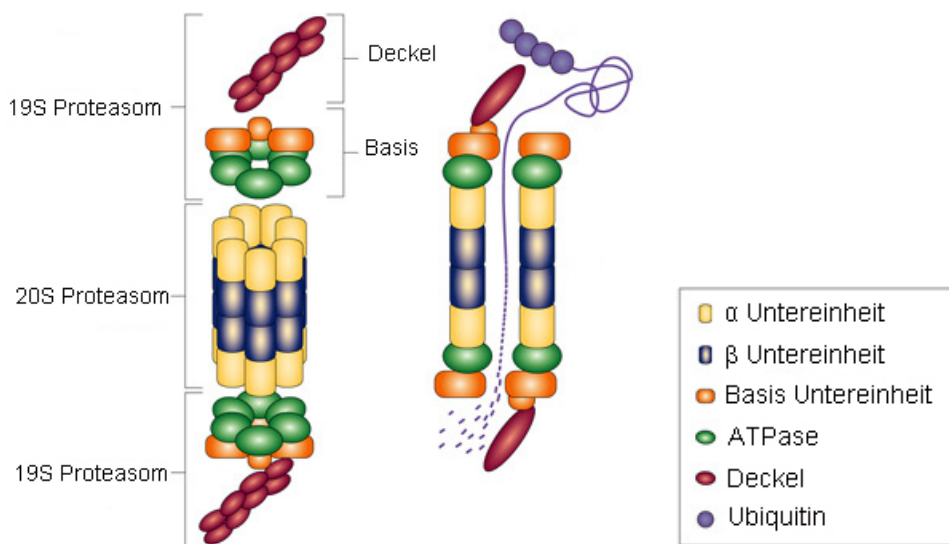


Abbildung 1.3.2. Aufbau des 26S Proteasoms modifiziert nach (Sullivan et al., 2003). Details siehe Text.

Der Abbau der Proteine findet am 26S Proteasom statt. Dieses ist ein Multi-Untereinheiten-Komplex, welcher sich aus dem 19S und 20S Proteasom zusammensetzt. Das 20S Proteasom ist die katalytische Untereinheit und besteht aus vier Heptamerringen, die jeweils aus zwei Klassen von sieben nicht-identischen aber homologen Untereinheiten aufgebaut sind. Die äußeren Ringe enthalten die α -

Untereinheit und sind funktionell für den Substrateingang verantwortlich, die inneren Ringe bestehen aus der β -Untereinheit und haben Peptid-hydrolysierende Aktivität (Zouambia et al., 2008). Insgesamt hat das 20S Proteasom sechs proteolytische Stellen, zwei Chymotrypsin-ähnliche, zwei Trypsin-ähnliche und zwei Caspase-ähnliche Stellen (Lee and Goldberg, 1998). Das 19S Proteasom ist die regulatorische Untereinheit des 26S Proteasoms. Es besteht aus einer Bindestelle für poly-ubiquitinierte Proteine, einem Enzym, das die Proteine deubiquitiniert und sechs ATPasen, die einen Ring bilden und eine Chaperon-ähnliche Funktion besitzen. Die Chaperon-ähnliche Funktion des 19S Proteasom entfaltet die Proteine, so dass sie im 20S Proteasom das katalytische Zentrum erreichen können. Das 19S Proteasom bindet in flexibler Art an das 20S Proteasom (Zouambia et al., 2008). Die Entfaltung der Substrate kann auch ATP-unabhängig durch das 11S Proteasom erfolgen (Coux et al., 1996; Kloetzel, 2001). Polypeptide werden durch das UPS in zwei bis 20 Aminosäuren lange Peptide gespalten, die dann durch andere Peptidasen weiter in einzelne Aminosäuren prozessiert werden (Lee and Goldberg, 1998).

Inhibitoren des Proteasoms

Die Aktivität des Proteasoms kann durch verschiedene Inhibitoren moduliert werden. Wobei die meisten Inhibitoren die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S Proteasoms beeinflussen. So auch das häufig verwendete MG-132. Hierbei handelt es sich um ein Peptid-aldehyd, welches reversibel durch Modifikation der katalytischen Hydroxylgruppe der Threonine die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms inhibiert (Chitra et al., 2012). Peptid-aldehyde inhibieren zusätzlich zum Proteasom auch lysosomale Cystein-Proteasen und Calpaine (Lee and Goldberg, 1998). Ein weiterer Inhibitor ist das Epoxomicin, das zur Gruppe der Epoxyketone gehört. Diese wirken über einen zwei Schritt Mechanismus auf das Proteasom (Chitra et al., 2012).

Die Inhibition des Proteasoms führt zu einer Ansammlung von ubiquitinierten und fehlgefalteten Proteinen sowie reaktiven Sauerstoffspezies (Huber and Groll, 2012). Als Ausgleich wird die Bag3 Expression erhöht und die Autophagie aktiviert, um die fehlgefalteten Proteine abzubauen (Gamerdinger et al., 2009).

1.3.2. Die Autophagie

Der zweite Protein-degradations-Weg der Zelle ist die Autophagie. Das Wort Autophagie kommt aus dem Griechischen und bedeutet so viel wie „sich selbst essen“. Unter Stressbedingungen wie Hunger ist die Autophagie aktiv und liefert durch ihre Prozesse Nährstoffe und fördert das Überleben der Zelle. Auch in der Entwicklung ist die Autophagie ein wichtiger Prozess. Durch autophagische Prozesse wird die Oozyte nach der Fertilisation bis zur Verbindung mit dem maternalen Blutsystem

mit Nährstoffen versorgt (Rabinowitz and White, 2010). Im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen ist zu beobachten, dass ein Defekt in den autophagischen Prozessen zu einer stärkeren Ausprägung der Symptome führt (Fleming et al., 2011).

Die Autophagie baut nicht nur Proteine sondern auch ganze Organellen wie Mitochondrien (Mitophagie), das Endoplasmatische Retikulum (Retikulophagie) und Peroxisomen (Pexophagie) ab (Mathew et al., 2009). Die Autophagie wird bislang in drei verschiedene Wege unterteilt: die Makroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie und die Mikroautophagie (Choi et al., 2013).

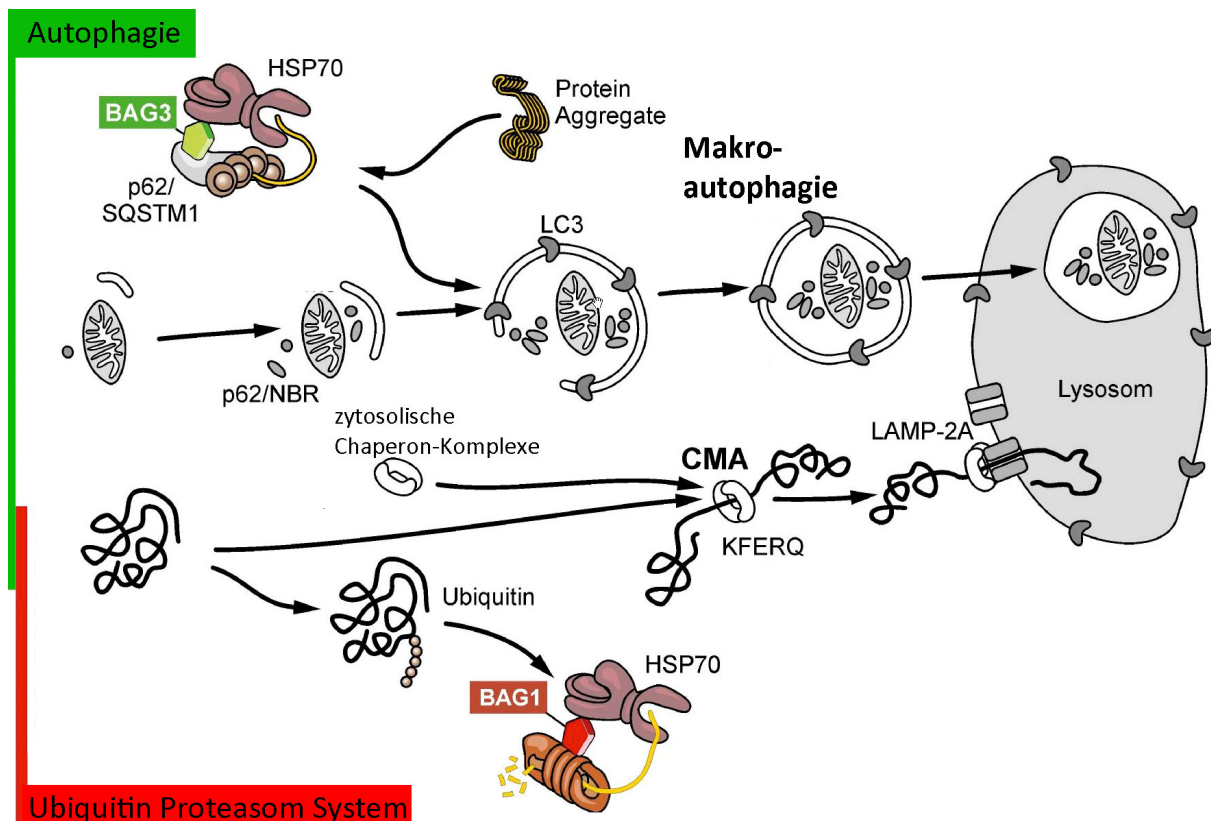


Abbildung 1.3.3. Die verschiedenen Wege der Autophagie: die Makroautophagie (siehe Kapitel 1.2.2.1) und die Chaperon-vermittelte Autophagie (siehe Kapitel 1.2.2.2), modifiziert nach (Morawe et al., 2012).

Die Makroautophagie

Die Makroautophagie ist ein Prozess, der in vier Schritte unterteilt wird: Initiation, Elongation, Einschluss und Fusion (He and Klionsky, 2009; Mizushima et al., 2011). Dabei wird zunächst zytosolisches Material von einer Doppelmembran umschlossen. Das so entstandene Autophagosom verschmilzt anschließend mit Lysosomen (Kuma and Mizushima, 2010). Eine Reihe von Proteinkomplexen bestehend aus *atg*-Genprodukten reguliert die Autophagie. Am Anfang des Prozesses spielt der negative Regulator der Autophagie mTOR (*mammalian target of rapamycin complex 1*) eine wichtige Rolle. In seiner aktiven Form inhibiert mTOR die Autophagie, indem der

ULK1-Atg13-Fip200 Komplex gebunden wird. Bei Hunger oder unter Stressbedingungen wird mTOR inhibiert und der ULK1-Atg13-Fip200 Komplex löst sich und aktiviert die Autophagie. Die Initiation wird außerdem durch den Beclin1-Atg14-PI3K Komplex reguliert. Für die Elongation der Phagophore ist der Atg12-Atg5-Atg16L1 Komplex wichtig (Rabinowitz and White, 2010).

Das Protein LC3 (*microtubuli associated protein1 light chain 3*) wird gewöhnlich als Marker der Autophagie verwendet. Durch E1 ähnliche Aktivität spaltet Atg7 das zytoplasmatische LC3-I in membrangebundenes LC3-II. Dieses ist an die innere und äußere Membran der Autophagosomen gebunden und kann LC3 interagierende Proteine wie p62 und Nbr1 binden. Diese beiden Proteine werden oft auch als Ubiquitin-Rezeptoren bezeichnet, da sie simultan poly-ubiquitinierte Proteine und LC3 binden können (Kirkin et al., 2009). Durch Bag3 werden Hsp70-Substrate aktiv entlang der Mikrotubuli zu den Rezeptoren p62 und Nbr1 transportiert (Gamerding et al., 2011b).

In Säugerzellen werden fehlgefaltete Proteine und autophagische Vakuolen zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum gebracht. Bei intensiver Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen, die nicht sofort abgebaut werden können, bilden sich dort so genannte Aggresomen. Aggresomen sind zytoplasmatische Einschlusskörper, die aggregierende Proteine beinhalten. Die Bildung von Aggresomen verhindert die Interaktion von fehlgefalteten Proteinen mit intakten Proteinen und ist somit zytoprotektiv (Cuanalo-Contreras et al., 2013).

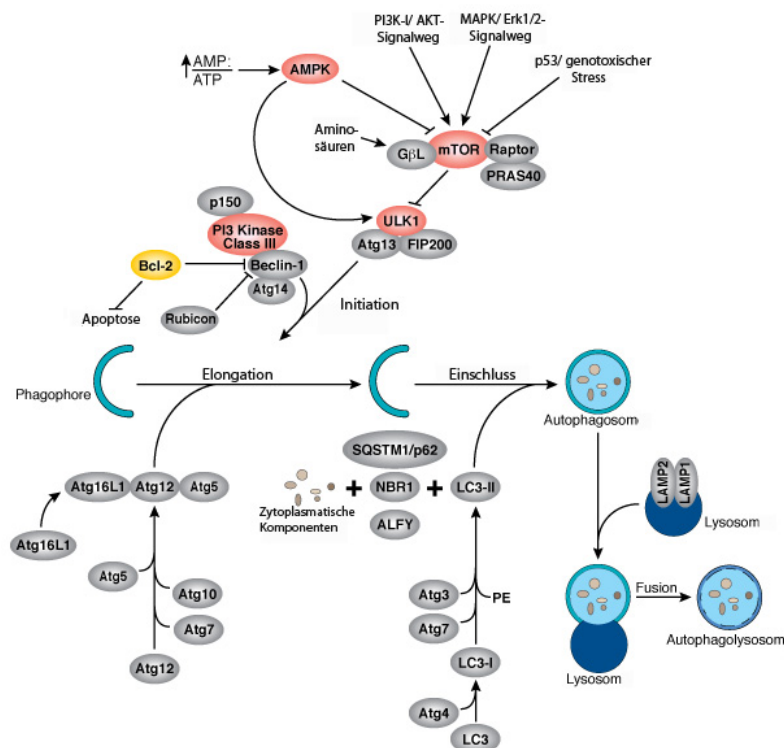


Abbildung 1.3.4. Der Prozess der Makroautophagie, Details siehe Text (modifiziert nach Cell Signaling, 2013).

Chaperon-vermittelte Autophagie und Mikroautophagie

Die Chaperon-vermittelte Autophagie ist ein hoch-selektiver Abbauprozess. Hierbei werden Proteine mit KFERQ-Aminosäuren-Sequenz durch Hsp70 erkannt, durch Co-Chaperone entfaltet und zum Lysosomen transportiert. Der Hsp70-Substrat-Komplex bindet an Lamp2a und wird in das Innere der Lysosomen transportiert (Kaushik and Cuervo, 2012).

Bei der Mikroautophagie gelangen kleine Teile des Zytoplasma direkt über Invagination der Lysosomenmembran und anschließender Abschnürung ins Innere der Lysosomen (Mijaljica et al., 2011).

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

Mehr als 95 % der Alzheimer Erkrankungen treten sporadisch auf, deren größter Risikofaktor das Altern ist (Kikis et al., 2010; Selkoe, 2001). Dabei spielt die Proteinhomöostase und damit der Abbau von schädlichen A β Plaques und NFT's eine große Rolle. So können durch die Veränderung im Proteinabbau im Alter Proteinaggregate akkumulieren (Cuervo and Dice, 2000). Das APP kann auf zwei Wegen prozessiert werden. Bei dem amyloidogenen Weg entsteht A β , bei dem nicht amyloidogenen Weg entsteht das sAPP α . Dieses wird als zytoprotektiv beschrieben und häufig als Therapieansatz für AD untersucht (Kögel et al., 2012). Der Zusammenhang zwischen der Zytoprotektion und einem möglichen Einfluss auf die Proteinhomöostase wurde bislang noch nicht untersucht, könnte aber von Bedeutung für die Behandlung von Alzheimer sein. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund der Einfluss von sAPP α auf die Proteinhomöostase untersucht.

Für die Analysen wurden primäre humane Lungenfibroblasten (IMR90) als zelluläres Alterungsmodell charakterisiert. Bereits 1961 wurde entdeckt, dass humane Fibroblasten nur eine eingeschränkte Proliferationskapazität besitzen und sich durch ihre definierte Lebensspanne als zelluläres Alterungsmodell eignen (Hayflick and Moorhead, 1961). Junge und alte IMR90 Kulturen wurden mit löslichem rekombinanten sAPP α behandelt und die Expression wichtiger Proteine der Autophagie und des UPS untersucht. Zusätzlich wurde auch analysiert, inwiefern die N-terminale Domäne APP E1 Einfluss auf die Proteinhomöostase hat. In weiteren Versuchen wurde analysiert, ob sAPP α und APP E1 die Autophagie unter proteasomalen Stressbedingungen reguliert. Hierbei wurde neben Proteinspiegeln und Zellüberleben, auch die Anzahl bzw. Bildung von Aggresomen und die Verteilung eines Autophagie-Substrates betrachtet. Darauf aufbauend wurde der Abbau eines Proteasom-Substrates, die Aktivität des UPS und die Expression von proteasomalen Genen bestimmt. Einige dieser Versuche wurden im Anschluss mit sAPP β wiederholt, um festzustellen, ob sAPP β einen ähnlichen Einfluss auf die Proteinhomöostase hat wie sAPP α .

Immer wieder wird postuliert, dass APP der Rezeptor von sAPP α ist (Ho and Südhof, 2004). Diese Hypothese wurde mittels transientem Knockout von APP und/oder APLP2 in den IMR90 Zellen untersucht.

Zur Überprüfung der *in vivo* Relevanz von sAPP α wurden Mäusen mit Knockout von APP und/oder APLP2 und Mäuse die nur sAPP α , aber kein komplettes APP exprimieren, analysiert. Dabei wurden die Proteinkonzentrationen wichtiger Marker der Proteinhomöostase betrachtet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Zellkultur

Inkubatoren	Binder, Tuttlingen
Sterilbänke	Heraeus/Thermo Scientific, Waltham
Absaug-System VacuSafe	Integra Biosciences, Zizers
Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Göttingen
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus/Thermo Scientific, Waltham
Nucleofector	Lonza, Basel
Axiovert 200	Zeiss, Göttingen
Binokular Stemi 2000-C	Zeiss, Göttingen
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott, Mainz

Proteinbiochemie

Mikrotiterplatten-Lesegerät Multiskan SR	Thermo Scientific, Waltham
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
UltrasonicProcessor UP50H	Hielscher, Teltow
Power Pack 300	Bio-Rad, München
Mini-Protean III Western Blotting System	Bio-Rad, München
Chemilumineszenzsystem Fusion-SL, 3500-WL	Peqlab, Erlangen
Homogenisator Potter S	Sartorius, Göttingen
Konfokales Laser-scanning-Mikroskop LSM710	Zeiss, Göttingen
Victor ³ V 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer/Wallac, Rodgau
Spektrophotometer	Beckmann, München
pH-Meter C6825	inoLab, Weilheim
Biologic Duo Flow	Bio-Rad, München
BiologicBioFracFractionCollector	Bio-Rad, München
Biologic Optics Module UV-Detektor	Bio-Rad, München
DU 800 Spectrophotometer	Beckmann Coulter, Krefeld

Molekularbiologie

Thermozykler T Professional basic	Biometra, Göttingen
iQ Real-Time-PCR Thermozykler	Bio-Rad, München

Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Perfect Spin	Peqlab, Erlangen
Nano Drop 1000	Peqlab, Erlangen
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Waltham

Mikrobiologie

Zentrifuge RC-5B	Sorvall/Thermo Scientific, Waltham
Zentrifuge Universal 32R	Hettich, Tuttlingen
Certomat H	Sartorius, Göttingen
Certomat S II	Sartorius, Göttingen

2.1.2. Chemikalien und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Abbott (Wiesbaden), AppliChem (Darmstadt), BD (Franklin Lakes), BioLine (London), Bio-Rad (München), Enzo (Lörrach), Expedeon (Harston), Invitrogen (Carlsbad), LC Laboratories (Woburn), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), New England BioLabs (Ipswich), Peqlab (Erlangen), Promega (Madison), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder Thermo Scientific (Waltham) erworben und jeweils nach Angaben des Herstellers aufbewahrt und verwendet.

2.1.3. Lösungen und Puffer

2.1.3.1. Zellkultur

Zellkulturmedium

IMR90	DMEM (1 g/l Glucose; Natriumpyruvat; L-Glutamin)
	1 % Antibiotika, Antimykotika
	10 % inaktives fetales Kälber Serum (FCS)
Hek 293	DMEM (4,5 g/l Glucose; L-Glutamin)
	1 % Natriumpyruvat
	1 % Antibiotika, Antimykotika
	10 % inaktives FCS
Primäre Zellen	Neurobasalmedium
	50x B27-Supplement
	0,5 % Gentamicin
	1 mM Glutamax

Elektroporationspuffer

135 mM	KCl
0,2 mM	CaCl ₂
2 mM	MgCl ₂
5 mM	EDTA
10 mM	HEPES pH 7,5
25 %	inaktives FCS

MTT-Lösung

5 mg/ml	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide in PBS
---------	--

Solubilisierungslösung

1 %	Essigsäure
40 %	Dimethylformamid
10 %	Natriumdodecylsulfat (SDS)
→ pH 4,0	

2.1.3.2. Proteinbiochemie

Lysispuffer

50 mM	Tris-HCl
2 %	SDS
10 %	Saccharose
→ pH 6,8	

4x Trenngelpuffer

1,5 M	Tris-Base
0,4 %	SDS
→ pH 8,8	

4x Sammelgelpuffer

0,6 M	Tris-Base
0,4 %	SDS
→ pH 6,8	

1x Laufpuffer

2,5 mM	Tris-Base
25 mM	Glycin
0,01 %	SDS

1x Transferpuffer

2,5 mM	Tris-Base
25 mM	Glycin
20 %	Methanol

5x Auftragspuffer

40 ml	1,25 M Tris-HCl pH 6,8
50 ml	100 % Glycerol
0,01 %	Bromphenolblau
8 %	SDS
25 %	β -Mercaptoethanol

PonceauS-Lösung

0,01 %	Essigsäure
0,005 %	PonceauS

1x PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$
1,8 mM	KH_2PO_4
→ pH 7,4	

1x PBST

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$
1,8 mM	KH_2PO_4
0,05 %	Tween20
→ pH 7,4	

Blockierungspuffer 1

4 %	Milchpulver
	in PBST

Blockierungspuffer 2

3 %	BSA
0,5 %	Triton X-100
	in PBS

ECL-Lösungen

Lösung A

0,1 M	Tris-HCl pH 8,6
0,025 %	Luminol

Lösung B

0,11 %	Para-Hydroxycoumarinsäure
	in DMSO

FPLC-Waschpuffer 1

300 mM	KCl
50 mM	KH_2PO_4
5 mM	Imidazol
→ pH 8,0	

FPLC-Waschpuffer 2

300 mM	KCl
50 mM	KH_2PO_4
10 mM	Imidazol
→ pH 8,0	

FPLC-Elutionspuffer

300 mM KCl
50 mM KH_2PO_4
250 mM Imidazol
→ pH 8,0

Eindeckmedium

10 % Polyvinylalkohol
70 % PBS
30 % Glycerol
0,1 % p-Phenyldiamin
→ pH 8,0

Suc-Puffer 1

10 mM HEPES
10 mM Kaliumacetat
1,45 mM Magnesiumacetat
1 mM Dithiothreitol (DTT)
→ pH 7,6

Suc-Puffer 2

15 mM HEPES
130 mM Kaliumacetat
1,5 mM Magnesiumacetat
1,5 mM CaCl_2
2 mM DTT
→ pH 7,6

2.1.3.3. Mikrobiologie

Kaliumphosphatpuffer

132 ml 1 M K_2HPO_4
868 ml 1 M KH_2PO_4
→ pH 6,0

BMGY Medium

1 % Hefeextrakt
2 % Pepton
100 mM Kaliumphosphatpuffer
1,34 % Hefe Nitrogen Base
0,0004 % Biotin
1 % Glycerol

BMMY Medium

1 % Hefeextrakt
2 % Pepton
100 mM Kaliumphosphatpuffer
1,34 % Hefe Nitrogen Base
0,0004 % Biotin
1 % Methanol

2.1.4. Modelle

2.1.4.1. Zellkulturmodelle

IMR90	Humane embryonale Lungenfibroblasten (Nichols et al., 1977) Coriell Institut for Medical Research, Camden
Hek 293	Humane embryonale Nierenzellen (Graham et al., 1977)
d2eGFP Hek 293	Stabil transfizierte Hek 293 Zellen (Gamerding et al., 2009)
Primäre Hippocampuszellen	entnommen aus Rattenembryonen (siehe Kapitel 2.2.1.6)
Primäre Kortexzellen	entnommen aus Rattenembryonen (siehe Kapitel 2.2.1.6)

2.1.4.2. Tiermodelle

Ratten

Sprague-Dawley Ratten Bestellt bei JANVIER LABS (St Berthevin)

Mäuse

Die verwendeten Mauslinien stammen aus dem Labor von Prof. Ulrike Müller (Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg) und basieren alle auf dem C57/BL6 Inzuchtmausstamm.

wt Mäuse	Wildtyp Mäuse
APP ^{-/-} Mäuse	Mäuse mit APP Knockout (KO), (Li et al., 1996)
sAPPα ^{+/+} Mäuse	Mäuse mit APP KO und sAPPα Knockin (KI), (Ring et al., 2007)
APLP2 ^{-/-} Mäuse	Mäuse mit APLP2 KO (von Koch et al., 1997)
sAPPα ^{+/+} -DM Mäuse	Mäuse mit APP- und APLP2 KO und sAPPα KI (Aydin et al., 2011)

Hefen

Es wurden Hefen vom Stamm *Pichia pastoris* verwendet. Die hier verwendeten Hefen stammen aus dem Labor von Prof. Stefan Kins (Institut für Humanbiologie und Humangenetik, Technische Universität Kaiserslautern). Die zugehörigen Vektorkarten sind im Anhang unter Kapitel 7.3 zu finden.

<i>P.pastoris</i> -sAPPα	Hefe mit pBLHIS-SX-sAPP695alpha Vektor; die Hefen exprimieren in Anwesenheit von Methanol sAPPα und sekretieren dieses in das Hefemedium
<i>P.pastoris</i> -APP-E1	Hefe mit pBLHIS-SX-APP E1 Vektor; die Hefen exprimieren in Anwesenheit von Methanol das APP E1 Fragment und sekretieren dieses in das Hefemedium

2.1.5. Statistische Auswertung

Zu jedem Experiment wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in der jeweiligen Abbildungsunterschrift angegeben. In den Abbildungen wird der Mittelwert der durchgeführten Experimente dargestellt. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung der entsprechenden Mittelwerte. Die statistische Signifikanz wurde unter der Verwendung von SigmaPlot 12.0 (Systat Software) mittels einfacher ANOVA gefolgt von einem Tukey's Mehrfachvergleichstest ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde in den Abbildungen folgendermaßen gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturtechniken

2.2.1.1. *Kultivierung der Zelllinien*

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 10 ml DMEM resuspendiert. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 4 Minuten (min) bei 800 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem DMEM resuspendiert. Die Zellen wurden auf 10 cm Schalen ausgesät und unter Standardkulturbedingungen (37°C, 5 % CO₂) kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurden die IMR90 Zellen mit erwärmten dPBS (Invitrogen) gewaschen und mit 3 %iger Trypsin-Lösung (Invitrogen) in dPBS für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Hek 293 Zellen wurden mit 1 %iger Trypsin-Lösung bei Raumtemperatur kurz inkubiert. Die Reaktion wurde mit serumhaltigem Medium abgestoppt und die Zellen mechanisch durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 4 min bei 800 g sedimentiert und anschließend in frischem DMEM resuspendiert. Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.2).

Die IMR90 Zellen wurden für die Versuche (siehe Kapitel 2.2.1.8) in 96 oder 24 Well Platten bzw. in 6 oder 10 cm Schalen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ ausgesät. Die Hek 293 Zellen wurden in 24 Well Platten oder 6 cm Schalen in einer Dichte von $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ für Versuche ausplattiert.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf Glas kultiviert. Dafür wurden Deckgläschen (\varnothing 12 mm, VWR) in die Vertiefungen einer 24 Well Platte gelegt und für 30 min bei Raumtemperatur mit 0,1 mg/ml Polyornithin (Sigma-Aldrich) in dPBS beschichtet. Anschließend

wurden die Deckgläschen erst mit dPBS und dann mit Zellkulturmedium gewaschen, bevor die Zellen auf den Platten ausgesät wurden.

2.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden tote und lebende Zellen mittels 1:1 Färbung mit Trypanblau (Sigma-Aldrich) in einer Neubauerzählkammer unterschieden. Trypanblau diffundiert in tote Zellen und ermöglicht somit durch die Blaufärbung die Unterscheidung von toten und lebenden Zellen.

Die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\sum \text{lebende Zellen}}{4} * f * 10^4$$

f = Verdünnungsfaktor der Zellsuspension mit Trypanblau

2.2.1.3. Bestimmung von Populationsverdopplungen

Mit der Populationsverdopplung (PDL) kann das aktuelle Alter der IMR90 Zellen bestimmt werden. Die PDL wurde bei jeder Passage ermittelt und mit folgender Formel berechnet:

$$PDL = \frac{\log C_h - \log C_s}{\log(2)}$$

Dabei ist C_h die Lebendzellzahl geernteter Zellen und C_s die Lebendzellzahl ausgesäter Zellen.

2.2.1.4. Zelluläre Dauerkulturen

Für die Erhaltung der Zelllinien wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu wurden subkonfluente Zellen von den 10 cm Schalen durch Trypsin gelöst. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in DMEM-Zellkulturmedium mit 10 % DMSO (Roth) resuspendiert und in ein Kryogefäß (VWR) überführt.

Die Zellen wurden zunächst in einer mit Isopropanol (Roth) gefüllten Kryobox (Nalgene Cryo Freezing Container, VWR) bei -80°C für 24 bis 48 Stunden (h) eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.2.1.5. Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase Färbung

Die zelluläre Seneszenz der IMR90 Zellen wurde mit der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase Färbung (Sigma-Aldrich) bestimmt. Dazu wurden subkonfluente Zellen in einer 24 Well Platte mit 4 %iger PFA-Lösung fixiert und die Färbung wie im Herstellerprotokoll angegeben durchgeführt.

2.2.1.6. Präparation und Kultivierung neuronaler primärer Zellen

Für die Gewinnung von primären neuronalen Vorläuferzellen wurden aus einer schwangeren Ratte am Tag 17 der Embryonalentwicklung (E17) die Embryonen gewonnen. Nach Betäubung der Ratte mit dem Inhalationsnarkotikum Forene (Wirkstoff: Isofluran; Abbott AG), wurde diese mittels Guillotine enthauptet und die Embryonen entnommen. Nach der Dekaptierung der Embryonen wurden die Köpfe in eiskaltem dPBS gesammelt und die Gehirne vorsichtig isoliert.

Die Präparation des Hippocampus- und des Kortex-Gewebe erfolgte in eiskaltem dPBS unter einem Stereomikroskop. Das Gewebe wurde für die Zeit der Präparation auf Eis in 1x Ca^{2+} - und Mg^{2+} - freier Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen) aufbewahrt.

Um das Gewebe zu dissoziieren wurde es für 20 min in 10 ml 1x Trypsin-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml HBSS mit 10 % inaktivem FCS abgestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend durch eine sterile Gaze mit 50 μm Porenweite (Nybolt Gaze; Eckardt) filtriert und in 7 ml HBSS aufgenommen. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 4 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur wurde das Zellpellet in Neurobasalmedium resuspendiert. Die Lebendzellzahl wurde mittels einer Neubauerzählkammer (siehe Kapitel 2.2.1.2) bestimmt. Die Zellen des Hippocampus und des Kortex wurden in einer Zelldichte von $3,5 \times 10^6$ Zellen pro Kulturplatte auf beschichteten Kulturplatten (TPP) ausgesät. Dafür wurden Kulturplatten mit 0,1 mg/ml Polyornithin in dPBS für mindestens 30 min beschichtet. Die Platten wurden vor dem Aussäen der Zellen mit dPBS gewaschen. Die primären Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

2.2.1.7. Transiente Transfektion

Plasmide

Die Karten der aufgeführten Plasmide sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Kapitel 7.3).

pSOD1-G85R-eGFP-N1 Superoxiddismutase 1 (SOD1) G85R gekoppelt mit GFP

pSOD1-G93A-eGFP-N1 SOD1 G93A gekoppelt mit GFP

Small interfering RNAs (siRNA)

Die siRNA wurde bei MWG Eurofins (Ebersberg) entworfen und bestellt.

APP-hu	GACGGAGGAGAUCUCUGAA (dTdT)
APLP2-hu	AUAUGCAUGUGAACAUUCA (dTdT)
nonsense	AUUCUCCGAACGUGUCACG (dTdT)

2.2.1.7.1. Elektroporation

Die Elektroporation wurde genutzt um Zellen transient mit siRNA zu transfizieren. Die siRNA wurde in 1x siMAX Universal Puffer (Eurofins MWG) gelöst und bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden die IMR90 Zellen wie unter Kapitel 2.2.1.1 beschrieben trypsinisiert und nach der Zentrifugation in Elektroporationspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Elektroporationsküvetten (4 mm, Sigma-Aldrich) pipettiert. Zu der Suspension wurden 20 µg siRNA zugegeben. Die Elektroporation wurde mit einem Elektroporator (Lonza) durchgeführt. Nach einer kurzen Ruhepause wurden die Zellen auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion (siehe Kapitel 2.2.1.8) behandelt.

2.2.1.7.2. FuGene

Für die Transfektion wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät (siehe Kapitel 2.2.1.1) und nach 24 h mit Hilfe von FuGene (Promega) transfiziert. Die verwendete Menge an FuGene wurde mit folgender Regel bestimmt: $1,2x \text{ Plasmid } [\mu\text{g}] = \text{FuGene } [\mu\text{l}]$. Zunächst wurden die Plasmide mit DMEM ohne Zusätze verdünnt und anschließend das FuGene-Reagenz langsam hinzugefügt. Die Lösung wurde vorsichtig invertiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung ins Nährmedium der Zellen gegeben. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben behandelt.

2.2.1.8. *Behandlung der in vitro Kulturen*

Die Behandlung der Zellen fand nach einem Tag Ruhephase bei den IMR90 und Hek 293 Zellen bzw. nach einer Differenzierungsphase von sieben Tagen bei der Primärzellkultur statt. Dabei wurden die Zellen 15 h vor der Toxin-Zugabe mit verschiedenen Konzentrationen sAPP α , sAPP β (Sigma-Aldrich) oder dem APP-E1 Fragment inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 0,5 µM MG-132 (Enzo) bzw. 100 nM Epoxomicin (Sigma-Aldrich) behandelt. Für das Aggresomen-Assay wurde eine Konzentration von 10 µM MG-132 für 8 h

verwendet. Auf Grund der Löslichkeit der Substanzen in DMSO wurden zu den Kontrollen eine entsprechenden Menge an DMSO als Vehikelkontrolle gegeben.

Für die Ermittlung des autophagischen Flux wurden die Zellen 15 h vor dem Ernten mit 500 nM Bafilomycin A1 (BafA, LC Laboratories) behandelt.

2.2.1.9. Zellüberleben mittels MTT-Assay

Anhand der metabolischen Aktivität der Zelle wurde das Zellüberleben mit Hilfe des Tetrazoliumsals MTT quantifiziert (Gerlier and Thomasset, 1986).

Die IMR90 Zellen wurden für diesen Versuch in 96 Well Platten kultiviert und zu den angegebenen Zeitpunkten (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.4.2) mit 0,5 mg/ml MTT für 2 h inkubiert. Die gebildeten Formazan-Kristalle als reduzierte Form von MTT wurden anschließend mit Solubilisierungslösung gelöst und bei 560 nm im Multiscan RC (Thermo Scientific) photometrisch gemessen.

2.2.2. Proteinbiochemie

2.2.2.1. Gesamtproteinisolierung aus Zellen

Die Zellen wurden nach der entsprechenden Behandlungszeit mit PBS gewaschen und nach Zugabe von Lysispuffer mechanisch von den Zellkulturschalen abgeschabt. Zu dem Lysispuffer wurden kurz vorher ein Protease- (Roche) und ein Phosphatase-Inhibitor (Roche) gegeben. Die Zelllysate wurden anschließend kurz mit einem Ultraschall-Sonifizierstab (Hielscher) sonifiziert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Test (siehe Kapitel 2.2.2.3) bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.2. Gesamtproteinisolierung aus Gewebe

Für die Isolierung von Protein aus Gewebe wurden die Mäuse zunächst mit Forene (Abbott AG) betäubt und dekapiert. Aus dem Gehirn wurden Kortex und Hippocampus präpariert. Außerdem wurden noch Lebergewebe entnommen. Die Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Die Gewebe wurden mit Lysispuffer versetzt und mit Hilfe des Homogenisators Potter S (Sartorius) zerkleinert. Danach wurden die Proben 3x 10 Sekunden (sec) sonifiziert und der Proteingehalt mit einem BCA-Test bestimmt. Die Proteinlysate wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2.3. **Proteinquantifizierung**

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Test (Bio-Rad) bestimmt und wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Die Proteinproben wurden hierbei mit BCA-Reagenz versetzt und bei 60°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 560 nm im Multiscan RC (Thermo Scientific) photometrisch gemessen und die Konzentration mit Hilfe einer Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA)-Standardkurve bestimmt.

2.2.2.4. **Western Blot Analyse**

2.2.2.4.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht im denaturierten Zustand nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Dazu wurden Protean-3-Elektrophoresekammern für Minigele (Bio-Rad) benutzt. Für das Polyacrylamidgel (PAA-Gel) wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol (Roth) überschichtet und erst nach erfolgter Polymerisation wurde das Sammelgel gegossen.

Zusammensetzung der PAA-Gele (die Volumina entsprechen zwei 1,5 mm dicken Gelen):

12 % Trenngel		Sammelgel	
9 ml	H ₂ O	6,5 ml	H ₂ O
5 ml	4x Trenngelpuffer	2,5 ml	4x Sammelgelpuffer
6 ml	Acrylamid	750 µl	Acrylamid
200 µl	APS	100 µl	APS
20 µl	TEMED	10 µl	TEMED

Es wurden 20 µg Proteinprobe mit 5x Auftragspuffer versetzt und auf das PAA-Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde der Prestained PageRuler (Peqlab) verwendet. Der Sammelgellauf erfolgte bei 90 V, der Trenngellauf bei 120 V im SDS-Laufpuffer.

2.2.2.4.2. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (geblottet). Der Blot wurde in folgender Reihenfolge aufgebaut: Pluspol, Schwamm, Transferpapier, Nitrocellulose-Membran, PAA-Gel, Transferpapier, Schwamm, Minuspol. Der Transfer wurde in Mini-Trans-Blot-Zellen für Minigele (Bio-Rad) bei Raumtemperatur und 30 V über Nacht oder bei 4°C und 80 V für 3 h in 1x Transferpuffer durchgeführt.

Um die erfolgreiche Übertragung und die Qualität des Blots zu überprüfen wurde anschließend die Nitrocellulose-Membran mit PonceauS-Lösung gefärbt.

2.2.2.4.3. Immunologischer Nachweis der Proteine

Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst für 30 min mit Blockierungspuffer 1 inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde die Membran mit PBST gewaschen und bei 4°C über Nacht mit dem primären Antikörper in geeigneter Konzentration in PBST mit 0,1 % Natriumazid (Sigma-Aldrich) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran mehrfach mit PBST gewaschen und anschließend für 1- 2 h mit einem geeigneten sekundären, Meerrettich-Peroxidasegekoppelten Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert.

Für Western Blot verwendete primäre Antikörper:

AKT	Cell Signaling
AKT (phospho Ser473)	Cell Signaling
APLP2	Calbiochem
APP 6E10	Covance
Bag3	Proteintech Group
ERK 1/2	Cell Signaling
ERK 1/2 (phospho)	Cell Signaling
GSK3β	BD Transduction Laboratories
GSK3β (phospho)	Cell Signaling
Hsp70	Stressgen
Hsp90	Stressgen
Lamp2	Abcam
LC3b (I+II)	Sigma-Aldrich
Nrf2	Abcam
p62	Progen
Proteasom 19S S4	Abcam
Proteasom 20Salpha 1	Santa Cruz Biotechnology
SAPK/JNK	Cell Signaling
SAPK/JNK (phospho)	Cell Signaling
Tubulin	Sigma-Aldrich
Ubiquitin	Dako

Im Anschluss wurde die Membran mit ECL-Lösung (1 ml Lösung A; 0,1 ml Lösung B und 0,5 µl H₂O₂) benetzt und es wurden mit dem Chemilumineszenzsystem Fusion-SL (Peglab) die immunreaktiven Proteinbanden fotografiert. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit der Software ImageJ (NIH).

Für Western Blot verwendete sekundäre Antikörper:

Peroxidase-AffiniPureDnk Anti-Guinea Pig IgG	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-AffiniPureDnk Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch
Peroxidase-AffiniPureDnk Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch

2.2.2.5. *Aufreinigung von sAPP α und APP E1*

2.2.2.5.1. Flüssigkeitschromatografie-FPLC

Die Aufreinigung von sAPP α und dem APP E1 Fragment aus dem Hefe Medium (siehe Kapitel 2.2.4.1) erfolgte über eine Flüssigkeitschromatografie (FPLC). Dazu wurde die Biologic Duo Flow Maschine (Bio-Rad) und Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC Säulen (5 ml, Bio-Rad) verwendet. Zunächst wurde der Hefe-Überstand auf einen DynaLoop 90 (Bio-Rad) geladen und anschließend das Aufreinigungsprogramm gestartet. Dabei wurde zunächst die Säule mit FPLC-Puffer 1 gewaschen und der Hefe-Überstand vom Loop auf die Säule übertragen, gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit FPLC-Puffer 1. Nach einem Waschschrift mit FPLC-Puffer 2 wurden die Proteine mit dem FPLC-Elutionspuffer eluiert. Die Eluate wurden mit Hilfe des Biologic BioFrac Fraction Collector (Bio-Rad) in Aliquots mit jeweils 3 ml Volumen gesammelt. Anhand der Extinktionskurve, gemessen durch das BioLogicOptics Module (Bio-Rad) bei 280 nm, wurden die Aliquots ausgewählt, die das Eluat enthielten.

Das Eluat wurde anschließend in Zentrifugationsröhrchen (Ultra 10 k, Millipore) pipettiert und durch Zentrifugation bei 4000 x g und 4°C aufkonzentriert. Nach der Aufkonzentrierung wurde mittels PD10 Entsalzungssäulen (GE Healthcare Lifesciences) der FPLC-Elutionspuffer gegen 1x PBS ausgetauscht. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Konzentrationsbestimmung von sAPP α) wurden 10 % Glycerol (Merck) zugesetzt und die sAPP α - bzw. APP E1- Lösung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.5.2. Konzentrationsbestimmung von sAPP α und APP E1

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe des Pierce® 660 nm Protein Assay Kit (Thermo Scientific) durchgeführt. Zu den Proteinproben wurde im Verhältnis 1:15 das Pierce 660 Reagent

zugegeben und kurz invertiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Extinktion bei 660 nm im Photometer (Beckmann Coulter) gemessen. Mit Hilfe einer BSA-Standardkurve konnte die Konzentration der Proben in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bestimmt werden. Diese wurde anschließend mit Hilfe der Molekülmasse von sAPP α (110 kDa) und APP E1 (22,4 kDa) in die Stoffmengenkonzentration $\left[\frac{\text{mol}}{\text{Liter}}\right]$ umgerechnet.

2.2.2.6. Coomassie Färbung

Mit Hilfe von Coomassie-Brillant-Blau können Proteine unspezifisch angefärbt werden. Dazu wurden Proteine in PAA-Gelen (siehe Kapitel 2.2.2.4.1) aufgetrennt und in 10 ml InstantBlue™ (Expedeon) für 15 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und fotografiert.

2.2.2.7. Immunocytochemie

Für die immunochemischen Fluoreszenzfärbungen wurden die Hek 293 Zellen auf beschichteten Deckgläschen ausgesät (siehe Kapitel 2.2.1.1) und behandelt (siehe Kapitel 2.2.1.8). Nach der erfolgten Behandlung wurden die Deckgläschen mit dPBS gewaschen und mit 4 %iger PFA-Lösung für 15 min fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 3 min mit Blockierungspuffer 2 inkubiert, dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert und die Zellen permeabilisiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in 1 % BSA-Lösung erfolgte bei 4°C über Nacht.

Für die Immunocytochemie verwendete primäre Antikörper:

Bag3	Proteintech Group
GFAP	Dako
MAP2	Sigma-Aldrich
Vimentin	Satan Cruz Biotechnology

Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem sekundären, Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Zellkerne mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich) für 15 min gefärbt. Zum Schluss wurden die Zellen in Eindeckmedium eingebettet und mit Nagellack auf einem Objektträger fixiert. Nach dem Aushärten des Nagellacks wurden die Zellen unter dem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop (Zeiss) analysiert.

Für die Immunocytochemie verwendete sekundäre Antikörper:

Alexa Fluor® 647-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno Research
Cy3-AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG	Jackson Immuno Research

2.2.2.8. Proteasomaler Aktivitätsassay

Die proteasomale Aktivität konnte mit Hilfe des Suc-LLVY-AMC-Substrat (*N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin*, Enzo Life Science) gemessen werden (Stein et al., 1996). Dazu wurden die behandelten Zellen mit Trypsin von der Schale gelöst und für 4 min bei 800 g sedimentiert. Das Zellpellet wurden mit dPBS gewaschen und in Suc-Puffer 1 resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mehrfach mit einer Nadel (Sterican 100 G25, Braun) aufgezogen. Danach wurde die Konzentration von Kaliumacetat (Sigma-Aldrich) auf 90 mM erhöht und die Suspension bei 4°C und 10000x g für 20 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand entnommen und damit eine Proteinbestimmung mittels BCA-Test (siehe Kapitel 2.2.2.3) durchgeführt.

10 µg gesamt Protein wurden mit Suc-Puffer 2 mit 8 mM ATP (AppliChem) auf 400 µL aufgefüllt, bevor 100 µM Suc-LLVY-AMC-Substrat zugegeben wurden. Für die Dreifachbestimmung wurden jeweils 100 µl der Proben in eine Vertiefung einer schwarzen Mikrotiterplatte gegeben. Die Platte wurde dann im Victor³V Multilabel Counter (Perkin Elmer/Wallak) bei 37 °C inkubiert. Nach 10 min wurde der Startwert bei einer Anregung von 355 ± 20 nm und 460 nm Emission gemessen. Nach weiteren 60, 120 und 180 min wurde erneut gemessen.

2.2.3. Molekularbiologie

2.2.3.1. Isolierung gesamt RNA

Für die Isolierung der gesamt RNA wurde das NucleoSpinRNA II Kit (Machery-Nagel) verwendet. Dazu wurden die Zellen auf den Kulturschalen zweimal mit dPBS gewaschen und anschließend abgeschabt. Die Isolierung der RNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Um die Gefahr einer DNA-Kontamination zu verringern wurde eine Behandlung mit DNase bei 37°C für 30 min durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde mit dem NanoDrop 1000 (Pqlab) durchgeführt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3.2. Reverse Transkription/Synthese cDNA

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgt mit dem Omniscript RT Kit (Qiagen). Zunächst wurden die Komponenten des Kits nach Vorgabe im Herstellerprotokoll zusammengefügt. Anschließend wurden äquivalente Mengen an RNA mit RNase-freiem H₂O (DEPC, Ambion) auf 10 µl aufgefüllt und bei 65°C für 5 min denaturiert. Im Anschluss wurde der Mastermix (2 µl RNase-freies Wasser (Qiagen), 2 µl 10x RT-Puffer (Qiagen), 2 µl dNTP-Mix (5 mM, Qiagen), 2 µl Oligo-(dT)15-

Primer (10 µM, Promega), 1 µl RNasin (Promega), 1 µl reverse Transskriptase (Qiagen)) zu den RNA-Proben gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.3.3. *Quantitative Realtime-PCR*

Die Genexpression auf Transkriptionsebene wurde mittels Realtime-PCR quantifiziert. Dazu wurden 1 µl DNA, 12,5 µl SensiMix SYBR & Fluorescein Kit (Bioline), 10,5 ml H₂O und jeweils 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer in eine Vertiefung einer 96 Well Platte pipettiert. Die Amplifikation erfolgte dann im iCycler (Bio-Rad) nach folgendem Protokoll:

Initiale Aktivierung	15 min	95°C
Amplifikation (35 Zyklen)	20 sec	95°C
	20 sec	60°C
	30 sec	72°C
Finale Denaturierung	1 min	95°C
Abkühlung	1 min	55°C
Schmelzkurve (88 Zyklen)	8 sec	55°C (+ 0,5°C/Zyklus)

Für die qRT-PCR verwendete Primer:

GAPDH- for	5´- GCA CCA CCA ACT GCT TAG CAC -3´
GAPDH- rev	5´- CAC CAC CTT CTT GAT GTC ATC -3´
Bag3- for	5´- TGG GAG ATC AAG ATC GAC CC -3´
Bag3- rev	5´- GGG CCA TTG GCA GAG GAT G -3´
p62- for	5´- TGC CCA GAC TAC GAC TTG TG -3´
p62- rev	5´- AGT GTC CGT GTT TCA CCT TCC -3´
PSMB5- for	5´- AGG TTC TGG CTC TGT GTA TGC -3´
PSMB5- rev	5´- CAT CTC TGT AGG TGG CTT GGT -3´
PSMB6- for	5´- GAG GCA TTC ACT CCA GAC TG -3´
PSMB6- rev	5´- CAA ACT GCA CGG CCA TGA TA -3´
PSMB7- for	5´- TGC AAA GAG GGG ATA CAA GC -3´
PSMB7- rev	5´- ACA ACC ATC CCT TCA GTT GC -3´

Der Zyklus („Threshold Cycle“, C_t) ist der Punkt an dem die Fluoreszenz sich erstmals signifikant von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet und konnte anhand der gewonnenen Amplifikationskurve

ermittelt werden. Über die Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität der Reaktion überprüft werden.

Die Genexpression wurde mit folgender Formel berechnet:

$$Ratio = E^{\Delta\Delta CP}$$

Hierbei gilt:

$$\Delta CP = CP_{Zielgen} - CP_{Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP_{Behandlung} - \Delta CP_{Kontrolle}$$

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

2.2.4. Mikrobiologie

2.2.4.1. *Hefeanzucht*

BMGY Medium wurde mit Hefen angeimpft und für 48 bis 72 h bei 30°C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 1500 x g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Hefen in BMMY Medium resuspendiert und für weitere 24 h bei 30°C und 300 rpm inkubiert. Zum Schluss erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 1500 x g für 10 min. Der Überstand wurde für die Aufreinigung mittels FPLC (siehe Kapitel 2.2.2.5.1) weiterverwendet und das Pellet verworfen.

2.2.4.2. *Herstellen von Dauerkulturen*

BMGY Medium wurden mit Hefen angeimpft und für 24 h bei 30°C und 300 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde zum Medium Glycerol (Merck) in einer finalen Konzentration von 15 % zugegeben. Die Hefen wurden aliquotiert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung fand bei -80°C statt.

3. Ergebnisse

3.1. Analyse von sAPP α und APP E1

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von sAPP α und APP E1 auf die Proteinhomöostase untersucht, dazu wurde zunächst rekombinantes sAPP α und APP E1 in Hefen produziert und mittels FPLC aufgereinigt. Anschließend wurde über SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung die Größe der erhaltenen Proteine überprüft und mittels Western Blot mit einem APP Antikörper festgestellt, ob es sich bei den Proteinen um ein APP Produkt handelt.

Das aufgereinigte sAPP α sowie das APP E1 Fragment zeigten im Coomassie-Gel die zu erwartende Proteingröße von ~23 kDa für APP E1 und ~100 kDa für sAPP α (Abbildung 3.1.1. A). Für das instabile sAPP α Protein sind Spaltprodukte im Gel erkennbar. Mit fortschreitender Lagerzeit war eine erhöhte Menge an Spaltprodukten im Gel zu erkennen, daher war eine regelmäßige Herstellung von sAPP α notwendig. Mittels Western Blot Analyse wurde anschließend mit einem Antikörper gegen APP gezeigt, dass es sich um sAPP α und das APP E1 Fragment handelt (Abbildung 3.1.1. B).

Insgesamt konnte durch diesen Versuch gezeigt werden, dass es sich bei den in Hefen produzierten Proteinen um sAPP α und APP E1 handelt.

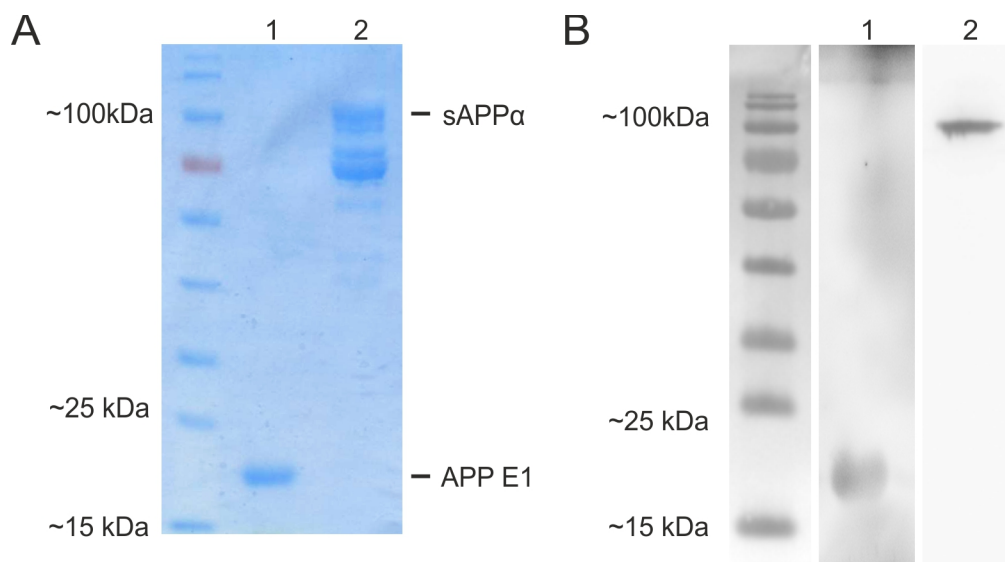


Abbildung 3.1.1. Coomassie-Gel und Western Blot Analyse der rekombinanten Proteine sAPP α und APP E1. (A) Mit Hilfe einer Coomassie-Färbung wurde die molekulare Größe der aufgereinigten Proteine APP E1 (1) und sAPP α (2) überprüft. (B) Der Western Blot der aufgereinigten Proteine zeigte, dass es sich um APP handelt.

3.2. Das Alterungsmodell IMR90

Die Alterung ist der Hauptrisikofaktor bei der Alzheimer'schen Erkrankung (AD). Aus diesem Grund wurde für die Versuche ein zelluläres Alterungsmodell die IMR90 Zellen ausgewählt, um auch Veränderungen zwischen jungen und alten Zellen untersuchen zu können. Zu Beginn wurden diese

Zellen charakterisiert, indem eine Alterungskurve erstellt und wichtige zelluläre Altersmarker über einen Western Blot analysiert wurden. Außerdem wurde eine β -Galaktosidase Färbung mit jungen und alten IMR90 Zellen durchgeführt, um auch diesen Alterungsmarker zu analysieren.

Die IMR90 Zellen wurden regelmäßig passagiert und die Populationsverdopplung bestimmt. Die Teilungsrate der Zellen nahm mit steigendem Alter ab bis es bei einer PDL von 47 zu einem Teilungsstopp kam (Abbildung 3.2.1. A)

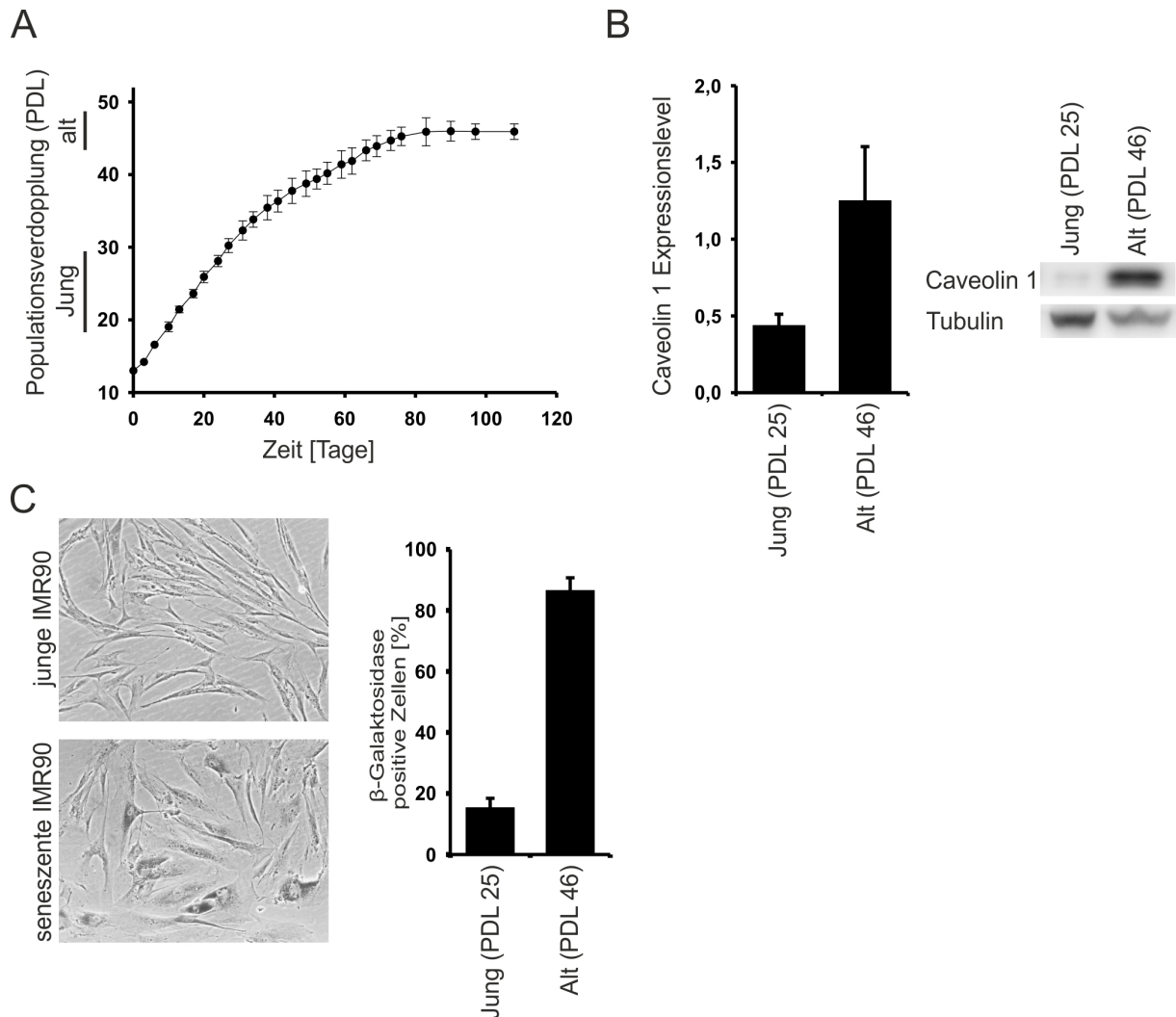


Abbildung 3.2.1. Das Alterungsmodell IMR90. (A) Alterung der Fibroblastenkultur. Die Teilungsaktivität nahm mit steigender Alterung ab, bis sie bei einem Alter von PDL 47 einen Teilungsarrest aufwies. (B) Western Blot mit Caveolin 1 Antikörper und densitometrische Auswertung. Die Proteinmenge von Caveolin 1 stieg mit zunehmender PDL. (C) β -Galaktosidase Färbung von jungen und seneszenten IMR90. Ungefähr 50 Zellen pro Kulturschale wurden auf eine Blaufärbung analysiert und prozentual gegen die Gesamtzahl der Zellen aufgetragen. Bei den seneszenten IMR90 Zellen ist der Großteil der Zellen (ungefähr 80 %) β -Galaktosidase positiv, wohingegen bei den jungen IMR90 Zellen weniger als 20 % positiv sind. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3).

Die Fibroblasten wurden mittels Western Blot auf den Alterungsmarker Caveolin 1 untersucht. Dieser war in jungen Zellen nur in sehr geringen Mengen vorhanden. Im Laufe der Alterung stieg die Proteinmenge von Caveolin 1 an (Abbildung 3.2.1. B).

Zusätzlich wurde die Zellalterung durch eine β -Galaktosidase Färbung überprüft. Seneszente Zellen weisen eine erhöhte β -Galaktosidase Aktivität auf (Dimri et al., 1995). So waren bei jungen Zellen nur ca. 20 % der gesamten Zellen β -Galaktosidase positiv, während bei den gealterten Zellen über 80 % eine Färbung aufwiesen. Außerdem veränderte sich die Morphologie der IMR90 Zellen. Junge IMR90 Zellen wiesen eine längliche Form auf und die Zellen lagen meist parallel angeordnet. Alte Zellen zeigten eine vergrößerte Zelloberfläche, mit geringerem Zell-Zell-Kontakt und lagen nicht mehr parallel angeordnet vor (Abbildung 3.2.1. C).

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die Teilungsrate der IMR90 Zellen im Laufe der Alterung abnahm und die seneszenten IMR90 Zellen β -Galaktosidase positiv waren und ein hohes Proteinlevel an Caveolin 1 hatten. Anhand der Ergebnisse wurde festgelegt das es sich bis PDL 30 um junge Zellen handelt und ab PDL 42 um seneszenten Zellen.

3.3. Der Einfluss von sAPP α und APP E1 auf die Zellviabilität und Proteinhomöostase

Im Folgenden sollte der Einfluss von sAPP α und APP E1 auf die Lebensspanne und Zellviabilität der IMR90 Zellen untersucht werden. Anschließend wurde mittels Western Blot und qRT-PCR der Einfluss der beiden Proteine auf die Proteinhomöostase analysiert.

3.3.1. Keine Veränderung der Zellviabilität und Lebensspanne durch sAPP α und APP E1

Zunächst wurde analysiert inwiefern sAPP α und APP E1 die Zellviabilität und die Teilungsrate der alternden IMR90 Zellen beeinflusst. Dazu wurden junge und alte IMR90 Zellen mit für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen sAPP α und APP E1 behandelt und mit einem MTT-Assay analysiert. Anschließend wurde die IMR90 Zellen in Anwesenheit 50 nM sAPP α bzw. APP E1 kultiviert und eine Alterungskurve anhand der PDL erstellt.

Bei der Analyse der Zellviabilität mittels MTT-Assay zeigte sich weder bei den jungen Zellen (Abbildung 3.3.1. A + B) noch bei den seneszenten Fibroblasten (Abbildung 3.3.1. C + D) eine Veränderung des Zellüberlebens durch sAPP α bzw. APP E1.

Anschließend wurden IMR90 Zellen unter ständiger Behandlung mit sAPP α bzw. APP E1 gealtert und die Populationsverdopplung aufgezeichnet. Dabei zeigte sich, dass sowohl sAPP α als auch APP E1 die Alterungskurve nur gering verlängern. Die mit sAPP α behandelten Zellen erreichten eine PDL von $47,8 \pm 1,4$, die mit APP E1 behandelten Fibroblasten eine PDL von $49,2 \pm 1,0$ und im Vergleich dazu die Kontrollzellen eine PDL von $45,9 \pm 1,0$. Der Wachstumsarrest trat bei den Kontrollzellen an Tag 83 ein, bei den behandelten Zellen an Tag 97 (Abbildung 3.3.2).

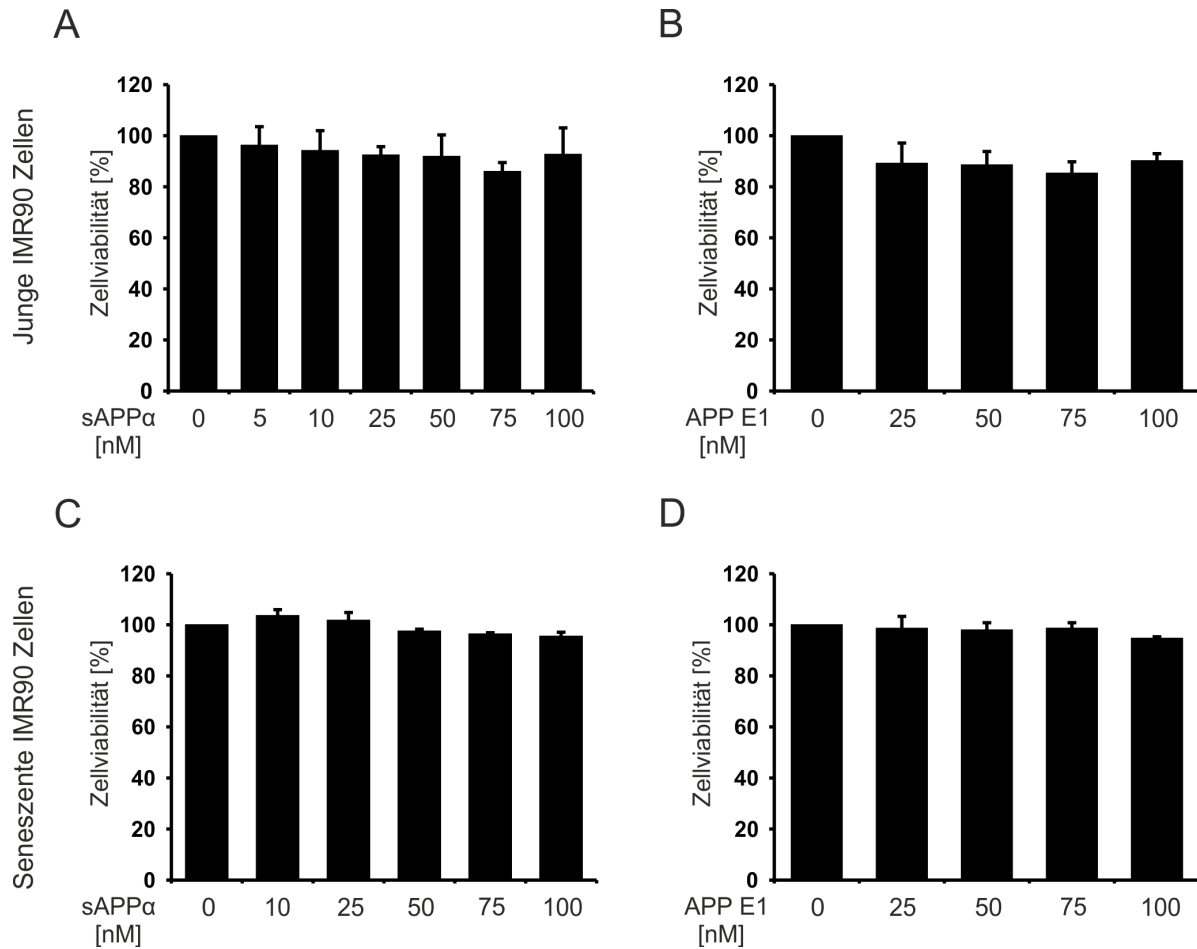


Abbildung 3.3.1. MTT-Assay von jungen und seneszenten IMR90 Zellen nach Behandlung mit sAPPα und APP E1. (A + B) Junge IMR90 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von sAPPα (A) und APP E1 (B) behandelt. (C + D) Senescente IMR90 Zellen behandelt mit sAPPα (C) und APP E1 (D). Die Zellen wurden mittels MTT-Assay analysiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Hierbei konnte keine Veränderung der Zellviabilität festgestellt werden. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3).

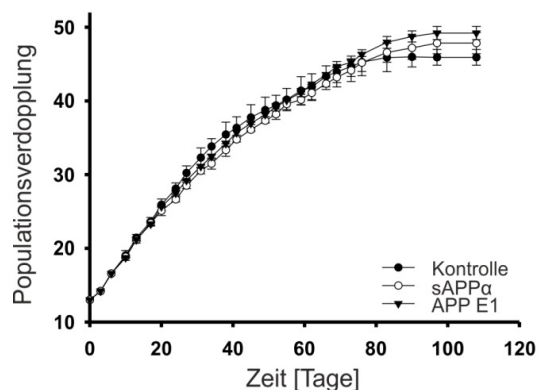


Abbildung 3.3.2 Alterungskurve von IMR90 unter ständiger Behandlung mit sAPPα und APP E1. IMR90 Zellen wurden in Anwesenheit von 50 nM sAPPα oder 50 nM APP E1 kultiviert und die PDL aufgetragen. Dabei zeigte sich eine erhöhte Teilungsrate durch sAPPα und APP E1 im Alter. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten (n= 2).

Die Ergebnisse zeigten insgesamt, dass sAPPα und APP E1 die Zellviabilität nach einer kurzen Behandlungszeit nicht verändern, dass aber durch eine Langzeitbehandlung die Wachstumsrate erhöht wurde.

3.3.2. sAPP α und APP E1 beeinflussen die Protein- und mRNA-Level wichtiger Marker der Proteinhomöostase in jungen und alten IMR90 Zellen nicht

Der Abbau von fehlgefalteten Proteinen und Aggregaten ist für die Zelle sehr wichtig. Gerade im Alter führt die Ansammlung dieser Proteine zum Funktionsverlust von Zellen und verursacht Krankheiten. Da auch Alzheimer die Ansammlung von Aggregaten bei der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielt, wurde der Einfluss von sAPP α auf den Proteinabbau und vorgeschaltete Signaltransduktionswege untersucht.

Dazu wurden junge und seneszente IMR90 Zellen mit sAPP α und APP E1 behandelt und mittels Western Blot die Expression wichtiger Regulatoren der Autophagie, des proteasomalen Abbausystems, Signaltransduktionswege und auf die zwei Hitzeschock Proteine Hsp70 und Hsp90 analysiert.

Gen	Junge Zellen		Seneszente Zellen	
	sAPP α	APP E1	sAPP α	APP E1
Bag3	-	-	-	-
p62	-	-	-	-
LC3	-	-	-	-
Lamp2	-	-	-	-
Hsp70	-	n.t.	n.t.	n.t.
Hsp90	-	n.t.	n.t.	n.t.
19S Proteasom	-	-	-*	n.t.
20S Proteasom	-	-	-*	n.t.
Ubiquitin	-	-	-*	n.t.
pERK/ERK	-	n.t.	n.t.	n.t.
pJNK/JNK	-	n.t.	n.t.	n.t.
pAKT/AKT	-	n.t.	n.t.	n.t.
pGSK3 β /GSK3 β	-	n.t.	n.t.	n.t.

Tabelle 3.3.1. Western Blot Analyse von jungen und seneszenten IMR90 Zellen nach Behandlung mit sAPP α und APP E1. Junge und alte IMR90 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 10 und 100 nM sAPP α und APP E1 behandelt (* es wurde nur mit einer Konzentration von 100 nM behandelt) und anschließend mittels Western Blot analysiert. Dabei konnte bei keinem der Proteine eine veränderte Expression durch sAPP α oder APP E1 festgestellt werden. - Keine Veränderung; n.t. nicht getestet. Die Daten zeigen die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten (n= 4).

In Tabelle 3.3.1. sind die Ergebnisse der Western Blots (siehe Anhang Abbildung 7.1.1 und Abbildung 7.1.2) zusammengefasst. So ergaben die Analysen, dass weder die Autophagie-relevanten Proteine (Bag3, p62, LC3 und Lamp2) noch die Proteine des proteasomalen Abbauweges (19S und 20S Proteasom und Ubiquitin) in den jungen und alten IMR90 Zellen beeinflusst wurden. Auch die Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 und die Faktoren aus Signaltransduktionswegen (ERK, JNK, AKT und GSK3 β) zeigten nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 keine veränderten Proteinspiegel.

Auch die Analyse der mRNA ergab keine Veränderung in den Spiegeln der Autophagie-Faktoren Bag3 und p62 in jungen und alten IMR90 Zellen. Die wichtigen Faktoren des proteasomalen Abbauweges die untersucht wurden, waren neben Bag1 und Nrf2, die drei Untereinheiten des 20S Proteasoms PSMB5, PSMB6 und PSMB7. Alle Faktoren zeigten weder nach der Behandlung mit sAPP α , noch mit APP E1 eine Veränderung der Expressionslevel in jungen und in seneszenten Zellen. Tabelle 3.3.2. zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse.

Insgesamt haben sowohl sAPP α als auch APP E1 keinen Einfluss auf die Protein- und mRNA-Spiegel wichtiger Marker der Proteinhomeostase und der Signaltransduktionswege.

Gen	Junge Zellen		Seneszente Zellen	
	sAPP α	APP E1	sAPP α	APP E1
Bag3	-	-	-	-
p62	-	-	-	-
Bag1	-	-	-	-
PSMB5	-	-	-	-
PSMB6	-	-	-	-
PSMB7	-	-	-	-
Nrf2	-	-	-	-

Tabelle 3.3.2. Analyse der mRNA-Spiegel durch qRT-PCR nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 in jungen und seneszenten IMR90. Junge und alte IMR90 Zellen wurden für 24 h mit 100 nM sAPP α oder APP E1 behandelt und anschließend mittels qRT-PCR analysiert. Die Ergebnisse zeigten keine Veränderung in den mRNA-Spiegeln durch sAPP α und APP E1. - Keine Veränderung der mRNA-Spiegel. Die Daten zeigen die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten (n=4).

3.4. Einfluss von sAPP α und APP E1 auf die Zellviabilität unter proteasomalen Stress

3.4.1. Ermittlung einer subtoxischen Stressdosis

Auf Grund der Tatsache, dass sAPP α und APP E1 keinen Einfluss auf die Zellviabilität und die Protein- und mRNA-Spiegel der Autophagie- und UPS-Marker hatte, wurde im Folgenden der Einfluss von sAPP α und APP E1 auf die Protein-Qualitätskontrolle (PQC) unter proteasomalen Stressbedingungen untersucht. Dazu wurde der proteasomale Inhibitor MG-132 verwendet. Junge und seneszente IMR90 Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von MG-132 behandelt und anschließend die Zellviabilität mittels MTT-Assay ermittelt (Abbildung 3.4.1). Die Ergebnisse zeigten sowohl bei den jungen als auch bei den seneszenten IMR90 Zellen beim 0,5 μ M MG-132 ein Zellüberleben von ungefähr 60 %. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche die Konzentration von 0,5 μ M MG-132 verwendet.

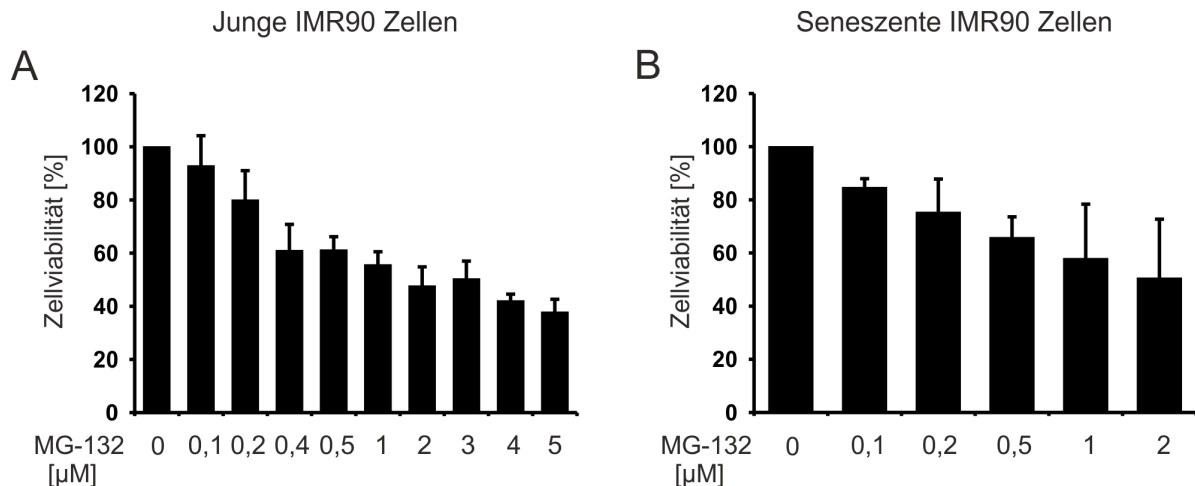


Abbildung 3.4.1. Ermittlung einer subtoxischen Stress Dosis. (A) Junge und (B) seneszente IMR90 Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von MG-132 behandelt und anschließend über einen MTT-Test analysiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl bei den jungen als auch bei den seneszenten bei einer Konzentration von 0,5 μ M MG-132 60 % der Zellen überlebten. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4).

3.4.2. Analyse der Zellviabilität unter proteasomalen Stress nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 in IMR90 Zellen

Nach der Ermittlung einer subtoxischen Stressdosis wurde analysiert inwiefern sAPP α und APP E1 das Zellüberleben nach proteasomalen Stress in jungen und seneszenten IMR90 verändern konnte.

Dazu wurden IMR90 Zellen mit sAPP α und APP E1 inkubiert und anschließend für 24 Stunden mit MG-132 behandelt. Die Zellviabilität wurde über einen MTT-Assay bestimmt. Bei den jungen IMR90 Zellen kann mit sAPP α (100 nM) das durch MG-132 reduzierte Zellüberleben wieder signifikant erhöht werden (Abbildung 3.4.2. A). Das APP E1 hatte hingegen keinen Einfluss (Abbildung 3.4.2. B). In den seneszenten IMR90 Zellen kann sAPP α das Zellüberleben nur minimal erhöhen (Abbildung 3.4.2. C), auch hier zeigt die Behandlung mit APP E1 keine Effekte (Abbildung 3.4.2. D).

Dieser Versuch zeigte, dass sAPP α in jungen IMR90 Zellen die Viabilität unter proteasomalen Stress verbessern kann. Da die Zellviabilität erst bei einer Konzentration von 100 nM wieder hergestellt werden konnte, wurde diese Konzentration bei den weiteren Analysen verwendet.

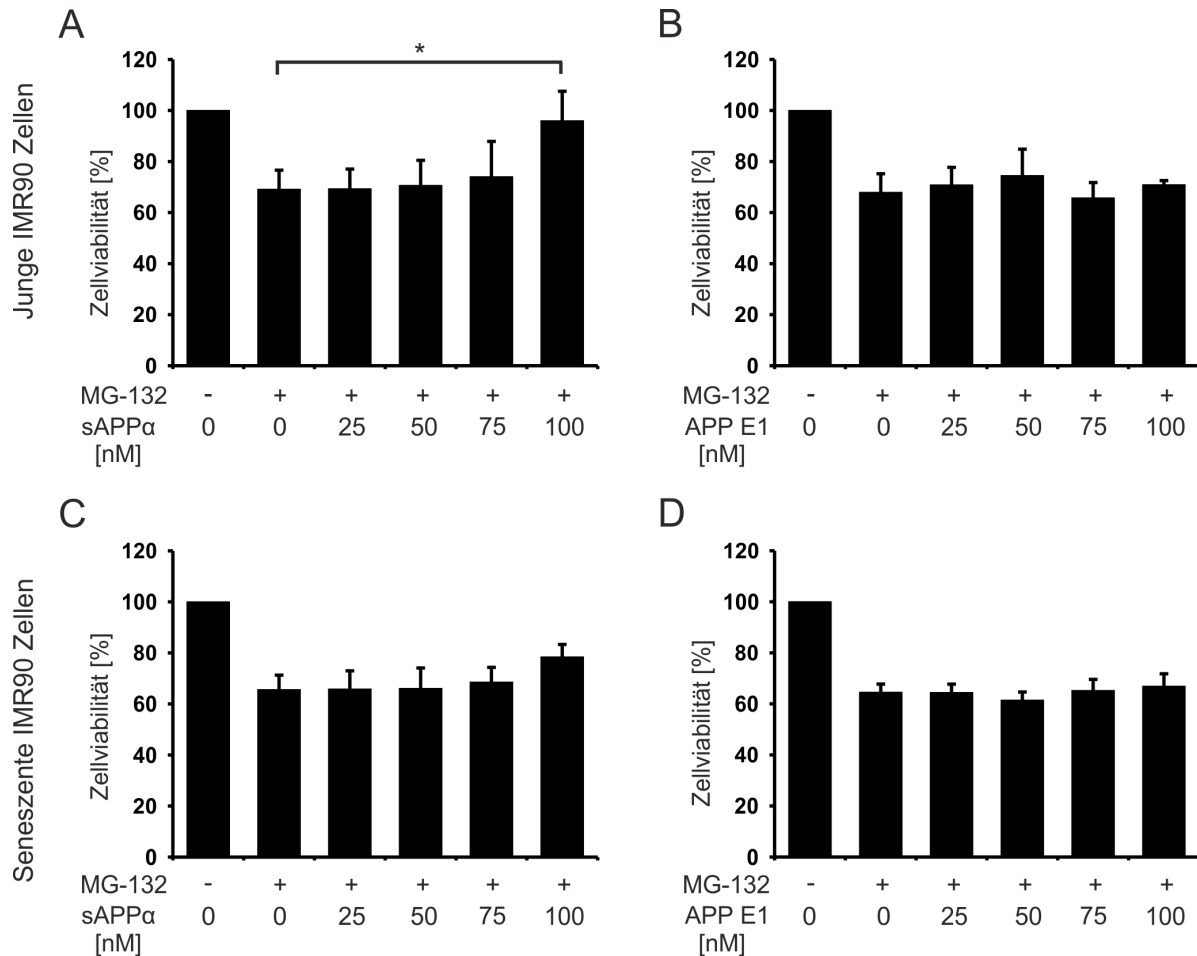


Abbildung 3.4.2. Zellviabilitäts-Analyse mittels MTT-Assay in IMR90 Zellen unter proteasomalen Stress nach Behandlung mit sAPPα und APP E1. (A + B) Junge und seneszente (C + D) IMR90 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen sAPPα (A + C) und APP E1 (B + D) für 15 h vorbehandelt und anschließend mit 0,5 μM MG-132 gestresst. Die Zellen wurden mittels MTT-Assay analysiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Dabei zeigte sich, dass sAPPα die Zellviabilität unter proteasomalen Stress in den jungen IMR90 Zellen verbessern konnte. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3). *p≤ 0,05; Tuckey Test.

3.5. Der Einfluss von sAPPα und APP E1 auf die Autophagie bei proteasomalen Stress

3.5.1. Regulierung der Proteinexpression von Autophagie-relevanten Genen

Da gezeigt wurde, dass sAPPα unter proteasomalen Stressbedingungen die Zellviabilität wieder erhöhen konnte, wurde im Anschluss der Einfluss von sAPPα und APP E1 auf Autophagie-relevante Gene untersucht. Dafür wurden junge Zellen mit sAPPα oder APP E1 behandelt und anschließend proteasomalem Stress ausgesetzt. Die Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert.

Die Behandlung mit sAPPα führte zu einer reduzierten Expression von Bag3 nach proteasomalen Stress und auch das Hitzeschockprotein Hsp70 zeigte eine verringerte Expression. Die Expression von p62 und Lamp2 veränderte sich nicht durch die Behandlung mit sAPPα (Abbildung 3.5.1. A + C).

Ebenso konnten bei APP E1 keine Regulierung der Expressionslevel von Bag3, p62 und Lamp2 beobachtet werden (Abbildung 3.5.1. B + D), jedoch zeigt Bag3 eine leichte Tendenz zur Abnahme der Proteinlevel.

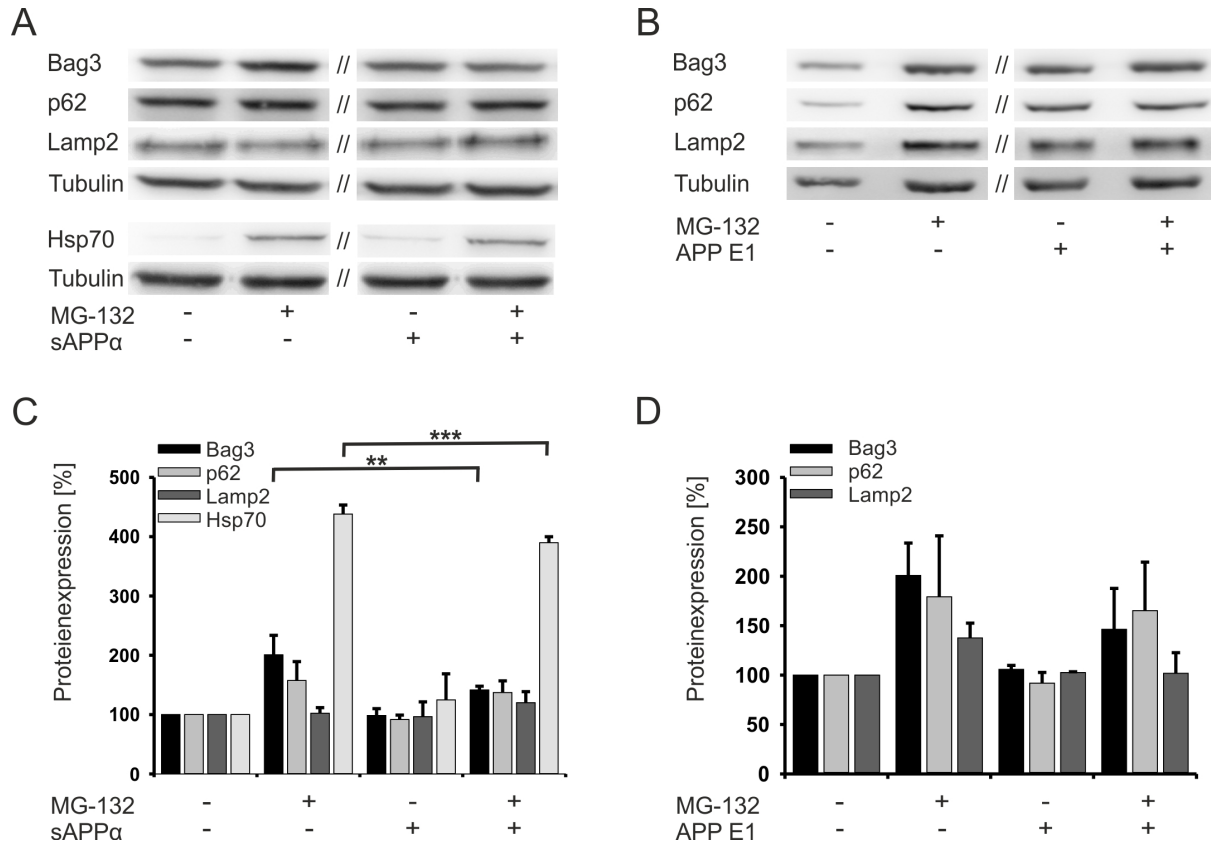


Abbildung 3.5.1 Western Blot Analyse von Autophagie-relevanten Genen in jungen IMR90 Zellen. Junge IMR90 Zellen wurden mit 100 nM sAPPα (A) oder 100 nM APP E1 (B) für 15 h behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μM MG-132 proteotoxisch gestresst. Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert. // Entfernte Banden mit niedrigeren Konzentration von sAPPα. (C + D) Densitometrische Auswertung von (A) und (B). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen, dass sAPPα die Proteinexpression von Bag3 und HSP70 verringert, aber nur geringen Einfluss auf p62 und Lamp2 zeigt. APP E1 verringert die Expression von Bag3 nur geringfügig und hat keinen Einfluss auf die Proteinexpression von p62 und Lamp2. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4). **p≤ 0,01 ***p< 0,001; Tuckey Test.

Im Anschluss wurde LC3, ein weiteres wichtiges Protein der Autophagie, das auch als Autophagie-Marker bezeichnet wird, untersucht. LC3-I wird im Rahmen der Autophagie zu LC3-II gespalten und dann im Autophagolysosom mit den fehlgefalteten Proteinen abgebaut. Für die Untersuchung der LC3-II Proteinlevel muss der Abbau der Autophagolysosomen inhibiert werden. Dafür wurde der Autophagie-Inhibitor Bafilomycin A1 (BafA) verwendet, der die Fusion von Autophagosom und Lysosom verhindert. Die Analyse der LC3-II Proteinspiegel zeigte eine leichte Abnahme des durch MG-132 induzierten autophagischen Flux der aber nicht signifikant war (Abbildung 3.5.2).

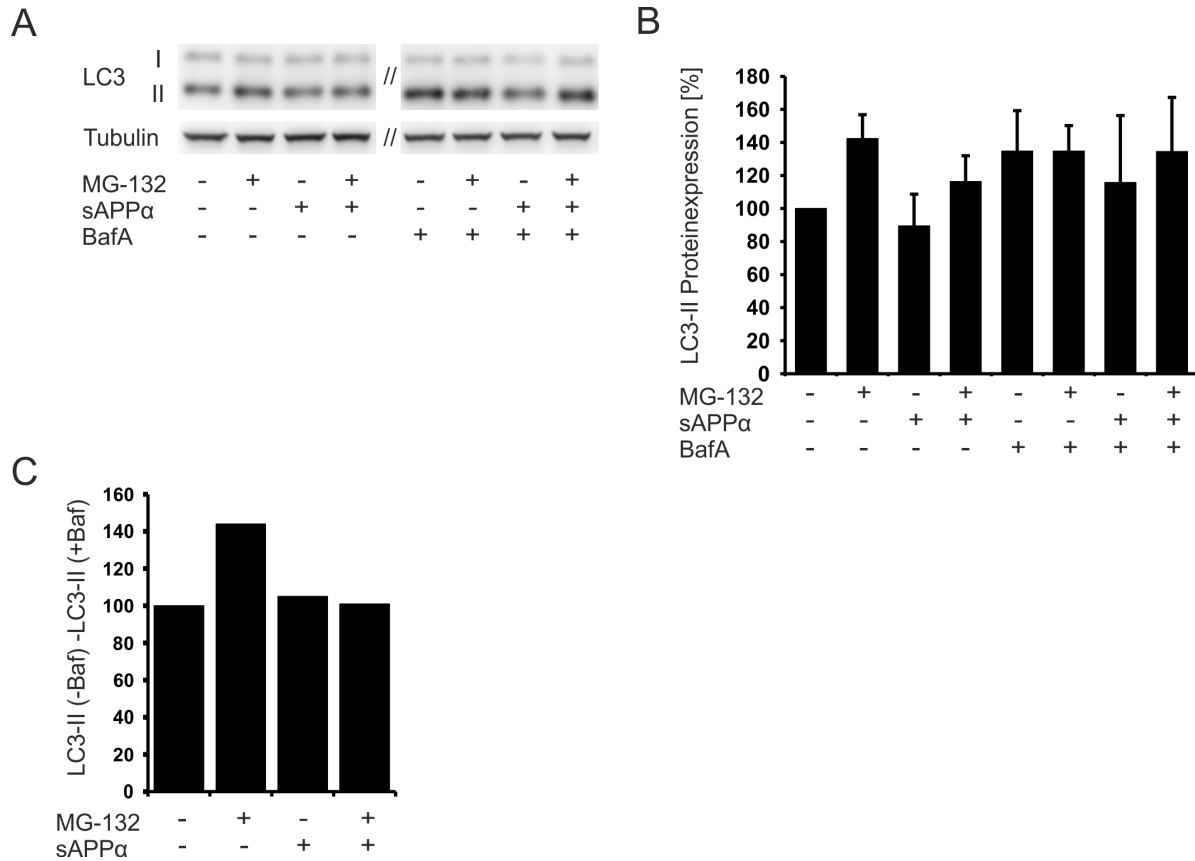


Abbildung 3.5.2. Western Blot Analyse der LC3 Proteinexpression in jungen IMR90 Zellen. Junge IMR90 Zellen wurden mit 100 nM sAPP α für 15 h behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 proteotoxisch gestresst. Zusätzlich wurde die Autophagie mit 0,5 μ M BafA für 4 h gehemmt. (A) Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert. Es konnte keine Veränderung der Proteinexpression durch sAPP α unter proteasomalen Stress festgestellt werden. (B) Densitometrische Auswertung von A. Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. (C) Quantifizierung des autophagischen Flux von dem in (A) dargestellten Western Blot. Dazu wurden von den LC3-II Werten -BafA die LC3-II Werte +BafA subtrahiert. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3).

Außerdem wurden über Western Blot die Proteinlevel des Hitzeschockproteins Hsp90 und Proteine von Signaltransduktionsketten analysiert. Dabei konnte weder durch sAPP α noch durch APP E1 ein verändertes Expressionslevel der Proteine nach proteotoxischem Stress beobachtet werden (Tabelle 3.5.1 und Anhang Abbildung 7.1.3).

Gen	Junge Zellen	
	sAPP α	APP E1
Bag3	+	-
p62	-	-
LC3 II	-	n.t.
Lamp2	-	-
Hsp70	+	n.t.
Hsp90	-	n.t.

Gen	Junge Zellen	
	sAPP α	APP E1
pERK/ERK	-	n.t.
pJNK/JNK	-	n.t.
pAKT/AKT	-	n.t.
pGSK3 β /GSK3 β	-	n.t.

Tabelle 3.5.1 Western Blot Analyse Autophagie-relevanter Gene und Signaltransduktions-Marker nach proteotoxischem Stress durch sAPP α oder APP E1 in jungen IMR90. Junge IMR90 Zellen wurden für 15 h mit 100 nM sAPP α oder APP E1 behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 gestresst. Die Proteinspiegel wurden mittels Western Blot analysiert (siehe Abbildung 3.5.1, Abbildung 3.5.2 und im Anhang Abbildung 7.1.3). + signifikante Veränderung der Proteinspiegel; - keine Veränderung; n.t. nicht getestet. Die Daten zeigen die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten (n= 4).

Die Proteinanalyse der jungen Zellen ergab, dass Bag3 und Hsp70 zwei wichtige Spieler der Autophagie durch sAPP α , aber nicht durch APP E1 reduziert werden. Die Proteine p62 und LC3, die erst im späten Verlauf der Autophagie eine Rolle spielen sind nur geringfügig reguliert. Bei den restlichen Autophagie-relevanten Genen und Signaltransduktions-Markern konnte keine Regulierung beobachtet werden.

Die Zellviabilität der seneszenten IMR90 Zellen konnte durch sAPP α und APP E1 nicht verbessert werden, das schließt aber eine Regulierung der Proteinexpression nicht aus. Aus diesem Grund wurden die Versuche anschließend mit gealterten IMR90 Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass weder sAPP α (Abbildung 3.5.3. A) noch APP E1 (Abbildung 3.5.3. B) die Autophagie-relevanten Gene Bag3, p62 und Lamp2 unter proteasomalen Stressbedingungen regulierten. Bei Bag3 und p62 kann man unter Behandlung mit sAPP α eine Tendenz zur Abnahme sehen, die aber nicht signifikant ist (Abbildung 3.5.3. C).

Folglich wird in den seneszenten Zellen unter proteotoxischen Stress neben der Zellviabilität auch die Proteinexpression Autophagie-relevanter Gene nicht beeinflusst.

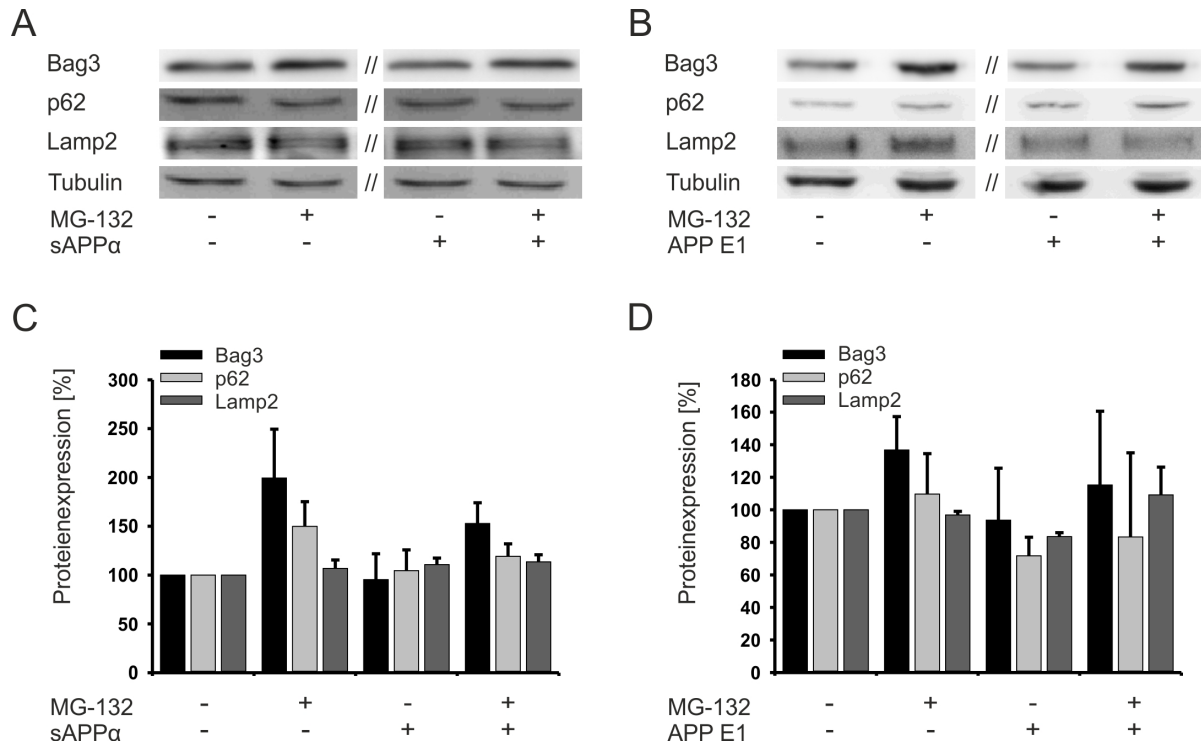


Abbildung 3.5.3 Western Blot Analyse von Autophagie-relevanten Genen in seneszenten IMR90 Zellen. Seneszente IMR90 Zellen wurden mit 100 nM sAPPα (A) oder 100 nM APP E1 (B) für 15 h behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μM MG-132 proteotoxisch gestresst. Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert. (C + D) Densitometrische Auswertung von (A) und (B). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Analyse ergab keine veränderten Proteinspiegel von Autophagie-relevanten Genen durch sAPPα und APP E1. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4).

Die reduzierten Proteinspiegel in den jungen IMR90 Zellen können durch unterschiedliche Gründe zustande kommen. So kann eine veränderte Transkription oder Translation die Regulierung bewirken, aber auch gesteigerter Proteinabbau kann Ursache für verringerte Proteinkonzentrationen sein. Aus diesem Grund wurden im Anschluss die mRNA-Spiegel wichtiger Autophagie-Gene in den jungen und seneszenten IMR90 Zellen analysiert. Dazu wurden ähnlich der Western Blot Analyse IMR90 Zellen zunächst mit sAPPα oder APP E1 inkubiert und anschließend mit MG-132 proteotoxisch gestresst.

Dabei zeigte sich bei den jungen Zellen unter Behandlung, dass die Bag3 und p62 mRNA-Level nach proteasomalem Stress steigen. Interessanterweise konnte nicht nur bei Bag3 sondern auch bei p62 nach zusätzlicher Behandlung mit sAPPα eine abnehmende mRNA Konzentration beobachtet werden (Abbildung 3.5.4. A). Bei der Behandlung mit APP E1 unter proteotoxischen Stress ist die Abnahme von Bag3 und p62 nicht signifikant (Abbildung 3.5.4. B).

Bei den gealterten IMR90 Zellen konnte wie auch in den Western Blots durch sAPP α und APP E1 keine Veränderung in den mRNA-Spiegeln von Bag3 und p62 nach proteasomalem Stress beobachtet werden (Abbildung 3.5.4. C + D).

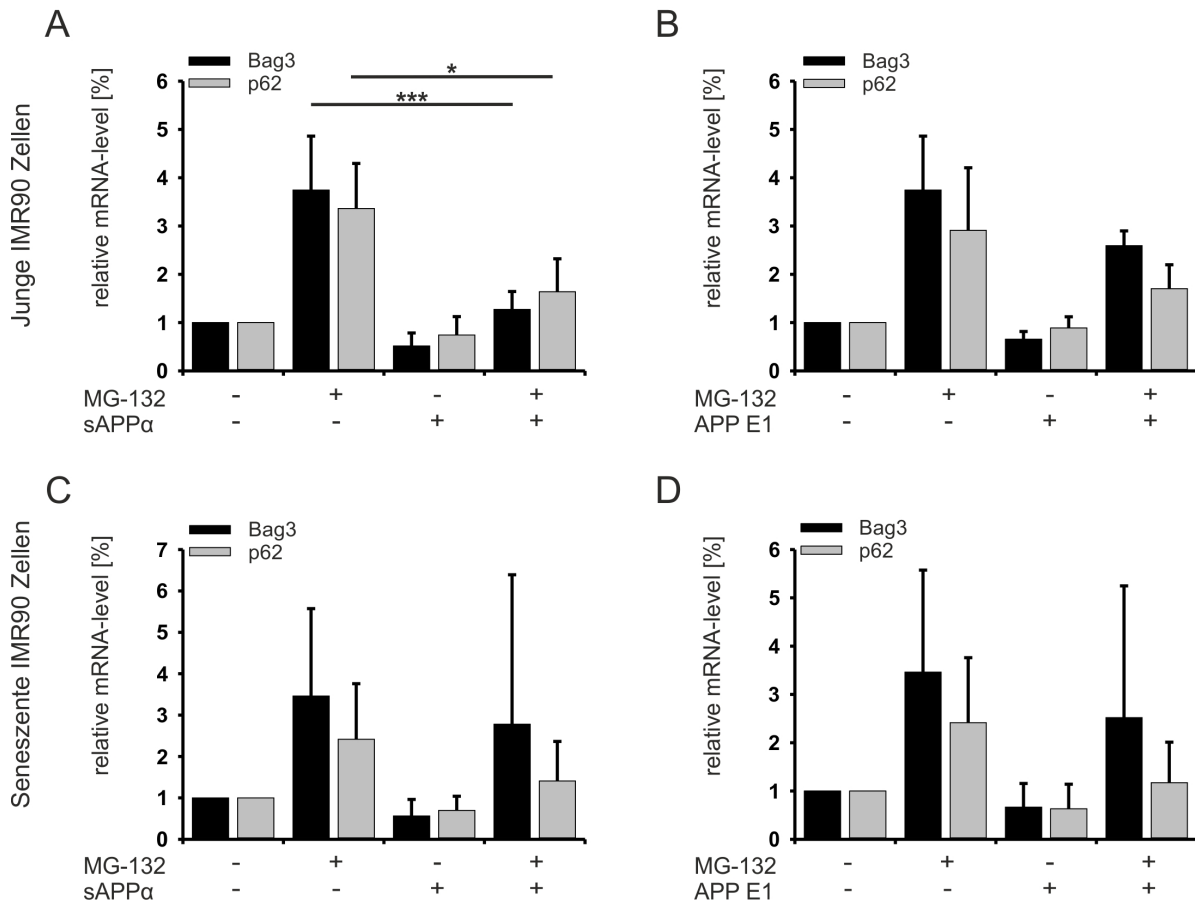


Abbildung 3.5.4. Analyse der mRNA-Spiegel von Autophagie-relevanten Genen in jungen und alten IMR90 Zellen. Junge und seneszente IMR90 Zellen wurden mit 100 nM sAPP α (A + C) oder 100 nM APP E1 (B + D) für 15 h behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 proteotoxisch gestresst. Anschließend wurde die mRNA aufgereinigt und über eine qRT-PCR analysiert. Die ermittelten Werte wurden auf GAPDH und anschließend auf die Kontrolle normiert. Die Analyse ergab, dass sAPP α die mRNA-Spiegel von Bag3 und p62 in jungen IMR90 Zellen, aber reduziert. APP E1 kann die mRNA-Spiegel in jungen Zellen geringfügig verringern. In den seneszenten Zellen waren die mRNA-Spiegel nicht verändert. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4). *p \leq 0,05 ***p< 0,001; Tuckey Test.

Insgesamt konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass sAPP α neben der Verbesserung der Zellviabilität in jungen IMR90 Zellen auch die Expression Autophagie-relevanter Gene reduziert. Da die Reduzierung der p62 Spiegel nur auf mRNA-Ebene, aber nicht auf Proteinebene beobachtet werden konnte, bleibt offen, ob zu einem späteren Zeitpunkt auch eine Regulierung der Proteinlevel zu sehen wäre. In den seneszenten Zellen konnte keine Veränderung festgestellt werden.

3.5.2. Der Einfluss von sAPP α auf Autophagie-relevante Gene unter proteasomalen Stress durch Epoxomicin

Der Proteasom-Inhibitor MG-132 beeinflusst nicht nur das Proteasom, sondern auch lysosomale Cystein-Proteasen und Calpaine. Um sicherzustellen, dass die bislang beobachteten Einflüsse von sAPP α ausschließlich durch die Inhibition des Proteasoms verursacht werden, wurden die Versuche mit Epoxomicin, einem anderen proteasomalen Inhibitor, wiederholt. Die jungen IMR90 Zellen wurden für 15 h mit sAPP α behandelt und dann für 24 h mit Epoxomicin gestresst. Ähnlich wie bei der Behandlung mit MG-132 konnte bei Bag3, die durch den Stress erhöhte Proteinexpression durch sAPP α wieder gesenkt werden und bei p62 und Lamp2 keine Veränderung beobachtet werden (Abbildung 3.5.5).

Dieses Ergebnis bestätigt, dass der Einfluss von sAPP α eine Reaktion auf die Inhibition des Proteasoms ist und nicht durch die Wirkung von MG-132 auf Calpaine und lysosomale Cystein-Proteasen verursacht wird.

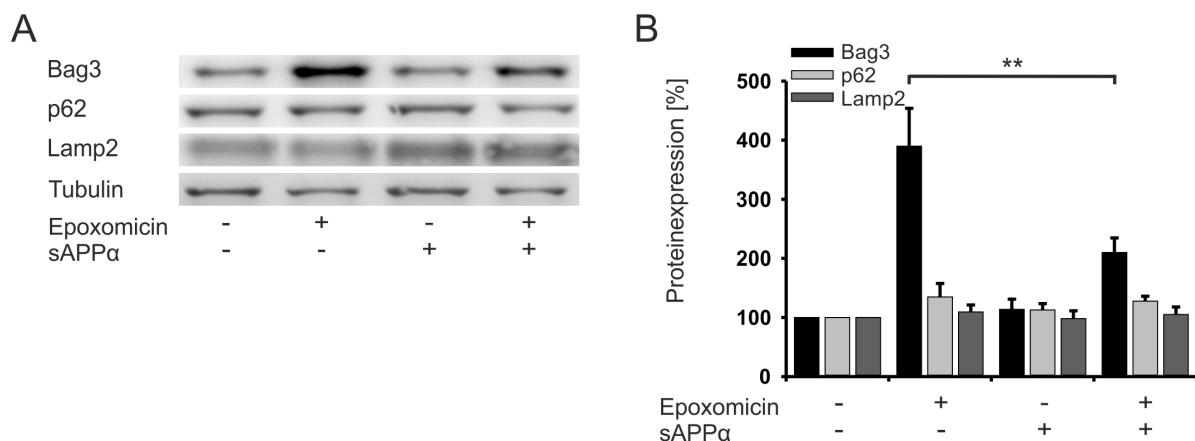


Abbildung 3.5.5 Western Blot Analyse nach Behandlung mit sAPP α unter proteasomalen Stress durch Epoxomicin. Junge IMR90 Zellen wurden für 15 h mit 100 nM sAPP α behandelt und anschließend zusätzlich für 24 h mit 100 nM Epoxomicin gestresst. Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert (A) und densitometrisch ausgewertet (B). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentuale Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen, dass auch nach proteotoxischen Stress durch Epoxomicin, die Proteinexpression von Bag3 durch sAPP α reduziert wird. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4). ** p<0,01; Tuckey Test.

3.5.3. sAPP α verhindert die durch MG-132 induzierte perinukleare Aggresomenformation

Die Inhibierung des Proteasoms führt in Zellen zur Ansammlung von beschädigten und fehlgefalteten Proteinen. Diese Proteine sammeln sich in der Nähe des Kernes in so genannten perinuklearen Aggresomen an und werden anschließend über die Autophagie abgebaut. Bag3 und Vimentin sind zwei Marker für Aggresomen, da sie direkt an diesen lokalisiert sind.

Da die Proteinexpression von Bag3 nach proteasomalem Stress und der Behandlung mit sAPP α verringert war, wurde untersucht inwiefern auch die Aggresomenformation sich durch sAPP α verändert. Dazu wurden Hek 293 Zellen mit sAPP α behandelt und anschließend mit MG-132 proteasomal gestresst. Hek 293 Zellen zeichnen sich durch eine kompakte Form aus, die im Gegensatz zu der langgestreckten Form der IMR90 Zellen besser zu analysieren war. Durch Immunfärbungen mit Bag3 und Vimentin wurde die Lokalisation und Expressionsmenge analysiert.

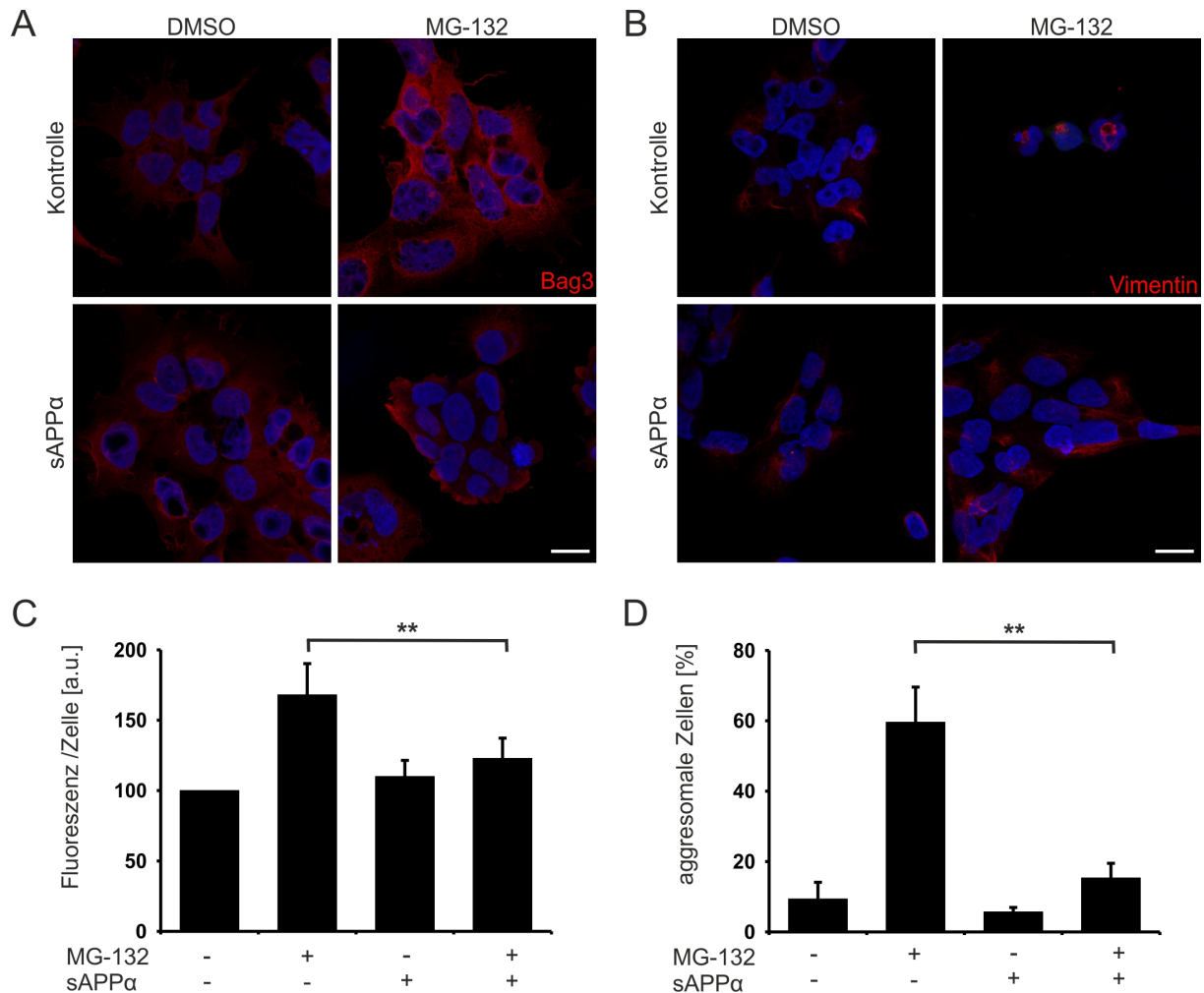


Abbildung 3.5.6 Aggresomen-Assay mit Hek 293 Zellen. Hek 293 Zellen wurden für 24 h mit 100 nM sAPP α vorbehandelt und anschließend zusätzlich mit 10 μ M MG-132 behandelt und nach 8 h mit PFA fixiert. Immunfärbung mit Anti-Bag3 (A) und mit Anti-Vimentin (B). (C) Densitometrische Auswertung von (A) gegen die Gesamtzellzahl (50 Zellen pro n). (D) Aufgetragen sind die Zellen bei den Vimentin aggresomal lokalisiert im Verhältnis zur Gesamtzellzahl. Die Analyse zeigte, dass durch sAPP α weniger Aggresomen unter proteasomalen Stressbedingungen vorlagen. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3). ** p \leq 0,01; Tuckey Test; Größenbalken: 20 μ m.

Die Immunfärbung mit Bag3 zeigte unter proteotoxischem Stress ein verstärktes Signal in der Nähe des Zellkerns, die bei den Zellen, die zusätzlich mit sAPP α behandelt wurden, nicht auftrat. sAPP α hatte alleine keinen Einfluss auf die Lokalisation von Bag3 (Abbildung 3.5.6. A). Zusätzlich wurde die Intensität der Fluoreszenz gemessen und gegen die Gesamtzellzahl aufgetragen. Dabei zeigte sich

ähnlich wie in den Western Blots der jungen IMR90 Zellen eine Abnahme des Bag3 Signals (Abbildung 3.5.6. B).

Die Vimentinfärbung zeigte sehr deutlich, dass nach der Behandlung mit MG-132 Vimentin gesammelt aggresomal am Kern lokalisiert war, wohingegen durch die zusätzliche Behandlung mit sAPP α es zu einer zytoplasmatischen Lokalisation kam (Abbildung 3.5.6. C). Für die Auswertung wurden alle Zellen mit aggresomaler Lokalisation von Vimentin ausgezählt und prozentual gegen die Gesamtzellzahl aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass Vimentin bei den Zellen, die proteasomalem Stress ausgesetzt waren ungefähr zu 60 % aggresomal lokalisiert war. Die Zellen, die mit sAPP α behandelt wurden und proteasomalen Stress ausgesetzt waren, hatten nur ca. 15 % aggresomale Lokalisation von Vimentin. Die Kontroll- und nur mit sAPP α behandelten Zellen hatten unter 10 % aggresomale Zellen (Abbildung 3.5.6. D).

Im Anschluss wurden unter gleichen Behandlungsbedingungen Hek 293 Zellen für eine Western Blot Analyse lysiert und auf die Autophagie-Marker Bag3, p62 und LC3 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Bag3 Proteinexpression ähnlich wie in den jungen IMR90 Zellen durch den proteotoxischen Stress mit MG-132 anstieg. Diese Proteinzunahme konnte durch sAPP α reduziert werden. Auf die Proteinexpression von p62 hatte sAPP α keinen Einfluss (Abbildung 3.5.7). Für die Analyse von LC3 wurde erneut mit BafA der Abbau der Autophagosomen inhibiert. Dabei zeigte sich, dass sAPP α auch in den Hek 293 Zellen den autophagischen Flux unter proteasomalen Stressbedingungen nicht signifikant beeinflussen konnte (Abbildung 3.5.8).

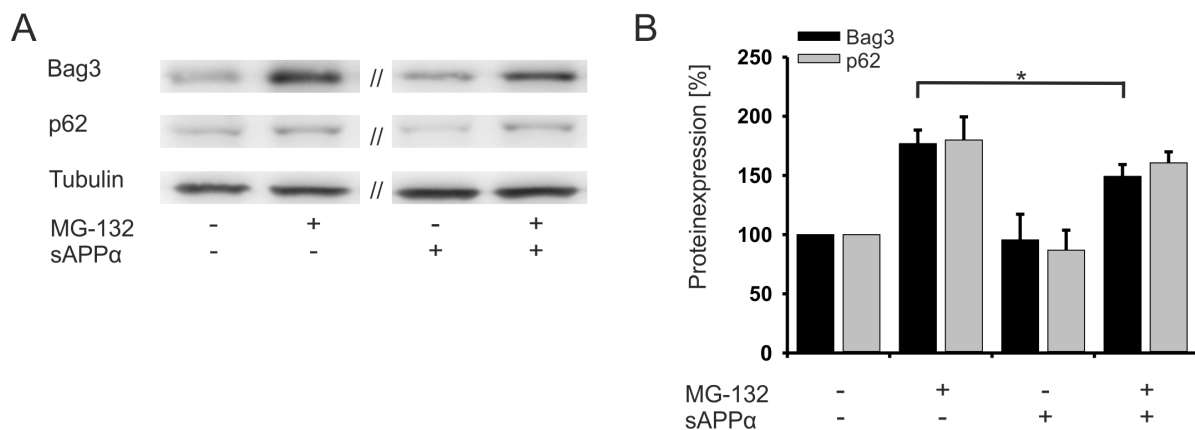
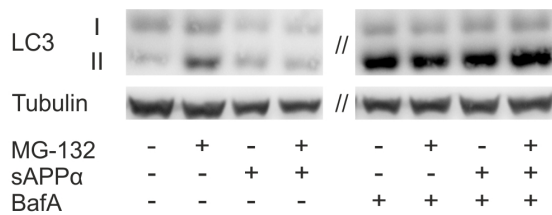
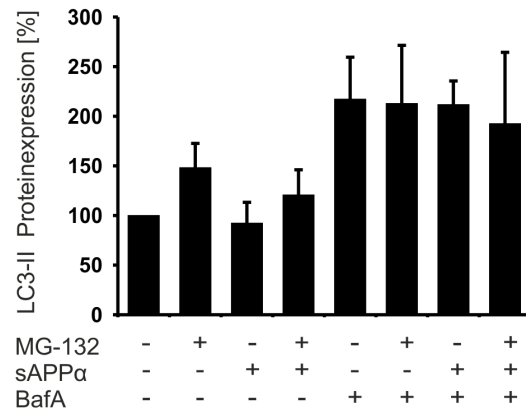


Abbildung 3.5.7. Western Blot Analyse von Autophagie-relevanten Genen in Hek 293 Zellen. Hek 293 Zellen wurden mit 100 nM sAPP α für 24 h behandelt und anschließend für 8 h mit 10 μ M MG-132 proteotoxisch gestresst. (A) Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert. // Entfernte Banden mit niedrigeren Konzentration von sAPP α . (B) Densitometrische Auswertung von (A). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. (C) Hek 293 Zellen wurden wie in (A) behandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass in der Zelllinie Hek 293 ähnlich wie in den jungen IMR90 Zellen die Proteinexpression von Bag3 unter proteasomalen Stress durch sAPP α reduziert wird. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4). * p \leq 0,05; Tuckey Test.

A



B



C

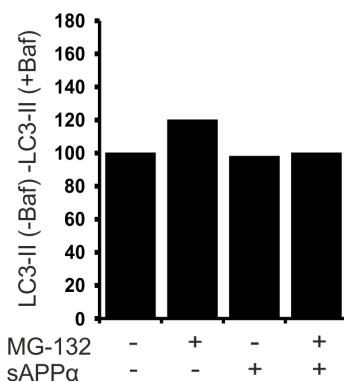


Abbildung 3.5.8. Western Blot Analyse der LC3 Proteinexpression in Hek 293 Zellen. Hek 293 Zellen wurden mit 100 nM sAPP α für 24 h behandelt und anschließend für 8 h mit 10 μ M MG-132 proteotoxisch gestresst. Zusätzlich wurde die Autophagie mit 0,5 μ M BafA für 4 h gehemmt. (A) Zellysate wurden mittels Western Blot analysiert. Es konnte keine Veränderung der Proteinexpression durch sAPP α unter proteasomalen Stress festgestellt werden. (B) Densitometrische Auswertung von A. Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. (C) Quantifizierung des autophagischen Flux von dem in (A) dargestellten Western Blot. Dazu wurden von den LC3-II Werten -BafA die LC3-II Werte +BafA subtrahiert. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass durch sAPP α die Aggresomenformation unter proteasomalen Stress reduziert wird. Dies konnte sowohl mit einer Immunfärbung von Bag3 als auch mit einer Färbung von Vimentin gezeigt werden. Außerdem ergaben die Ergebnisse, dass klonale Zellen in diesem Versuch ähnliche Ergebnisse wie junge Zellen zeigen, da auch in den Hek 293 Zellen die Proteinexpression von Bag3 durch sAPP α unter proteasomalen Stress reduziert wurde.

3.5.4. sAPP α verändert die Lokalisation von mutanter SOD1 unter proteasomalen Stressbedingungen

Ein weiteres Protein, das über die Autophagie abgebaut wird, ist die Superoxiddismutase 1 (SOD1). Mutationen in diesem Protein können zum Ausbruch der neurodegenerativen Krankheit ALS führen. Im folgenden Versuch sollte die Lokalisation der SOD1 Mutanten G85R (SOD1^{G85R}) und G93A (SOD1^{G93A}) analysiert werden. Für die Analyse wurden Vektoren verwendet, in denen die mutante

SOD1 mit GFP gekoppelt wurde. Ähnlich wie bei Vimentin liegen beide Mutanten unter normalen Bedingungen zytoplasmatisch, bei leichtem Stress prä-aggresomal und unter starkem Stress aggresomal vor (Abbildung 3.5.9).

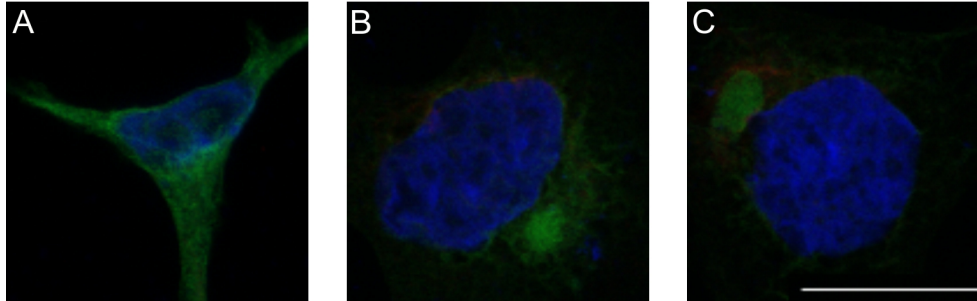


Abbildung 3.5.9. Die drei Lokalisationen von SOD1^{G85R}: Zytoplasmatische (A), prä-aggresomale (B) und aggresomale (C) Lokalisation. Größenbalken: 20 µm.

Hek 293 Zellen wurden mit den Vektoren transfiziert und später mit sAPP α und MG-132 behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und mikroskopisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass die Lokalisation von SOD1^{G85R} in den Kontrollen und den Zellen, die nur mit sAPP α behandelt wurden größtenteils zytoplasmatisch war (~99 %). In den meisten Zellen, die proteotoxisch gestresst wurden lag SOD1^{G85R} aggresomal vor (71 % \pm 11). Bei den Zellen, die sowohl mit sAPP α behandelt, als auch proteasomal gestresst wurden, lag SOD1^{G85R} nur bei 8 % der Zellen aggresomal lokalisiert vor (Abbildung 3.5.10. A + B). Dieselben Beobachtungen konnten auch mit dem SOD1^{G93A}-GFP Konstrukt gemacht werden (Abbildung 3.5.10. C + D).

Durch diesen Versuch konnte das Ergebnis des Aggresomen-Assay bestätigt werden, da in beiden Ansätzen weniger mutante SOD1 aggresomal vorlag. Stattdessen lag diese zytoplasmatisch, ähnlich wie in den Kontrollzellen vor.

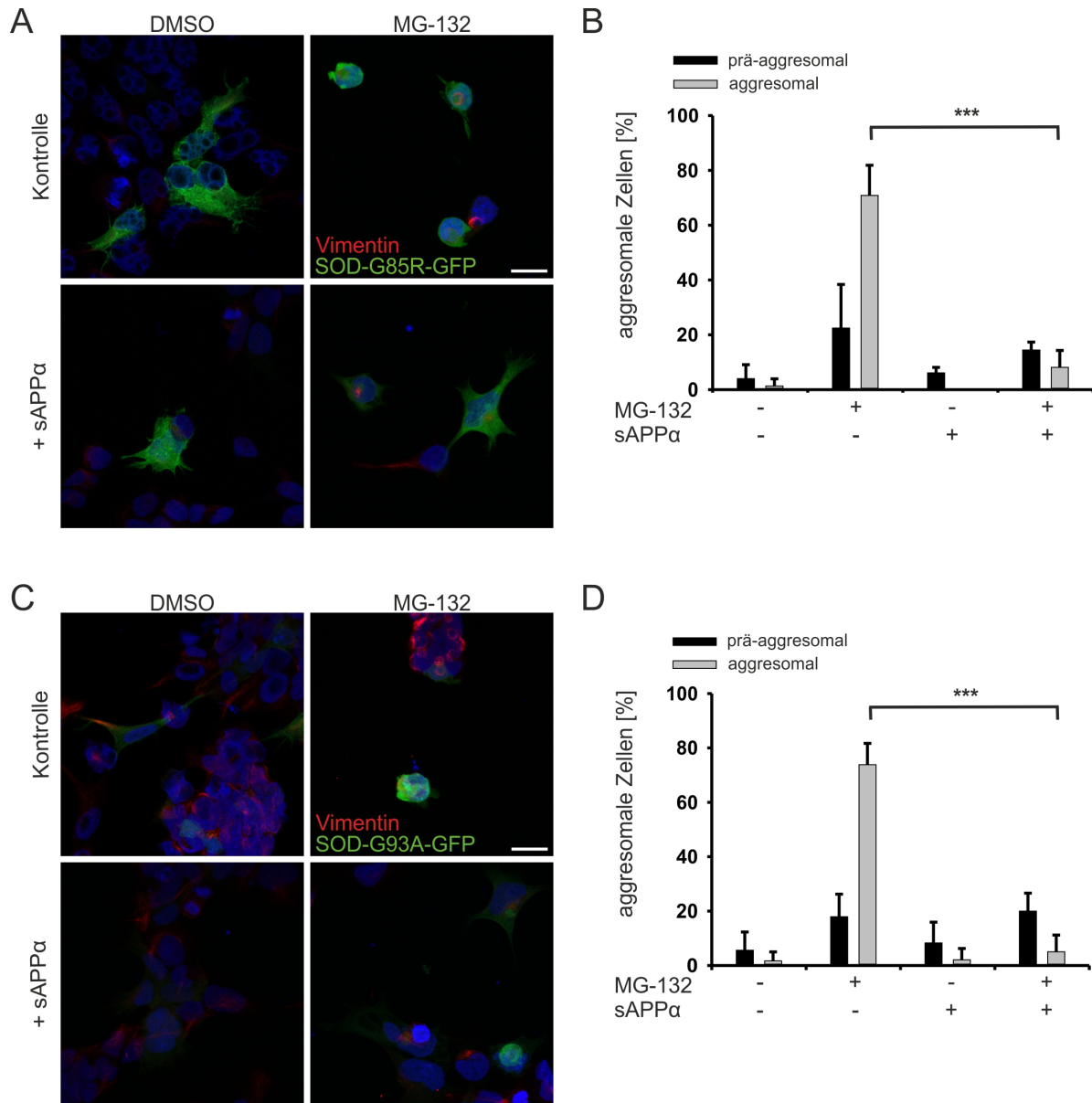


Abbildung 3.5.10. Immunocytochemie nach Transfektion mit SOD1-GFP Konstrukten in Hek 293 Zellen. Hek 293 Zellen wurden mit SOD1^{G85R}-GFP bzw. SOD1^{G93A}-GFP transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 100 nM sAPPα behandelt und nach weiteren 15 h mit 0,5 μM MG-132. 24 h später wurden die Zellen fixiert und zur Kontrolle eine Immunfärbung mit Anti-Vimentin durchgeführt. Mikroskopische Aufnahme mit SOD1^{G85R}-GFP (A) und SOD1^{G93A}-GFP (C). Auftragung der prä-aggregosomalen und aggregosomalen Zellen für SOD1^{G85R}-GFP (B) und SOD1^{G93A}-GFP (D) gegen die Gesamtzellzahl von ungefähr 60 Zellen. Die Ergebnisse zeigten, dass sAPPα nach proteasomalen Stress die Anzahl von aggregosomalen Zellen verringert. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3). *** p < 0,001; Tuckey Test; Größenbalken: 20 μm.

3.6. Der Einfluss von sAPPα und APP E1 auf das Proteasom

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass sAPPα unter proteasomalen Stress die Zellviabilität erhöht und anscheinend die Autophagie reduziert wird. Neben der Autophagie können fehlgefaltete und beschädigte Proteine über den proteasomalen Weg abgebaut werden. Dabei werden die Proteine durch Ubiquitin markiert und anschließend durch das 26S Proteasom abgebaut. Die Aktivität des

Proteasoms wurde über das proteasomale Substrat d2 und über einen Aktivitätsassay gemessen. Außerdem wurden die Protein- und mRNA-Level wichtiger proteasomaler Gene überprüft.

3.6.1. sAPP α aktiviert den Abbau von d2-GFP unter proteotoxischen Stress

Die Aktivität des Proteasoms wurde zunächst über ein proteasomales Substrat gemessen. Dazu wurden Hek 293 Zellen verwendet, die stabil mit einem d2-GFP Vektor transfiziert waren. Das d2-Protein wird ausschließlich über das Proteasom abgebaut und ist in dem Vektor mit einer PEST Sequenz sowie mit GFP gekoppelt. Die Zellen wurden mit sAPP α inkubiert und im Anschluss mit MG-132 gestresst. Die Analyse des Substrates erfolgt indirekt mit einem GFP Antikörper über einen Western Blot.

Durch die Inhibierung des Proteasoms mit MG-132 steigt die Proteinkonzentration von d2-GFP an. Die Zellen, die zusätzlich mit sAPP α behandelt wurden, zeigten hingegen eine signifikant niedrigere Konzentration. Die Zellen, die nur mit sAPP α behandelt wurden, besaßen eine ähnliche Konzentration von d2-GFP wie die Kontrollzellen (Abbildung 3.6.1). Dieses Ergebnis deutet an, dass sAPP α das Proteasom trotz des Inhibitors MG-132 aktivieren kann, da weniger von dem Proteasom-Substrat d2 gemessen werden konnte.

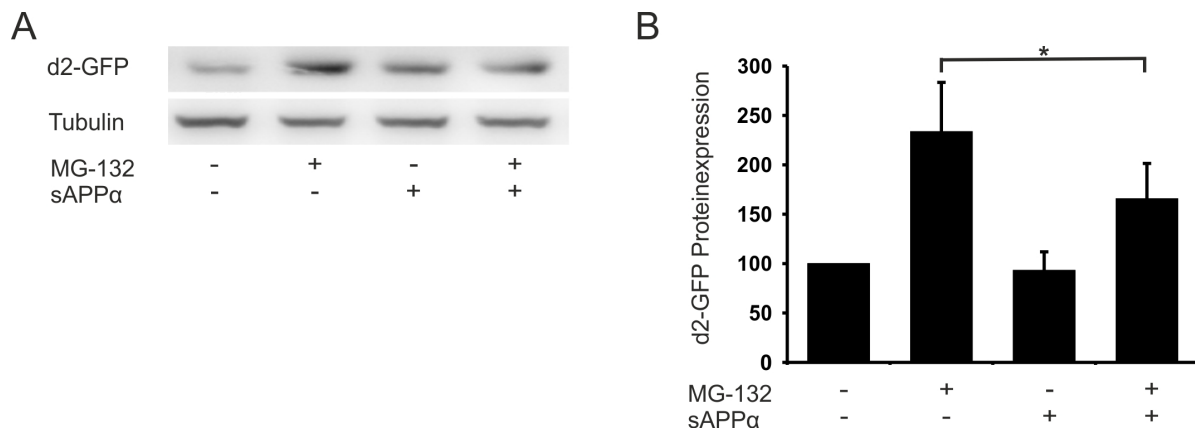


Abbildung 3.6.1. Western Blot Analyse der d2-GFP-Hek Zellen unter proteasomalen Stress. Stabil mit d2-GFP transfizierte Hek 293 Zellen wurden für 15 h mit 100 nM sAPP α behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 gestresst. Die Zellen wurden lysiert und über Western-Blot analysiert. (A) Repräsentativer Western Blot. (B) Densitometrische Auswertung der Western Blots. Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Ergebnisse zeigten, dass durch sAPP α die Proteinlevel von d2-GFP nach proteasomalen Stress abnehmen. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4). *p<0,05; Tuckey Test.

3.6.2. Die Aktivität des Proteasoms kann durch sAPP α erhöht werden

Nachdem gezeigt wurde, dass durch sAPP α unter proteasomalen Stressbedingungen weniger von dem Proteasom-Substrat d2 vorlag, wurde die Aktivität des Proteasoms über die Spaltung des UPS-Substrates Suc-LLVY-AMC (*N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin*) nachgewiesen,

das durch das 20S Proteasom gespalten wird. Dabei entsteht AMC, das bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt wird und somit über eine Fluoreszenzmessung die Aktivität des Proteasoms gemessen werden kann. Junge und seneszente IMR90 Zellen, sowie Hek 293 Zellen wurden für die Analyse mit sAPP α bzw. APP E1 und dem Proteasom-Inhibitor MG-132 behandelt. Anschließend wurden die Zellen aufgearbeitet und das Assay durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.8).

Bei den jungen Zellen sieht man eine deutlich reduzierte proteasomale Aktivität durch den Proteasom-Inhibitor MG-132. Die Aktivität der Zellen, die zusätzlich mit sAPP α behandelt wurden ist nach 60 und 120 min leicht erhöht. Nach 180 min Inkubationszeit kann eine signifikant höhere Aktivität gegenüber den nur mit MG-132 behandelten Zellen festgestellt werden. Die Zellen, die nur mit sAPP α behandelt wurden, zeigten eine ähnliche Aktivität wie die Kontrollzellen (Abbildung 3.6.2. A). Bei den seneszenten IMR90 Zellen ist die Aktivität des Proteasoms durch MG-132 ebenfalls reduziert, diese kann aber nicht durch sAPP α erhöht werden (Abbildung 3.6.2. B).

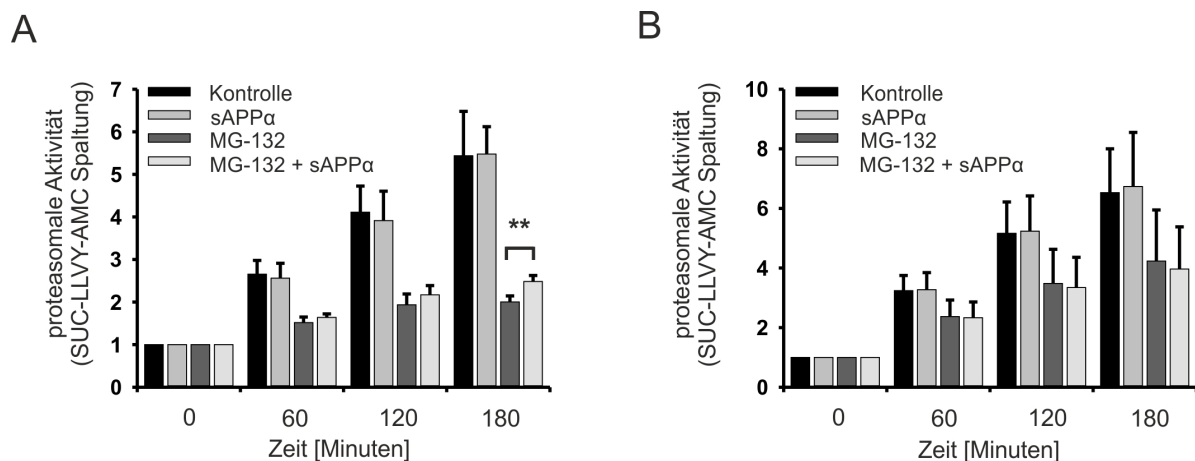


Abbildung 3.6.2. Proteasom-Aktivitätsassay in jungen und alten IMR90 Zellen. Junge (A) und alte (B) IMR90 Zellen wurden für 15 h mit 100nM sAPP α inkubiert und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 behandelt. Zelllysate wurden mit Suc-LLVY-AMC bei 37 °C inkubiert und alle 60 min wurde das Lysat bei 360 nm angeregt und die Emission von 460 nm gemessen. Die Daten wurden auf den Startwert normiert und aufgetragen. Die Analyse zeigte, dass sAPP α die proteasomale Aktivität unter proteotoxischen Stress in jungen IMR90 Zellen, jedoch nicht in seneszenten Zellen, steigern kann. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4). ** p \leq 0,01; Tukey Test.

Im Weiteren wurde der Einfluss von APP E1 auf die jungen und alten IMR90 Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass APP E1 die durch MG-132 reduzierte proteasomale Aktivität weder in den jungen (Abbildung 3.6.3. A) noch in den alten Zellen (Abbildung 3.6.3. B) erhöhen konnte. In Hek 293 Zellen konnte sAPP α ähnlich wie in den jungen IMR90 Zellen die durch MG-132 reduzierte Aktivität wieder erhöhen (Abbildung 3.6.3. C). APP E1 hatte auch in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Aktivität (Abbildung 3.6.3. D).

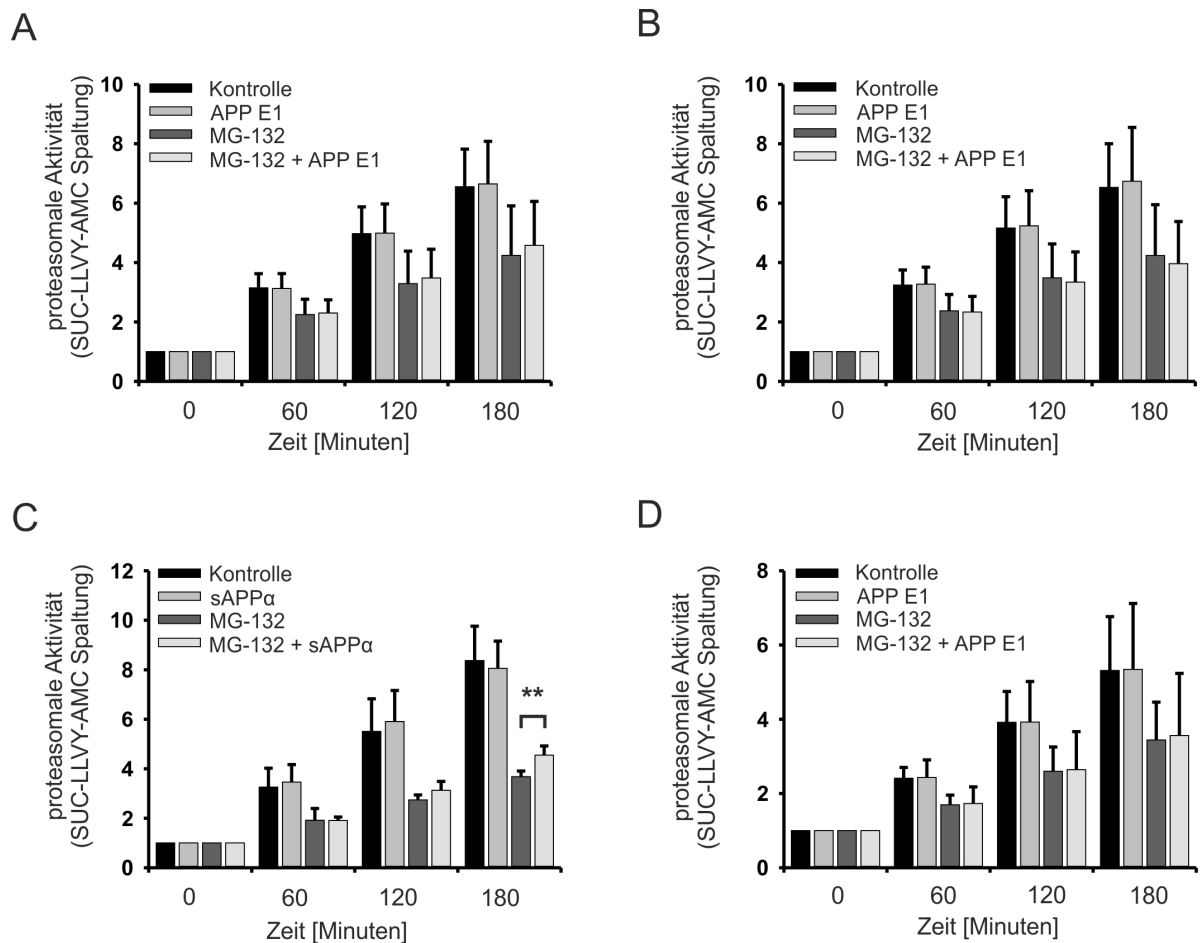


Abbildung 3.6.3. Proteasom-Aktivitätsassay in jungen und seneszenten IMR90 und Hek 293 Zellen. Junge (A) und seneszente (B) IMR90 Zellen wurden für 15 h mit 100 nM APP E1 inkubiert und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 inkubiert. Hek 293 Zellen wurden ebenfalls für 15 h mit 100 nM sAPP α (C) oder APP E1 (D) vorbehandelt und mit 0,5 μ M MG-132 proteotoxisch gestresst. Zelllysate wurden mit Suc-LLVY-AMC bei 37 °C inkubiert und alle 60 min wurde das Lysat bei 360 nm angeregt und die Emission von 460 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden auf den Startwert normiert und aufgetragen. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4). ** $p \leq 0,01$; Tuckey Test.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass sAPP α , aber nicht APP E1 die proteasomale Aktivität in jungen IMR90 Zellen und in Hek 293 Zellen unter proteasomalen Stress steigern kann. Da das Proteasom im aktiven Zustand die Autophagie inhibiert, bestätigen diese Ergebnisse auch die Reduktion der Bag3 und p62 Spiegel. Außerdem konnte keine gesteigerte Aktivität des Proteasoms in den alten Zellen festgestellt werden.

3.6.3. Der Einfluss von sAPP α auf die Expression proteasomal wichtiger Faktoren

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sAPP α die Aktivität des Proteasoms unter proteasomalen Stress steigert. Dieser Stress wurde durch einen Inhibitor verursacht, der die Aktivität des 20S Proteasoms inhibiert. Daher lag die Vermutung nahe, dass sAPP α über eine Erhöhung der Proteinexpression wichtiger proteasomaler Gene die Aktivität steigert. Aus diesem Grund wurde anschließend die Expression dieser Gene mittels Western Blot und qRT-PCR analysiert.

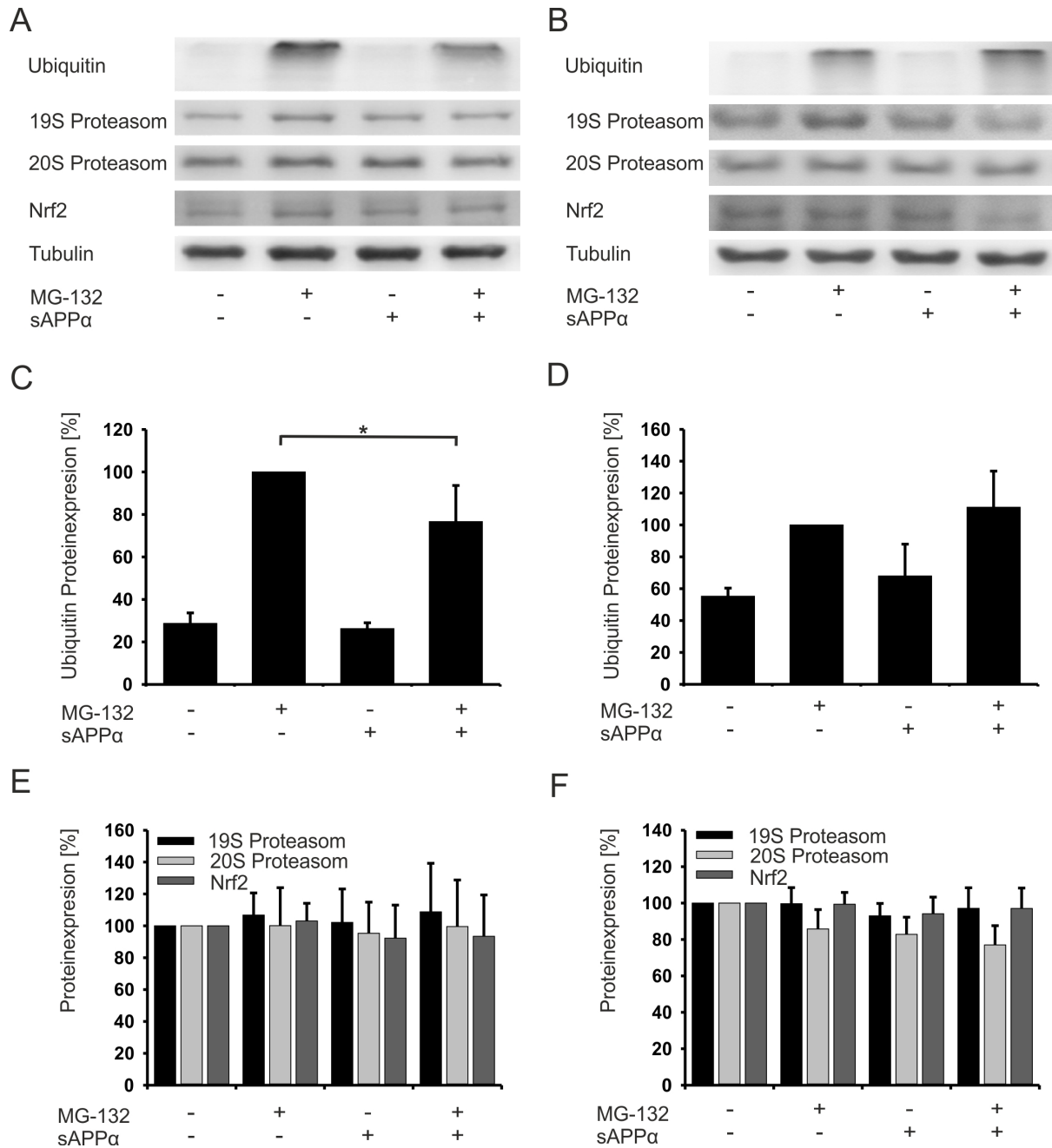


Abbildung 3.6.4. Western Blot Analyse von Faktoren des proteasomalen Abbauges. Junge und alte IMR90 Zellen wurden für 15 h mit 100 nM sAPP α und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 inkubiert und mittels Western Blot analysiert. Repräsentative Blots von Zelllysaten junger (A) und alter (B) IMR90 Zellen. Densitometrische Auswertung von Ubiquitin von jungen (C) und alten (D) IMR90 Zellen, durch die sehr geringen Expressionslevel in den Kontrollen, wurde auf die proteasomal gestressten Lysate normiert. (E + F) Densitometrische Auswertung von Nrf2, 19S und 20S Proteasom. Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Diese Analysen zeigten, dass durch sAPP α unter proteasomalen Stress, die Ubiquitin-Spiegel reduziert werden. Die anderen proteasomal-relevanten Gene zeigten keine Veränderung in der Expression. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n=4). * $p \leq 0,05$; Tukey Test.

In der Western Blot Analyse wurden neben Ubiquitin, das fehlgefaltete und beschädigte Proteine für den Abbau markiert das 19S und das 20S Proteasom sowie Nrf2 analysiert. In den Kontrollen und den nur mit sAPP α behandelten jungen IMR90 Zellen konnten nur sehr geringe Proteinmengen an Ubiquitin festgestellt werden. Durch die Inhibition des Proteasoms steigt die Konzentration von

Ubiquitin, die zusätzliche Inkubation mit sAPP α führt zu verringerten Ubiquitin Konzentrationen (Abbildung 3.6.4. A + C). Bei den alten Zellen kann sAPP α die durch MG-132 erhöhten Level an Ubiquitin nicht reduzieren (Abbildung 3.6.4. B + D). Die Proteinexpressions-Level von Nrf2 und dem 19S und 20S Proteasom bleiben in den jungen und alten IMR90 sowohl nach proteasomalen Stress als auch nach Inkubation mit sAPP α unverändert (Abbildung 3.6.4).

Im Anschluss wurden die mRNA-Level der drei 20S Proteasom Untereinheiten PSMB5, PSMB6 und PSMB7 untersucht. PSMB5 und PSMB6 zeigen weder in den jungen (Abbildung 3.6.5. A) noch in den alten IMR90 Zellen (Abbildung 3.6.5. B) eine Regulierung durch sAPP α . PSMB7 ist sowohl bei den jungen als auch in den alten Zellen nach Behandlung mit MG-132 erhöht. Durch zusätzliche Behandlung mit sAPP α ist eine Tendenz zu geringeren mRNA-Leveln erkennbar, die aber nicht signifikant ist (Abbildung 3.6.5).

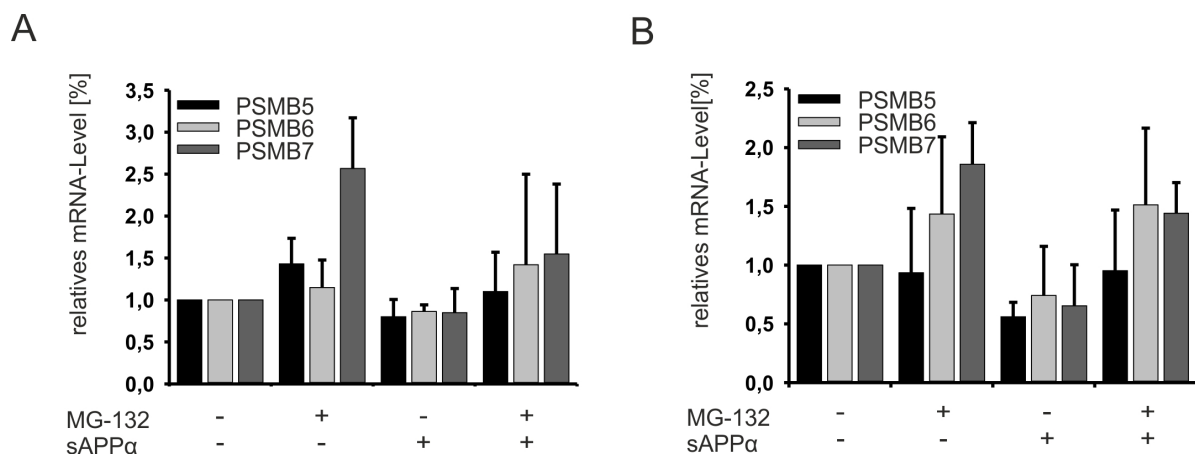


Abbildung 3.6.5. Unveränderte mRNA-Level der 20S Proteasom Untereinheiten. Junge (A) und seneszente (B) IMR90 Zellen wurden mit 100 nM sAPP α für 15 h behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 proteotoxisch gestresst. Im Anschluss wurde die mRNA aufgereinigt und über eine qRT-PCR analysiert. Die ermittelten Werte wurden auf GAPDH und anschließend auf die Kontrolle normiert. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n=4).

Des Weiteren wurden auch die mRNA-Level von Bag1 und Nrf2 untersucht. Auch bei diesen beiden Genen konnte keine Regulierung der mRNA durch sAPP α festgestellt werden. Ebenso hatte APP E1 keinen Einfluss auf die Konzentration der mRNA von den drei 20S Proteasom Untereinheiten, Nrf2 und Bag1 (Tabelle 3.6.1).

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass sAPP α nicht wie vermutet die Protein- und mRNA-Spiegel der proteasomal-relevanten Gene verändert. Lediglich Ubiquitin wies eine veränderte Proteinspiegel auf, da durch die erhöhte Aktivität des Proteasoms vermutlich weniger fehlgefaltete Proteine vorlagen, die für den Abbau markiert werden mussten. Die Aktivierung des Proteasoms durch sAPP α erfolgt folglich nicht durch erhöhte Proteinexpression proteasomaler Proteine.

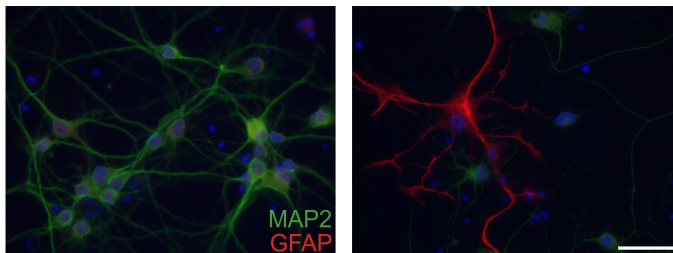
Gen	Junge Zellen		Alte Zellen	
	sAPP α	APP E1	sAPP α	APP E1
Bag1	-	-	-	-
PSMB5	-	-	-	-
PSMB5	-	-	-	-
PSMB7	-	-	-	-
Nrf2	-	-	-	-

Tabelle 3.6.1. Keine Veränderung in den mRNA-Leveln nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 in jungen und seneszenten IMR90 Zellen. Junge und alte IMR90 Zellen wurden für 15 h mit 100 nM sAPP α oder APP E1 behandelt und anschließend mit 0,5 μ M MG-132 proteotoxisch gestresst. Die Zellysate wurden mittels qRT-PCR analysiert. - Keine Veränderung; Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n=4).

3.7. Der Einfluss von sAPP α auf die Proteinhomöostase in primären Neuronen

In den vorangegangenen Versuchen wurde der Effekt von sAPP α und APP E1 in Lungenfibroblasten (IMR90) und Nierenzellen (Hek 293) gezeigt. Da APP ein wichtiger Faktor in der AD, einer neurodegenerativen Erkrankung ist, wurde im folgenden Abschnitt der Einfluss von sAPP α auf die PQC in primären neuronalen Zellen aus dem Hippocampus und dem Kortex analysiert.

A



B

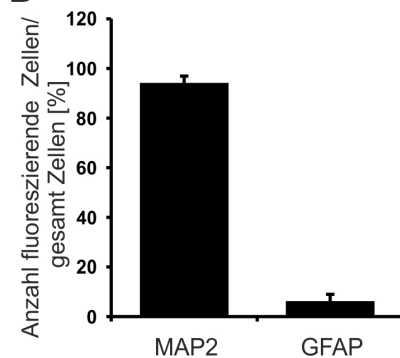


Abbildung 3.7.1. Immunfärbung der primären Zellen. (A) Kortikale Zellen wurden nach einer Ausdifferenzierungszeit von 7 Tagen mit MAP2 (neuronaler Marker) und GFAP (Gliazell-Marker) immunhistochemisch gefärbt. (B) Auftragung der neuronalen (MAP2 positiven) und glialen (GFAP positiven) Zellen gegen die Gesamtzellzahl von 224. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n=3). Größenbalken: 50 μ m

Bei der Präparation von primären Zellen aus dem Gehirn, gewinnt man neben den gewünschten neuronalen Zellen auch Gliazellen. Im Idealfall sollte der Anteil an Gliazellen möglichst gering sein. Für die Analyse der gewonnenen Zellen wurde eine Immunfärbung mit GFAP und MAP2 durchgeführt. GFAP ist ein Hauptbestandteil der Intermediärfilamente im Zytoplasma von Gliazellen. MAP2 ist ein Protein, das die Mikrotubuli in post-mitotischen Neuronen stabilisiert. Die Immunfärbung zeigte, dass ungefähr 95 % der Zellen in der Kultur neuronal und 5 % glial waren (Abbildung 3.7.1).

Anschließend wurde die Proteinexpression von Bag3, p62 und Ubiquitin in diesen Zellen untersucht. Sowohl in kortikalen als auch in hippocampalen Zellen konnten die Effekte, die für die jungen IMR90 Zellen gezeigt wurden, bestätigt werden. So stieg die Konzentration der drei Proteine unter

proteasomalen Stress an und konnte bei Bag3 und Ubiquitin durch sAPP α , nicht aber durch APP E1 signifikant reduziert werden. p62 war auch in diesen Zellen nicht reguliert (Abbildung 3.7.2).

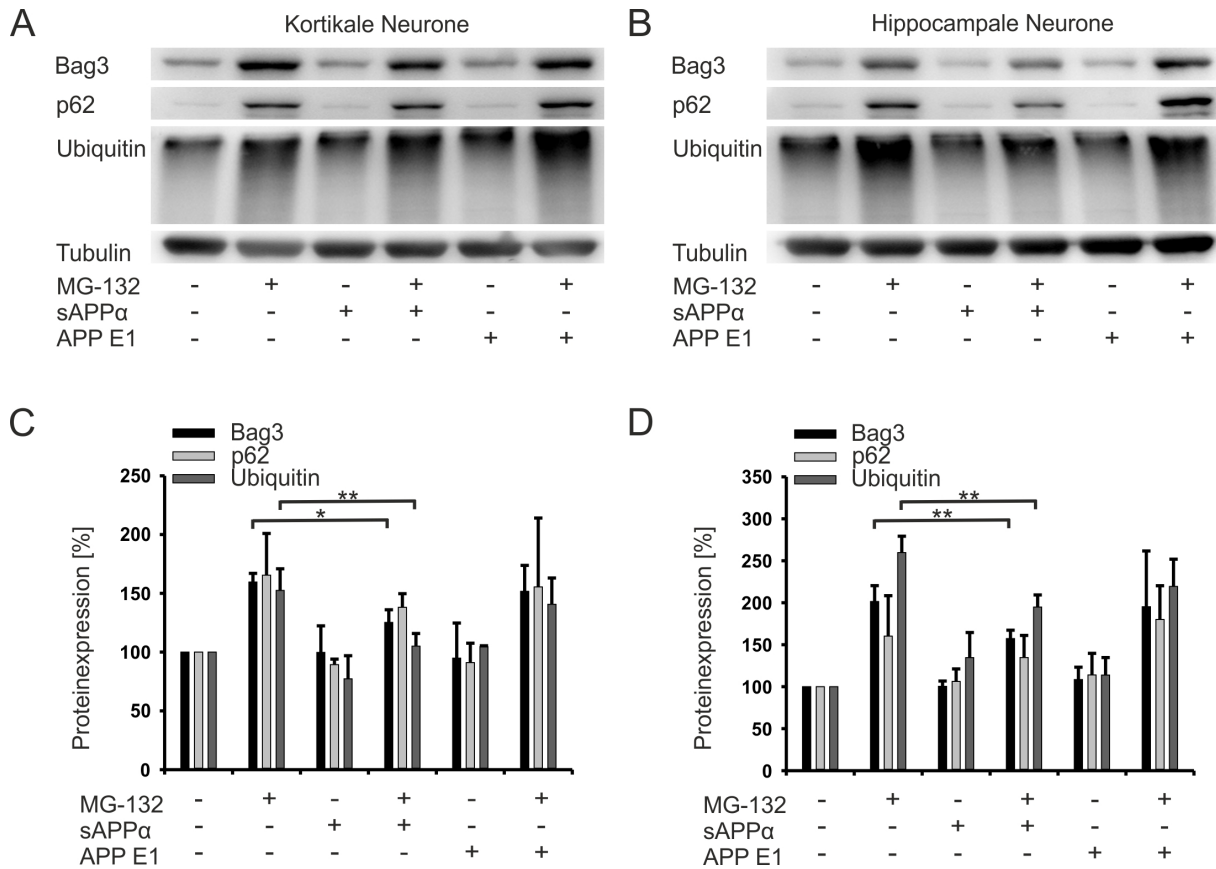


Abbildung 3.7.2. Western Blot Analyse von primäre Neuronen unter proteasomalen Stress. Primäre neuronale Zellen wurden aus Hippocampi und Korti von Rattenembryonen E17 präpariert. Nach einer Ausdifferenzierungsphase von 7 Tagen wurden die Zellen mit 100 nM sAPP α bzw. APP E1 für 15 h und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 behandelt. (A + B) Repräsentative Western Blots der kortikalen (A) und hippocampalen (B) Neurone. (C + D) Densitometrische Auswertung von (A) und (B). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Analyse ergab, dass ähnlich wie in den jungen IMR90 Zellen die Expression von Bag3 und Ubiquitin durch sAPP α unter proteasomalen Stress reduziert wird. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n=4). *p \leq 0,05 ** p \leq 0,01; Tukey Test.

Insgesamt konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass sAPP α auch in neuronalen Zellen die Proteinexpression von Bag3 und die Level an poly-ubiquitinierten Proteinen nach proteotoxischen Stress reduziert.

3.8. Der Einfluss des löslichen sAPP β auf die Proteinhomöostase

Das lösliche Prozessierungsprodukt sAPP β ist nur wenige Aminosäuren kürzer als sAPP α , dennoch wird in der Literatur oft von unterschiedlichen Funktionen der beiden Proteine berichtet. Im folgenden Abschnitt wurde analysiert inwiefern sAPP β die PQC unter proteasomalen Stress beeinflussen kann.

Zunächst wurde die Proteinlevel von Bag3, p62 und Ubiquitin unter proteasomalen Stress untersucht. Dabei zeigte sich, dass sAPP β , ähnlich wie sAPP α die durch MG-132 induzierten Expressionslevel von Bag3 und Ubiquitin reduziert. Bei p62 konnte keine veränderte Proteinexpression festgestellt werden (Abbildung 3.8.1).

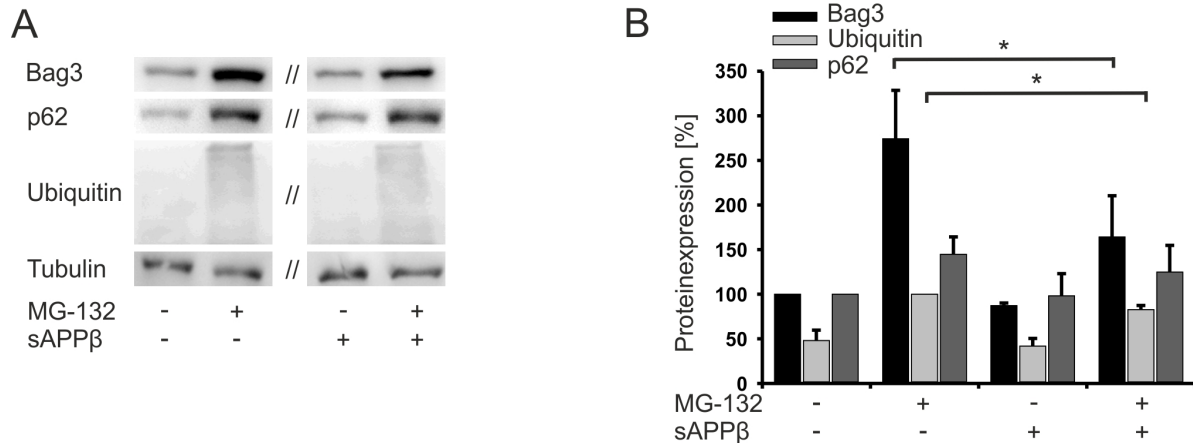


Abbildung 3.8.1. Western Blot Analyse von jungen IMR90 Zellen unter proteotoxischen Stress. Junge IMR90 Zellen wurden für 15 h mit 100 nM sAPP β behandelt und anschließend zusätzlich für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 gestresst. Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert (A) und densitometrisch ausgewertet (B). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Analyse ergab, dass sAPP β ähnlich wie sAPP α die Expression von Bag3 und Ubiquitin unter proteasomalen Stress verringert. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n=3). * $p \leq 0,05$; Tuckey Test.

Da die Expressionslevel von Bag3 und Ubiquitin erniedrigt waren, wurde zusätzlich die Aggresomenformation untersucht (siehe Kapitel 3.5.3).

Die Färbung mit Bag3 zeigt nach proteotoxischem Stress ein verstärktes Signal in der Nähe des Zellkerns. Bei zusätzlicher Behandlung mit sAPP β konnte eine signifikant verringerte Intensität von Bag3 beobachtet werden (Abbildung 3.8.2. A). Zusätzlich wurde die Intensität der Fluoreszenz gemessen und gegen die Gesamtzellzahl aufgetragen. Dabei zeigte sich ähnlich wie bei der Analyse von sAPP α eine Abnahme des Bag3 Signals (Abbildung 3.8.2. C).

Die Färbung mit Vimentin zeigte, dass durch sAPP β eher eine zytoplasmatische Lokalisation von Vimentin vorliegt. Zellen unter proteasomalen Stress, die mit sAPP β behandelt wurden hatten zu 20 % eine aggresomale Lokalisation von Vimentin. Ohne sAPP β hatten ca. 60 % der gestressten Zellen eine aggresomale Lokalisation (Abbildung 3.8.2. B + D), somit wird durch sAPP β die Anzahl von Zellen bei denen Vimentin aggresomal vorliegt, verringert.

Diese Versuche haben gezeigt, dass nicht nur sAPP α die Proteinlevel von Bag3 und die Level an polyubiquitinierten Proteinen reduziert, sondern auch das wenige Aminosäuren kürzere sAPP β . Auch die reduzierte Anzahl an Aggresomen bestätigt, dass sAPP β eine ähnliche Wirkung zeigt.

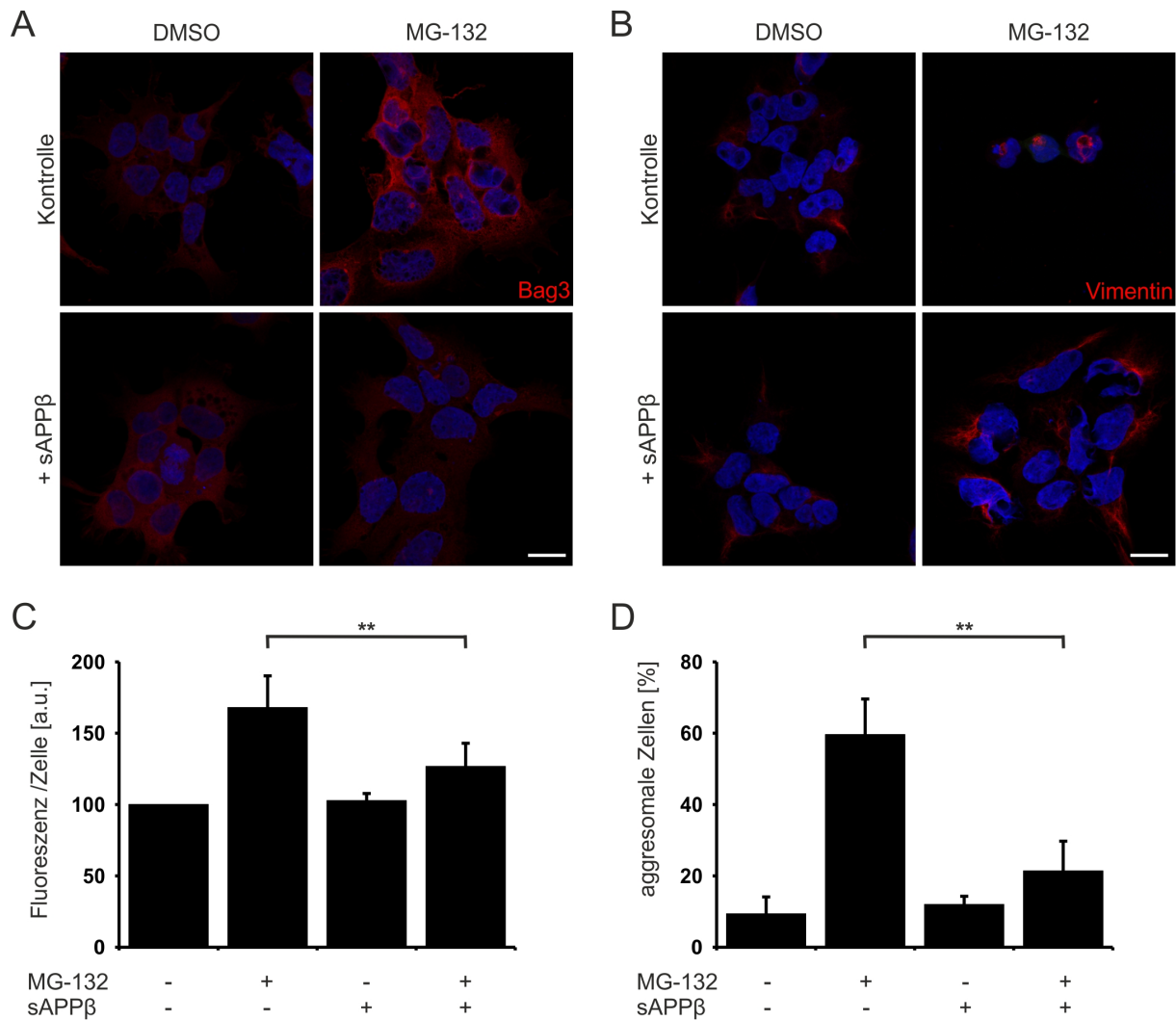
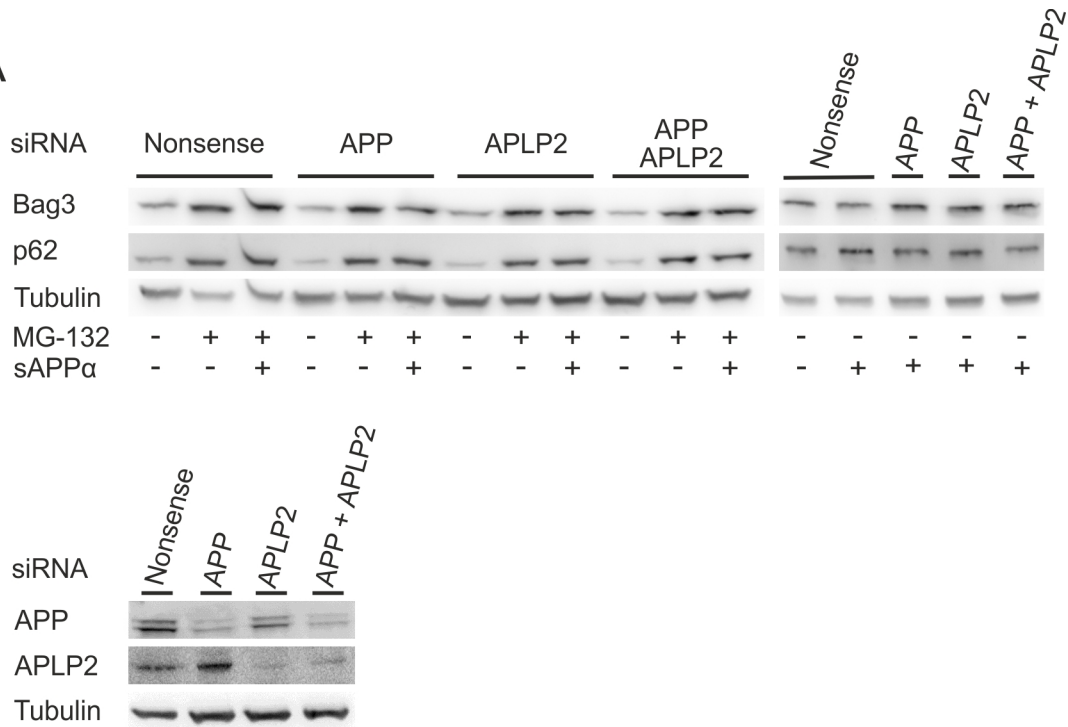


Abbildung 3.8.2. Aggresomen-Assay in Hek 293 Zellen mit sAPPβ. Hek 293 Zellen wurden für 24 h mit 100 nM sAPPβ vorbehandelt, anschließend zusätzlich mit 10 μM MG-132 inkubiert und nach 8 h mit PFA fixiert. (A) Immunfärbung mit Anti-Bag3. (B) Immunfärbung mit Anti-Vimentin. (C) Densitometrische Auswertung von (A) gegen die Gesamtzellzahl (50 Zellen pro n). (D) Aufgetragen sind die Zellen bei den Vimentin aggresomal lokalisiert war im Verhältnis zur Gesamtzellzahl. Die Ergebnisse bestätigen, dass sAPPβ eine ähnliche Wirkung wie sAPPα zeigt. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3). ** p<0,01; Tuckey Test. Größenbalken: 20 μm

3.9. Knockdown von APP und APLP2 und der Einfluss auf die Wirksamkeit von sAPPα

Schon seit langem wird untersucht auf welche Art und über welche Rezeptoren sAPPα wirkt. Dabei wird das komplette APP als Rezeptor von sAPPα diskutiert. Durch den transienten Knockdown von APP und/oder APLP2 wurde analysiert, inwiefern sAPPα noch einen Einfluss auf die Expression von Bag3 und p62 nach proteasomalen Stress zeigt.

A



B

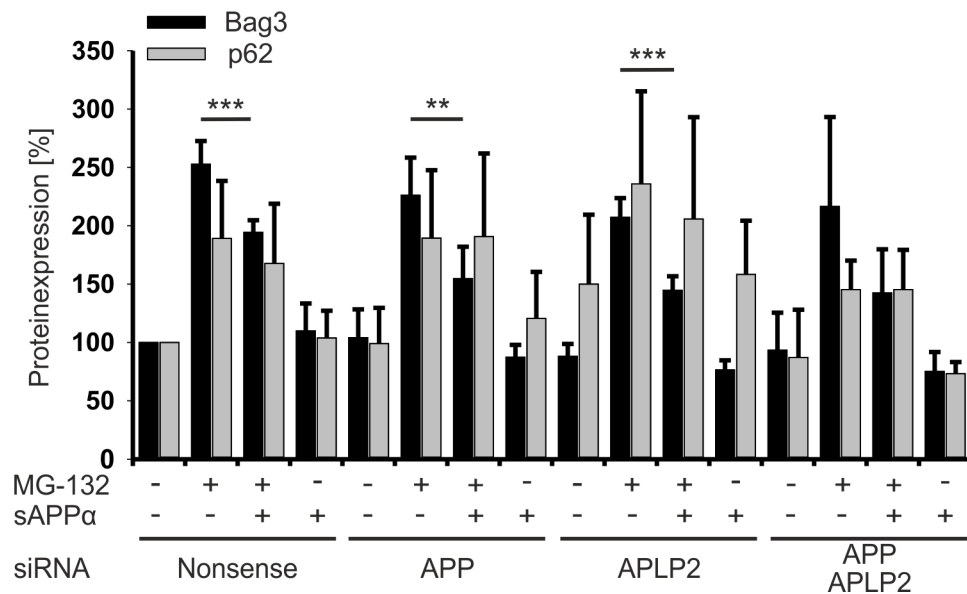


Abbildung 3.9.1. Western Blot Analyse von IMR90 Zellen nach Knockdown von APP bzw. APLP2. In jungen IMR90 Zellen wurde zunächst durch Elektroporation von siRNA die Proteinexpression von APP und/oder APLP2 reduziert. 48 Stunden später wurde mit 100 nM sAPP α für 15 h behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μ M MG-132 proteotoxisch gestresst. (A) Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert. (B) Densitometrische Auswertung von (A). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Der Knockdown von APP und APLP2 zeigte, dass sAPP α nur die Expression von Bag3 reduziert, wenn APP oder APLP2 vorhanden waren. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten (n= 4). ** p < 0,01 *** p < 0,001; Tuckey Test.

In den IMR90 Zellen wurde mit Hilfe von siRNA zunächst die Proteinexpression von APP oder APLP2 gesenkt und in einem zusätzlichen Ansatz die Expression von beiden Proteinen gehemmt. Das Ausschalten eines der beiden Proteine zeigte keinen Effekt auf die Wirksamkeit von sAPP α , so konnte weiterhin beobachtet werden, dass sAPP α die durch MG-132 erhöhte Expression von Bag3 senkt. Die Zellen, die weder APP noch APLP2 haben, zeigen tendenziell eine Abnahme von Bag3, die aber nicht signifikant ist. Die Expression von p62 wird auch in diesem Versuch nicht durch sAPP α beeinflusst (Abbildung 3.9.1).

Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass APP als eine Art Rezeptor für sAPP α dienen könnte. Zumindest muss APP oder das APP ähnliche Protein APLP2 vorhanden sein, damit die Expression von Bag3 unter proteotoxischen Stress durch sAPP α reduziert wird.

3.10. Analyse wichtiger Protein-Qualitätskontroll-Gene in Mäusen

Zellmodelle sind eine gute Möglichkeit Prozesse zu studieren, da sie leicht zu kultivieren sind. Allerdings fehlen in der Zellkultur die Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben und der Einfluss des Immunsystems. Aus diesem Grund wurde abschließend die Proteinexpression verschiedener PQC-Gene in verschiedene Mausmodellen untersucht.

Für die Proteinanalyse wichtiger PQC-Gene standen vier verschiedene Mausmodelle zur Verfügung. Neben einer Mauslinie in der das APP-Gen ausgeschaltet wurde (APP $^{-/-}$) und einer Linie ohne APLP2 (APLP2 $^{-/-}$), wurde eine Linie verwendet, die statt eines kompletten APP nur das sAPP α Proteinfragment exprimiert (sAPP $\alpha^{+/+}$). Das vierte Mausmodell ist die Doppelmutante aus APLP2 $^{-/-}$ und sAPP $\alpha^{+/+}$ (sAPP $\alpha^{+/+}$ -DM). Neben den Gehirnarealen Kortex und Hippocampus, wurde auch Lebergewebe über Western Blots analysiert.

Zunächst wurde die Expression von Bag3 und p62 in jungen Mäusen untersucht. Im Kortex der sAPP $\alpha^{+/+}$ Mäuse konnte eine reduzierte Expression von Bag3 und p62 beobachtet werden (Abbildung 3.10.1. A + B), wohingegen im Hippocampus Bag3 in APP $^{-/-}$, APLP2 $^{-/-}$ und sAPP $\alpha^{+/+}$ Mäusen leicht erhöht und in den sAPP $\alpha^{+/+}$ -DM Mäusen gesenkt war (Abbildung 3.10.1. C + D). In der Leber konnte keine veränderte Expression beobachtet werden (Abbildung 3.10.1. E + F).

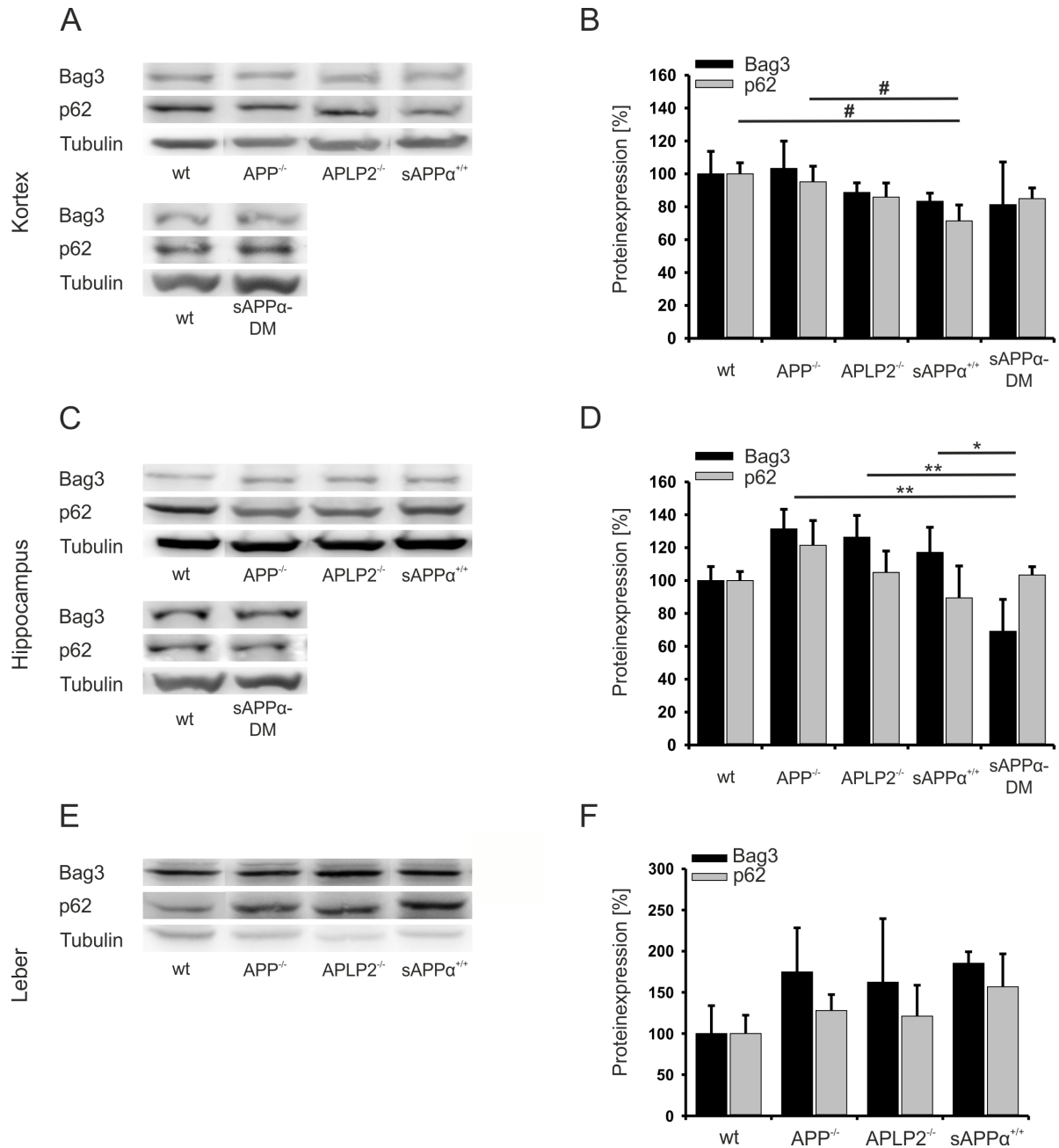


Abbildung 3.10.1. Western Blot Analyse von Bag3 und p62 in verschiedenen Geweben von jungen Mäusen. Analysiert wurden neben wt Mäusen, APP^{-/-}, APLP2^{-/-}, sAPPα^{+/+} und sAPPα^{+/+}-DM Mäuse. Western Blots und densitometrische Auswertung von Kortex (A + B), Hippocampus (C + D) und Leber (E + F). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3). Bag3: * p < 0,05 ** p < 0,01; p62: # p < 0,05; Tuckey Test.

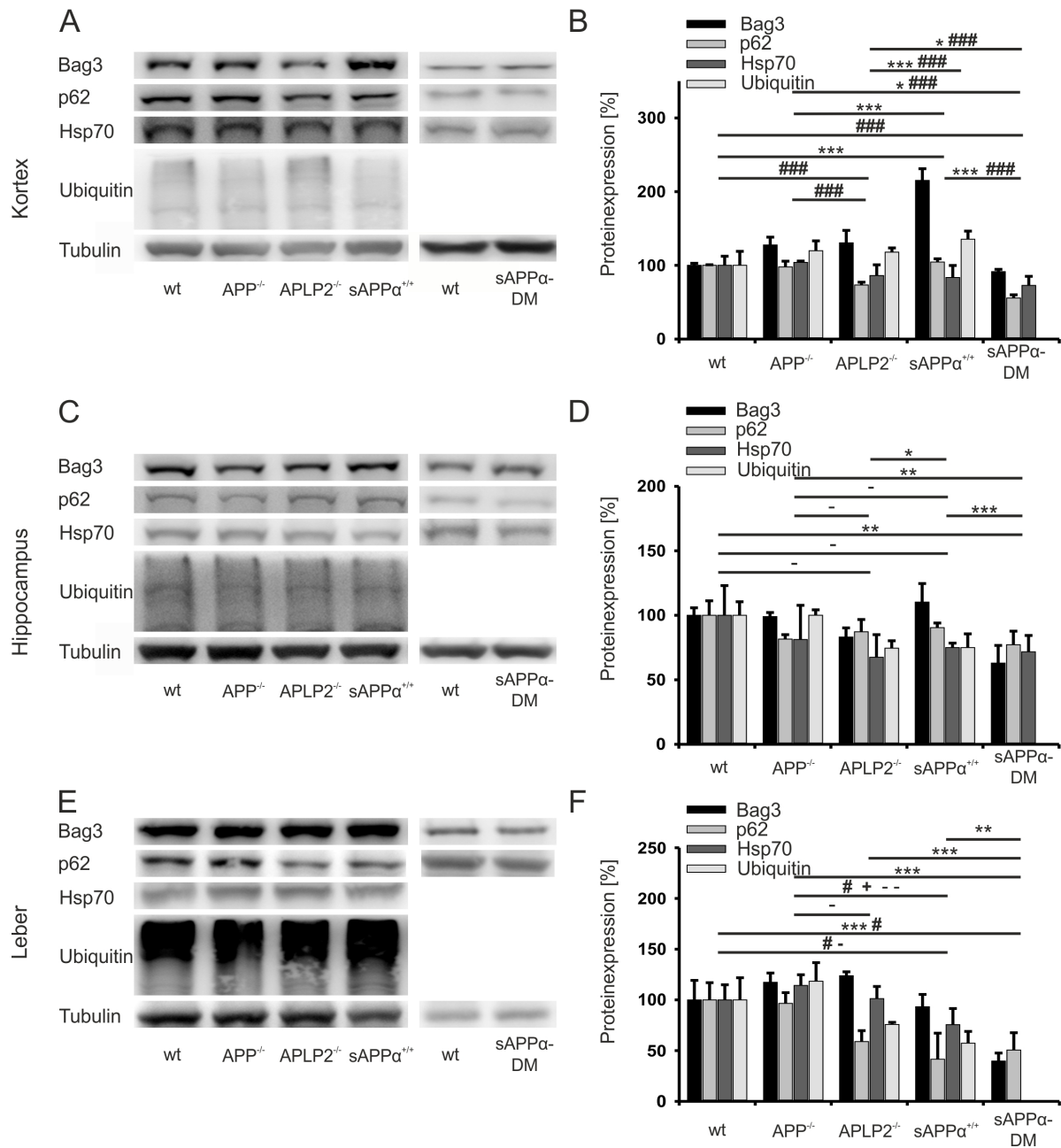


Abbildung 3.10.2. Proteinexpressions-Analysen von wichtigen PQC-Genen in verschiedenen Geweben von seneszenten Mäusen. Analysiert wurden neben wt Mäusen, APP^{-/-}, APLP2^{-/-}, sAPPα^{+/+} und sAPPα^{+/+}-DM Mäuse. Western Blots und densitometrische Auswertung von Kortex (A + B), Hippocampus (C + D) und Leber (E + F). Die ermittelten Werte wurden auf Tubulin normiert. Die Grafik zeigt die prozentual Veränderung der behandelten Zellen zur Kontrolle. Die Daten zeigen den Mittelwert ± die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n= 3). Bag3: * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001; p62: # p<0,05 ### p<0,001; Hsp70: + p<0,05; Ubiquitin: - p<0,05 -- p<0,01; Tuckey Test.

In den gealterten Tieren wurde zusätzlich auch Hsp70 und Ubiquitin untersucht. Im Kortex war Bag3 in den APP^{-/-} und APLP2^{-/-} Tieren leicht erhöht und in sAPPα^{+/+} Mäusen deutlich auf die doppelte Expressionshöhe gesteigert. In den sAPPα^{+/+}-DM jedoch war die Expression von Bag3 im Vergleich zu den wt Mäusen leicht erniedrigt. Die Expression von p62 war in den APLP2^{-/-} und den sAPPα^{+/+}-DM Mäusen leicht gesenkt. Hsp70 und Ubiquitin waren im Kortex nicht reguliert (Abbildung 3.10.2. A + B).

Die Expression von Bag3 war im Hippocampus in den APLP2^{-/-} und sAPPα^{+/+}-DM Mäusen geringfügig niedriger und in den sAPPα^{+/+} leicht erhöht. Wohingegen p62 in allen vier veränderten Mauslinien niedriger exprimiert wurde als in der wt Linie. Die Expression von Hsp70 war in allen Linien konstant, Ubiquitin zeigte eine Expressionsabnahme in APLP2^{-/-} und sAPPα^{+/+} Mäusen (Abbildung 3.10.2. C + D).

In der Leber war in den APLP2^{-/-} die Expression von p62 und Ubiquitin erniedrigt. In den sAPPα^{+/+} Mäusen waren die Proteinlevel aller vier Gene gesenkt und in den sAPPα^{+/+}-DM die Spiegel von Bag3 und p62 (Abbildung 3.10.2. E + F).

Insgesamt haben die *in vivo* Analysen gezeigt, dass sich in den jungen Mäusen die Proteinexpression der Autophagie-Marker nur geringfügig verringert im Vergleich zu den wt Mäusen, wohingegen in den seneszenten Mäuse eine niedrigere Expression von Bag3 und p62 in den sAPPα^{+/+}-DM beobachtet werden konnte.

4. Diskussion

4.1. Der Einfluss von sAPP α und sAPP β auf die Proteinhomöostase

Die Alzheimer'schen Krankheit (AD) ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen und ist bislang unheilbar. Der Hauptrisikofaktor von der AD ist das Alter und durch den demographischen Wandel erkranken immer mehr Menschen an der Demenz (Ferri et al., 2005; Kern and Behl, 2009).

In der Histopathologie von AD können Ablagerungen in Form von NFT's aus hyperphosphorylierten Tau und amyloiden Plaques gefunden werden (Alzheimer, 1907; Maurer et al., 1997). Ein Hauptbestandteil dieser Plaques ist A β , ein Spaltprodukt des APP. Die physiologische Rolle von APP im Organismus ist bislang nicht verstanden, bekannt ist aber, dass APP proteolytisch auf zwei Wegen gespalten werden kann. Auf dem einen Weg entsteht das A β , auf dem anderen das lösliche Fragment sAPP α , dem zytoprotektive Eigenschaften zugesprochen werden (Kögel et al., 2012; Vassar et al., 1999).

Als mögliche Therapieansätze von der AD wurden Inhibitoren für die Sekretasen des amyloidogenen Prozessierungsweges untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition der β - und γ -Sekretasen zu teils schwerwiegenden Nebenwirkungen führte, so dass eine Zulassung der Inhibitoren nicht erfolgte (Doody et al., 2013; Schenk et al., 2012).

Eine weitere Strategie ist die Aktivierung der α -Sekretase. Durch Acitretin, einem Retinoid, wird die Aktivität der α -Sekretase gesteigert (Tippmann et al., 2009). Da diese APP im Bereich der A β -Domäne spaltet, entsteht kein A β , wodurch keine amyloiden Plaques sich bilden können. Zusätzlich entsteht bei diesem Spaltungsweg das sAPP α , das durch seine zytoprotektive Eigenschaften auch als möglicher Therapieansatz für AD diskutiert wird (Kögel et al., 2012; Tippmann et al., 2009). Das sAPP α wird in Bezug auf viele zelluläre Prozesse genannt, so soll es neben neuroprotektiven Eigenschaften auch eine Rolle bei der Stressantwort spielen. Außerdem wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass die Expression von sAPP α die Defizite einer APP^{-/-} Maus wieder aufheben kann (Ring et al., 2007) und die Sekretion von sAPP α im Alter abnimmt (Kern et al., 2006). Dadurch ergab sich die Hypothese, dass nicht nur die Akkumulation von A β , sondern auch das Fehlen von sAPP α zu AD führen kann. In diesem Zusammenhang wird aber auch diskutiert, inwiefern das sAPP β , das bei der amyloidogenen Prozessierung von APP entsteht und nur 5 bis 16 Aminosäuren kürzer als sAPP α ist, neuroprotektiv sein kann (Brinkmalm et al., 2013; Chasseigneaux and Allinquant, 2012).

Das Alter spielt eine sehr große Rolle bei AD (Lobo et al., 2000). Ein sehr wichtiger Prozess im Organismus der sich im Laufe der Alterung verändert ist die Protein-Qualitätskontrolle (PQC) und der

damit verbundene Abbau von fehlgefalteten und aggregierenden Proteinen. Durch die abnehmende Kapazität der PQC im Alter können sich eher schadhafte Proteine, wie A β und NFT's ansammeln und die Zellfunktion beeinflussen (Cuervo and Dice, 2000). Studien haben gezeigt, dass sich ein gesteigerter Proteinabbau vorteilhaft auf altersabhängige Krankheiten wie AD auswirkt (Komatsu et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss von sAPP α auf die Zellviabilität und die PQC untersucht. Dabei wurde das zelluläre Alterungsmodell IMR90 verwendet, um zusätzlich die Unterschiede zwischen jungen und seneszenten Zellen zu untersuchen. Es wird davon ausgegangen, dass eine der beiden Heparan-Sulfat-Proteoglykan Domänen (HSPG) verantwortlich für die Einfluss von sAPP α ist. So konnten Corrigan et al. zeigen, dass die HSPG der E1 Domäne protektiv bei traumatischen Gehirnverletzungen ist und Furukawa et al. zeigten, dass die HSPG der E2 Domäne bei Glutamat- und A β -induzierte Neurotoxizität das Zellüberleben steigert (Corrigan et al., 2011, 2014; Furukawa et al., 1996). Aus diesem Grund wurde zusätzlich zum sAPP α auch der Einfluss von APP E1 auf die Zellviabilität und die PCQ analysiert.

4.1.1. Der Einfluss von sAPP α und APP E1 auf die Zellviabilität und die Lebensspanne

Dem löslichen sAPP α werden verschiedene protektive Eigenschaften zugesprochen (Kögel et al., 2012). Aus diesem Grund wurde die Zellviabilität von jungen und seneszenten IMR90 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von sAPP α und dem N-terminalen Fragment APP E1 analysiert. Dabei zeigte sich weder eine verbessertes Zellüberleben durch sAPP α noch durch APP E1 in jungen und seneszenten Zellen (Abbildung 3.3.1). Um mögliche Langzeiteffekte zu untersuchen, wurde eine Alterungskurve von IMR90 unter konstanter Behandlung mit sAPP α und APP E1 durchgeführt. Die Lebensspanne der drei Behandlungen verlief insgesamt sehr ähnlich, allerdings konnten ab Tag 80 Unterschiede festgestellt werden. Durch die Gabe von sAPP α und APP E1 wurde die Lebensdauer geringfügig verlängert (Abbildung 3.3.2). Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass sAPP α und APP E1 in gesunden und vitalen Zellen kurzfristig keinen Effekt auf die Zellviabilität haben, langfristig jedoch wirken beide Fragmente besonders im Alter leicht verlängernd auf die Lebensdauer. Die Veränderung der Lebensdauer deutet an, dass möglicherweise die reduzierten sAPP α Spiegel im Alter verkürzend auf die Lebenszeit wirken und durch die langfristige Gabe von sAPP α oder APP E1 die Lebensspanne verlängert werden könnte.

4.1.2. Der Effekt von sAPP α und APP E1 auf die Proteinhomöostase

Für die Zelle ist eine gut funktionierende PQC sehr wichtig. Dabei werden fehlgefaltete Proteine über Chaperone wieder in die richtige Konformation gebracht oder, falls diese Rückfaltung fehlschlägt,

abgebaut. Junge Zellen bauen Proteine meistens über das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) ab. Die Aktivität des UPS nimmt aber im Laufe der Alterung ab und der Abbau von Proteinen wird durch die Autophagie sichergestellt (Gamerding et al., 2009). Auf Grund der verlängerten Lebensspanne der IMR90 Zellen durch sAPP α und APP E1, die sich erst im Alter bemerkbar machte, wurde im Anschluss die Proteinexpression und mRNA-Spiegel wichtiger PQC-Gene sowohl in jungen als auch in alten IMR90 Zellen überprüft. Anhand der Alterungskurve wurde postuliert, dass sAPP α in den jungen Zellen keinen oder nur geringfügigen Einfluss auf die Qualitätskontrolle hat. In den alten Zellen hingegen könnte eine Regulierung der Expression von PQC-Genen vorhanden sein.

In den jungen Zellen waren weder die Hitzeschockproteine noch das Co-Chaperon Bag3 reguliert. Auch der Autophagie-Marker LC3-II und der Rezeptor p62 werden weder durch sAPP α noch durch APP E1 reguliert. Auch die Gene des UPS darunter Ubiquitin, Nrf2, 19S und 20S Proteasom wiesen keine veränderte Proteinexpression auf. Zusätzlich wurden auch Signaltransduktionswege die mit der Autophagie verknüpft sind untersucht, die keine Regulierung zeigten (Tabelle 3.3.1 und Abbildung 7.1.1). Interessanterweise waren die in den seneszenten Zellen untersuchten Protein- und mRNA-Level ebenfalls nicht reguliert. Weder das mit der Autophagie verknüpfte Co-Chaperon Bag3, noch die autophagischen Proteine LC3-II und p62 wiesen Veränderungen auf. Auch die proteasomalen Gene zeigten in den seneszenten Zellen keine Veränderung (Tabelle 3.3.1, Tabelle 3.3.2 und Abbildung 7.1.2).

Die Tatsache, dass sowohl in den jungen als auch in den seneszenten Zellen keine Proteinregulation stattfand, könnte daran liegen, dass sAPP α nur über eine längerfristige Behandlung die Expression dieser Gene verändern kann. Dies würde auch erklären, warum die Zellviabilität nach einer eintägigen Behandlung mit sAPP α oder APP E1 nicht verbessert war, aber die dauerhafte Behandlung die Lebensspanne erhöhte.

4.1.3. Die Wirkung von sAPP α auf die Proteinhomöostase unter proteasomalen Stressbedingungen

Viele Studien berichten von protektiven Eigenschaften der APP Fragmente unter Stressbedingungen wie oxidativen oder auch proteasomalen Stress (Huber and Groll, 2012). Proteotoxischer Stress, ausgelöst durch das häufig verwendete MG-132, verringert die proteasomale Aktivität und geht einher mit der Akkumulation von Proteinen. Außerdem kann durch die Proteinhäufung eine mögliche Regulation besser beobachtet werden.

Im folgenden Abschnitt wurde analysiert, inwiefern sAPP α und APP E1 einen Einfluss auf die Zellviabilität und die PQC unter proteasomalen Stress durch den Proteasom-Inhibitor MG-132 haben.

4.1.3.1. Eine verbesserte Zellviabilität in jungen Zellen durch sAPP α unter proteotoxischen Stress

Vorversuche mit verschiedenen Konzentrationen MG-132 zeigten, dass die Zellviabilität durch proteasomalen Stress konzentrationsabhängig abnimmt. Bei der verwendeten Konzentration von 0,5 μ M MG-132 zeigten die IMR90 Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen eine verringerte Zellviabilität von etwa 70 % (Abbildung 3.4.1). Die Analyse ergab, dass sAPP α in einer Konzentration von 100 nM nach proteotoxischen Stress in jungen IMR90 Zellen die Viabilität erhöhen kann. Das N-terminale Fragment APP E1 hingegen hat keinen Einfluss auf das Zellüberleben in den jungen Zellen. In den seneszenten Zellen hat weder sAPP α noch APP E1 einen Einfluss auf die Zellviabilität (Abbildung 3.4.2).

Durch die Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sAPP α unter proteasomalem Stress die Zellviabilität junger Zellen verbessert und protektiv bei dieser Art von Stress wirkt. Das sAPP α in alten Zellen nicht protektiv wirkt, könnte verschiedene Ursachen haben. Denkbar ist, dass die seneszenten IMR90 Zellen durch ihr Alter und einer damit veränderten Physiologie und Genexpression zu stark geschwächt sind und sAPP α nicht mehr protektiv wirken kann. Zum anderen kann es durch die veränderte Genexpression dazu kommen, dass die Signalkaskade, über die sAPP α wirkt, im Alter beschädigt ist. Da der Wirkungsmechanismus von sAPP α bislang nicht bekannt ist, können dazu keine Analysen durchgeführt werden und die Gründe bleiben spekulativ. Dass APP E1 hingegen nicht protektiv ist, deutet an, dass der protektiv wirkende Bereich von sAPP α außerhalb der E1 Domäne liegt oder beide E Domänen zusammen protektiv wirken können.

4.1.3.2. Der Einfluss von sAPP α auf die Autophagie

Für jede Zelle ist es wichtig, fehlgefaltete und geschädigte Proteine abzubauen (Broadley and Hartl, 2009). Die Proteinabbau erfolgt entweder über das UPS oder die Autophagie. Diese ist in jungen Organismen und Zellen nur gering aktiv und nimmt im Laufe der Alterung zu. In jungen Zellen kann man durch Inhibition des Proteasoms die Autophagie aktivieren und so einen künstlichen Alterungszustand erreichen (Gamerdinger et al., 2009).

Durch MG-132 wird eine Inhibition des Proteasoms herbeigeführt und sorgt für die Akkumulation von Proteinen, die abgebaut werden müssen (Huber and Groll, 2012). Da diese Akkumulation die Zelle schädigt und zu einem verringerten Zellüberleben führt, liegt die Vermutung nahe, dass sAPP α durch die protektive Wirkung die Aktivität der Autophagie steigert und so für einen schnelleren Abbau der Proteine und eine verbesserte Zellviabilität sorgt. Aus diesem Grund wurden die

Proteinexpressionen von Autophagie-relevanten Genen unter proteasomalen Stress und Behandlung mit sAPP α und APP E1 untersucht. Dabei wurde zunächst das Alterungsmodell IMR90 verwendet.

Gamerding et al. zeigten bereits, dass durch die Inhibition des UPS die Proteinexpression von Bag3, dem Hitzeschockprotein Hsp70 und den zwei Autophagie-Genen p62 und LC3-II ansteigt (Gamerding et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von Hsp70 unter proteotoxischen Stress und bei zusätzlicher Behandlung mit sAPP α abnahm. Gleichzeitig nahm auch die Expression von Bag3 einem Co-Chaperon von Hsp70 ab (Abbildung 3.5.1). Bag3 ist für den Transport von Hsp70-Substraten zu den Autophagie-Rezeptoren zuständig (Gamerding et al., 2009). Dies deutet an, dass die Zelle sowohl ihre PQC als auch den Transport von geschädigten Proteinen zu den sich bildenden Autophagosomen verringert. Die Proteinexpression des Autophagie-Rezeptors p62, des Autophagie-Markers LC3-II und des lysosomalen Membranproteins Lamp2 verändert sich nicht, lediglich p62 zeigt eine geringe Abnahme, die aber nicht signifikant ist (Abbildung 3.5.1 und Abbildung 3.5.2). Die mRNA Analysen zeigten, dass neben Bag3 auch die Expression von p62 verringert ist (Abbildung 3.5.4). Das bedeutet, dass die Regulation von Bag3 transkriptionell erfolgt. Die unterschiedlichen mRNA- und Proteinlevel von p62 könnten zwei mögliche Ursachen haben. Zum einen könnte die Veränderung der Proteinexpression erst zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar werden. Zum anderen könnten die verringerten mRNA-Spiegel durch gesteigerte Translation ausgeglichen werden. Zusätzlich wurde die Expression von Hsp90 und verschiedener Proteine von Signaltransduktionswege untersucht. Diese sind der Autophagie vorgeschaltet und von ihnen ist bekannt, dass sie durch sAPP α reguliert werden können. Weder bei Hsp90 noch bei den Faktoren der Signaltransduktionsketten konnte eine Regulierung durch sAPP α nach proteasomalen Stress beobachtet werden (Tabelle 3.5.1 und Abbildung 7.1.3).

Die Analyse der jungen Zellen, die mit APP E1 behandelt wurden, ergab keine signifikante Veränderung in der Protein- und mRNA-Expression der untersuchten Gene. Lediglich bei Bag3 kann eine geringfügige Abnahme der Expressionslevel beobachtet werden (Abbildung 3.5.1). Daraus ergibt sich, dass APP E1 bei proteasomalen Stress eine geringere Wirkungskraft im Gegensatz zu sAPP α hat und bestätigt damit, dass APP E1 alleine nicht die Autophagie beeinflussen kann.

In den seneszenten Zellen wurde die Proteinexpression von Bag3, p62 und Lamp2 untersucht. Dabei zeigte sich, dass ähnlich wie bei der Zellviabilität sAPP α und APP E1 keinen Einfluss auf die Zellen haben. Für Bag3 kann eine geringe Abnahme der Proteinlevel beobachtet werden (Abbildung 3.5.3). Die geringere Wirkungskraft von sAPP α könnte auch durch den verlangsamten Metabolismus der Zelle im Alter verursacht werden. Dadurch könnte es zu einer verzögerten Wirkung durch sAPP α

kommen. Diese Möglichkeit würde auch erklären, warum bei der Alterungskurve im Alter nach durchgehender Behandlung ein Effekt gesehen wurde.

Diese und vorangegangenen Ergebnisse zeigen einen Widerspruch auf. Zum einen ist das Proteasom inhibiert und zum anderen scheinen Autophagie und die PQC ebenfalls verringert zu sein. Diese Tatsache sollte zu einer Akkumulation geschädigter Proteine führen und damit auch die Zellviabilität verringern. Stattdessen kann ein verbessertes Zellüberleben beobachtet werden. Die Ergebnisse der Proteinanalyse in den jungen Zellen wurde anschließend mit einem zweiten Proteasom-Inhibitor überprüft, da MG-132 auch lysosomale Cystein-Proteasen und Calpaine inhibiert. Epoxomicin gehört zu einer anderen Klasse von Proteasom-Inhibitoren als MG-132. Auch in dieser Analyse konnte eine verringerte Expression von Bag3 beobachtet werden und weder Lamp2 noch p62 zeigen eine Regulation. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Inhibition von lysosomalen Cystein-Proteasen und Calpainen durch MG-132 keinen Einfluss auf die Effekte durch sAPP α hatten.

Bei intensiver Proteinakkumulation, z.B. bei proteasomalen Stress bilden sich in der Zelle perinukleare Aggresomen, diese beinhalten aggregierende Proteine, die nicht sofort abgebaut werden können. Durch die Bildung von Aggresomen isoliert die Zelle geschädigtes Material bis zu dessen Abbau. Nach den vorangegangenen Versuchen wurde postuliert, dass sich in den Zellen Aggresomen gebildet haben, um die Proteine aufzufangen, die nicht mehr abgebaut werden konnten. Gamerdinger et al. haben gezeigt, dass sich zum einen Vimentin in Aggresomen akkumuliert und zum anderen aber auch Bag3 vermehrt im Bereich der Aggresomen auftritt (Gamerdinger et al., 2009). Eine durchgeführte Immunfärbung mit Antikörpern gegen die beiden Proteine sollte Aufschluss über die Anzahl und die Lokalisation der Aggresomen geben. Für diesen Versuch wurden Hek 293 Zellen verwendet, da diese durch die eher kompakte Form im Gegensatz zu der sehr langgestreckten Morphologie der IMR90 Zellen für die Analyse geeignet waren. Die Analyse der Verteilung von Bag3 in den Zellen ergab, dass zum einen nach proteasomalen Stress die Intensität und damit die Proteinmenge von Bag3 steigt, zum anderen konnte eine verstärkte Bag3 Lokalisation am Kern beobachtet werden. Durch die zusätzliche Behandlung mit sAPP α nahm sowohl die Intensität als auch die verstärkte Kernlokalisierung ab (Abbildung 3.5.6. A + C). Die mit Vimentin gefärbten Zellen zeigten ein ähnliches Ergebnis. So war Vimentin nach proteasomalen Stress mit MG-132 aggresomal in der Nähe des Zellkerns lokalisiert. Durch die Behandlung mit sAPP α lag Vimentin wie auch in den Kontrollzellen meist verteilt auf das Zytoplasma vor (Abbildung 3.5.6. B + D). Dieses Ergebnis bedeutet, dass durch sAPP α nach proteasomalen Stress keine Aggresomen gebildet werden, die man aber nach einem proteasomalen Inhibitor und einer verringerten Autophagie erwarten würde. Eine Analyse der Hek 293 Proteinspiegel ergab ähnliche Ergebnisse wie bei den jungen IMR90

Zellen (Abbildung 3.5.7 und Abbildung 3.5.8). Somit kann davon ausgegangen werden dass die HEK 293 Zellen sich wie junge Zellen in diesen Versuchen verhalten.

Zur zusätzlichen Bestätigung dieses Ergebnisses wurde die Lokalisation von mutanter SOD1 untersucht. SOD1 liegt unter nicht gestressten Bedingungen zytoplasmatisch lokalisiert vor. Hek 293 Zellen wurden auf Grund ihrer kompakten Form und der guten Transfektionsrate verwendet. Unter Stressbedingungen, wie nach Behandlung mit MG-132, liegt mutante SOD1 in den Aggresomen nahe dem Zellkern vor. Zusätzlich kann es bei leichtem Stress oder zu Beginn eines Stressimpulses prä-aggresomal vorliegen (Gamerding et al., 2011b). Für die Analyse der mutanten SOD1 wurden Konstrukte mit einem GFP verwendet. Außerdem wurde zur Kontrolle immunhistochemisch mit Vimentin gefärbt. Der Versuch mit zwei unterschiedlichen SOD1 Mutanten zeigte eine Bestätigung der Aggresomenanalyse. So stieg der Anteil der aggresomal vorliegenden SOD1 nach proteasomalen Stress. Durch die zusätzliche Behandlung mit sAPP α lag die mutante SOD1 zum Großteil wieder zytoplasmatisch vor (Abbildung 3.5.10).

Insgesamt konnte in Bezug auf die Autophagie gezeigt werden, dass sAPP α nach proteasomalen Stress die Autophagie und die PQC durch Hsp70 reduziert. Außerdem gibt es nur eine geringe Bildung von Aggresomen. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass sAPP α die Bildung der Aggresomen verhindert. Zu erwarten war, dass durch die geringe Anzahl an Aggresomen in der Zelle viele geschädigte Proteine vorliegen und die Zellviabilität verringert ist. Jedoch weisen die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass Überleben der Zelle steigt, so dass es eher wahrscheinlich ist, dass sAPP α die Proteinhomöostase über einen anderen Weg beeinflusst und so für den Abbau der Proteine sorgt.

4.1.3.3. *Das Ubiquitin-Proteasom-System wird durch sAPP α aktiviert*

Die gesteigerte Zellviabilität und die verringerte Bildung von Aggresomen durch sAPP α zeigen auf, dass die Zellen trotz Inhibition des Proteasoms und einer verringerten Autophagie keine Akkumulation von Proteinen aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Aktivität des Proteasoms untersucht.

Zunächst wurde der Abbau des Proteasomsubstrates d2 in stabil transfizierte Hek 293 Zellen untersucht. Es wurde deutlich, dass sich nach Inhibition des Proteasoms wie bereits von Gamerding gezeigt mehr d2-GFP in den Zellen ansammelte, das auf Grund der Inhibition nicht mehr abgebaut werden konnte (Gamerding et al., 2009). Durch die zusätzliche Behandlung mit sAPP α verringerte sich die Akkumulation des Proteins (Abbildung 3.6.1). Dies deutet an, dass sAPP α trotz des Inhibitors MG-132 die proteasomale Aktivität erhöhen kann. Die Proteinlevel von d2-GFP zeigten durch sAPP α

keine Veränderung unter Kontroll-Bedingungen. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde anschließend die Aktivität des Proteasoms mit Hilfe des Suc-LLVY-AMC-Assays gemessen. Dabei zeigte sich, dass sAPP α in jungen IMR90 Zellen die durch MG-132 verringerte Aktivität wieder steigern kann. In den Kontroll-Zellen zeigte sAPP α aber keine aktivitätssteigernden Effekte (Abbildung 3.6.2). Auch in Hek 293 Zellen wirkte sAPP α unter proteasomalen Stress aktivierend (Abbildung 3.6.3.C). Wohingegen in seneszenten IMR90 Zellen und in den Zellen die mit APP E1 behandelt wurden keine Aktivierung beobachtet werden konnte (Abbildung 3.6.2 und Abbildung 3.6.3). Diese Ergebnisse bestätigen, die bisher beschriebenen Ergebnisse, dass sAPP α nur in jungen IMR90 oder Hek 293 Zellen unter Stressbedingungen die PQC beeinflusst, in dem es die proteasomale Aktivität erhöhte. Dies wiederum führt zu einer Senkung der Autophagie, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde (Gamerding et al., 2009). In den Kontroll-Zellen ist die Aktivität des Proteasoms hoch, sodass sAPP α diese vermutlich nicht weiter steigern kann. Die proteasomale Aktivität sinkt im Alter sehr stark, möglicherweise sind Aktivierungsprozesse gestört, sodass auch die Inkubation mit sAPP α nicht mehr aktivierend wirken kann. Das würde auch erklären, warum durch sAPP α in den seneszenten Zellen keine Verbesserung der Zellviabilität festzustellen war und auch keine Veränderung der Proteinspiegel von Bag3. APP E1 zeigte keine Beeinflussung der Proteinhomeostase. Dies bestätigt, dass die E1 Domäne alleine nicht protektiv wirken kann, sondern dass entweder die E2 Domäne dafür verantwortlich ist oder nur beide in Kombination protektiv sind.

Eine Analyse der Proteinlevel wichtiger proteasomaler Gene in jungen und seneszenten IMR90 Zellen zeigte, dass durch sAPP α weniger poly-ubiquitinierte Proteine in den jungen Zellen vorhanden waren. Die anderen Proteine wie 19S Proteasom, 20S Proteasom und Nrf2 waren nicht reguliert (Abbildung 3.6.4). Auch in den seneszenten Zellen konnte keine Regulierung der proteasomalen Gene beobachtet werden. Zusätzlich wurden die mRNA-Spiegel von drei Untereinheiten (PSMB5, PSMB6 und PSMB7) des 20S Proteasoms analysiert. Alle drei Untereinheiten bilden Teile des beta-Rings vom 20S Proteasom, der für die katalytische Spaltung der Proteine zuständig ist. PSMB5 hat Chymotrypsin-ähnliche Eigenschaften und ist Ziel vieler Proteasom-Inhibitoren, PSMB6 hat Caspase-ähnliche Eigenschaften und PSMB7 Trypsin-ähnliche Eigenschaften. Dabei zeigte sich, dass die Transkription von PSMB5 und PSMB6 nicht verändert war. PSMB7 zeigte eine gesteigerte Expression nach proteasomalen Stress in den jungen und seneszenten Zellen, die durch sAPP α geringfügig, aber nicht signifikant verringert wurde (Abbildung 3.6.5). Die gesteigerte Expression von PSMB7 könnte eine Reaktion auf die Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Eigenschaften des 20S Proteasoms zu sein, die auch in seneszenten Zellen zu beobachten war. Allerdings scheint es keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration des 20S Proteasoms zu haben.

Insgesamt kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass sAPP α unter Stressbedingungen die proteasomale Aktivität steigert. Dadurch wird die Anzahl der poly-ubiquitinierten Proteine verringert und die Zellviabilität gesteigert. Inwiefern und auf welchem Weg sAPP α diese Aktivitätssteigerung bewirkt bleibt ungeklärt, sicher ist aber, dass die gesamte Menge an 20S und 19S Proteasom gleich bleibt, was darauf hindeutet, dass keine transkriptionelle Regulierung stattfindet. Festgestellt wurde, dass die E1 Domäne alleine nicht protektiv bei proteasomalen Stress wirken kann und die Aktivität des UPS nicht steigert.

4.1.3.4. *Regulatorische Effekte von sAPP α in primären neuronalen Zellen*

Bislang wurden alle Analysen in Lungenzellen (IMR90) und Nierenzellen (Hek 293) durchgeführt. Da es sich bei AD um eine neurodegenerative Erkrankung handelt, wurden die Proteinanalysen zusätzlich noch in primären neuronalen Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Veränderung der Bag3 Level und die Menge an poly-ubiquitinierten Proteinen durch sAPP α nach proteasomalen Stress abnahmen. Dieses konnte sowohl in den kortikalen als auch in den hippocampalen Neuronen gezeigt werden (Abbildung 3.7.2). Die Proteinexpression von p62 zeigte wie auch in den IMR90 Zellen keine Veränderung auf. APP E1 hat auch in den neuronalen Zellen keinen Einfluss auf Bag3, p62 und poly-ubiquitinierte Proteine. Durch die verringerte Menge an poly-ubiquitinierten Proteinen durch sAPP α kann davon ausgegangen werden, dass auch in diesen Zellen die Aktivität des Proteasoms gesteigert wird. Dennoch sollte diese Vermutung über einen Zellviabilitäts- und den Proteasom-Aktivitätsassay bestätigt werden.

4.1.3.5. *Der Einfluss von sAPP β auf die Proteinhomöostase*

Das APP Prozessierungsprodukt sAPP β ist nur 5 bis 16 Aminosäuren kürzer als sAPP α , die bislang beschriebenen Eigenschaften sind aber teilweise sehr unterschiedlich (Brinkmalm et al., 2013; Chasseigneaux and Allinquant, 2012). So wird davon berichtet, dass sAPP β nur eine 100-fach niedrigere protektive Fähigkeit besitzt, andere beschreiben aber dass beide löslichen Spaltprodukte des APP den axonalen Wachstum steigern und durch sAPP β im Vergleich zu sAPP α die neuronale Differenzierung stärker stimuliert wird (Chasseigneaux et al., 2011; Freude et al., 2011; Furukawa et al., 1996). Die unterschiedlichen Eigenschaften werden damit erklärt, dass bei dem kürzeren sAPP β die letzten 16 Aminosäuren der zweiten HSPG fehlen und sie dadurch nicht protektiv wirken kann. Andererseits begründen diejenigen, die gleiche Eigenschaften von sAPP α und sAPP β beobachten konnten, dass die HSPG der E1 Domäne ausschlaggebend für die Neuroprotektion ist bzw. das Zusammenspiel beider HSPGs ausschlaggebend ist. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden,

dass die E1 Domäne alleine keine neuroprotektiven Eigenschaften besitzt und aus diesem Grund war es sehr wichtig zu überprüfen, ob sAPP β die Proteinhomöostase beeinflussen kann.

Für die Analyse von sAPP β wurden junge IMR90 Zellen auf die Proteinlevel nach proteasomalen Stress untersucht. Dabei zeigte sich, dass sAPP β ähnlich wie sAPP α sowohl die Expression von Bag3 als auch die Menge an poly-ubiquitinierten Proteinen verminderte (Abbildung 3.8.1). Auch die Bildung von Aggresomen wird durch sAPP β nach proteasomalen Stress reduziert (Abbildung 3.8.2). Das zeigte, dass sowohl sAPP β wie auch sAPP α Einfluss auf die Proteinhomöostase nach proteasomalen Stress hat und der Unterschied in der Länge keine Auswirkung auf die Neuroprotektion hat. Da in sAPP β die letzten Aminosäuren der E2 Domäne fehlen, scheinen diese nicht ausschlaggebend für die protektive Wirkung zu sein. Inwiefern der Rest der APP E2 Domäne für die protektive Wirkung verantwortlich ist oder ob das gesamte lösliche Spaltprodukt notwendig ist konnte über diesen Versuch nicht geklärt werden.

4.2. Die Rolle von APP als Rezeptor für sAPP α

Über den Wirkungsweg von sAPP α ist bislang wenig bekannt. Ungeklärt ist auch wie das extrazellulär vorliegende sAPP α intrazellulär wirken kann. Als mögliche Rezeptoren wurden bislang der IGF-1 und der Insulin Rezeptor genannt (Jimenez et al., 2011). Auch APP oder die beiden APLPs kämen als Rezeptor in Frage, da Studien gezeigt haben, dass diese über die extrazelluläre Domäne Homo- und Heterodimere bilden können. Folglich können auch die löslichen Prozessierungsprodukte an diese binden. Außerdem kann die AICD an Transkriptionsfaktoren binden und als Regulator diese beeinflussen (Cao and Südhof, 2001; Müller et al., 2008). Die Rolle von APP beim Einfluss von sAPP α auf die Proteinhomöostase konnte durch einen transienten Knockdown der APP Familienmitglieder in den IMR90 Zellen überprüft werden. Da APLP1 nur in neuronalen Zellen exprimiert wird, wurden in diesen Zellen APP und APLP2 herunterreguliert. Dabei zeigte sich, dass bei einem Knockdown von APP bzw. APLP2 sAPP α die Proteinexpression von Bag3 reduziert wird. Bei einem Knockdown von beiden Genen wird die Expression nicht mehr signifikant reduziert (Abbildung 3.9.1). Die positive Wirkung von sAPP α ist von der Anwesenheit von APP und APLP2 abhängig. Die noch vorhandene Tendenz zur Abnahme, kann durch das Vorhandensein von geringen Mengen an APP und APLP2 erklärt werden, da ein transienter Knockdown die Spiegel stark reduziert, aber kein komplettes Ausschalten bewirkt. In den Zellen bei denen nur eines der beiden Proteine reduziert vorliegt, scheint das andere Protein jeweils die Rezeptorfunktion zu übernehmen. Die Übernahme der Funktion durch andere APP Familienmitglieder wurde bereits häufig beschrieben (Anliker and Müller, 2006). Insgesamt kann daraus gefolgert werden, dass sAPP α nur in Anwesenheit eines APP Familienglieds

die Proteinhomöostase beeinflussen kann und somit APP bzw. APLP2 in diesem Fall der Rezeptor von sAPP α sein könnte.

4.3. Veränderung in der Proteinhomöostase in Mäusen

Bislang wurde der Einfluss von sAPP α auf die Proteinhomöostase in verschiedenen Zellkulturmodellen untersucht. In diese können komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen Organen und der Einfluss des Immunsystems nicht untersucht werden und die Übertragbarkeit ist dadurch nur eingeschränkt möglich (Cristofalo et al., 2004). Zur Überprüfung der *in vivo* Relevanz wurde verschiedene Mauslinien analysiert. Neben den wildtypischen Tieren (wt) wurde die sAPP $\alpha^{+/-}$ -DM Linie untersucht, die das sAPP α Fragment überexprimiert und weder das komplette APP noch APLP2 exprimiert. Als Kontrollen dienten eine APP Knockout (KO), eine APLP2 KO und die sAPP α Knockin (sAPP $\alpha^{+/+}$) Mauslinie. Letztere Linie exprimiert sAPP α , aber kein komplettes APP. Bei allen Mäusen wurden die Proteinlysate aus Kortex, Hippocampus und Leber auf die Proteinspiegel einiger PQC-Gene in jungen und alten Mäusen analysiert.

Im Kortex der jungen Mäusen konnte keine Veränderung der Bag3 Proteinexpression festgestellt werden, wohingegen in den alten Mäusen die Expression in den sAPP $\alpha^{+/-}$ Mäusen im Vergleich zu den wt Mäusen stark anstieg (Abbildung 3.10.1 und Abbildung 3.10.2). Das ist insofern erstaunlich, da in den bisherigen Analysen, die Expression von Bag3 durch sAPP α immer reduziert wurde. Möglicherweise ist das eine Kompensation der Mäuse auf die reduzierte Aktivität des Proteasoms im Alter. Unterstützung findet die Vermutung in der Langzeitbehandlung der IMR90 Zellen (Abbildung 3.3.2). Dort konnte bereits gezeigt werden, dass nach einer durchgängigen Behandlung mit sAPP α die Lebensdauer verlängert werden kann, wobei dieser Effekt erst im Alter zu beobachten war. Die p62 Proteinlevel nahmen in den jungen sAPP $\alpha^{+/-}$ Mäusen ab, wohingegen in den alten Mäusen die Expression von p62 in den APLP2 $^{-/-}$ und sAPP $\alpha^{+/-}$ -DM Mäusen und nicht in den sAPP $\alpha^{+/+}$ Mäusen abnahm (Abbildung 3.10.1). Dieses Ergebnis zeigte, dass in den jungen sAPP $\alpha^{+/-}$ Mäusen die Autophagie reduziert war. Möglicherweise waren diese Tiere durch das Fehlen des gesamten APP gestresst und sAPP α hat die proteasomale Aktivität gesteigert, wodurch die Autophagie abnahm. In den alten Mäusen hingegen konnte ähnlich wie in den Fibroblasten das Proteasom nicht aktiviert werden und dadurch kommt es zu keiner p62-Expressionsabnahme in den sAPP $\alpha^{+/-}$ Mäusen (Abbildung 3.10.2). Die Expressionsabnahme in den APLP2 $^{-/-}$ und sAPP $\alpha^{+/-}$ -DM Mäusen beruht vermutlich auf dem Fehlen von APLP2, das in beiden Mauslinien nicht exprimiert wird. Da allerdings die Funktionen von APLP2 bislang unbekannt sind, kann in diesem Fall nur spekuliert werden. In den seneszenten Mäusen wurde zusätzlich Ubiquitin und Hsp70 untersucht, die aber keine veränderten Expressionslevel aufwiesen (Abbildung 3.10.2). Das zeigte, dass im Alter weder die Qualitätskontrolle

der Proteine noch die poly-Ubiquitinierung durch das Fehlen von APP bzw. APLP2 und auch nicht durch die Expression von sAPP α beeinflusst werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen in den seneszenten IMR90 Zellen überein.

Im Hippocampus ist die Expression von p62 weder in den jungen noch in den alten Mäusen verändert (Abbildung 3.10.1 und Abbildung 3.10.2). Die Expression von Bag3 ist in den jungen Mäusen der APP und APLP2 KO-Linie und in den sAPP α ^{+/+} Mäusen leicht erhöht und in der sAPP α ^{+/+}-DM Linie im Vergleich zu den genveränderten Mauslinien reduziert. Auch in den seneszenten Tieren konnte eine Abnahme der Bag3 Expression in den sAPP α ^{+/+}-DM Mäusen beobachtet werden (Abbildung 3.10.1 und Abbildung 3.10.2). Das Ergebnis zeigt, dass zwar die Expression von Bag3 reduziert ist, die Autophagie davon nicht beeinflusst wird. Vermutlich beeinflusst das Fehlen von APP und APLP2 die Expression von Bag3. Die Analyse der Hsp70 und Ubiquitin Level in den seneszenten Mäusen zeigte keine Veränderungen der HSP70 Expressionslevel und eine Abnahme von Ubiquitin in den APLP2^{-/-} und sAPP α ^{+/+} Mäusen (Abbildung 3.10.2). Das zeigte, dass die Genveränderungen keinen Einfluss auf die PQC hatten, aber durch das Fehlen von APLP2 bzw. durch den sAPP α KI weniger Protein durch Ubiquitin markiert wurde. Möglicherweise waren im Hippocampus dieser Mäuse weniger fehlgefaltete und beschädigte Proteine vorhanden oder der Prozess der poly-Ubiquitinierung ist gestört.

In den Leber-Zelllysaten der jungen Mäuse konnte weder für Bag3 noch für p62 eine Veränderung der Proteinexpression festgestellt werden. In den seneszenten Mäusen nimmt die Expression von beiden Genen in den sAPP α ^{+/+}-DM Mutanten ab (Abbildung 3.10.1 und Abbildung 3.10.2). Folglich ist die Autophagie in diesen Mäusen in der Leber reduziert, da in seneszenten Organismen aber auch die proteasomale Aktivität reduziert ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Leber in diesen Tieren stark geschädigt ist. Für die Verifizierung dieser Vermutung wäre es wichtig auch die Proteinspiegel von Hsp70 und Ubiquitin in dieser Mauslinie zu untersuchen.

Insgesamt war in allen drei untersuchten Geweben die Expression von Bag3 und/oder p62 in den alten Mäusen der sAPP α ^{+/+}-DM reduziert. Hier wäre es wichtig andere PQC-Gene auf ihre Expressionslevel zu untersuchen. Sollte sich eine reduzierte Autophagie bestätigen, würde das die Analysen dieser Mäuse aus der Literatur verifizieren. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die sAPP α ^{+/+}-DM Mäuse muskuläre Schwächen zeigen und Defizite im hippocampal-abhängigen lernen und der Erinnerung haben (Weyer et al., 2011).

Die Analysen der Mäuse wurden in diesem Fall mit nur drei Tieren je Linien und Alter untersucht. Da bei Mäusen sekundäre Einflüsse und Erkrankungen die Expressionsmuster verändern können, sollten diese Versuche mit mehr Mäusen je Linie verifiziert werden.

4.4. Ausblick

Für das Verständnis der AD ist eine Erforschung von möglichen Präventionen und Behandlungsmöglichkeiten sehr wichtig, da die Anzahl der Betroffenen immer weiter steigt. Um die altersbedingten Veränderungen im Organismus besser zu verstehen, ist eine Untersuchung, insbesondere die der Proteinhomöostase, notwendig. Die Proteinhomöostase spielt in vielen altersabhängigen Krankheiten eine große Rolle und die Aktivierung dieser vermindert die Akkumulation und Aggregation von Proteinen bzw. sorgt für deren Abbau. Auf diesem Weg verbessert sie die Zellviabilität und Gesundheit von einzelnen Zellen und somit des gesamten Organismus. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sAPP α und sAPP β unter Stressbedingungen die Zellviabilität, durch Steigerung der proteasomalen Aktivität, verbessern. Diese Verbesserung beschränkt sich jedoch auf junge oder klonale Zellen. Weiter ungeklärt bleibt, warum sAPP α und sAPP β im Alter keinen Einfluss mehr auf das Proteasom haben. Daher ist eine genauere Untersuchung des Wirkungsmechanismus notwendig. Das genaue Wissen über den Mechanismus und der Veränderung dieses Weges im Alter, könnte zu einem neuen Therapieansatz für Alzheimer und andere neurodegenerative Erkrankungen, die auf einer erhöhten Proteinaggregation beruhen, führen.

5. Zusammenfassung

Die Alzheimer'sche Erkrankung (AD) ist die am häufigsten vorkommende Form der Demenz. Die Erkrankung ist altersassoziiert und verbunden mit Gedächtnisverlust sowie dem Abbau kognitiver Fähigkeiten. Die Spaltung des APP scheint eine große Rolle in der Pathologie der Erkrankung zu spielen. APP kann auf zwei unterschiedlichen Wegen prozessiert werden. Dem amyloidogenen Weg, bei dem neben einem löslichen extrazellulären Fragment (sAPP β) und der APP Intrazellulären Domäne (AICD) auch A β entsteht, das in AD Gehirnen akkumuliert. Auf dem nicht-amyloidogenen Weg entsteht sAPP α , p3 und die AICD. Dem löslichen Fragment sAPP α werden neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Proteinabbau in AD Gehirnen reduziert ist. Die Rolle von sAPP α auf die Autophagie und die proteasomale Degradation ist bislang unbekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sAPP α in jungen IMR90, primären neuronalen Zellen und Hek 293 Zellen, den durch proteasomalen Stress ausgelösten Anstieg der Bag3 und Hsp70 Proteinlevel senkt. Zwei weitere untersuchte Autophagie-Marker p62 und LC3 sind in ihrer Proteinkonzentration durch sAPP α nicht beeinflusst. Allerdings sind die mRNA-Level von p62 reduziert, so dass eine Regulierung der Autophagie nicht ausgeschlossen werden kann. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sAPP α die Zellviabilität nach proteasomalen Stress erhöht und weniger Aggresomen und krankheitsbekannte Proteinaggregate gebildet werden. Die Analyse der proteasomalen Aktivität zeigte, dass die Akkumulation des Proteasom-Substrates d2 unter Stressbedingung durch sAPP α reduziert werden kann und dass sAPP α die proteasomale Aktivität gestresster junger IMR90 und Hek 293 Zellen erhöhen kann. Dabei konnten reduzierte poly-Ubiquitinierungslevel beobachtet werden, aber keine veränderte Expression der proteasomalen Gene. In alten IMR90 Zellen konnte keine Beeinflussung der Autophagie und der proteasomalen Aktivität festgestellt werden. Das ist ein Anhaltspunkt dafür, dass im Alter das Proteasom zu stark geschädigt ist, um durch sAPP α aktiviert zu werden. Das bei der amyloidogenen Prozessierung von APP entstehende sAPP β zeigte eine ähnliche protektive Eigenschaft, wohingegen der N-terminale Teil der löslichen Fragmente APP E1 keine Effekte zeigte. Ein transienter Knockdown von APP und/oder APLP2 in den jungen IMR90 Zellen zeigte, dass sAPP α nur in Anwesenheit von APP oder einem Familienmitglied die Bag3-Proteinspiegel reduziert und somit APP vermutlich den Rezeptor für sein eigenes Spaltprodukt darstellt.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein protektiver Einfluss von sAPP α und sAPP β in Anwesenheit eines APP Familienmitgliedes unter proteotoxischen Bedingungen gezeigt werden, wodurch die Zellviabilität verbessert wird. Die protektive Wirkung beschränkt sich auf junge Zellen und ist sowohl in neuronalen Zellen als auch in peripheren Zellen zu beobachten.

Summary

The Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. The disease is age-associated and characterized by memory loss and cognitive decline. The cleavage of APP is thought to play a major role in the pathology of the disease. APP can be processed in two ways, first the amyloidogenic pathway, resulting in a soluble extracellular fragment (sAPP β), the APP Intracellular Domain (AICD), and A β , which accumulates in AD brains. Second, the non-amyloidogenic pathway generates sAPP α , p3 and the AICD. The soluble fragment sAPP α is described as neuroprotective. Further, various studies have shown that protein degradation is reduced in AD brains. The role of sAPP α on autophagy and proteasomal degradation is still unknown.

Here it is shown that sAPP α prevents in young IMR90, primary neuronal, and Hek 293 cells the proteotoxic stress-induced increase of Bag3 Protein. This was also observed at mRNA-levels indicating a transcriptional regulation. Two further examined autophagy markers p62 and LC3 are not affected in their protein concentration by sAPP α . However, the mRNA-levels of p62 are reduced, so that a regulation of autophagy cannot be excluded. Moreover, it could be shown that sAPP α increases cell viability after proteasomal stress and leads to less aggregates and disease-related protein aggregates. The analysis of proteasomal activity showed a reduced accumulation of the proteasome substrate d2 after proteasomal stress by sAPP α . Interestingly, sAPP α increases proteasomal activity of stressed young IMR90 and Hek 293 cells. Reduced poly-ubiquitin levels were observed, but no altered expression of proteasomal genes. In old IMR90 cells sAPP α shows no effect on autophagy and the proteasomal activity. This could be due to the age-associated occurrence of irreversible changes to the proteasome complex. The sAPP β generated by amyloidogenic processing of APP showed a similar protective property, whereas the N-terminal part of both soluble APP fragments (APP E1) showed no effects.

A transient knockdown of APP and/or APLP2 in young IMR90 cell showed that sAPP α reduces the BAG3 protein levels only in the presence of APP or a family member, and therefore probably the APP is the receptor for its own cleavage product.

Overall, a protective effect of sAPP α and sAPP β in the presence of APP family member on the stressed proteasome has been shown, so that the cell viability is improved. The protective effect is limited to young cells and can be observed in neuronal cells and in peripheral cells.

6. Literaturverzeichnis

Allinson, T.M.J., Parkin, E.T., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res.* *74*, 342–352.

Allsopp, R.C., and Harley, C.B. (1995). Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* *219*, 130–136.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Für Psychiatr. Psych.-Gerichtl. Med.* *64*, 146–148.

Anliker, B., and Müller, U. (2006). The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener. Dis.* *3*, 239–246.

Aydin, D., Filippov, M.A., Tschäpe, J.-A., Gretz, N., Prinz, M., Eils, R., Brors, B., and Müller, U.C. (2011). Comparative transcriptome profiling of amyloid precursor protein family members in the adult cortex. *BMC Genomics* *12*, 160.

Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., and Kelly, J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* *319*, 916–919.

Barger, S.W., and Harmon, A.D. (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* *388*, 878–881.

Beckett, C., Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., and Turner, A.J. (2012). Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. *Cell. Signal.* *24*, 402–409.

Behl, C. (2012). Brain aging and late-onset Alzheimer's disease: many open questions. *Int. Psychogeriatr. IPA 24 Suppl 1*, S3–9.

Behl, C., and Ziegler, C. (2013). *Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease* (Springer Berlin Heidelberg).

Bell, K.F.S., Zheng, L., Fahrenholz, F., and Cuello, A.C. (2008). ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol. Aging* *29*, 554–565.

Bettens, K., Sleegers, K., and Van Broeckhoven, C. (2013). Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* *12*, 92–104.

- Bouron, A., Mbebi, C., Loeffler, J.-P., and De Waard, M. (2004). The beta-amyloid precursor protein controls a store-operated Ca²⁺ entry in cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 2071–2078.
- Braak, H., and Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* *18*, 351–357.
- Brinkmalm, G., Brinkmalm, A., Bourgeois, P., Persson, R., Hansson, O., Portelius, E., Mercken, M., Andreasson, U., Parent, S., Lipari, F., et al. (2013). Soluble amyloid precursor protein α and β in CSF in Alzheimer's disease. *Brain Res.* *1513*, 117–126.
- Broadley, S.A., and Hartl, F.U. (2009). The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett.* *583*, 2647–2653.
- Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 2173–2181.
- Cao, X., and Südhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* *293*, 115–120.
- Catalano, S.M., Dodson, E.C., Henze, D.A., Joyce, J.G., Krafft, G.A., and Kinney, G.G. (2006). The role of amyloid-beta derived diffusible ligands (ADDLs) in Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* *6*, 597–608.
- Chang, H.-C., Tang, Y.-C., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2007). SnapShot: molecular chaperones, Part I. *Cell* *128*, 212.
- Chasseigneaux, S., and Allinquant, B. (2012). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J. Neurochem.* *120 Suppl 1*, 99–108.
- Chasseigneaux, S., Dinc, L., Rose, C., Chabret, C., Couplier, F., Topilko, P., Mauger, G., and Allinquant, B. (2011). Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PLoS One* *6*, e16301.
- Cheney, K.E., and Walford, R.L. (1974). Immune function and dysfunction in relation to aging.

Life Sci. 14, 2075–2084.

Chitra, S., Nalini, G., and Rajasekhar, G. (2012). The ubiquitin proteasome system and efficacy of proteasome inhibitors in diseases. *Int. J. Rheum. Dis.* 15, 249–260.

Choi, A.M.K., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013). Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 1845–1846.

Clark, L.N., Poorkaj, P., Wszolek, Z., Geschwind, D.H., Nasreddine, Z.S., Miller, B., Li, D., Payami, H., Awert, F., Markopoulou, K., et al. (1998). Pathogenic implications of mutations in the tau gene in pallido-ponto-nigral degeneration and related neurodegenerative disorders linked to chromosome 17. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13103–13107.

Clement, A.B., Hanstein, R., Schröder, A., Nagel, H., Endres, K., Fahrenholz, F., and Behl, C. (2008). Effects of neuron-specific ADAM10 modulation in an in vivo model of acute excitotoxic stress. *Neuroscience* 152, 459–468.

Copanaki, E., Chang, S., Vlachos, A., Tschäpe, J.-A., Müller, U.C., Kögel, D., and Deller, T. (2010). sAPPalpha antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 386–393.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Jr, Rimmler, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., and Schmechel, K.E. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7, 180–184.

Corrigan, F., Pham, C.L.L., Vink, R., Blumbergs, P.C., Masters, C.L., van den Heuvel, C., and Cappai, R. (2011). The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res.* 1378, 137–143.

Corrigan, F., Thornton, E., Roisman, L.C., Leonard, A.V., Vink, R., Blumbergs, P.C., van den Heuvel, C., and Cappai, R. (2014). The neuroprotective activity of the amyloid precursor protein against traumatic brain injury is mediated via the heparin binding site in residues 96-

110. *J. Neurochem.* *128*, 196–204.

Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* *65*, 801–847.

Crews, L., and Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* *19*, R12–20.

Cristofalo, V.J., Lorenzini, A., Allen, R.G., Torres, C., and Tresini, M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* *125*, 827–848.

Cuanalo-Contreras, K., Mukherjee, A., and Soto, C. (2013). Role of Protein Misfolding and Proteostasis Deficiency in Protein Misfolding Diseases and Aging. *Int. J. Cell Biol.* *2013*, 638083.

Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J. Biol. Chem.* *275*, 31505–31513.

Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B.J., Boyce, S., Trumbauer, M.E., Chen, H.Y., et al. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* *90*, 1–13.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9363–9367.

Doody, R.S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X., Thomas, R.G., et al. (2013). A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* *369*, 341–350.

Duce, J.A., Tsatsanis, A., Cater, M.A., James, S.A., Robb, E., Wikke, K., Leong, S.L., Perez, K., Johansen, T., Greenough, M.A., et al. (2010). Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell* *142*, 857–867.

Dyrks, T., Weidemann, A., Multhaup, G., Salbaum, J.M., Lemaire, H.G., Kang, J., Müller-Hill, B., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1988). Identification, transmembrane orientation and

biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J.* 7, 949–957.

Ellis, R.J. (2007). Protein misassembly: macromolecular crowding and molecular chaperones. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594, 1–13.

Endres, K., and Fahrenholz, F. (2012). Regulation of α -secretase ADAM10 expression and activity. *Exp. Brain Res.* 217, 343–352.

Evans, N.A., Facci, L., Owen, D.E., Soden, P.E., Burbidge, S.A., Prinjha, R.K., Richardson, J.C., and Skaper, S.D. (2008). Abeta(1-42) reduces synapse number and inhibits neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neurons: a quantitative analysis. *J. Neurosci. Methods* 175, 96–103.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366, 2112–2117.

Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T., and Rubinsztein, D.C. (2011). Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* 7, 9–17.

Freude, K.K., Penjwini, M., Davis, J.L., LaFerla, F.M., and Blurton-Jones, M. (2011). Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 286, 24264–24274.

Fukuchi, K., Hart, M., and Li, L. (1998). Alzheimer's disease and heparan sulfate proteoglycan. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 3, d327–337.

Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., and Mattson, M.P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J. Neurochem.* 67, 1882–1896.

Gakhar-Koppole, N., Hundeshagen, P., Mandl, C., Weyer, S.W., Allinquant, B., Müller, U., and Ciccolini, F. (2008). Activity requires soluble amyloid precursor protein alpha to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *Eur. J. Neurosci.* 28, 871–882.

Gamerdinger, M., Hajieva, P., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Hartl, F.U., and Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J.* *28*, 889–901.

Gamerdinger, M., Carra, S., and Behl, C. (2011a). Emerging roles of molecular chaperones and co-chaperones in selective autophagy: focus on BAG proteins. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *89*, 1175–1182.

Gamerdinger, M., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Clement, A.M., and Behl, C. (2011b). BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep.* *12*, 149–156.

Gerlier, D., and Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* *94*, 57–63.

Ghosal, K., Vogt, D.L., Liang, M., Shen, Y., Lamb, B.T., and Pimplikar, S.W. (2009). Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 18367–18372.

Goodman, Y., and Mattson, M.P. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.* *128*, 1–12.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* *36*, 59–74.

Gralle, M., Botelho, M.G., and Wouters, F.S. (2009). Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *J. Biol. Chem.* *284*, 15016–15025.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* *297*, 353–356.

Harman, D. (1965). The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels. *J. Gerontol.* *20*, 151–153.

Hayashi, H., Kimura, N., Yamaguchi, H., Hasegawa, K., Yokoseki, T., Shibata, M., Yamamoto,

N., Michikawa, M., Yoshikawa, Y., Terao, K., et al. (2004). A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 4894–4902.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585–621.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 67–93.

Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rüllicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., et al. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 7951–7963.

Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretschmar, H., Sisodia, S., and Müller, U. (2004). Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* *23*, 4106–4115.

Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* *258*, 8206–8214.

Ho, A., and Südhof, T.C. (2004). Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2548–2553.

Hornsten, A., Lieberthal, J., Fadia, S., Malins, R., Ha, L., Xu, X., Daigle, I., Markowitz, M., O'Connor, G., Plasterk, R., et al. (2007). APL-1, a *Caenorhabditis elegans* protein related to the human beta-amyloid precursor protein, is essential for viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1971–1976.

Huber, E.M., and Groll, M. (2012). Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *51*, 8708–8720.

Hynes, T.R., Randal, M., Kennedy, L.A., Eigenbrot, C., and Kossiakoff, A.A. (1990). X-ray crystal structure of the protease inhibitor domain of Alzheimer's amyloid beta-protein precursor. *Biochemistry (Mosc.)* *29*, 10018–10022.

Ikin, A.F., Sabo, S.L., Lanier, L.M., and Buxbaum, J.D. (2007). A macromolecular complex involving the amyloid precursor protein (APP) and the cytosolic adapter FE65 is a negative regulator of axon branching. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 57–63.

Iwatsubo, T. (2004). The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 379–383.

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45–53.

Jacobsen, K.T., and Iverfeldt, K. (2009). Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 2299–2318.

Jimenez, S., Torres, M., Vizuete, M., Sanchez-Varo, R., Sanchez-Mejias, E., Trujillo-Estrada, L., Carmona-Cuenca, I., Caballero, C., Ruano, D., Gutierrez, A., et al. (2011). Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J. Biol. Chem.* 286, 18414–18425.

Josephs, K.A., Whitwell, J.L., Ahmed, Z., Shiung, M.M., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Parisi, J.E., Petersen, R.C., Dickson, D.W., et al. (2008). Beta-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann. Neurol.* 63, 204–212.

Kalaria, R.N., Maestre, G.E., Arizaga, R., Friedland, R.P., Galasko, D., Hall, K., Luchsinger, J.A., Ogunniyi, A., Perry, E.K., Potocnik, F., et al. (2008). Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol.* 7, 812–826.

Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736.

Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 22, 407–417.

Kern, A., and Behl, C. (2009). The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1124–1132.

Kern, A., Roempp, B., Prager, K., Walter, J., and Behl, C. (2006). Down-regulation of endogenous amyloid precursor protein processing due to cellular aging. *J. Biol. Chem.* 281, 2405–2413.

Kikis, E.A., Gidalevitz, T., and Morimoto, R.I. (2010). Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 694, 138–159.

Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell* 34, 259–269.

Kloetzel, P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179–187.

Von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* 18, 661–669.

Kögel, D., Schomburg, R., Copanaki, E., and Prehn, J.H.M. (2005). Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: inhibition of the JNK/c-Jun pathway. *Cell Death Differ.* 12, 1–9.

Kögel, D., Deller, T., and Behl, C. (2012). Roles of amyloid precursor protein family members in neuroprotection, stress signaling and aging. *Exp. Brain Res.* 217, 471–479.

Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 937–953.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884.

Kuma, A., and Mizushima, N. (2010). Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 683–690.

Kwak, Y.-D., Brannen, C.L., Qu, T., Kim, H.M., Dong, X., Soba, P., Majumdar, A., Kaplan, A., Beyreuther, K., and Sugaya, K. (2006). Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells. *Stem Cells Dev.* *15*, 381–389.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680–685.

Lahiri, D.K., and Maloney, B. (2010). The “LEARn” (Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer’s disease, and proposes remedial steps. *Exp. Gerontol.* *45*, 291–296.

Lahiri, D.K., Maloney, B., and Zawia, N.H. (2009). The LEARn model: an epigenetic explanation for idiopathic neurobiological diseases. *Mol. Psychiatry* *14*, 992–1003.

Lee, D.H., and Goldberg, A.L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol.* *8*, 397–403.

Li, Z.W., Stark, G., Götz, J., Rüllicke, T., Gschwind, M., Huber, G., Müller, U., and Weissmann, C. (1996). Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 6158–6162.

Lobo, A., Launer, L.J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di Carlo, A., Breteler, M.M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Jagger, C., Martinez-Lage, J., et al. (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* *54*, S4–9.

Magara, F., Müller, U., Li, Z.W., Lipp, H.P., Weissmann, C., Stagljar, M., and Wolfer, D.P. (1999). Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 4656–4661.

Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1998). Tau in Alzheimer’s disease. *Trends Cell Biol.* *8*, 425–427.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through

elimination of p62. *Cell* 137, 1062–1075.

Mattson, M.P., Cheng, B., Culwell, A.R., Esch, F.S., Lieberburg, I., and Rydel, R.E. (1993). Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10, 243–254.

Mattson, M.P., Guo, Z.H., and Geiger, J.D. (1999). Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J. Neurochem.* 73, 532–537.

Maurer, K., Volk, S., and Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 1546–1549.

Mbebi, C., Sée, V., Mercken, L., Pradier, L., Müller, U., and Loeffler, J.-P. (2002). Amyloid precursor protein family-induced neuronal death is mediated by impairment of the neuroprotective calcium/calmodulin protein kinase IV-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 20979–20990.

Meiners, S., Ludwig, A., Stangl, V., and Stangl, K. (2008). Proteasome inhibitors: poisons and remedies. *Med. Res. Rev.* 28, 309–327.

Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7, 673–682.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132.

Morawe, T., Hiebel, C., Kern, A., and Behl, C. (2012). Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 46, 41–54.

Müller, T., Meyer, H.E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 85, 393–406.

Multhaup, G., Bush, A.I., Pollwein, P., and Masters, C.L. (1994). Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor

protein (APP). *FEBS Lett.* *355*, 151–154.

Murakami, K., Irie, K., Morimoto, A., Ohigashi, H., Shindo, M., Nagao, M., Shimizu, T., and Shirasawa, T. (2003). Neurotoxicity and physicochemical properties of Abeta mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* *278*, 46179–46187.

Neve, R.L., and Robakis, N.K. (1998). Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.* *21*, 15–19.

Nichols, W.W., Murphy, D.G., Cristofalo, V.J., Toji, L.H., Greene, A.E., and Dwight, S.A. (1977). Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* *196*, 60–63.

Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D.D.M., and Tessier-Lavigne, M. (2009). APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* *457*, 981–989.

Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., et al. (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* *113*, 1456–1464.

Powell, S.R. (2006). The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H1–H19.

Prince, M., Prina, M., Guerchet, M., Prince, M., Prina, M., and Guerchet, M. (2013). *World Alzheimer Report 2013* (London: Alzheimer's Disease International).

Prinzen, C., Müller, U., Endres, K., Fahrenholz, F., and Postina, R. (2005). Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1522–1524.

Rabinowicz, A.L., Starkstein, S.E., Leiguarda, R.C., and Coleman, A.E. (2000). Transient epileptic amnesia in dementia: a treatable unrecognized cause of episodic amnesic wandering. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* *14*, 231–233.

Rabinowitz, J.D., and White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science* *330*, 1344–1348.

Recuero, M., Muñoz, T., Aldudo, J., Subías, M., Bullido, M.J., and Valdivieso, F. (2010). A free

radical-generating system regulates APP metabolism/processing. *FEBS Lett.* 584, 4611–4618.

Reinhard, C., Hébert, S.S., and De Strooper, B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 24, 3996–4006.

Riederer, B.M., Leuba, G., Vernay, A., and Riederer, I.M. (2011). The role of the ubiquitin proteasome system in Alzheimer's disease. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 236, 268–276.

Riley, K.P., Snowden, D.A., Desrosiers, M.F., and Markesbery, W.R. (2005). Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurobiol. Aging* 26, 341–347.

Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M., et al. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 7817–7826.

Roch, J.M., Masliah, E., Roch-Levecq, A.C., Sundsmo, M.P., Otero, D.A., Veinbergs, I., and Saitoh, T. (1994). Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 7450–7454.

Rohan de Silva, H.A., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L.S., Wilkinson, S.L., and Patel, A.J. (1997). Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 47, 147–156.

Salbaum, J.M., and Ruddle, F.H. (1994). Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons. *J. Exp. Zool.* 269, 116–127.

Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1996). APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 777, 281–287.

Sando, S.B., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M., Sletvold, O., Saltvedt, I., White, L.R., Lydersen, S., and Aasly, J. (2008). Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 23, 1156–1162.

Scarmeas, N., Luchsinger, J.A., Schupf, N., Brickman, A.M., Cosentino, S., Tang, M.X., and Stern, Y. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* *302*, 627–637.

Schenk, D., Basi, G.S., and Pangalos, M.N. (2012). Treatment strategies targeting amyloid β -protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006387.

Schubert, D., and Behl, C. (1993). The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from beta-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain Res.* *629*, 275–282.

Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* *81*, 741–766.

Selkoe, D.J., and Wolfe, M.S. (2007). Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* *131*, 215–221.

Sergio, G. (2008). Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): anti-inflamm-aging remodelling of inflamm-aging, from robustness to frailty. *Inflamm. Res.* *57*, 558–563.

Sisodia, S.S., and St George-Hyslop, P.H. (2002). gamma-Secretase, Notch, Abeta and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 281–290.

Small, D.H., Nurcombe, V., Reed, G., Clarris, H., Moir, R., Beyreuther, K., and Masters, C.L. (1994). A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *14*, 2117–2127.

Smith-Swintosky, V.L., Pettigrew, L.C., Craddock, S.D., Culwell, A.R., Rydel, R.E., and Mattson, M.P. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J. Neurochem.* *63*, 781–784.

Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., Löwer, A., Langer, A., Merdes, G., Paro, R., et al. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* *24*, 3624–3634.

Stein, R.L., Melandri, F., and Dick, L. (1996). Kinetic characterization of the chymotryptic activity of the 20S proteasome. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 3899–3908.

Storey, E., and Cappai, R. (1999). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Aβ peptide. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25, 81–97.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (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. U. S. A.* 90, 1977–1981.

Sullivan, J.A., Shirasu, K., and Deng, X.W. (2003). The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nat. Rev. Genet.* 4, 948–958.

Takayama, S., and Reed, J.C. (2001). Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat. Cell Biol.* 3, E237–241.

Tang, Y.-C., Chang, H.-C., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2007). SnapShot: molecular chaperones, Part II. *Cell* 128, 412.

Thal, D.R., Schultz, C., Botez, G., Del Tredici, K., Mrak, R.E., Griffin, W.S.T., Wiestler, O.D., Braak, H., and Ghebremedhin, E. (2005). The impact of argyrophilic grain disease on the development of dementia and its relationship to concurrent Alzheimer's disease-related pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 31, 270–279.

Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615–29619.

Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., and Fahrenholz, F. (2009). Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 1643–1654.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.

Weyer, S.W., Klevanski, M., Delekate, A., Voikar, V., Aydin, D., Hick, M., Filippov, M., Drost,

N., Schaller, K.L., Saar, M., et al. (2011). APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J.* 30, 2266–2280.

Wirhth, O., Multhaup, G., and Bayer, T.A. (2004). A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J. Neurochem.* 91, 513–520.

Wu, J., Basha, M.R., Brock, B., Cox, D.P., Cardozo-Pelaez, F., McPherson, C.A., Harry, J., Rice, D.C., Maloney, B., Chen, D., et al. (2008). Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 3–9.

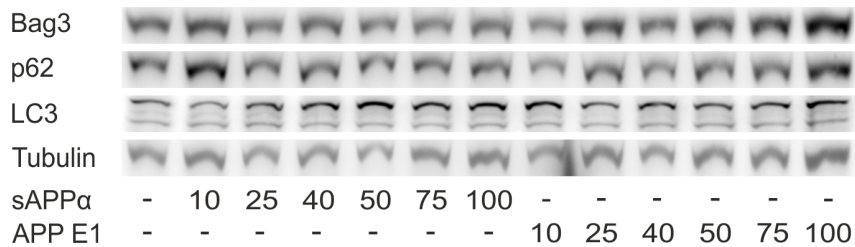
Zheng, H., and Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* 1, 5.

Zouambia, M., Fischer, D.F., Hobo, B., De Vos, R.A.I., Hol, E.M., Varndell, I.M., Sheppard, P.W., and Van Leeuwen, F.W. (2008). Proteasome subunit proteins and neuropathology in tauopathies and synucleinopathies: Consequences for proteomic analyses. *Proteomics* 8, 1221–1236.

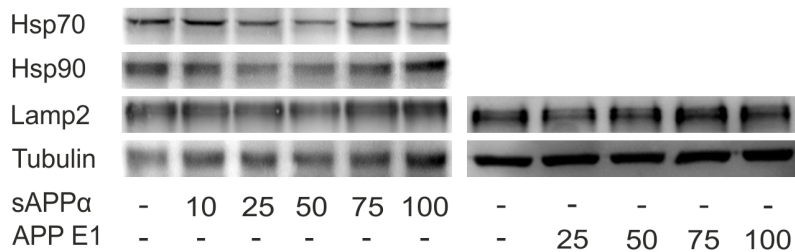
7. Anhang

7.1. Weitere Abbildungen

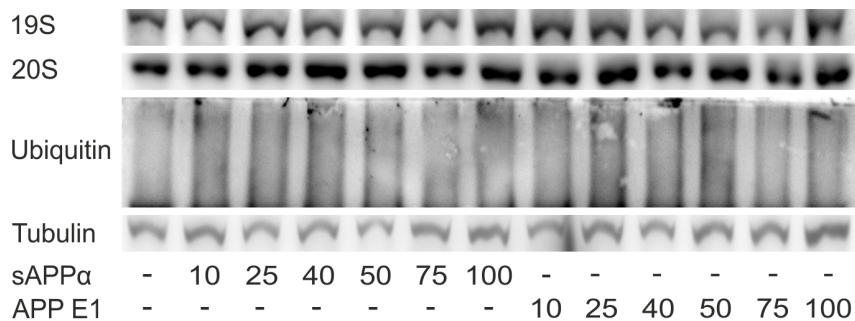
A



B



C



D

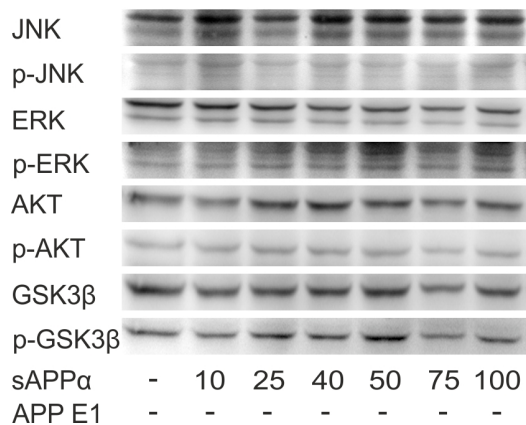
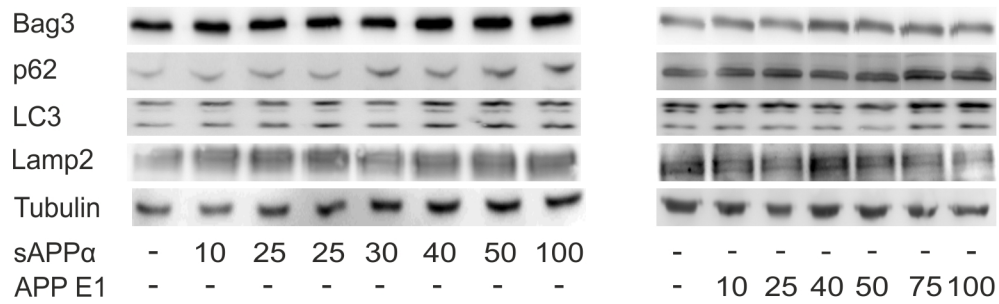


Abbildung 7.1.1. Keine veränderten Proteinspiegel nach Behandlung mit sAPPα und APP E1 in jungen IMR90. Junge IMR90 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 10 und 100 nM sAPPα und APP E1 behandelt und anschließend mittels Western Blot analysiert. (A-D) Repräsentative Blots der Versuche. n=4.

A



B

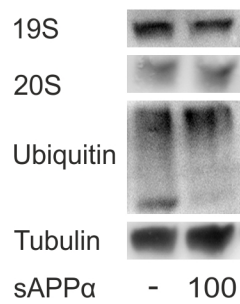


Abbildung 7.1.2. Keine veränderten Proteinspiegel nach Behandlung mit sAPPα und APP E1 in seneszenten IMR90. Alte IMR90 Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 10 und 100 nM sAPPα und APP E1 behandelt und anschließend mittels Western Blot analysiert. (A + B) Repräsentative Blots der Versuche. n=4.

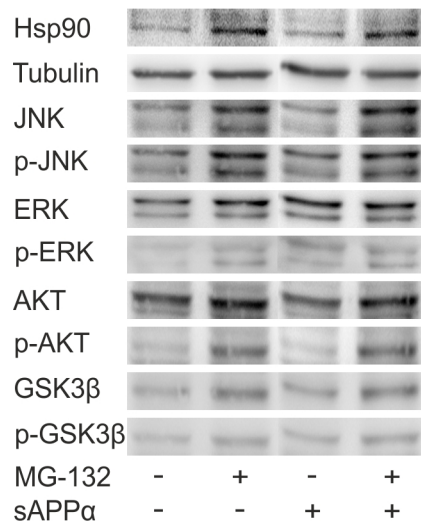


Abbildung 7.1.3. Veränderung der Proteinspiegel nach proteotoxischen Stress durch sAPPα oder APP E1 in jungen IMR90. Junge IMR90 Zellen wurden für 15 h mit 100 nM sAPPα behandelt und anschließend für 24 h mit 0,5 μM MG-132 gestresst. Die Proteinspiegel wurden mittels Western Blot analysiert. Gezeigt werden Repräsentative Blots der Versuche. n=4.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer'sche Erkrankung (<i>alzheimer disease</i>)
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
AICD	APP intrazelluläre Domäne
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APLP	Amyloid Vorläufer ähnliches Protein (<i>amyloid precursor like protein</i>)
APP	Amyloid-beta-Vorläuferprotein (<i>amyloid precursor protein</i>)
α CTF	alpha C-terminales APP-Fragment
β CTF	beta C-terminales APP-Fragment
A β	Amyloid- β -Protein
α CTF	alpha C-terminales APP-Fragment
β CTF	beta C-terminales APP-Fragment
fAD	familiäre Alzheimer'sche Erkrankung
loAD	spät beginnende Alzheimer'sche Erkrankung (<i>late-onset AD</i>)
ATG	Autophagie-relevante Gene (<i>autophagy relevated genes</i>)
BACE	β -site APP cleaving enzyme
BafA	Bafilomycin A1
Bag	<i>Bcl-2-associated athanogen</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins/Peptids
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
d2	<i>Deiodinase Type II</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
E17	Embryonaltag 17
ERK	<i>extracellular-signaling-regulated kinases</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
GFLD	<i>Growth factor like domain</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescence protein</i>)
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>

h	Stunde (<i>hour</i>)
HEK 293 Zellen	humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells)
Hsp	Hitzeschockprotein (<i>Heat-shock-protein</i>)
HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan Domäne
IMR90	<i>Human Caucasian fetal lung fibroblast</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminale Kinasen</i>
kDa	kilo-Dalton
KI	Knockin
KO	Knockout
KPI	Kunitz Protease Inhibitor
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
Lamp	<i>lysosomal-associated membrane protein</i>
LC3	<i>microtubuli associated protein light chain 3</i>
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	<i>Tiazolyl Blue Terazolim Bromide</i>
n.t.	nicht getestet
Nbr1	<i>Neighbor Of BRCA1 Gene 1</i>
nM	Nanomol
µM	Mikromol
nm	Nanometer
Nrf2	<i>nuclear factor, erythroid 2-like 2</i>
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins/Peptids
NFT	neurofibrilläre Bündel (<i>neurofibrillary tangles</i>)
p62/SQSTM1	Sequestosom-Protein 1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDL	Populationsverdopplungslevel
PI3K	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PQC	Protein-Qualitätskontrolle (<i>protein quality control</i>)
PS	Presenilin

PSMB	<i>proteasome subunit, beta type</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SOD1	Superoxid Dismutase 1
Suc-LLVY-AMC	<i>N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
UPS	Ubiquitin-Proteasome System
V	Volt
wt	wildtypisch
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.3. Plasmidkarten

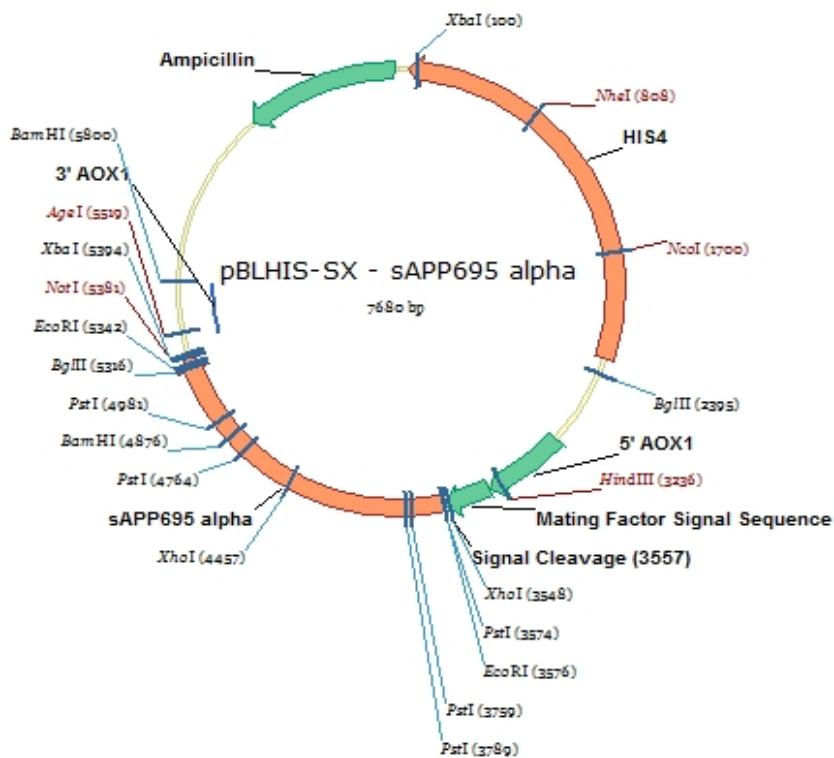


Abbildung 7.3.1. Der pBLHIS-SX-sAPP695 alpha Vektor

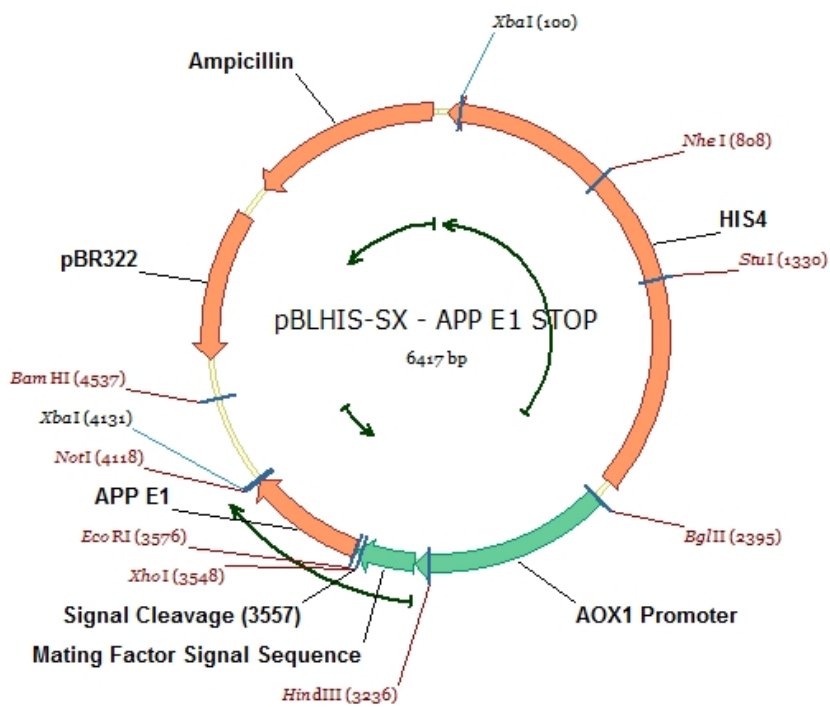


Abbildung 7.3.2. Der pBLHIS-SX-APP E1 Vektor

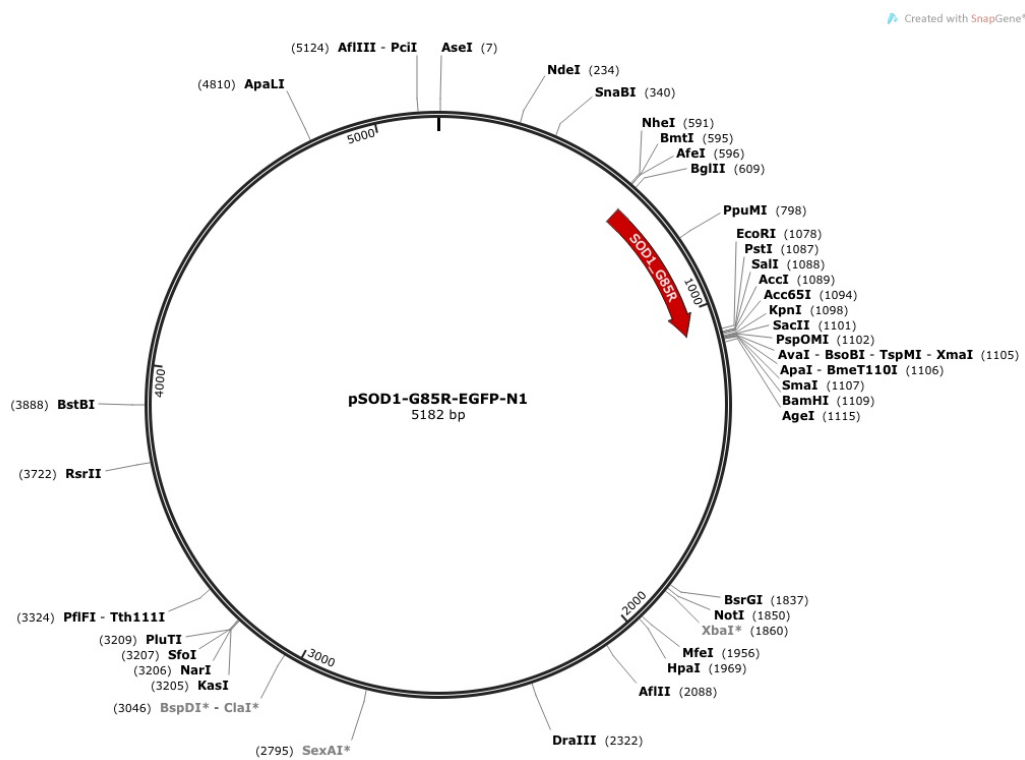


Abbildung 7.3.3. Der pSOD1-G85R-eGFP-N1 Vektor

7.4. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1. (A) Auguste D., die erste Patientin von A. Alzheimer (B) Neurofibrilläre Bündel von A. Alzheimer gezeichnet	3
Abbildung 1.1.2. (A) Abbildung eines amyloid Plaques (B) Elektronen Mikroskop Aufnahme von neurofibrillären Bündeln	3
Abbildung 1.1.3. (A) Darstellung der Domänen-Struktur von APP ₇₇₀ , APLP1 und APLP2.....	5
Abbildung 1.1.4. Proteolytische Prozessierung von APP.....	7
Abbildung 1.3.1. Abbildung des Hsp70-System und seine Co-Chaperone.....	13
Abbildung 1.3.2. Aufbau des 26S Proteasoms	14
Abbildung 1.3.3. Die verschiedenen Wege der Autophagie	16
Abbildung 1.3.4. Der Prozess der Makroautophagie	17
Abbildung 3.1.1. Coomassie-Gel und Western Blot Analyse der rekombinanten Proteine sAPP α und APP E1.	39
Abbildung 3.2.1. Das Alterungsmodell IMR90.	40
Abbildung 3.3.1. MTT-Assay von jungen und seneszenten IMR90 Zellen nach Behandlung mit sAPP α und APP E1.	42
Abbildung 3.3.2 Alterungskurve von IMR90 unter ständiger Behandlung mit sAPP α und APP E1.	42
Abbildung 3.4.1. Ermittlung einer subtoxischen Stress Dosis. (A) Junge und (B) seneszente IMR90 Zellen wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen von MG-132 behandelt und anschließend über einen MTT-Test analysiert.	45
Abbildung 3.4.2. Zellviabilitäts-Analyse mittels MTT-Assay in IMR90 Zellen unter proteasomalen Stress nach Behandlung mit sAPP α und APP E1..	46
Abbildung 3.5.1 Western Blot Analyse von Autophagie-relevanten Genen in jungen IMR90 Zellen. ...	47
Abbildung 3.5.2. Western Blot Analyse der LC3 Proteinexpression in jungen IMR90 Zellen.....	48
Abbildung 3.5.3 Western Blot Analyse von Autophagie-relevanten Genen in seneszenten IMR90 Zellen.....	50

Abbildung 3.5.4. Analyse der mRNA-Spiegel von Autophagie-relevanten Genen in jungen und alten IMR90 Zellen.	51
Abbildung 3.5.5 Western Blot Analyse nach Behandlung mit sAPP α unter proteasomalen Stress durch Epoxomicin.....	52
Abbildung 3.5.6 Aggresomen-Assay mit Hek 293 Zellen.....	53
Abbildung 3.5.7. Western Blot Analyse von Autophagie-relevanten Genen in Hek 293 Zellen.....	54
Abbildung 3.5.8. Western Blot Analyse der LC3 Proteinexpression in Hek 293 Zellen.	55
Abbildung 3.5.9. Die drei Lokalisationen von SOD1 ^{G85R} : Zytoplasmatische (A), prä-aggresomale (B) und aggresomale (C) Lokalisation.	56
Abbildung 3.5.10. Immunocytochemie nach Transfektion mit SOD1-GFP Konstrukten in Hek 293 Zellen.....	57
Abbildung 3.6.1. Western Blot Analyse der d2-GFP-Hek Zellen unter proteasomalen Stress.	58
Abbildung 3.6.2. Proteasom-Aktivitätsassay in jungen und alten IMR90 Zellen.....	59
Abbildung 3.6.3. Proteasom-Aktivitätsassay in jungen und seneszenten IMR90 und Hek 293 Zellen.	60
Abbildung 3.6.4. Western Blot Analyse von Faktoren des proteasomalen Abbauweges.	61
Abbildung 3.6.5. Unveränderte mRNA-Level der 20S Proteasom Untereinheiten.	62
Abbildung 3.7.1. Immunfärbung der primären Zellen.	63
Abbildung 3.7.2. Western Blot Analyse von primäre Neuronen unter proteasomalen Stress.	64
Abbildung 3.8.1. Western Blot Analyse von jungen IMR90 Zellen unter proteotoxischen Stress.	65
Abbildung 3.8.2. Aggresomen-Assay in Hek 293 Zellen mit sAPP β	66
Abbildung 3.9.1. Western Blot Analyse von IMR90 Zellen nach Knockdown von APP bzw. APLP2.....	67
Abbildung 3.10.1. Western Blot Analyse von Bag3 und p62 in verschiedenen Geweben von jungen Mäusen.	69
Abbildung 3.10.2. Proteinexpressions-Analysen von wichtigen PQC-Genen in verschiedenen Geweben von seneszenten Mäusen.....	70

Abbildung 7.1.1. Keine veränderten Proteinspiegel nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 in jungen IMR90.....	105
Abbildung 7.1.2. Keine veränderten Proteinspiegel nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 in seneszenten IMR90.....	106
Abbildung 7.1.3. Veränderung der Proteinspiegel nach proteotoxischen Stress durch sAPP α oder APP E1 in jungen IMR90.	106
Abbildung 7.3.1. Der pBLHIS-SX-sAPP695 alpha Vektor.....	109
Abbildung 7.3.2. Der pBLHIS-SX-APP E1 Vektor	110
Abbildung 7.3.3. Der pSOD1-G85R-eGFP-N1 Vektor.....	110

7.5. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.1. Funktionen von sAPP α	10
Tabelle 3.3.1. Western Blot Analyse von jungen und seneszenten IMR90 Zellen nach Behandlung mit sAPP α und APP E1.	43
Tabelle 3.3.2. Analyse der mRNA-Spiegel durch qRT-PCR nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 in jungen und seneszenten IMR90.....	44
Tabelle 3.5.1 Western Blot Analyse Autophagie-relevanter Gene und Signaltransduktions-Marker nach proteotoxischem Stress durch sAPP α oder APP E1 in jungen IMR90.....	49
Tabelle 3.6.1. Keine Veränderung in den mRNA-Leveln nach Behandlung mit sAPP α und APP E1 in jungen und seneszenten IMR90 Zellen.	63

7.6. Lebenslauf

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

7.7. Publikationen

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

7.8. Erklärung

8. Danksagung